

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

GABRIELLE LÜCK DE ARAUJO

PRODUÇÃO DE BIOFILME, DETECÇÃO DOS
GENES *icaAD*, *atlE* E *aap* E RESISTÊNCIA
AOS ANTIMICROBIANOS EM CEPAS DE
Staphylococcus epidermidis RESISTENTES À
METICILINA (MRSE).

Niterói

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GABRIELLE LÜCK DE ARAUJO

**PRODUÇÃO DE BIOFILME, DETECÇÃO DOS GENES
icaAD, *atlE* E *aap* E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM CEPAS DE *Staphylococcus
epidermidis* RESISTENTES À METICILINA (MRSE).**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Médicas
da Universidade Federal Fluminense,
como requisito parcial para obtenção
do Grau de Mestre.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a **LENISE ARNEIRO TEIXEIRA**
Prof.^a Dr.^a **AGNES MARIE SÁ FIGUEIREDO**

Niterói

2006

Ar15 Araujo, Gabrielle Lück de

Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap* e resistência aos antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE). Niterói: [s.n], 2006.

126 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)
Universidade Federal Fluminense, 2006.

1. Biofilme. 2. Genes *icaAD*, *atlE* e *aap*. 3. Resistência a antimicrobianos. 4. *Staphylococcus epidermidis*.

CDD 579

GABRIELLE LÜCK DE ARAUJO

**PRODUÇÃO DE BIOFILME, DETECÇÃO DOS GENES
icaAD, *atlE* E *aap* E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM CEPAS DE *Staphylococcus
epidermidis* RESISTENTES À METICILINA (MRSE).**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Médicas
da Universidade Federal Fluminense,
como requisito parcial para obtenção
do Grau de Mestre.

Aprovada em ___/_____/____

BANCA EXAMINADORA

*Prof.^a Dr.^a Ledy do Horto Santos Oliveira – Instituto Biomédico -
Presidente*

Prof. Dr. Geraldo Renato de Paula – Faculdade de Farmácia - UFF

Prof.^a Dr.^a Verônica Viana Vieira – INCQS - Fiocruz

Niterói
2006

A Deus, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos pais Esther e Gerziel, pelo amor, apoio e incentivo em todas as fases e momentos da minha vida.

Ao meu querido irmão André, pelo amor, incentivo, alegria e companheirismo.

À minha querida vovó Mimi, pelo incentivo, amor e carinho.

Aos meus avós que estão junto a Deus, Elce, Dito e Luludi, por acreditarem e sempre torcerem por mim.

Ao meu amorzinho Jonathan, pelo amor, carinho e incentivo.

À tia Eliana, minha segunda mãe e Milena, minha irmãzinha, por todos os anos de carinho, amor e incentivo.

Ao Fernando, pelo apoio, incentivo e paciência nesses anos.

A minha homenagem.

À professora *Lenise Arneiro Teixeira*, pela amizade, incentivo, orientação e ensinamentos durante todos esses anos.

À professora *Agnes Marie Sá Figueiredo*, pela amizade, incentivo e orientação por todos esses anos.

À coordenação de Pós-graduação em Ciências Médicas da UFF.

Às professoras Bernadete Teixeira Ferreira-Carvalho e Regina Maria Cavalcante Pilotto Domingues do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da UFRJ do pelo incentivo e auxílio em algumas fases experimentais deste trabalho.

As bibliotecárias Anne Marie Paes de Carvalho e Cecília Maria Pereira do Nascimento do NDC da Biblioteca Central da UFF, pela colaboração.

Ao farmacêutico Silvio José de Mello Junior do Setor de Microbiologia do Hospital Universitário Antônio Pedro – UFF, pela colaboração neste trabalho.

Ao colega de Mestrado e professor Luiz Sérgio Keim, pela amizade, colaboração e incentivo nesses dois anos de convívio.

Aos amigos da UFRJ Amada, Adriana, Leo, Cícera e Ivi pela amizade, incentivo e colaboração durante esses anos de convívio.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias pela alegria e apoio nesses anos de convivência.

Aos amigos da UFF, Patrícia, Janaína, Renata, Rejanne, Ana Paula, Marcell, Camila e Rafael, pela amizade, apoio e companheirismo.

Ao senhor Wilmar Jorge da Silva pelo auxílio técnico na fase experimental deste trabalho.

Aos amigos do Instituto Vital Brazil, Teresa, Antônia, Luis Eduardo, Iara, Walter, Luciene, Lordeste, Maria Antônia, Eliene, Dalva, Paula, Joseane, Marquinhos, Tião, Marcinho, Adejair, Wallace, Raimundo e todos que contribuíram com o incentivo, apoio e carinho durante esses anos de convivência.

Aos amigos da Proac Mara, Alessandra e Flávio, pela amizade e ajuda durante esses anos.

A toda minha família e todos os amigos que de alguma forma colaboraram para o sucesso deste trabalho.

O meu agradecimento.

*Entrega o teu caminho ao SENHOR,
confia nele, e o mais ele fará.*

Salmos 37:5

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTO	
EPÍGRAFE	
SUMÁRIO	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
<i>ABSTRACT</i>	
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Estafilococos	16
1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
1.3 Biofilme	22
1.3.1 Primeira fase: aderência bacteriana à superfície do polímero	23
1.3.2 Segunda fase: formação do biofilme	24
1.4 Resistência antimicrobiana	25
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Coleta e identificação das amostras	29
3.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	30
3.2.1 Teste de triagem para a detecção de resistência à meticilina	30
3.2.2 Teste de difusão de drogas em meio sólido	30
3.3 Teste de aderência e formação de biofilme	31
3.4 Métodos moleculares para a detecção dos genes <i>mecA</i>, <i>icaAD</i>, <i>atlE</i> e <i>aap</i>	32
3.4.1 Extração do DNA bacteriano	32
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
3.4.3 <i>Dot blot hybridization</i>	33
3.5 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	36

4.1 Identificação das cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes à meticilina	36
4.2 Produção de biofilme	37
4.2.1 Hospital Universitário Antônio Pedro	37
4.2.2 Comunidade	37
4.2.3 <i>Home care</i>	38
4.2.4 Análise estatística da produção de biofilme	38
4.3 Análise da distribuição dos genes <i>icaAD</i>, <i>atlE</i>, <i>aap</i> e produção de biofilme nas cepas de MRSE estudadas	39
4.4 Susceptibilidade aos antimicrobianos dos <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes à meticilina (MRSE)	40
4.4.1 Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP)	40
4.4.2 Comunidade	41
4.4.3 <i>Home care</i>	41
4.4.4 Análise agrupada do perfil de susceptibilidade das cepas associadas ao sistema de saúde e associadas à comunidade	42
4.4.5 Relação entre a multirresistência a antimicrobianos e a produção de biofilme	43
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	52
7 BIBLIOGRAFIA	53
8 APÊNDICES	65
9 ANEXO	84
9.1 Questionário	85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Descrição dos primers utilizados.
- Tabela 2** Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atIE* e *aap*, origem clínica e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro.
- Tabela 3** Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atIE* e *aap*, e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas da nasofaringe de indivíduos sãos da comunidade.
- Tabela 4** Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atIE* e *aap*, e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas da nasofaringe de pacientes de um sistema de *home care*.
- Tabela 5** Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atIE* e *aap*, e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas da nasofaringe de profissionais de saúde de um sistema de *home care*.
- Tabela 6** Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atIE* e *aap*, e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas da nasofaringe de contactantes domiciliares de um sistema de *home care*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Produção de biofilme pelas cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) nas diferentes populações estudadas.
- Figura 2** Padrão da expressão de biofilme das cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) nas diferentes populações estudadas.
- Figura 3** Produção de biofilme sobre superfície de poliestireno por cepas representativas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE).
- Figura 4A** Amplificação dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap* em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) através da reação em cadeia da polimerase.
- Figura 4B** Detecção dos genes *icaAD*, em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), através da técnica de hibridização por *dot blot*, utilizando uma sonda específica para esses genes.
- Figura 5** Incidência dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap* em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) produtoras de biofilme.
- Figura 6** Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isolados de pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro.
- Figura 7** Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), obtidos de indivíduos sãos da comunidade.
- Figura 8** Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), obtidos de pacientes de um sistema *home care*.
- Figura 9** Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), obtidos de profissionais de saúde de um sistema *home care*.
- Figura 10** Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), obtidos de contactantes domiciliares de um sistema *home care*.

Figura 11 Percentagens de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), que apresentaram diferenças significativas entre os grupos associado ao sistema de saúde (ASS) e associado a indivíduos sãos da comunidade (AC).

Figura 12 Relação entre a produção de biofilme e multirresistência a antimicrobianos nas cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) isoladas de: (A) indivíduos sãos da comunidade, (B) contactantes domiciliares de um sistema *home care*, (C) pacientes do HUAP, (D) pacientes de um sistema *home care* e (E) profissionais de saúde de um sistema *home care*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAP	Do inglês: <i>Accumulation-associated protein</i>
<i>aap</i>	Do inglês: <i>Accumulation-associated protein gene</i>
AC	Associados a indivíduos sãos da comunidade
<i>agr</i>	Do inglês: <i>Accessory gene regulators</i>
ASS	Associados ao sistema de saúde
<i>atlE</i>	Gene que codifica a principal autolisina de <i>Staphylococcus epidermidis</i>
ATP	Adenosina tri-fosfato
Bap	Do inglês: <i>Biofilm associated protein</i>
Bhp	Do inglês: <i>Bap-homologous protein</i>
CA-MRSA	Do inglês: <i>Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
CTP	Citidina tri-fosfato
DNA	Do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade ótica
ECN	Estafilococos coagulase negativa
ECNRM	Estafilococos coagulase negativa resistentes à meticilina
EUA	Estados Unidos da América
FAME	Do inglês: <i>Fatty acid-metabolizing enzyme</i>
Gap	Gliceraldeído-3-fosfato- desidrogenase
<i>gehCD</i>	Genes que codificam para as lipases GehC e GehD
GTP	Guanosina tri-fosfato
HC	Do inglês: <i>Home care</i>
<i>hld</i>	δ -hemolisina
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
<i>ica</i>	Do inglês: <i>Intercellular adhesin gene</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
<i>mecA</i>	Gene que codifica resistência à meticilina/oxacilina
MIC	Do inglês: <i>Minimal inhibitory concentration</i>
MRSA	Do inglês: <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MRSE	Do inglês: <i>Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis</i>
NNISS	Do inglês: <i>National Nosocomial Infections Surveillance System</i>
ON	Do inglês: <i>Overnight</i>
PBP	Do inglês: <i>Penicillin-binding protein</i>
PCR	Do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	Do inglês: <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PIA	Do inglês: <i>Polysaccharide intercellular adhesin</i>
PP	Pró-peptídeo
RNA	Do inglês: <i>Ribonucleic acid</i>

SarA	Do inglês: <i>Staphylococcus aureus regulator A</i>
SCCmec	Do inglês: <i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SSP	Do inglês: <i>Staphylococcal surface protein</i>
StbA	Transferrina StbA
TBE	Tris borato EDTA
TSA	Do inglês: <i>Trypticase soy agar</i>
TSB	Do inglês: <i>Trypticase soy broth</i>
TSST-1	Do inglês: <i>Toxic shock syndrome toxin-1</i>
TTP	Timidina tri-fosfato
UB	Unidade de biofilme
UTI	Unidade de tratamento intensivo
UTIN	Unidade de tratamento intensivo neonatal
vanA	Gene que codifica para resistência à vancomicina

RESUMO

O Biofilme tem sido considerado o principal fator de virulência dos *Staphylococcus epidermidis*. A presença do operon *ica* e de outros genes, incluindo *atlE* e *aap*, tem sido sugerida como importante para a sua formação. Entretanto, existem controvérsias com relação aos genes considerados essenciais para a produção do biofilme. Nosso trabalho teve como objetivo estudar a expressão de biofilme, detectar a presença dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap* e determinar a susceptibilidade a antimicrobianos em cepas de *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), obtidas de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP; 25 cepas), indivíduos saudáveis da comunidade (35 cepas) e, ainda, de indivíduos de um sistema de *home care* (HC; 77 cepas). Para a detecção do biofilme, as culturas foram inoculadas em Trypticase Soy Broth contendo 1% de glicose. O teste utilizado foi o da produção de biofilme em placa de microtitulação de poliestireno e subsequente coloração com cristal violeta. Para a detecção dos genes *mecA* (que codifica para resistência à meticilina), *icaAD*, *atlE* e *aap* utilizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR). Das 25 cepas hospitalares, seis (24 %) foram classificadas como não aderentes, nove (36 %) como fracamente, cinco (20 %) moderadamente e outras cinco (20 %) como fortemente aderentes; demonstrando certa homogeneidade nos perfis de expressão de biofilme. Das 25 cepas comunitárias, 14 (40 %) foram não aderentes, três (8 %) fracamente aderentes, nove (26 %) moderadamente e nove (26 %) fortemente aderentes; enquanto nas 77 cepas do HC, 33 (43 %) foram não aderentes, 12 (16%) fracamente aderentes, sete (9 %) moderadamente e 25 (32 %) fortemente aderentes. Do total das cepas produtoras de biofilme, 99 % apresentaram *icaAD*, 86 % *atlE* e 82 % *aap*. Neste estudo detectamos uma diferença significativa entre a produção de biofilme em cepas de MRSE hospitalares e não hospitalares. Nossos dados demonstraram ainda uma correlação entre a característica de forte produção de biofilme e a presença concomitante dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap*. Finalmente, cepas de MRSE multirresistentes estavam mais associadas ao padrão aderente, sugerindo que o ambiente do biofilme possa favorecer as transferências de genes de resistência aos antimicrobianos.

ABSTRACT

Biofilm has been considered the major virulence factor of *Staphylococcus epidermidis*. The presence of *ica* operon and of other genes, including *atfE* and *aap*, seems to be important for its formation. However, there are controversies in relation to the genes considered essential for biofilm production. In the present work we aimed to study the expression of biofilm, the presence of *icaAD*, *atfE* and *aap* genes and antimicrobial resistance in strains of methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE) obtained from hospitalized patients at the Antônio Pedro University Hospital (HUAP; 25 strains), healthy individuals of the community (35 strains) and individuals of a *home care* system (HC; 77 strains). For biofilm detection, cultures were inoculated in Trypticase Soy Broth supplemented with 1% glucose. The biofilm was formed on polystyrene microtitre plates and subsequently stained with violet crystal. The polymerase chain reaction (PCR) was used for detecting *mecA* (encoding for methicillin resistance) *icaAD*, *atfE* and *aap* genes. Of the hospital strains, six (24 %) were classified as non-adherent, nine (36 %) as weakly, five (20 %) moderately and other five (20 %) as strongly adherent; showing certain homogeneity in the biofilm expression profile. Of the community strains, 14 (40 %) were non-adherent, three (8 %) weakly, nine (26 %) moderately and nine (26 %) strongly adherent. From the 77 HC strains, 33 (43 %) were non-adherent, 12 (16 %) weakly, seven (9 %) moderately and 25 (32 %) strongly adherent. Of the total biofilm producer strains, 99 % carried *icaAD*, 86 % *atfE* and 82 % *aap*. In this study we detected significant difference in the biofilm production between hospital and non-hospital MRSE strains. Our data also showed correlation between the characteristic of strong biofilm formation and the concomitant presence of *icaAD*, *atfE* and *aap* genes. Finally, multiresistant strains of MRSE were associated with adherent pattern mostly; suggesting the biofilm environment may facilitate exchanges of antimicrobial resistant genes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estafilococos

Os estafilococos são microrganismos pertencentes à família *Staphylococcaceae*, a qual é atualmente composta por cerca de 42 espécies e pelo menos 34 subespécies (1); sendo algumas associadas a uma ampla variedade de infecções em seres humanos e animais (2). Tais microrganismos são cocos gram-positivos, quando corados pelo método de Gram, imóveis, anaeróbios facultativos e produtores da enzima catalase. A parede celular dos estafilococos é constituída por peptidoglicana, que forma uma verdadeira “rede” de ligações entre a D-alanina de uma cadeia penta-peptídica e a D-alanina de outra. Essa trama resultante é capaz de fornecer certa proteção à bactéria contra o sistema de defesa do hospedeiro, além de dar forma ao microrganismo e protegê-lo contra o choque osmótico (2).

As principais espécies deste gênero bacteriano, encontradas no homem são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus simulans*, além de outras (2). Essas bactérias fazem parte da microbiota anfibiótica presente na pele e nas superfícies mucosas de humanos, principalmente na cavidade nasal, parte superior das

narinas e axilas e, em menores quantidades, na boca, vagina e intestino. Além disso, esses microrganismos estão associados a uma ampla variedade de infecções oportunistas, podendo causar bacteremias, endocardites, osteomielites, peritonites, infecções do trato urinário, dentre outras (2).

Os estafilococos vêm crescendo de importância, em todo o mundo, como agentes de infecções hospitalares e comunitárias (3), causando preocupações aos profissionais de saúde. Na última década eles têm sido descritos como um dos mais importantes gêneros bacterianos associados às infecções nosocomiais (2,4).

A diferenciação taxonômica do gênero *Staphylococcus* não é simples. Porém a utilização de testes bioquímicos e moleculares tem permitido se chegar a uma identificação mais precisa das diferentes espécies deste gênero. Tendo como base a produção da enzima coagulase, esses microrganismos são divididos em estafilococos coagulase-positiva, cujo principal representante são os *S. aureus*; e estafilococos coagulase-negativa (ECN), cujo principal membro é o *S. epidermidis* (2). Os pacientes hospitalizados com doenças estafilocócicas, destacando-se aqueles infectados em sítios cutâneos (feridas cirúrgicas, queimaduras infectadas e escaras) e pacientes eliminando elevado conteúdo de secreção, constituem o maior reservatório nosocomial dessas bactérias (5). Estes pacientes eliminam uma elevada quantidade de microrganismos podendo rapidamente colonizar a equipe de profissionais que lhes prestam assistência (5). Além disso, o uso freqüente de medicamentos, principalmente antibióticos, leva à pressão seletiva de microrganismos resistentes a diversas drogas. Essas cepas resistentes podem transferir genes intra e inter espécies, facilitando a disseminação de cepas multirresistentes no ambiente hospitalar (6).

1.2 *Staphylococcus epidermidis*

Os *S. epidermidis* são os principais componentes da flora normal da pele, da cavidade nasal e das demais mucosas sendo considerados a espécie de ECN de maior prevalência na pele humana (2). Estes microrganismos normalmente colonizam e infectam pacientes imunocomprometidos fisiologicamente tais como

recém-natos prematuros ou pacientes idosos, como também aqueles que apresentam doença de base causadora de imunossupressão, usuários de drogas ilícitas injetáveis e pacientes submetidos à terapia imunossupressora (2).

Um dos grandes problemas da medicina moderna é a utilização, cada vez maior, de procedimentos mais invasivos e agressivos, tal como o uso de dispositivos médicos implantáveis, por exemplo, cateteres e próteses. Tais procedimentos têm propiciado o aparecimento de infecções por causarem lesões teciduais, carrearem bactérias de um sítio não estéril para outro estéril e pela adesão de certas bactérias a superfícies desses dispositivos médicos (produção de biofilme). Devido à importância dessas infecções na atualidade, alguns pesquisadores sugeriram que seja reconhecida uma nova classe de doença: “infecções crônicas associadas a polímeros” (7). Os ECN e, em especial, o *Staphylococcus epidermidis*, são um dos agentes etiológicos mais importantes nessas patologias, sendo responsáveis por 50 a 70 % das infecções relacionadas a tais dispositivos (7). A patogenia dessas infecções é complexa e multifatorial, envolvendo o corpo estranho, o hospedeiro e os microrganismos (8). A colonização da pele próxima ao orifício aberto para a implantação de um dispositivo é a fonte microbiana principal. Os microrganismos podem, a partir deste local, contaminar e colonizar o dispositivo durante a sua implantação, progredindo através das paredes internas ou externas de um cateter, por exemplo. Assim, os ECN, em particular os *S. epidermidis*, que até a década de 80 eram considerados microrganismos saprofiticos da pele e das mucosas, passaram a estar envolvidos em processos patogênicos associados a implantes médicos (2).

Hoje, esses microrganismos são apontados como importantes agentes de infecções hospitalares, como as infecções na corrente sanguínea, observadas com frequência em UTI neonatal, infecções do trato genito-urinário, infecções de pele, infecções cirúrgicas, pneumonia, infecção ocular, peritonite, meningite, infecções osteo-articulares, endocardite, infecções associadas a implantes de próteses cardíacas e cateteres endovenosos ou peritoneais (2,5).

Estudos realizados em um hospital de Nova York demonstraram que a taxa de bacteremias por *S. epidermidis* associadas ao uso de cateteres endovenosos

foi de 73 %. Dentre essas, 50 % foram causadas *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilina (MRSE). A maioria dessas bacteremias estava associada a recém-nascidos (56,6 %). Muitos desses pacientes eram prematuros e estavam sob ventilação mecânica (9). Em outro trabalho realizado na Itália foi relatado que 25,5 % dos MRSE estavam relacionados a infecções cirúrgicas, 11,5 % à pneumonia e 8,7 % às infecções urinárias (10).

É interessante citar que trabalhos realizados em neonatos demonstraram que cepas endêmicas de *S. epidermidis* podem permanecer circulando em UTI neonatal por muitos anos e até décadas (10). A persistência de um clone epidêmico dificulta a discriminação de qual cepa realmente estaria causando infecção e qual seria contaminante (10). Esse mesmo estudo demonstrou que uma proporção significativa de infecções por clones específicos de *S. epidermidis* estava relacionada à transmissão entre os pacientes, o que sugere que tais cepas poderiam tornar-se endêmicas com o passar dos anos (10). O sucesso de clones predominantes, no estudo citado, poderia estar relacionado a fatores ainda desconhecidos, os quais proveriam o microrganismo de vantagens para a colonização e/ou infecção. Um desses fatores poderia estar associado à resistência antimicrobiana (11). Entretanto, a maioria das infecções hospitalares por *S. epidermidis* não ocorre sob a forma de surtos e as cepas envolvidas apresentam uma extensa diversidade genômica (12).

Para que se estabeleça uma infecção, a bactéria deve apresentar alguns fatores contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e de proteção ao ambiente hostil que se estabelece num processo infeccioso. Um dos mais importantes fatores de virulência dos *S. epidermidis* parece ser a produção de biofilme. O biofilme é um material polissacarídeo, extracelular, amorfo e mucóide formado pela bactéria na superfície de polímeros, como por exemplo, na superfície de cateteres e próteses (7,8). O biofilme é formado sobre quase todos os tipos de cateteres e sobre muitos outros dispositivos médicos e próteses, produzindo uma camada protetora que facilitaria o desenvolvimento e crescimento bacteriano (8).

Alguns outros fatores de virulência têm sido descritos em cepas de *S. epidermidis*, dentre eles a presença de uma metaloprotease extracelular com

atividade de elastase (13). Uma outra elastase, que degrada IgA e IgM humana, albumina do soro, fibrinogênio e fibronectina foi identificada como uma cisteína protease (14). A contribuição dessas proteases para a patogenicidade dos *S. epidermidis* ainda é altamente especulativa. Além dessas proteases, duas lipases codificadas pelos genes *gehC* (15) e *gehD* (16) foram caracterizadas. Tais proteínas parecem estar envolvidas no processo de colonização da pele. A caracterização e a expressão do FAME (enzimas modificadoras de ácidos graxos) também foram descritas. Essas enzimas atuam na esterificação do ácido graxo a colesterol inativando lipídeos estafilocidas (17).

Com relação às toxinas, apenas uma (δ -toxina) parece ser produzida pelo *S. epidermidis*. Essa toxina é uma hemolisina codificada pelo gene *hld*, localizado no locus *agr*, e atua através da formação de poros na membrana levando à lise de eritrócitos e de outras células de mamíferos. A δ -toxina também faz parte de um complexo pró-inflamatório polipeptídico, chamado modulina fenol solúvel, o qual exerce um papel na modulação de citocinas e na expressão do fator nuclear κ B. A produção de enterotoxina C ou da toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) por cepas de *S. epidermidis* é controversa (18).

A produção de lantibióticos (*lanthionine-containing antibiotics*) é um outro fator de virulência dos *S. epidermidis* que poderia auxiliar na sua efetiva colonização na pele. Esses antibióticos peptídicos caracterizados pela presença de raros aminoácidos lantioninas atuam inibindo o crescimento de bactérias Gram positivas, funcionando como bacteriocinas, excluindo assim microrganismos que lhe são sensíveis. Os genes envolvidos na produção de lantibióticos estão organizados em cluster localizados em plasmídios (19,20).

A capacidade de captar ferro é uma característica importante para um patógeno bacteriano, durante um processo infeccioso, uma vez que no hospedeiro o ferro encontra-se ligado a transferrinas e lactoferrinas. Anteriormente, acreditava-se que a proteína gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Gap), encontrada na parede celular bacteriana, e uma lipoproteína associada à membrana citoplasmática funcionariam como receptores para transferrina humana. Estudos recentes realizados com *S. aureus*, utilizando uma construção

nocaute para o gene *gap*, demonstraram que a Gap não estava envolvida nesta atividade, uma vez que a cepa nocaute reteve a mesma capacidade de se ligar à transferrina quando comparada à cepa selvagem. A partir dessas pesquisas, identificou-se uma nova proteína de ligação à transferrina, a qual encontra-se ancorada à parede celular, chamada StbA (21). Tanto a proteína Gap quanto a lipoproteína associada à membrana citoplasmática foram descritas em *S. epidermidis* (22,23). No entanto, o papel dessas proteínas nessa bactéria continua incerto.

A expressão de fatores de virulência encontra-se finamente regulada por vários sistemas de regulação gênica. Dentre esses sistemas podemos citar o sistema Agr, observado inicialmente em *S. aureus*, o qual funciona como um sensor de densidade populacional (*quorum sensing*; 24). O locus *agr* em *S. aureus* é composto por genes acessórios *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD* e de um região de transcrição para o RNA III, molécula reguladora do locus, a qual também codifica para a δ -toxina (*hld*; 25). Esse operon é muito similar em *S. epidermidis*, apresentando tamanho de 3-5 Kb e 68 % de similaridade. O sistema Agr em *S. epidermidis* poderia estar envolvido na formação de biofilme através da regulação da expressão da autolisina *atlE*, a qual parece estar relacionada à adesão primária à superfície de polímeros (26).

Outro fator modulador da virulência estafilocócica é a proteína reguladora transcricional SarA. Esta proteína está intimamente relacionada ao desenvolvimento do biofilme em *S. aureus*. Experimentos realizados com mutantes do gene *sarA* em *S. aureus* demonstraram diminuição na transcrição do operon *ica*, que codifica enzimas para síntese do polissacarídeo conhecido como PIA (do inglês: *polysaccharide intercellular adhesin*), o qual é importante na produção de biofilme (27). Da mesma forma, estudos com uma cepa mutante de *S. epidermidis* apresentando inativação por inserção no gene *sarA* observaram diminuição da transcrição do operon *icaADBC* (28). Conseqüentemente, a mutação do *sarA* provocou significativo decréscimo da produção de PIA, demonstrando sua influência na produção de biofilme.

1.3 Biofilme

A produção de biofilme e a resistência antimicrobiana são ainda os principais mecanismos de patogenicidade observados nos *S. epidermidis* (29). Em 1972, Bayston & Penny observaram pela primeira vez a presença de uma substância mucóide produzida por uma cepa de *S. epidermidis* isolada de válvulas infectadas utilizadas para o tratamento de hidrocefalia (30). Mais tarde em 1982, Christensen *et al.* demonstraram que a maioria das cepas de *S. epidermidis* associada à infecção na corrente sanguínea, relacionada ao uso de cateter endovenoso, crescia em meio de cultura produzindo um filme viscoso que revestia a parede do tubo de ensaio (31). Atualmente acredita-se que o biofilme seja um fator de virulência importante, sendo encontrado em diversas espécies bacterianas e, em especial, nos *S. aureus* e nos *S. epidermidis*. Diversos genes, sistemas e fatores têm sido associados à regulação expressão do biofilme (32).

A composição do biofilme ainda é incerta; porém este parece ser formado por um polissacarídeo e proteínas. Estudos recentes parecem comprovar a importância do PIA no biofilme produzido por *S. epidermidis* (33). Entretanto, outros estudos realizados com *S. aureus* sugerem que cepas não produtoras de PIA possam se aderir a polímeros (34). A composição do PIA foi descrita por Mack e colaboradores em 1996 (35) que observaram tratar-se de uma homoglicana linear de pelo menos 130 resíduos de β -1,6 N-acetilglicosamina, das quais 15 a 20% são diacetiladas, e outras com um conteúdo mais baixo de resíduos de D-glucosaminil não acetilado, contendo fosfato e éster ligados a succinato. A estrutura deste polissacarídeo é única e, de acordo com a sua função de agregação intercelular, foi denominado adesina polissarídica intercelular (do inglês: *polysaccharide intercellular adhesin*; PIA).

A biossíntese do PIA é codificada pelo operon *ica* (do inglês: *intercellular adhesin*; 7), composto pelos genes *icaR* (regulador) e *icaADBC* (envolvidos na biossíntese). Estudos comparando a produção de PIA na presença ou ausência do *ica* em *S. carnosus* (uma cepa naturalmente *ica*-negativa e não produtora de biofilme) demonstraram que a cepa mutante expressando o *ica* (clonado em um

plasmídeo) apresentou maciça agregação celular e conseqüente formação de biofilme. Outros estudos demonstraram que o gene *icaA*, que codifica para proteína IcaA, possui baixa atividade de transferase, mas quando este é co-expresso com o *icaD*, a sua atividade foi aumentada 20 vezes. O gene *icaD* parece possuir uma atividade de chaperona, fazendo a dobra (*folding*) correta da proteína IcaA e sua inserção na membrana bacteriana. Quando *icaADC* são expressos em conjunto, uma cadeia polissacarídica mais longa, com cerca de 130 resíduos, é produzida e anticorpos anti-PIA são desenvolvidos (7).

O efeito dos fatores ambientais na transcrição do operon *ica* em *S. epidermidis* tem sido estudado. Foi verificado que concentrações submínimas inibitórias de tetraciclina e quinupristina-dalfopristina, bem como elevadas temperaturas e osmolaridade, aumentavam a atividade do promotor do operon *ica* (8). O biofilme é formado sobre quase todos os tipos de cateteres e sobre muitos outros dispositivos médicos e implantes. O processo de infecção por um corpo estranho realiza-se através de duas etapas importantes: aderência bacteriana à superfície do polímero e acumulação de biofilme.

1.3.1 Primeira fase: aderência bacteriana à superfície do polímero

Logo após a implantação de um dispositivo médico, o material composto de polímeros rapidamente é recoberto por proteínas plasmáticas e da matriz extracelular como fibronectina, fibrinogênio, vitronectina e trombospondina (8). Esse material depositado na superfície do polímero facilita a colonização pelos patógenos. Na primeira fase, parece ocorrer ligação direta, não específica, da bactéria ao polímero, principalmente, devido a interações eletrostáticas e hidrofóbicas, como força de van der Waal's, as quais são promovidas por proteínas bacterianas de superfície e pelo PIA (36). Várias proteínas parecem estar envolvidas nessa etapa inicial de formação do biofilme, dentre elas a proteína AtlE, codificada pelo gene cromossômico *atlE*, que exibe uma alta similaridade com a principal autolisina dos *S. aureus* (37). A proteína AtlE de 1335 aminoácidos é composta por um peptídeo N-terminal simples, um pró-peptídeo

(PP), um domínio amidase de 60 KDa, três ligações catiônicas fortes e um domínio glicosaminidase de 52 KDa. Estudos complementares demonstraram que apenas a produção da amidase foi suficiente para restaurar o fenótipo positivo do biofilme e a separação completa da célula, sugerindo que a amidase parece ser uma proteína que também está envolvida na produção de biofilme em *S. epidermidis* (32). Ainda não foi completamente esclarecido como a proteína AtlE efetivamente possui esta capacidade de ligação específica a superfícies. Porém, estudos com mutantes do gene *atlE* verificaram que estes apresentaram reduzida aderência primária ao poliestireno, baixa atividade de ligação à vitronectina *in vitro* e reduzida hidrofobicidade. Provavelmente, por esse motivo, tais cepas não formaram biofilme no poliestireno, demonstrando redução na virulência (38).

Veenstresta *et al.* (1996) identificaram a proteína de superfície SSP1 de 280 KDa e seu produto de degradação SSP2, adesinas fimbriais presentes na superfície da bactéria, como estando envolvidas na etapa inicial de formação de biofilme (39). Uma outra proteína de superfície que também parece estar associada à produção de biofilme é a chamada Bap (do inglês: *biofilm-associated protein*), observada em cepas de *S. aureus* envolvidas em infecções de glândulas mamárias bovinas. O gene *bap* está contido em uma ilha de patogenicidade (SaPIbov2) e codifica para uma proteína de 2276 aminoácidos que atua na primeira fase de aderência à superfície (40). A proteína Bhp (homóloga à proteína Bap), de 258 KDa, parece exercer uma função semelhante em cepas humanas de *S. epidermidis*, ou seja, ligação célula/célula, aderência a superfícies lisas e produção de biofilme (41).

1.3.2 Segunda fase: formação do biofilme

Na segunda fase, a bactéria ligada (direta ou indiretamente) à superfície do polímero produz e acumula um material polissacarídico, extracelular, amorfo e mucóide, o biofilme (7).

Além do PIA parece que proteínas também estão envolvidas nesta fase de acumulação. Um importante exemplo é a proteína de 140 KDa associada à

acumulação (Aap; do inglês: *accumulation-associated protein*). Estudos com cepas de *S. epidermidis* mutantes, que não expressam o gene *aap*, demonstraram que sua ausência reduz drasticamente esta fase (42). Adicionalmente, foi verificado que o tratamento de *S. epidermidis* com anticorpos monoclonais anti-Aap levou à redução na espessura do biofilme formado (43).

Foi sugerido anteriormente que a proximidade entre as bactérias dentro do biofilme maduro poderia facilitar as trocas horizontais de informações genéticas, incluindo genes de resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência (29). Estudos têm também sugerido que o acúmulo de biofilme poderia ainda afetar a resistência bacteriana aos antimicrobianos por dificultar o acesso da droga (29). Por outro lado, dados indicam que a ação do sistema imune em bactérias, no ambiente do biofilme, encontra-se da mesma forma dificultada (7).

1.4 Resistência antimicrobiana

A emergência de cepas resistentes à meticilina tem se tornado um grave problema terapêutico, principalmente, para o tratamento das estafilocóccias adquiridas em ambiente hospitalar (6,29). No início da década de 60, a meticilina, um derivado da penicilina, foi lançada no mercado como o primeiro antimicrobiano semi-sintético, quimicamente modificado, de forma a resistir à ação da penicilinase estafilocócica (44). Porém, logo após sua introdução na clínica médica, as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina, foram descritas (45). Tal fato ocorreu devido à aquisição do gene *mecA*, que codifica para a proteína PBP2a, a qual confere resistência à meticilina e a outras penicilinas semi-sintéticas como a oxacilina, e ainda a todos os outros β -lactâmicos (46).

O gene *mecA* é um segmento de DNA de 21Kb, o qual não é nativo das espécies *S. aureus* e *S. epidermidis*, que se encontra inserido em um grande bloco de DNA exógeno, conhecido como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*; 47). O SCC*mec* é um elemento genético móvel, integrado ao cromossomo dos MRSA, flanqueado por seqüências diretas e repetidas. Este segmento de DNA, variando de 21-67 Kb, carrega o gene *mecA* e os genes *mecR1*

e *mecl* que codificam o indutor MecR e a proteína repressora Mecl, respectivamente (complexo gene *mec*). Em adição, esse elemento carrega ainda o complexo gene *ccr*, o qual codifica recombinases responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. Além do gene *mecA*, o SCC*mec* pode carrear outros genes de resistência a drogas. Assim, devido às características citadas acima, o SCC*mec* pode ser definido como uma ilha de resistência a antibióticos (47). A presença do gene *mecA*, no entanto, não é monopólio exclusivo dos *S. aureus*, uma vez que outras espécies deste mesmo gênero também o adquiriram. Acredita-se que foram os ECN, em especial os *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, os principais responsáveis pela transferência desse gene para o *S. aureus* (48).

Resultados do programa SENTRY de vigilância antimicrobiana, realizado no período de 1997 a 1999, envolvendo Estados Unidos, Canadá, América Latina, Europa e região do Pacífico Asiático mostraram que a resistência à meticilina em cepas de *S. aureus* variou, entre os países participantes, de 1,8 % (Suíça) a 73,8 % (China), enquanto entre as cepas de ECN todas as taxas encontradas foram superiores a 70 % (49). Além disso, esses estudos revelaram que entre os ECN, cepas de *S. haemolyticus* têm apresentado as maiores taxas de resistência à meticilina (86,2 %) seguidas de *S. epidermidis* (73,8 %) e de *S. hominis* (57,1 %; 49,50). A resistência à meticilina geralmente vem acompanhada da resistência a outros antimicrobianos, o que tem dificultado muitas vezes a indicação de um melhor tratamento para o paciente; uma vez que as complicações infecciosas hospitalares podem ocorrer por cepas resistentes a múltiplos antibióticos. Nestes casos, a droga de escolha para o tratamento das infecções são os glicopeptídeos. No entanto, trabalhos relatando a presença de ECN resistentes a glicopeptídeos já foram verificados. Por exemplo, um estudo realizado na Itália com cepas de *S. epidermidis* provenientes de pacientes com infecção associada à implantes ortopédicos, constatou que de 31 % das cepas de ECN analisadas, 78 % eram resistentes à meticilina, 14 % à teicoplanina (MIC variando de 8 a 32 µg/mL), e 1 % resistente à vancomicina (51). Nesse mesmo trabalho também foi constatado a presença de uma cepa resistente ao sinercide (quinupristina/dalfopristina). Assim, os estafilococos coagulase-negativa resistentes à meticilina (ECNRM) podem

servir como reservatório de genes de resistência antimicrobiana, os quais poderiam ser potencialmente transferidos para outros estafilococos.

A disseminação global de tipos clonais proximamente relacionados de MRSE (*Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina) tem sido descrita. Estudos realizados na Dinamarca e Islândia, países com um controle rígido de infecção e uma severa política de controle do uso de antibióticos, verificaram uma disseminação contínua de certos clones de *S. epidermidis* isolados como patógenos nosocomiais (6). Nesse trabalho foi observado ainda, que tipos clonais proximamente relacionados foram encontrados em cepas presentes na Islândia, Dinamarca, México, Uruguai, Grécia e Cabo Verde, evidenciando pela primeira vez a disseminação geográfica clonal de MRSE (6). Porém, outros trabalhos apontam para uma maior diversidade genética das cepas de *S. epidermidis* envolvidas em infecções nosocomiais (52).

De acordo com estudos do programa SENTRY, cerca de 80 % das cepas de ECN, em hospitais brasileiros, são isoladas de infecções na corrente sanguínea (53). Estudos recentes realizados com cepas de ECN isoladas de cateter de pacientes submetidos à diálise peritoneal demonstraram uma frequência de 64 % de ECNRM e destes cerca de 75 % eram MRSE (54).

Devido ao elevado nível de multirresistência entre os *S. epidermidis*, e a sua crescente importância no cenário hospitalar, torna-se claro que mais estudos são necessários visando-se esclarecer os mecanismos de virulência envolvidos nas infecções nosocomiais, principalmente, com relação à produção de biofilme em dispositivos médicos, uma vez que uma série de controvérsias é verificada na literatura científica. Tal fato pode ser devido ao número reduzido de cepas estudadas, ao fenômeno de variação de fase observado na expressão do biofilme e às diferentes técnicas utilizadas para a detecção do filme biológico.

2 OBJETIVOS

O nosso trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilicina (MRSE), em diferentes populações, compreendendo cepas isoladas de indivíduos saudáveis da comunidade, de pacientes hospitalizados, bem como pacientes, profissionais de saúde e contactantes domiciliares de um sistema de assistência médica domiciliar (*home care*). Adicionalmente, visando-se estudar o papel do operon *ica* e dos genes *atlE* e *aap* na produção do biofilme, a distribuição desses loci nas populações estudadas foi avaliada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Finalmente, a susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas produtoras e não produtoras de biofilme foi analisada de forma a esclarecer o papel do biofilme no aumento da resistência bacteriana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação das amostras

Foram estudados 3 grupos populacionais distintos: i. voluntários saudáveis da população, ii. pacientes, contactantes e profissionais da saúde de um sistema de assistência médica domiciliar (Home Care; HC) do Rio de Janeiro, e iii. pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da Universidade Federal Fluminense.

Apenas aos voluntários da comunidade que concordaram em participar deste estudo foi solicitado que preenchessem um questionário (anexo 9.1). Baseadas nessas informações foram selecionadas cepas oriundas de indivíduos que não tiveram contato direto ou indireto com o ambiente hospitalar e que não fizeram uso de antibióticos por no mínimo três meses.

A coleta do material de voluntários e de indivíduos do HC foi realizada com *swab* seco e estéril, para cada narina. O material foi semeado em TSB (Trypticase Soy Broth, Oxoid) acrescido de NaCl a 7,5 % (p/v) e metilina na concentração de 10 µg/mL, sendo logo após incubado a 37°C/24-48 h. Para o isolamento e diferenciação dos estafilococos as cepas foram semeadas em agar manitol-salgado (BBL) e incubadas a 37°C/24 h. As colônias com morfologia sugestiva de estafilococos foram identificadas pelos métodos convencionais (Gram, catalase, coagulase), para confirmação do gênero.

As cepas de *S. epidermidis* oriundas de pacientes hospitalizados no HUAP apresentando diferentes tipos de infecção (sangue, infecção ocular, infecção sanguínea, colonização, infecção respiratória e otite) foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia do HUAP.

Todas as cepas foram identificadas por métodos automatizados como o VITEK (Lab. BioMérieux –Vitek Inc) ou o Sistema Micro Scan (Baxter Diagnostic Inc) e, em seguida, a confirmação desta identificação foi realizada por métodos bioquímicos convencionais (55). Assim, foi analisada a capacidade de crescer e acidificar o meio básico contendo peptona, extrato de carne, NaCl 0,5 % (p/v), vermelho de fenol, acrescidos de diferentes açúcares (trealose, manitol, maltose, sacarose) e urease, todos na concentração de 1 % (p/v).

Após a identificação e conseqüente confirmação da espécie *S. epidermidis*, as culturas foram estocadas em meio crioprotetor (glicerol a 20 %; v/v) e congeladas em freezer a -70°C.

3.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

3.2.1 Teste de triagem para a detecção de resistência à metilina

As cepas de estafilococos isoladas foram inoculadas em tubos com 2 ml de TSB e incubadas a 37°C por 24 h, sob intensa agitação (250 rpm). A seguir, 100µl desta cultura foram semeados em placas contendo TSA (Trypticase Soy Agar, Oxoid) acrescido de 25 µg/mL de metilina (Sigma) e as placas incubadas em estufa a 37°C, por 24-48 h (56). As colônias resistentes (que cresceram nas placas) foram submetidas à coloração de Gram, para confirmação da morfologia celular.

3.2.2 Teste de difusão de drogas em meio sólido

O antibiograma foi realizado conforme recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS; 57). As culturas bacterianas,

crescidas a 37°C em TSB, foram ajustadas a turbidimetria de 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $10^7 - 10^8$ UFC/mL) em solução salina estéril (0,85 %; p/v). A suspensão foi então semeada, de forma homogênea, com o auxílio de um "swab" estéril, em placas de Petri contendo Muller Hinton Agar. Após 3 a 5 min, discos contendo antibióticos foram aplicados nas placas semeadas, e estas foram incubadas ON/37°C. Após este período, os diâmetros dos halos de inibição foram determinados e as cepas classificadas como sensíveis, resistentes ou apresentando resistência intermediária, para cada antimicrobiano analisado.

Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: penicilina 10 U, oxacilina 1 µg, clindamicina 2 µg, eritromicina 15 µg, cloranfenicol 30 µg, tetraciclina 30 µg, ciprofloxacino 5 µg, sulfametoxazol/trimetoprima 1,25 µg/23,75 µg, rifampicina 5 µg, gentamicina 10 µg, teicoplanina 30 µg, vancomicina 30 µg, linezolid 30 µg e mupirocina 5 µg. Para o controle dos testes a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC25925 foi utilizada como padrão.

3.3 Teste de aderência e formação de biofilme

Para a detecção de biofilme foram utilizadas placas para microtitulação de fundo plano, compostas de poliestireno inerte, contendo 96 poços (Nunclon; Nunc InterMed). As cepas analisadas foram semeadas por esgotamento em meio TSA e incubadas por 24 h a 37°C. Após esse período, colônias foram repicadas para tubos contendo TSB e incubadas *overnight* com agitação. Em seguida, as culturas foram diluídas em TSB suplementado com 1 % (p/v) de glicose e em cada 4 poços foram aplicados 200 µL de uma mesma cultura. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 h a 37°C. A turvação provocada pelo crescimento bacteriano foi determinada em leitor de ELISA a 540 nm. Após esta leitura, a placa foi lavada 4 vezes com solução salina e as bactérias fixadas à placa a 65°C por 1 h. Em seguida, 200 µL de solução de cristal violeta para Gram foram adicionados a cada poço, por 1 min. A placa foi lavada 2 vezes com água destilada estéril e a água evaporada a 45°C. A densidade ótica (DO) do biofilme foi então medida a 540nm e

as cepas classificadas segundo Amaral *et al.*, 2005 (58) em: não aderente ($DO \leq 0,182$); fracamente aderente ($0,182 < DO < 0,364$); moderadamente aderente ($0,364 < DO < 0,728$) e fortemente aderente ($DO \geq 0,728$). Cada teste individual foi realizado em quadruplicata. Porém, caso biofilme não fosse detectado, o teste era repetido em até 3 experimentos independentes, com 4 repetições cada.

3.4 Métodos moleculares para a detecção dos genes *mecA*, *icaAD*, *atlE* e *aap*

3.4.1 Extração do DNA bacteriano

Para obtenção rápida do DNA total, foi utilizada a metodologia descrita por Ferreira *et al.*, 2002 (59). Na confirmação dos resultados, seis cepas de MRSE também tiveram seu DNA total extraído conforme descrito por Sambrook *et al.*, 1989 (60).

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os *primers* foram desenhados baseados nas seqüências da cepa *S. epidermidis* RP62a (ATCC35984) para os genes *icaAD*, *atlE* e *aap*, disponíveis no GenBank (61) sob os números de acesso AY382582, U71377 e AJ249487, respectivamente. Como controle interno foi utilizado o gene *mecA*, sob número de acesso YO68000 (tabela 1). Posteriormente, foi feita análise visual das regiões que flanqueiam os fragmentos de DNA a serem amplificados, visando-se escolher seqüências de nucleotídeos, variando de 18 a 22 bases, com conteúdo GC em torno de 50 %, evitando-se seqüências repetitivas ou que pudessem vir a formar estruturas secundárias. Uma vez realizada essa primeira etapa, os *primers* desenhados foram analisados com o auxílio do programa Primer Analysis, da Cybergene (62), sendo escolhidas, preferencialmente, as seqüências sem palíndromes e/ou *hairpins* ou as que contivessem palíndromes e/ou *hairpins* que pudessem ser desnaturadas na temperatura de anelamento dos *primers* desenhados.

Para cada *primer* a temperatura de anelamento foi determinada pela seguinte fórmula $T_a (^{\circ}\text{C}) = T_d - 5$, onde $T_d (^{\circ}\text{C}) = [(n^{\circ} \text{ total de A} + n^{\circ} \text{ total de T}) \times 2] + [(n^{\circ} \text{ total de G} + n^{\circ} \text{ total de C}) \times 4]$. Os primers dos genes *mecA*, *icaAD*, *atlE* e *aap* estão descritos na tabela 1.

A reação de PCR foi realizada utilizando-se 8 μL do DNA de cada cepa (aproximadamente 200ng), 5 μL de tampão 10X Buffer (Sigma), 50 μM de dNTPs (ATP, TTP, GTP e CTP), 20 pmol de cada primer *forward* e *reverse* de cada gene analisado, 23,5 μL de água bidestilada estéril e 2 U de Taq polimerase, volume final da reação 50 μL .

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (PE Applied Biosystems) programado para desnaturação inicial de 94 $^{\circ}\text{C}$ por 4 min, 25 ciclos de 94 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s e 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min. Finalmente, procedeu-se uma extensão final de 72 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese convencional em gel de agarose a 1,5% (p/v), utilizando tampão TBE 0,5X (45 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA, pH8) a 90 V por 1 h e 30 min. Após este período, o gel foi tratado com brometo de etídio a 0,5 % (p/v) e os fragmentos de DNA visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. O registro do padrão de bandas produzidas pela eletroforese foi feito através de fotografia empregando-se o filme Polaroid 667. Os experimentos de PCR foram realizados em duplicatas. Caso o resultado fosse negativo, pelo menos três outros experimentos independentes eram realizados, utilizando-se então DNA obtido pela técnica de fenol-clorofórmio, conforme descrita por Sambrook *et al.* 1989 (60).

3.4.3 Dot blot hybridization

Os DNA testes foram desnaturados (5 min/100 $^{\circ}\text{C}$) e aplicados em uma membrana de náilon (Photo gene; Gibco). O mesmo procedimento foi realizado para o DNA controle do Kit de hibridização (λ DNA). A membrana foi em seguida levada ao forno seco a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 2 h, para fixação do DNA.

A sonda para o fragmento interno dos genes *icaAD* foi obtida por PCR utilizando os primers descritos na tabela 1 e marcada por quimioluminescência, através do Kit Gene Imager AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Bioscience do Brasil Ltda), de acordo com as recomendações do fabricante. A hibridização foi realizada utilizando-se o mesmo kit. Resumidamente, um volume de 10 μ L da sonda (10 ng/ μ L) foi aquecido a 100° C por 5 min, sendo então deixado em banho de gelo por 5 min ou mais. Em seguida, foi adicionado à sonda 10 μ L do tampão de reação. Após agitação manual branda, adicionou-se ao Eppendorf 2 μ L do reagente de marcação, seguindo-se de uma outra agitação manual. Ao tubo foi acrescentado 10 μ l de reagente *Crosslinker* (previamente diluído 1:5), este foi novamente agitado e então incubado em banho-maria a 37°C por 30 min. Ao final desta etapa, a mistura foi colocada no gelo (por até 2 h).

A membrana foi introduzida no cilindro de hibridização contendo 20 mL de tampão primário (720 g de uréia, 6 g de SDS, 600 mL de fosfato de sódio monobásico 0,5 M, pH7,0; 52,2 g de NaCl, 6 mL de MgCl₂ 1 M, 12 g de reagente de bloqueio e 6 L de água bidestilada; qsp), previamente aquecido a 55°C, e deixada no cilindro por 15 min a 55°C. Em seguida foi acrescentada a solução contendo a sonda. A hibridização foi processada a 55°C por 18-24 h. A membrana foi lavada 4 vezes com SSC 5X (SSC 20X: 175,3 g de NaCl, 88,2 g de citrato de sódio, água bidestilada 1 L; qsp; pH7) à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão primário duas vezes, por 10 min a 55° C. Posteriormente, a membrana foi lavada com tampão secundário duas vezes por 15 min, à temperatura ambiente (tampão secundário 20X: 121 g de TRIS base, 112 g de NaCl, 1 L de água bidestilada; qsp; pH 10). Após retirada do excesso de tampão, a solução reveladora “CDP-Star” (40 μ L/cm² de membrana) foi aplicada e deixada agir por 2 a 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, retirou-se o excesso do revelador e colocou-se a membrana em contato com o filme de raio X (X-OMAT-XK1; Kodak) por 30 min. O filme foi revelado automaticamente (X-OMAT/M20-BR; Kodak).

3.5 Análise estatística

A análise estatística utilizada para se testar as hipóteses formuladas a partir dos resultados obtidos neste trabalho foi o teste qui-quadrado. Adotamos como nível de confiança 95% ($\alpha = 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação das cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilicina

Sessenta e seis cepas de ECN resistentes à metilicina (ECNRM) foram cedidas pelo laboratório de microbiologia do HUAP, durante os anos de 2003 e 2004. Destas, 25 (38 %) cepas foram por nós identificadas como MRSE. Tais cepas foram obtidas de diversos materiais clínicos e estavam associadas à colonização de naso/orofaringe ou a processos infecciosos (tabela 2).

Foram coletados 286 *swabs* das narinas esquerda e direita de indivíduos sãos (voluntários) da comunidade da cidade de Niterói, a partir dos quais foram isoladas 59 (21 %) cepas identificadas como ECNRM. Dentre os ECNRM encontrados, 35 cepas (60 %) foram identificadas como MRSE (tabela 3).

Adicionalmente, foram coletados 1656 *swabs* das narinas esquerda e direita de pacientes, contactantes domiciliares e profissionais de saúde de um sistema de assistência médica domiciliar (*home care*). Desses 1656 *swabs*, 270 (16 %) apresentaram crescimento bacteriano compatível com estafilococos e foram identificados como ECNRM, sendo 77 (28 %) identificados como MRSE (tabelas 4,5,6).

4.2 Produção de biofilme

4.2.1 Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP)

Os resultados sobre a expressão de biofilme pelas cepas de MRSE obtidas de pacientes infectados e colonizados do HUAP são apresentados na tabela 2. Das 25 cepas de MRSE testadas, seis (24 %) foram classificadas como não aderentes, ou seja, foram consideradas como não produtoras de biofilme (figura 1). Assim, 19 (76 %) cepas do HUAP foram produtoras de biofilme (figura 1), recebendo a seguinte classificação: fracamente aderentes 36 % (9/25), moderadamente aderentes 20 % (5/25) e fortemente aderentes 20 % (5/25; figura 2).

Das cepas isoladas, oito foram obtidas de colonização da naso/orofaringe e destas apenas uma não produziu biofilme. Das 17 cepas isoladas de quadros infecciosos, 13 foram obtidas de infecção na corrente sanguínea. Entretanto, quatro dessas foram classificadas como não aderentes e somente uma apresentou uma forte aderência em placas de poliestireno. As quatro cepas restantes foram isoladas de infecção oftálmica (duas), infecção no trato respiratório (uma) e otite (uma). Uma das cepas envolvidas em infecção oftálmica foi classificada como não aderente, porém a outra apresentou uma elevada expressão de biofilme (fortemente aderente; tabela 2).

A figura 3 ilustra os resultados obtidos no estudo da expressão do biofilme em superfícies de poliestireno por cepas representativas dos MRSE estudados.

4.2.2 Comunidade

Quanto ao perfil de expressão de biofilme, ao analisarmos as 35 cepas de MRSE obtidas de nasofaringe de indivíduos sãos da comunidade observamos um número expressivo de cepas não produtoras de biofilme (14/35; 40 %). Das 21 cepas restantes, 8% (3/35) foram classificadas como fracamente aderentes, 26 %

(9/35) moderadamente aderentes e 26 % (9/35) como fortemente aderentes (tabela 3 e figuras 1 e 2).

4.2.3 *Home care*

Três populações englobando cepas de MRSE isoladas de um sistema de *home care* foram estudadas, totalizando 77 cepas. O perfil de formação de biofilme desta população analisada em conjunto demonstrou que 33 cepas de MRSE (43 %) foram não aderentes. Das 44 (57 %) cepas produtoras de biofilme, 16 % (12/77) foram fracamente aderentes, 9 % (7/77) moderadamente e 32 % (25/77) fortemente aderentes (figura 2). Analisando-se separadamente cada grupo, das 10 cepas obtidas de paciente, cinco foram classificadas como não aderente (50 %) e outras cinco como produtoras de biofilme. Destas últimas, duas foram fracamente aderentes e três fortemente aderentes, não havendo nenhuma cepa classificada como moderadamente produtora de biofilme (tabela 4). Das 38 cepas obtidas de profissionais de saúde, 15 (39 %) não foram produtoras de biofilme e das 23 produtoras, 18 % (7/38) foram fracamente produtoras, 11 % (4/38) moderadamente e 32 % (12/38) fortemente produtoras (tabela 5). Quarenta e cinco por cento (13/29) dos MRSE obtidos de contactantes domiciliares do *home care* foram classificados como não aderente. Em adição, 34 % (10/29) foram fortemente aderentes e as seis cepas restantes foram igualmente classificadas em fracamente e moderadamente aderente (10 % cada; tabela 6).

4.2.4 Análise estatística da produção de biofilme

A produção de biofilme entre cepas de MRSE das diferentes populações estudadas: cepas isoladas do Hospital Universitário Antônio Pedro, de indivíduos saudáveis da comunidade e de paciente, profissionais de saúde e contactantes domiciliares de um sistema de *home care*, foi analisada estatisticamente através do teste qui-quadrado. Verificamos que não houve diferença significativa entre as percentagens de cepas produtoras de biofilme na população de MRSE da

comunidade (60 %) e do *home care* (57 %). Porém, quando a população de MRSE do HUAP (76 %) foi comparada com a desses outros dois grupos de cepas estudadas, verificamos uma diferença significativa ($p=0,0107$). Tal diferença foi também constatada quando o padrão de expressão de biofilme foi analisado pelo mesmo teste (figuras 1 e 2).

4.3. Análise da distribuição dos genes *icaAD*, *atlE*, *aap* e produção de biofilme nas cepas de MRSE estudadas

Na análise dos três grupos populacionais foi verificado que a grande maioria das cepas produtoras de biofilme apresentava os genes *icaAD*, *atlE* e *aap* (figura 4A). Assim, das 84 cepas produtoras de biofilme, 83 (99 %) possuíam o gene *icaAD*, 72 (86 %) o gene *atlE* e 69 (82 %) o gene *aap* (tabelas 2, 3, 4, 5, 6). Por outro lado, apenas uma cepa foi produtora de biofilme sem que tenha sido detectada a presença de nenhum desses três genes pelo método utilizado (PCR). Esta cepa (73/04D) foi isolada de um indivíduo são da comunidade e classificada como produtora moderada de biofilme (tabela 3). Como a presença do *ica* em *S. epidermidis* tem sido apontada como fundamental na produção de biofilme, o DNA total desta cepa foi obtido e hibridizado com uma sonda específica para os genes *icaAD*. O resultado dessa hibridização, mais uma vez, apontou para a ausência desses genes no cromossomo dessa cepa (figura 4B).

A presença dos genes descritos neste item, também foi detectada em quatro cepas não produtoras de biofilme. Uma dessas cepas foi isolada de um paciente do HUAP e apesar de não produzir biofilme carregava todos os três genes. Duas cepas não produtoras de biofilme carregando o gene *icaAD* foram observadas colonizando um profissional de saúde e um contactante domiciliar do sistema *home care*. A cepa do profissional de saúde carregava também o gene *atlE*. Finalmente uma outra cepa não produtora isolada de contactante domiciliar carregava somente o gene *atlE*. Para confirmarmos os resultados obtidos no PCR, os genomas das cepas CM133/03 (HUAP), HC328 (*home care*) HC329 (*home care*), que possuíam o *ica*, mas que não produziam biofilme, foram obtidos e

hibridizados com uma sonda específica para os genes *icaAD*. Verificamos, da mesma forma, a presença desses genes através desse método, confirmando assim que essas cepas não aderentes carregam o operon *ica* (figura 4B).

É interessante ressaltar que no perfil fortemente aderente foi encontrada a presença de todos os genes estudados em 100 % (39/39) das cepas (figura 5). No perfil moderadamente aderente, 62 % (13/21) das cepas produtoras de biofilme possuíam os genes *icaAD*, *atlE* e *aap*, enquanto que em 38 % (5/21) foi detectada a presença dos genes *icaAD* em combinação com *atlE* ou *aap* (figura 5). Para o perfil fracamente aderente foi observado que 58 % (14/24) possuíam os três genes, enquanto que 17 % (4/24) possuíam o gene *icaAD* em combinação com *atlE* ou *aap*. Um total de 25 % (6/24) das fracamente aderentes apresentavam apenas *icaAD* (figura 5). A análise estatística desses resultados indicou que havia diferença significativa entre a presença ou não dos três genes concomitantemente e as diferentes formas de expressão de biofilme ($p < 0,0001$), apontando para uma tendência das cepas fortemente produtoras de carrear os três genes (figura 5).

4.4 Susceptibilidade aos antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE)

4.4.1 Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP)

Na análise do perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos 25 MRSE analisados, elevado perfil de multirresistência foi verificado para a maioria das cepas estudadas (tabela 2). A resistência à gentamicina foi observada em 23 (92 %) das cepas de MRSE, seguida da resistência à sulfametoxazol + trimetoprima (15/25; 60 %), eritromicina (15/25; 60 %), ciprofloxacino (13/25; 52 %), clindamicina (10/25; 40 %), cloranfenicol (5/25; 20 %), rifampicina (4/25; 16 %), tetraciclina (2/25; 8 %) e mupirocina (1/25; 4 %). Todas as cepas apresentaram sensibilidade à teicoplanina, vancomicina e linezolida (figura 6). Cabe ressaltar que 18 das 25 cepas de MRSE isoladas do HUAP (72 %) apresentavam

resistência a três ou mais classes de antimicrobianos além dos β -lactâmicos (tabela 2).

4.4.2 Comunidade

O estudo da resistência a antimicrobianos mostrou que 31 das 35 cepas isoladas de indivíduos sãos da comunidade (89 %) eram resistentes à tetraciclina, 63 % (22/35) à gentamicina, 54 % (19/35) à eritromicina, 11 % (4/35) ao ciprofloxacino e 9 % (3/35) à sulfametoxazol + trimetoprima (figura 7). Nenhuma cepa resistente à clindamicina, cloranfenicol, rifampicina, mupirocina, teicoplanina, vancomicina e à linezolida foi detectada (tabela 3). Foi verificado que 15 das 35 cepas estudadas (43 %) apresentavam resistência a 3 ou mais classes de drogas além dos β -lactâmicos (tabela 3).

4.4.3 *Home care*

O resultado do perfil de susceptibilidade das cepas de MRSE encontradas no sistema *home care* (pacientes, profissionais de saúde e contactantes), encontra-se descrito nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente. Nenhuma das cepas apresentou resistência à teicoplanina, vancomicina e linezolida. Todas as 10 cepas de MRSE obtidas de pacientes foram resistentes à clindamicina (tabela 4, figura 8). Noventa por cento (9/10) dos MRSE foram resistentes à eritromicina, 70% (7/10) ao cloranfenicol, 60 % (6/10) à sulfametoxazol + trimetoprima, 50 % (5/10) ao ciprofloxacino, 40 % (4/10) à rifampicina, 20 % (2/10) à tetraciclina, 10 % (1/10) à gentamicina e 10 % (1/10) à mupirocina (figura 8). Cabe ressaltar que nove das 10 cepas de MRSE obtidas desses pacientes (90 %) apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos além dos β -lactâmicos.

Com relação às cepas obtidas de profissionais de saúde, 34 (89 %) das 38 cepas isoladas apresentaram resistência à eritromicina, 74 % (28/38) à clindamicina, 61 % (23/38) à gentamicina, 55 % (21/38) ao ciprofloxacino, 55 % (21/38) ao cloranfenicol, 42 % (16/38) à sulfametoxazol + trimetoprima, 42 %

(16/38) à rifampicina, 29 % (11/38) à tetraciclina e 8 % (3/38) à mupirocina (figura 9). Adicionalmente, trinta e quatro das 38 cepas analisadas (89 %) apresentaram multirresistência a três ou mais drogas além dos β -lactâmicos (tabela 5).

Das 29 cepas de MRSE obtidas de contactantes domiciliares, 62 % (18/29) foram resistentes à eritromicina, 59 % (17/29) à clindamicina, 55 % (16/29) ao ciprofloxacino, 45 % (13/29) à rifampicina, 45 % (13/29) ao cloranfenicol, 41 % (12/29) à sulfametoxazol + trimetoprima, 38 % (11/29) à gentamicina e 31 % (9/29) à tetraciclina. Nenhuma das cepas analisadas foi resistente à mupirocina (figura 10). Por outro lado, 21 das 29 cepas de MRSE estudadas apresentaram resistência a três ou mais drogas além dos β -lactâmicos (tabela 6).

4.4.4 Análise agrupada do perfil de susceptibilidade das amostras associadas ao sistema de saúde e associadas à comunidade

Agrupando-se as cepas obtidas de pacientes do HUAP com as cepas de pacientes, profissionais de saúde e contactantes do *home care*, foi formado um grupo identificado como ASS (*Associados ao Sistema de Saúde*) e outro identificado como AC (*Associados a indivíduos sãos da Comunidade*). Estes dois grupos foram então comparados entre si, através do teste estatístico.

A análise da susceptibilidade a antimicrobianos desses dois grupos (figura 11) demonstrou uma resistência aumentada nas cepas isoladas do grupo ASS para os antibióticos sulfametoxazol + trimetoprima 48 % (49/102), clindamicina 64 % (65/102), ciprofloxacino 54 % (55/102), cloranfenicol 45 % (46/102) e rifampicina 36 % (37/102). Exceção foi verificada para a tetraciclina, cuja percentagem na comunidade de indivíduos sãos foi significativamente mais elevada (89 %; 31/35) quando comparada com os valores obtidos para as cepas isoladas do grupo ASS (24 %; 24/102; $p < 0,0001$).

Com relação à resistência para mupirocina, gentamicina e eritromicina não foram observadas diferenças significativas nos 2 grupos analisados, sendo as percentagens obtidas para mupirocina de 5 % (5/102) e nenhuma resistência,

gentamicina de 57 % (58/102) e 63 % (22/35), e eritromicina de 75 % (76/102) e 54 % (19/35), para ASS e AC respectivamente.

4.4.5 Relação entre a multirresistência a antimicrobianos e a produção de biofilme

Quando a presença de multirresistência a drogas (aqui definida como presença de resistência a três ou mais antimicrobianos em adição aos β -lactâmicos) foi relacionada à produção de biofilme, verificamos que as cepas de MRSE isoladas de indivíduos sãos da comunidade, produtoras de biofilme, apresentavam uma elevada incidência de multirresistência (15/21; 71 %; $p < 0,0001$). Ao contrário, nenhuma cepa de MRSE multirresistente foi detectada entre as 14 cepas não aderentes isoladas de indivíduos sãos da comunidade (figura 12A). É importante ressaltar ainda que todas as seis cepas de MRSE mais sensíveis, observadas entre as cepas produtoras de biofilme da população formada de indivíduos sãos, foram fracamente ou moderadamente produtoras, enquanto que todas as fortemente produtoras de biofilme apresentaram múltipla resistência a drogas (tabela 3). Elevada presença de cepas multirresistentes (14/16; 87 %) foi também verificada entre cepas produtoras de biofilme na população de contactantes domiciliares e uma incidência significativamente menor (7/13; 54 %; $p = 0,0442$) foi observada entre as cepas não aderentes desta mesma população (figura 12B). Porém, não houve diferenças significativas entre a produção de biofilme e multirresistência nas populações de MRSE isoladas de pacientes do HUAP ou do *home care*, ou de profissionais de saúde do *home care*. Nesses casos, a incidência de cepas multirresistentes foi igualmente elevada no grupo de cepas produtoras (74 %; 100 %; 87 %) quanto no grupo formado de cepas não produtoras de biofilme (67 %; 80 %; 93 %), respectivamente (figuras 12C, 12D e 12E e tabelas 2, 4 e 5)

5 DISCUSSÃO

Um fator de virulência considerado importante em diversas espécies bacterianas e, principalmente, nos *S. epidermidis*, é a capacidade de produção de biofilme (5,32). O biofilme é formado sobre quase todos os tipos de cateteres e sobre muitos outros dispositivos médicos e implantes (7,8). Quando esse filme biológico é formado, freqüentemente, o paciente tem que ser submetido à cirurgia para retirada do implante contaminado, uma vez que o acesso de antimicrobianos e de células do sistema imune às bactérias torna-se dificultado pela imensa quantidade de material amorfo embebendo tais microrganismos (5,7). O aumento das infecções por *S. epidermidis* nos últimos anos tem sido relacionado ao aumento do uso de dispositivos médicos implantáveis e, portanto, a patogenicidade dos *S. epidermidis* como agentes de infecções nosocomiais parece estar, principalmente, associada à sua capacidade de produzir biofilme sobre as superfícies de polímeros (2,8). Porém, apesar de sua importância clínica, poucos estudos foram realizados sobre *S. epidermidis*, se compararmos com os *S. aureus* e, assim, muitas controvérsias ainda existem sobre a composição de seu biofilme e sobre quais os genes estariam envolvidos nesse processo (7). Estudos utilizando uma cepa nocaute para o operon *ica* sugeriram um importante papel do *ica* na formação de biofilme e patogênese de *S. epidermidis* (63,64,65,66,67,68). Entretanto outros estudos têm levantado dúvidas a cerca da função crítica do locus *ica* nas infecções de *S. epidermidis* associadas à biofilme (69). Mas, o papel

desse filme biológico na patogênese das infecções nosocomiais pelos *Staphylococcus* parece ser inquestionável. Alguns estudos têm demonstrado que uma reduzida capacidade de produção do biofilme pelos estafilococos levaria à diminuição da virulência dessas bactérias (33). Dessa forma, sem a proteção do biofilme, essas bactérias estariam susceptíveis às defesas imunológicas do hospedeiro ou mesmo aos antimicrobianos. Recentemente, Amaral *et al.* (2005) estudando cepas de *S. aureus* produtoras de biofilme classificou tais cepas em não aderentes, fracamente aderentes, moderadamente aderentes e fortemente aderentes, e demonstraram que cepas pertencentes a um clone epidêmico (mais virulento) de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) apresentaram uma capacidade aumentada de produzirem biofilme; sendo que a maioria dessas cepas foi classificada como fortemente aderentes (58). Mais recentemente, o papel do biofilme na virulência dos *S. epidermidis* foi demonstrado em um modelo animal de cateter venoso central utilizando ratos (33). Os autores verificaram que uma cepa comensal de *S. epidermidis*, não produtora de biofilme e *ica* negativa, passou a causar com maior frequência bacteremia associada a cateteres em ratos, após infecção com uma cepa isogênica mutante que apresentava o operon *ica* clonado em um plasmídio. Cabe ressaltar aqui que muitos dos estudos sobre biofilme, realizados até o momento, utilizaram poucas cepas laboratoriais mutantes e metodologias diferentes para a detecção do mesmo (63,64,65,66,67,68,69). Isso, juntamente com o fato do biofilme sofrer variação de fase (podendo ser ou não expresso, dependendo das condições do meio), poderia explicar as controvérsias existentes na literatura científica com relação aos estudos sobre biofilme em *S. epidermidis*. Por outro lado, estudos que utilizam apenas mutantes e cepas laboratoriais poderiam gerar resultados que não reflitam, exatamente, o que ocorre na patogênese dos *S. epidermis*. Por esse motivo, objetivamos, neste trabalho de tese, realizar um estudo comparativo sobre a produção de biofilme em cepas clínicas de *S. epidermidis*, recentemente obtidas, utilizando três populações distintas: uma formada por cepas isoladas de indivíduos hospitalizados, os quais são freqüentemente pacientes imunocomprometidos e cujas cepas estão sob pressão seletiva antibiótica; outra envolvendo indivíduos sãos da comunidade, que

não estariam sob forte pressão seletiva de antimicrobianos, e, finalmente, uma outra envolvendo indivíduos associados a um sistema de *home care* (pacientes, seus contactantes domiciliares e profissionais de saúde). Essa última seria uma população intermediária entre a comunitária e a hospitalar, uma vez que apesar dos pacientes não estarem internados, eles haviam tido alta hospitalar logo antes de sua entrada no *home care* e a grande maioria era imunocomprometido e fazia uso de antimicrobianos. Por outro lado, muitos dos contactantes domiciliares foram acompanhantes desses pacientes quando hospitalizados e os profissionais de saúde deste *home care* também atuavam concomitantemente em um ou mais hospitais. Quando comparamos a produção de biofilme nessas três populações verificamos que as cepas associadas ao HUAP produziam significativamente ($p=0,0107$) mais biofilme (76 %) que as cepas isoladas da comunidade (60 %) ou do *home care* (57 %). Tais dados indicam que apesar das cepas hospitalares estarem mais associadas à presença de biofilme, as cepas comensais também apresentavam potencial patogênico (ou seja, produção de biofilme). Assim, segundo nossos resultados, a produção de biofilme não poderia ser utilizada como um marcador de significância clínica como sugerem alguns pesquisadores (70). Dados semelhantes aos nossos foram também obtidos por outros pesquisadores (29). De Silva *et al.* (2002) verificaram que cepas de *S. epidermidis* isoladas de sangue ou de pele de neonatos produziam biofilme mais espesso quando comparadas com cepas de outras espécies de ECN também envolvidas em septicemias neonatal (71). Mais recentemente, dados semelhantes foram descritos por Klingenberg *et al.* (2005), estudando 150 episódios de septicemias em neonatos causadas por *S. epidermidis* e outras espécies de ECN (29). Todos esses dados parecem indicar que a elevada capacidade de expressar biofilme poderia ser o fator responsável pela maior virulência das cepas de *S. epidermidis* em relação a cepas de outras espécies de ECN; o que poderia explicar uma maior frequência dos *S. epidermidis* em infecções.

Ao compararmos a expressão da produção de biofilme das cepas classificadas nas diferentes populações por nós estudadas, verificamos que tais populações se comportaram de forma significativamente heterogênea quanto à

expressão do biofilme (figura 2). As cepas hospitalares apresentaram distribuição mais homogênea quando classificadas como não aderentes, fracamente, moderadamente e fortemente aderentes, enquanto as cepas do *home care* e da comunidade apresentaram padrão mais heterogêneo. É possível que as diferenças na expressão de biofilme entre as bactérias dessas populações possam ser reflexo de variações no *background* genético entre essas cepas. Entretanto, estudos sobre a diversidade clonal desses microrganismos não foram realizados por nós para comprovar tal hipótese.

A estrutura polissacarídica do biofilme, denominada de adesina polissacarídica intercelular (PIA; 35), é codificada pelo operon *ica* (7). Neste estudo, utilizando a técnica de PCR, observamos nos três grupos populacionais estudados, a prevalência do gene *icaAD* em 99 % das cepas de MRSE produtoras de biofilme e a ausência desses genes em praticamente todas as cepas não produtoras de biofilme, com exceção de somente três cepas. Tais resultados corroboram com estudos de outros autores que utilizando nocaute para genes do operon *ica* verificaram que o funcionamento desse operon era essencial para a expressão de biofilme em cepas de *S. epidermidis* (72). Outros pesquisadores utilizando estratégias semelhantes às nossas verificaram que a detecção do operon *ica* não distingue uma cepa invasiva de uma contaminante, e que este encontrava-se presente em quase 100 % das cepas produtoras de biofilme (29). Do mesmo modo que Frebourg *et al.* (2000), nós constatamos a prevalência dos genes *icaAD* em cepas produtoras de biofilme associadas ou não a casos de infecções (73). Tais resultados estão de acordo com a idéia de que a patogênese de muitas doenças estafilocócicas é precedida da colonização dessas cepas na pele e/ou mucosa dos pacientes infectados (10).

Além do *ica*, outros genes vêm sendo citados como importantes na produção de biofilme. Dentre esses genes incluem-se os genes *aap* e *atlE*. Tais elementos genéticos parecem estar envolvidos no acúmulo de biofilme sob superfícies de polímeros e na capacidade de ligação específica a estas superfícies, respectivamente (37,42). Esses genes também foram verificados por nós em cepas produtoras de biofilme, onde 86 % apresentaram o gene *atlE* e

82 % o *aap*. No perfil moderadamente aderente 62 % das cepas possuíam os três genes, enquanto que 38 % apresentavam os genes *icaAD* em combinação com *atlE* ou *aap*. Para o perfil fracamente aderente foi observado que 58 % das cepas produtoras de biofilme possuíam os três genes, enquanto que 17 % possuíam *icaAD* em combinação com *atlE* ou *aap* e 25% carregavam somente o *icaAD*. É interessante ressaltar que a presença dos três genes estava associada, no estudo aqui apresentado, a todas as cepas fortemente produtoras de biofilme. Cálculos estatísticos demonstraram maior tendência das cepas fortemente produtoras de apresentarem os três genes quando comparadas com as cepas fracamente aderentes ou moderadamente aderentes ($p < 0,0001$). Em um estudo recente realizado por Sun *et al.* (2005) com uma cepa laboratorial de *S. epidermidis* foi verificado que a neutralização da proteína Aap com anticorpos monoclonais reduziu a acumulação de biofilme em cerca de 79 % a 87 % (43). Nossos estudos, utilizando cepas clínicas, confirmam também a importância da presença do gene *aap* para a acumulação do biofilme, levando a formação de um biofilme mais denso. Ainda não é completamente esclarecido como a proteína AtlE efetivamente possui a capacidade de ligação específica a superfícies. Estudos com mutantes *atlE*-negativo verificaram que tais mutantes apresentam reduzida aderência primária ao poliestireno, reduzida atividade à vitronectina *in vitro* e reduzida hidrofobicidade. Assim, os autores concluíram que por este motivo tais cepas não formavam biofilme em superfície de poliestireno, apresentando uma redução na virulência (38). Deste modo, nossos dados estão de acordo com a literatura indicando que esse gene está mais associado a uma forte expressão de biofilme (37,42,43,65). Klingenberg *et al.* (2005) verificaram em seus estudos que 17 % das cepas não produtoras de biofilme analisadas apresentavam os genes *ica*, *atlE* e *aap* sugerindo que outros fatores estariam também envolvidos na produção do filme biológico (29). Da mesma forma, a presença desses genes em quatro cepas não produtoras de biofilme foi detectada em nosso estudo, porém com uma incidência menor que a relatada (4/137; 3%). Por outro lado, em pelo menos uma das cepas analisadas, a produção de biofilme parecia se dar por um processo *ica*-independente, uma vez que tal operon não pôde ser detectado na amostra.

Produção de biofilme *ica*-independente já foi também observada anteriormente (74).

Uma associação entre o fenótipo do biofilme e a resistência antimicrobiana foi recentemente descrita (29). Os autores observaram um aumento da resistência a drogas entre as cepas produtoras de biofilme. Tal fenômeno poderia ser conseqüência do íntimo contato entre bactérias no ambiente do biofilme, o que poderia facilitar transferências horizontais de informações genéticas, incluindo genes de resistência aos antimicrobianos (29). Outro trabalho envolvendo cepas de MRSE demonstrou também elevada resistência associada a cepas produtoras de biofilme, enquanto que entre as não produtoras houve acentuada sensibilidade (11,75). Em nosso estudo dados semelhantes foram observados para as cepas de MRSE isoladas de indivíduos sãos da comunidade e dos contactantes domiciliares do *home care*, visto que as cepas não aderentes apresentavam-se mais sensíveis aos antimicrobianos quando comparados com as cepas produtoras de biofilme, que apresentaram elevado grau de multirresistência. Devido, provavelmente, à elevada pressão seletiva antibiótica sofrida pelas cepas isoladas de pacientes hospitalizados ou do *home care* e de profissionais de saúde do *home care*, tal diferença não foi verificada para cepas isoladas dessas populações, as quais foram em sua maioria multirresistentes.

Nas últimas décadas, um aumento substancial na freqüência de resistência à metilina e na multirresistência tem sido observado entre os ECN (54). Estudos demonstram que mais de 50 % dos ECN são *S. epidermidis* resistentes à metilina (MRSE) e a outros antibióticos (49,50). O número de cepas de *S. epidermidis* multirresistentes que colonizam a pele de pacientes hospitalizados, dos profissionais de saúde e até mesmo de pessoas saudáveis da comunidade vem aumentando nos últimos anos. A múltipla resistência aos antibióticos em *S. epidermidis* é um problema reconhecido mundialmente e isto parece estar relacionado com o uso indiscriminado e prolongado dessas drogas (76,77). A vancomicina, teicoplanina e linezolida são antimicrobianos para os quais a resistência ainda é raramente observada dentre os *Staphylococcus*, e devem ser, portanto, consideradas drogas de última escolha para terapia de infecções

nosocomias por microrganismos gram-positivos. No entanto, a resistência do MRSA à linezolida já foi descrita (76). No estudo aqui apresentado, nenhuma cepa analisada apresentou resistência a esses três antimicrobianos. Das 25 cepas de MRSE obtidas de pacientes hospitalizados no HUAP, além da resistência à penicilina e oxacilina, 72 % apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos. Trabalhos semelhantes com cepas de MRSE obtidas de infecção na corrente sanguínea também demonstraram resistência a até seis antimicrobianos diferentes utilizados (29). Em nosso estudo, a maioria das cepas nosocomiais apresentou resistência à gentamicina (92 %) e taxas elevadas foram também observadas para a sulfametoxazol+trimetoprima (60 %), ciprofloxacino (52 %) e clindamicina (40 %), seguidas de 20 % de resistência ao cloranfenicol e 16 % à rifampicina. Esses dados estão de acordo com a literatura científica, uma vez que estudos anteriores também observaram um aumento da frequência da resistência a esses antimicrobianos em cepas de MRSE hospitalares (49,50,53).

Além das cepas nosocomiais, as cepas de MRSE isoladas de indivíduos são da comunidade vêm crescendo quanto ao seu potencial de multirresistência aos antimicrobianos (54,78). Isso, provavelmente, deve estar relacionado com o uso indiscriminado dessas drogas na comunidade, levando à adaptação seletiva das cepas de MRSE resistentes em detrimento das cepas sensíveis. Em nosso estudo, observamos que, na comunidade, 15 das 35 cepas de MRSE analisadas apresentavam resistência a até quatro antimicrobianos diferentes, além da penicilina e oxacilina (tabela 3), demonstrando que cepas de MRSE isoladas de indivíduos são da comunidade podem apresentar multirresistência. Dentre elas, 89% foram resistentes à tetraciclina, 63% à gentamicina, 11% ao ciprofloxacino e apenas 9% à sulfametoxazol + trimetoprima. É curioso que uma percentagem menor de resistência à sulfametoxazol + trimetoprima tenha sido encontrada entre cepas comunitárias, já que esse antimicrobiano era um dos mais utilizado até a década de 80 (79). É possível que, atualmente, com a diminuição e substituição de sua prescrição por outro antibiótico, os *S. epidermidis* tenham se tornado mais sensíveis à sulfametoxazol+trimetoprima. Por outro lado, um aumento de cepas resistentes ao ciprofloxacino, um antibiótico que vem sendo prescrito cada vez

mais, na comunidade, para o tratamento de infecções urinárias e oculares (80), foi verificado em nosso estudo com cepas de MRSE obtidas da comunidade.

O perfil de resistência das cepas do *home care* seguiu um comportamento mais semelhante ao das cepas hospitalares, já que esta população era composta de pacientes, seus contactantes domiciliares e profissionais de saúde. Muitos dos pacientes do *home care* haviam sido internados em hospitais, antes de sua admissão a este sistema. Por outro lado, alguns dos contactantes domiciliares foram acompanhantes dos pacientes durante seu período de internação e outros faziam visitas hospitalares constantes aos pacientes. Acrescentamos ainda o fato de que os profissionais de saúde deste *home care* trabalhavam também em um ou mais hospitais. Assim, realizando-se uma análise agrupada das populações, dividindo-as em ASS – grupo associado ao sistema de saúde (pacientes do HUAP e pacientes, contactantes e profissionais de saúde do *home care*) e AC – grupo associado à comunidade (indivíduos são da comunidade) observamos também elevada prevalência de resistência à tetraciclina (89 %) nas cepas comunitárias, quando comparadas com as associadas ao sistema de saúde (24 %; $p < 0,0001$). Finalmente, verificamos um elevado percentual de resistência à clindamicina (64 %), ciprofloxacino (54 %), sulfametoxazol+trimetoprima (48 %), cloranfenicol (45 %) e ainda à rifampicina (36 %) na população associada ao sistema de saúde.

CONCLUSÃO

Concluindo, os resultados obtidos a partir do presente estudo de tese elucidam algumas questões controvertidas na literatura científica, com relação à produção e expressão de biofilme em *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE). Tais dados demonstraram que cepas hospitalares estavam mais associadas à produção de biofilme, sugerindo assim sua importância na patogênese de infecções nosocomiais. Porém, a produção de biofilme não poderia ser utilizada como um marcador de significância clínica, como sugerem alguns pesquisadores, visto que cepas comensais também se mostraram bem equipadas para produção do filme biológico. Este estudo confirma a importância do operon *ica* na expressão do biofilme, uma vez que este operon foi carregado por todas as cepas produtoras, exceto uma que apresentou um biofilme *ica*-independente. Por outro lado, ficou aqui demonstrado que os genes *atlE* e *aap* não parecem ser essenciais para a produção de biofilme, mas colaboram para o aumento da espessura deste filme biológico; parecendo deste modo importantes para sua acumulação. Finalmente, nossos dados confirmam que o ambiente do biofilme parece ser realmente favorável às transferências gênicas, uma vez que a população formada por cepas capazes de se aderir à superfície do poliestireno apresentava maior índice de multirresistência. Desta forma, a produção de biofilme parece ser um importante fator de virulência não somente por sua ligação à superfície dos dispositivos médicos, mas também por sua capacidade de aumentar a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos e, possivelmente, de outros genes de virulência. Tal fenômeno poderia, potencialmente, aumentar a adaptabilidade do microrganismo ao hospedeiro, contribuindo assim para uma evolução acelerada em direção ao aumento de sua patogenicidade.

7 BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=taxonomy>
2. Kloos WE & Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 1994; 7:117-40.
3. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquo L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol. 2005; 43:1985-8.
4. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clin Infect Dis 1998; 26:1179-81.
5. Von Eiff, C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *staphylococci*. Infect Dis. 2002; 2:677-85.
6. Miragaia M, Couto I, Pereira SFF, Kristinsson KG, Westh H, Jarlov JO, Carriço J, Almeida J, Santos-Sanches I and de Lancastre H. Molecular

- Characterization of methicillin-resistant *S. epidermidis* clones: evidence of Geographic dissemination. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 430-8.
7. Gotz, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002; 43:1367-78.
 8. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 2002; 4:481-9.
 9. Milisavljevic V, Wu F, Cimmotti J, Haas J, Della-Latta P, Larson E, Saiman L. Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2005; 33: 341-7.
 10. Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1740-6.
 11. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Pirini V, Visai L, Speziale P, Montanaro L. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials.* 2005; 26:6530-5.
 12. Nunes AP, Teixeira LM, Bastos CC, Silva MG, Ferreira RB, Fonseca LS, Santos KR. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. *J Hosp Infect.* 2005; 59:19-26.
 13. Teufel P, Götz F. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 1993; 175:4218-24.

14. Sloat N, Thomas M, Marre R, Gatermann S. Purification and characterization of elastase from *Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol. 1992; 37:201-5.
15. Farrell AM, Foster TJ, Holland KT. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. J Gen Microbiol. 1993; 139:267-77.
16. Longshaw CM, Farrell AM, Wright JD, Holland KT. Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. Microbiology. 2000;146:1419-27.
17. Chamberlain NR, Brueggemann SA. Characterisation and expression of fatty acid modifying enzyme produced by *Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol. 1997; 46:693-7.
18. Kuroishi T, Komine K, Kai K, Itagaki M, Kobayashi J, Ohta M, Kamata S, Kumagai K. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. J Vet Med Sci. 2003; 65:899-906.
19. Kupke T, Götz F. Expression, purification, and characterization of EpiC, an enzyme involved in the biosynthesis of the lantibiotic epidermin, and sequence analysis of *Staphylococcus epidermidis* *epiC* mutants. J Bacteriol. 1996; 178:1335-40.
20. Heidrich C, Pag U, Josten M, Metzger J, Jack RW, Bierbaum G, Jung G, Sahl HG. Isolation, characterization, and heterologous expression of the novel lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster. Appl Environ Microbiol. 1998; 64:3140-6.

21. Taylor JM, Heinrichs DE. Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol.* 2002; 43:1603-14.
22. Modun B, Williams P. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun.* 1999; 67:1086-92.
23. Cockayne A, Hill PJ, Powell NB, Bishop K, Sims C, Williams P. Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated *Staphylococcus epidermidis* ABC transporter. *Infect Immun.* 1998; 66:3767-74.
24. Vuong C, Kocianova S, Yao Y, Carmody AB, Otto M. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *J Infect Dis.* 2004; 15:1498-505.
25. van Wamel WJ, van Rossum G, Verhoef J, Vandenbroucke-Grauls CM, Fluit AC. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 163:1-9.
26. Li M, Guan M, Jiang XF, Yuan FY, Xu M, Zhang WZ, Lu Y. Genetic polymorphism of the accessory gene regulator *agr* locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. *J Med Microbiol.* 2004; 53:545-9.
27. Cheung AL, Manna AC. Role of the distal *sarA* promoters in SarA expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2005; 73:4391-4.
28. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* 2004; 186:6208-19.

29. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, Flaegstad T. Coagulase-Negative staphylococcal sepsis in neonates: Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24:817-22.
30. Bayston R, Penny SR. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus* SIIA: a possible factor in colonization of Holter shunts. *Dev Med Child Neurol.* 1972 suppl; 27:25-8.
31. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 1982; 37:318-26.
32. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Eldere J. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *J Infect Dis.* 2003; 188:730-7.
33. Li H, Xu L, Wang J, Wen Y, Vuong C, Otto M, Gao Q. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun.* 2005; 73:3188-91.
34. Kristian SA, Golda T, Ferracin F, Cramton SE, Neumeister B, Peschel A, Gotz F, Landmann R. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. *Microb Pathog.* 2004; 36:237-45.
35. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H. & Laufs R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of

- Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.* 1996; 178:175-83.
- 36.** Ziebuhr W, Lossner I, Rachid S, Dietrich K, Gotz F, Hacker J. Modulation of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. Analysis of genetic mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 485:151-7.
- 37.** Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol.* 1997; 24:1013-24.
- 38.** Takahashi J, Komatsuzawa H, Yamada S, Nishida T, Labischinski H, Fujiwara T, Ohara M, Yamagishi J, Sugai M. Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 2002; 46:601-12.
- 39.** Veentresta GL, Cremers FF, van Dijk H, Fleer A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* 1996; 178:537-41.
- 40.** Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2004; 72:2177-85.
- 41.** Tormo MA, Knecht E. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology.* 2005; 151:2465-75.

42. Hussain M, Herrmann M, Von Eiff C, Perdreau-Remington F, Peters G. A 140 KDa extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun.* 1997 ;65:519-24.
43. Sun D, Accavitti MA, Bryers JD. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12:93-100.
44. Harding RE, Thompson RE. Results of treatment of hospital staphylococcal infections with methicillin. *Postgrad Med J.* 1961; 37:485-9.
45. Brakstad, OG, Maeland, J.A. Mechanisms of methicillin resistance in *staphylococci*. *APMIS.* 1997; 105:264-76.
46. McKinney TK, Sharma VK, Craig WA, Archer GL. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus mecA* is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. *J Bacteriol.* 2001; 183:6862-8.
47. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:1549-55.
48. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002; 292: 67-74.
49. Diekema DJ, Pfaller MA, Scmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M & Sentry Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific

Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. Clin Infect Dis. 2001; 32: S114-32.

50. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML. The SENTRY participant groups. Survey of bloodstream infections attributable to gram-positive cocci: frequent of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in United States, Canada, and Latin America from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 33:283-97.
51. Garrett DO, Jochimsen E, Murfitt K, Hill B, McAllister S, Nelson P, Spera RV, Sall RK, Tenover FC, Johnston J, Zimmer B, Jarvis WR. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *S. epidermidis*. Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; 20:167-70.
52. FitzGerald SF, Fitzpatrick F, Dillane T, Smith EG, Humphreys H, O'Gara JP. Genomic diversity of *Staphylococcus epidermidis* isolates from the intensive care unit. Clin Microbiol Infect. 2005; 11:597.
53. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Braz J Infect Dis 2001; 5:200-14.
54. Mattos EM, Teixeira LA, Alves VMM, Rezenda CAF, Coimbra MVS, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of *Staphylococcus epidermidis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 45:13-22.

55. Cunha RS, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99:855-60.
56. Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AMS, de Lencastre H, Tomasz A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol. 1995; 33:2400-4.
57. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 2002 M17-A20; NCCLS, Wayne, Pa.
58. Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. J Infect Dis. 2005; 192:801-10.
59. Ferreira RB, Nunes AP, Kokis VM, Krepsky N, Fonseca LS, Bastos MC, Giambiagi MM, Santos KR. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 42:205-12.
60. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 1989. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide>
62. <http://www.cybergene.se/primer.html>

63. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol. 1996; 20:1083-91.
64. Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, Schwarzkopf A, Heesemann J, Laufs R. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesion. Infect. Immun. 1994; 62:3244-53.
65. Rupp ME, Fey PD, Heilmann C, Gotz F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. J Infect Dis. 2001; 183:1038-42.
66. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. Infect Immun. 1999; 67:2627-32.
67. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. Infect Immun. 1999; 67:2656-9.
68. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. J Infect Dis. 2003; 188:706-18.

69. Francois P, Tu Quoc PH, Bisognano C, Kelley WL, Lew DP, Schrenzel J, Cramton SE, Gotz F, Vaudaux P. Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 35:135-40.
70. Ishak, MA, Groschel DH, Mandell GL, Wenzel RP. Association of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. J. Clin. Microbiol. 1985; 22:1025-9.
71. De Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2002; 40:382-8.
72. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, 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; 10:1081-8.
73. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J Clin Microbiol. 2000; 38:877-80.
74. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43:1973-6.
75. Tekerekoglu MS, Durmaz R, Ay S, Cicek A, Kutlu O. Epidemiologic and clinical features of a sepsis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus*

- epidermidis* (MRSE) in a pediatric intensive care unit. Am J Infect Control. 2004; 32:362-4.
- 76.** Peeters MJ, Sarria JC. Clinical characteristics of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Am J Med Sci. 2005; 330:102-4.
- 77.** Mukherjee S, Bhadra B, Chakraborty R, Gurung A, Some S, Chakraborty R. Unregulated use of antibiotics in Siliguri city *vis-a-vis* occurrence of MAR bacteria in community waste water and river Mahananda, and their potential for resistance gene transfer. J Environ Biol. 2005; 26:229-38.
- 78.** Silva, F.R., Mattos, E.M., Coimbra, M.V.S., Ferreira-Carvalho, B.T., Figueiredo, A.M.S. Isolation and molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-negative *staphylococci* from nasal flora of healthy humans at three community institutions in Rio de Janeiro City. Epidemiol. Infect. 2001; 127:57-62.
- 79.** Al-Shawwa BA, Wegner D. Trimethoprim-sulfamethoxazole plus topical antibiotics as therapy for acute otitis media with otorrhea caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2005; 131:782-4.
- 80.** Aires de Sousa M, Santos Sanches I, Ferro ML, De Lencastre H. Epidemiological study of staphylococcal colonization and cross-infection in two West African Hospitals. Microb Drug Resist. 2000; 6:133-41.

8 APÊNDICES

8.1 Tabelas

Tabela 1 – Descrição dos primers utilizados.

Designação dos primers (gene)	“Primers” (5’ – 3’)	Temperatura de anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência (GenBank)
<i>mecA</i> -P4 (<i>mecA</i>)	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	55	160	YO68000
<i>mecA</i> -P7 (<i>mecA</i>)	CCACTTCATATCTTGTAACG	55		YO68000
<i>icaAD</i> -F (<i>icaAD</i>)	TAGTAATCACAGCCAACATCTT	55	496	AY382582
<i>icaAD</i> -R (<i>icaAD</i>)	AAACAAACTCATCCATCCGAAT	55		AY382582
<i>atlE</i> -F (<i>atlE</i>)	GCTAAGGCACCAGTAAAAAGT	55	480	U71377
<i>atlE</i> -R (<i>atlE</i>)	GACCTCATCTTGTTTTACCCA	55		U71377
<i>aap</i> -F (<i>aap</i>)	CAACGAAGGCAGAAGAAGGA	55	719	AJ249487
<i>aap</i> -R (<i>aap</i>)	CATCCCCATCTTTCTTGCTG	55		AJ249487

Tabela 2 – Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atIE* e *aap*, origem clínica e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro.

Cepas	Infecção/colonização ^a	Data da coleta	U.B. ^b	Aderência a poliestireno	<i>icaAD</i>	<i>atIE</i>	<i>aap</i>	Perfil de resistência a antimicrobianos ^c
CM 194/02	IO	18/11/02	0,082	Não adere	-	-	-	Eri, Gn, Ox, Pen
CM 211/02	IS	23/01/03	0,163	Não adere	-	-	-	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
CM 31/03	IS	02/04/03	0,008	Não adere	-	-	-	Cli, Eri, Ox, Pen, Sul+tri
CM 35/03	IS	13/04/03	0,085	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Sul+tri
CM 75/03	IS	04/09/03	0,154	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+Tri
CM 133/03	C	18/12/03	0,131	Não adere	+	+	+	Cip, Cli, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+Tri
CM 16/04	C	17/12/03	0,199	Fraca	+	+	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+Tri
CM 06/04	IS	07/01/04	0,250	Fraca	+	-	-	Gn, Ox, Pen, Sul+tri, Tet
CM 15/03	IS	17/03/03	0,277	Fraca	+	-	+	Cip, Gn, Ox, Pen
CM 70/03	IS	22/07/03	0,189	Fraca	+	+	+	Gn, Ox, Pen
CM 83/03	C	29/08/03	0,357	Fraca	+	+	-	Cip, Gn, Ox, Pen, Sul+Tri
CM 101/03	C	17/10/03	0,189	Fraca	+	+	+	Cip, Gn, Ox, Pen, Sul+Tri
CM 07/04	IS	09/01/04	0,234	Fraca	+	+	+	Gn, Ox, Pen Rif, Sul+Tri
CM 130/03	IS	25/12/03	0,188	Fraca	+	+	+	Cip, Clo, Cli, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+tri
CM 23/04	IS	25/03/04	0,357	Fraca	+	+	-	Cip, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+Tri
CM 117/03	C	08/12/03	0,401	Moderada	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+Tri
CM 06/03	IS	25/02/03	0,376	Moderada	+	+	+	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
CM 12/03	IS	14/03/03	0,460	Moderada	+	-	+	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
CM 39/03	C	22/04/03	0,563	Moderada	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Mup, Ox, Pen, Sul+Tri
CM 24/03	IR	26/03/04	0,380	Moderada	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen
CM 116/03	Otite	31/12/03	1,376	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
CM 10/04	IO	07/01/04	3,627	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen
CM 126/03	C	18/12/03	0,790	Forte	+	+	+	Cip, Gn, Ox, Pen, Sul+Tri
CM 25/04	IS	25/03/04	0,977	Forte	+	+	+	Cip, Clo, Gn, Ox, Pen, Rif, Pen, Sul+Tri
CM 27/04	C	25/03/04	1,378	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen

a: IO: Infecção ocular; IS: Infecção sanguínea; C: Colonização; IR: Infecção respiratória.

b: U.B.: Unidade de Biofilme. O biofilme foi testado em superfícies de poliestireno conforme Materiais e Métodos.

c: Cip: Ciprofloxacino, Cli: clindamicina, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Gn: gentamicina, Mup: mupirocina, Ox: oxacilina, Pen: penicilina, Rif: rifampicina, Sul+tri: sulfametoxazol+trimetoprima, Tet: tetraciclina.

Tabela 3 – Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atIE* e *aap*, e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas da nasofaringe de indivíduos sãos da comunidade.

Cepas	U.B. ^a	Aderência a poliestireno	<i>icaAD</i>	<i>atIE</i>	<i>aap</i>	Perfil de resistência a antimicrobianos ^b
58 D	0,069	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Tet
61 D	0,062	Não adere	-	-	-	Eri, Gn, Ox, Pen
61 E	0,061	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Tet
62 E	0,086	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Sul+ Tri
63 E	0,066	Não adere	-	-	-	Eri, Ox, Pen, Tet
75 D	0,048	Não adere	-	-	-	Gn, Ox, Pen, Tet
77 E1	0,100	Não adere	-	-	-	Gn, Ox, Pen, Tet
80 E1	0,126	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Tet
84 Eg	0,018	Não adere	-	-	-	Gn, Ox, Pen, Tet
86 D	0,123	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Tet
23/04 E	0,094	Não adere	-	-	-	Gn, Ox, Pen, Tet
68/04 D	0,052	Não adere	-	-	-	Eri, Ox, Pen, Tet
119/02	0,135	Não adere	-	-	-	Gn, Ox, Pen
139/02	0,117	Não adere	-	-	-	Eri, Ox, Pen, Tet
36/02	0,190	Fraca	+	-	-	Eri, Ox, Pen, Tet
82/04 E	0,331	Fraca	+	-	-	Gn, Ox, Pen
95/04 D	0,255	Fraca	+	-	-	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
56 E	0,636	Moderada	+	-	-	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
73/04 D	0,531	Moderada	-	-	-	Gn, Ox, Pen, Sul+ Tri, Tet
84/04 D	0,372	Moderada	+	+	+	Cip, Gn, Ox, Pen Tet
107/04 E	0,540	Moderada	+	+	-	Ox, Pen, Tet
108/04 D	0,607	Moderada	+	-	-	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
27/02	0,567	Moderada	+	+	+	Eri, Ox, Pen, Tet
33/02	0,689	Moderada	+	+	+	Cip, Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
86/02	0,701	Moderada	+	+	+	Ox, Pen, Tet
154/02	0,596	Moderada	+	-	+	Eri, Ox, Pen, Tet
41/02	1,370	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
46 D	3,046	Forte	+	+	+	Cip, Gn, Ox, Pen, Sul+ Tri, Tet,
52 E	0,800	Forte	+	+	+	Cip, Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
55 E	0,850	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
70 D	1,994	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
07/04 E	2,704	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
80/04 D	0,782	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
137/02	1,360	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet
123/02	2,572	Forte	+	+	+	Eri, Gn, Ox, Pen, Tet

a: U.B. : Unidade de Biofilme. O biofilme foi testado em superfícies de poliestireno conforme Materiais e Métodos.

b: Cip: Ciprofloxacino, Cli: clindamicina, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Gn: gentamicina, Mup: mupirocina, Ox: oxacilina, Pen: penicilina, Rif: rifampicina, Sul+tri: sulfametoxazol+trimetoprima, Tet: tetraciclina.

Tabela 4: Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap*, e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilicina (MRSE), isoladas da nasofaringe de pacientes de um sistema de *home care*.

Cepas	U.B. ^a	Aderência	<i>icaAD</i>	<i>atlE</i>	<i>aap</i>	Perfil de resistência a antimicrobianos ^b
HC 1369	0,116	Não adere	-	-	-	Cip,Cli, Ox, Pen
HC 1089g/p	0,034	Não adere	-	-	-	Cli, Clo, Eri, Ox, Pen Sul+tri, Tet
HC 607	0,035	Não adere	-	-	-	Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Sul+tri, Tet
HC 1041	0,111	Não adere	-	-	-	Cli, Eri, Ox, Pen, Rif
HC 1585	0,120	Não adere	-	-	-	Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Rif
HC 1554	0,300	Fraca	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Sul+tri
HC 991	0,190	Fraca	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Sul+tri
HC 189	1,736	Forte	+	+	+	Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Sul+tri
HC 1314	0,844	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Mup, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 689	1,320	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Eri, Ox, Pen, Rif

a: U.B. : Unidade de Biofilme. O biofilme foi testado em superfícies de poliestireno conforme Materiais e Métodos.

b: Cip: Ciprofloxacino, Cli: clindamicina, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Gn: gentamicina, Mup: mupirocina, Ox: oxacilina, Pen: penicilina, Rif: rifampicina, Sul+tri: sulfametoxazol+trimetoprima, Tet: tetraciclina.

Tabela 5: Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap*, e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas da nasofaringe de profissionais de saúde de um sistema de *home care*.

Cepas	U.B. ^a	Aderência	<i>icaAD</i>	<i>atlE</i>	<i>aap</i>	Perfil de resistência a antimicrobianos ^b
HC 1100	0,158	Não adere	-	-	-	Cli, Eri, Ox, Pen, Rif
HC 907	0,023	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Mup, Ox, Pen Rif, Sul+tri, Tet
HC 287	0,110	Não adere	-	-	-	Eri, Gn ,Ox, Pen, Tet
HC 1404	0,141	Não adere	-	-	-	Eri, Gn ,Ox, Pen, Tet
HC 328	0,160	Não adere	+	+	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen , Rif
HC 337	0,045	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+tri
HC 343	0,037	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+tri
HC 370	0,125	Não adere	-	-	-	Cli, Ox, Pen, Rif, Tet
HC 1044	0,125	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Eri, Ox, Pen
HC 483	0,087	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Eri, Ox, Pen, Tet
HC 1136p	0,068	Não adere	-	-	-	Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 572	0,153	Não adere	-	-	-	Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 584	0,079	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Sul+tri
HC 1158	0,142	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+Tri, Tet
HC 1373	0,162	Não adere	-	-	-	Cip, Clo, Ox, Pen
HC 164	0,202	Fraca	+	+	+	Cip, Clo, Ox, Pen
HC 573b	0,202	Fraca	+	+	+	Cip, Clo, Ox, Pen
HC 1400	0,187	Fraca	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 1403	0,190	Fraca	+	+	+	Cip, Cli, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+tri, Tet
HC 626	0,259	Fraca	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Mup, Ox, Pen, Rif, Sul+tri, Tet
HC 748	0,193	Fraca	+	+	+	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
HC 991	0,190	Fraca	+	+	+	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
HC 942	0,634	Moderada	+	+	+	Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Rif, Tet
HC 1520	0,500	Moderada	+	+	+	Eri, Ox, Pen, Tet
HC 1515	0,382	Moderada	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 1588b	0,602	Moderada	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Mup, Ox, Pen, Rif, Sul+tri, Tet
HC 588	1,600	Forte	+	+	+	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
HC 922	1,740	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn Ox, Pen, Rif, Sul+Tri
HC 322	0,749	Forte	+	+	+	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
HC 360	2,025	Forte	+	+	+	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
HC 541	1,766	Forte	+	+	+	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
HC 598	0,780	Forte	+	+	+	Cli, Eri, Gn, Ox, Pen
HC 600	2,161	Forte	+	+	+	Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 945	0,848	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 1111	2,208	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 1497	1,860	Forte	+	+	+	Clo, Eri, Ox, Pen, Rif
HC 198	1,200	Forte	+	+	+	Cip, Clo, Eri, Ox, Pen
HC 464	1,550	Forte	+	+	+	Cip, Clo, Eri, Ox, Pen

a: U.B. : Unidade de Biofilme. O biofilme foi testado em superfícies de poliestireno conforme Materiais e Métodos.

b: Cip: Ciprofloxacino, Cli: clindamicina, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Gn: gentamicina, Mup: mupirocina, Ox: oxacilina, Pen: penicilina, Rif: rifampicina, Sul+tri: sulfametoxazol+trimetoprima, Tet: tetraciclina.

Tabela 6 – Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap*, e perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isoladas da nasofaringe de contactantes domiciliares de um sistema de *home care*.

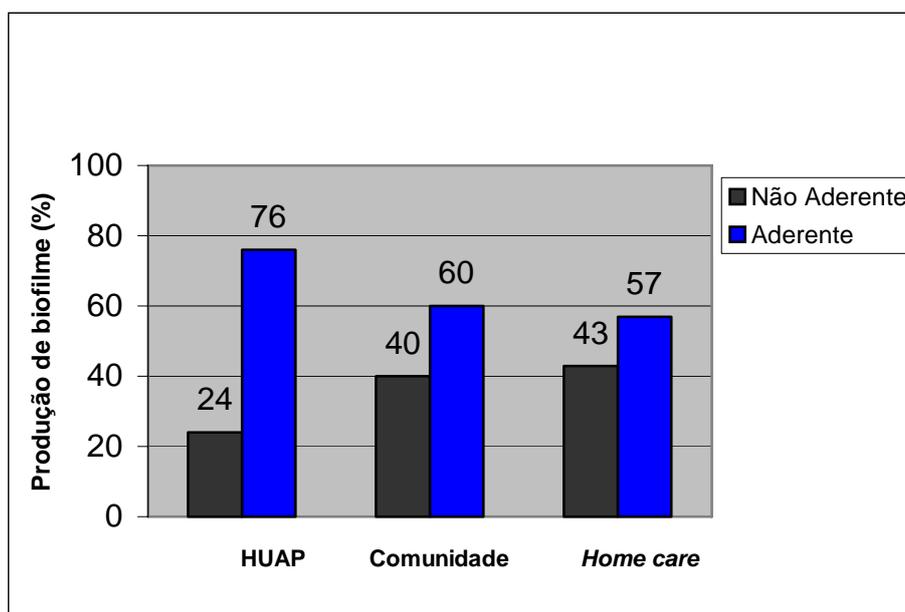
Cepas	U.B. ^a	Aderência	<i>icaAD</i>	<i>atlE</i>	<i>aap</i>	Perfil de resistência a antimicrobianos ^b
HC 280	0,170	Não adere	-	-	-	Cip,Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 329	0,169	Não adere	+	-	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 371	0,133	Não adere	-	+	-	Ox, Pen, Tet
HC 199	0,102	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Eri, Ox, Pen
HC 281	0,136	Não adere	-	-	-	Eri, Ox, Pen
HC 282	0,144	Não adere	-	-	-	Gn, Eri, Ox, Pen
HC 1045g	0,036	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 412	0,029	Não adere	-	-	-	Clo, Eri, Gn, Ox, Pen
HC 522	0,108	Não adere	-	-	-	Clo, Eri, Ox, Pen, Tet
HC 546	0,109	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Tet
HC 686	0,156	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Tet
HC 730	0,112	Não adere	-	-	-	Ox, Pen, Tet
HC 1380	0,179	Não adere	-	-	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 505	0,205	Fraca	+	-	-	Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri, Tet,
HC 195	0,199	Fraca	+	-	-	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 543	0,213	Fraca	+	+	+	Ox, Pen, Tet
HC 619	0,510	Moderada	+	+	-	Cli, Clo, Eri, Cip, Gn, Ox, Pen, Rif , Sul+tri, Tet
HC 531	0,502	Moderado	+	+	-	Cip, Ox, Pen
HC 342	0,468	Moderada	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Rif,
HC 331	0,806	Forte	+	+	+	Cip Cli,, Clo, Ox, Pen, Sul+tri
HC 1100	0,806	Forte	+	+	+	Cli, Eri, Ox, Pen, Rif
HC 179	0,760	Forte	+	+	+	Cip, Gn, Ox, Pen, Sul+tri
HC 319	0,825	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Gn, Ox, Pen, Sul+tri
HC 509	1,606	Forte	+	+	+	Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Tet
HC 637b	0,932	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Clo, Eri, Ox, Pen, Rif, Sul+tri
HC 897a	1,248	Forte	+	+	+	Cli, Clo, Gn, Ox, Pen, Sul+tri
HC 1108p	2,026	Forte	+	+	+	Cli, Cip, Eri, Ox, Pen, Rif
HC 1108g	2,093	Forte	+	+	+	Cli, Cip, Eri, Ox, Pen, Rif
HC 611	0,914	Forte	+	+	+	Cip, Cli, Gn, Ox, Pen, Rif

a: U.B. : Unidade de Biofilme. O biofilme foi testado em superfícies de poliestireno conforme Materiais e Métodos.

b: Cip: Ciprofloxacino, Cli: clindamicina, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Gn: gentamicina, Mup: mupirocina, Ox: oxacilina, Pen: penicilina, Rif: rifampicina, Sul+tri: sulfametoxazol+trimetoprima, Tet: tetraciclina.

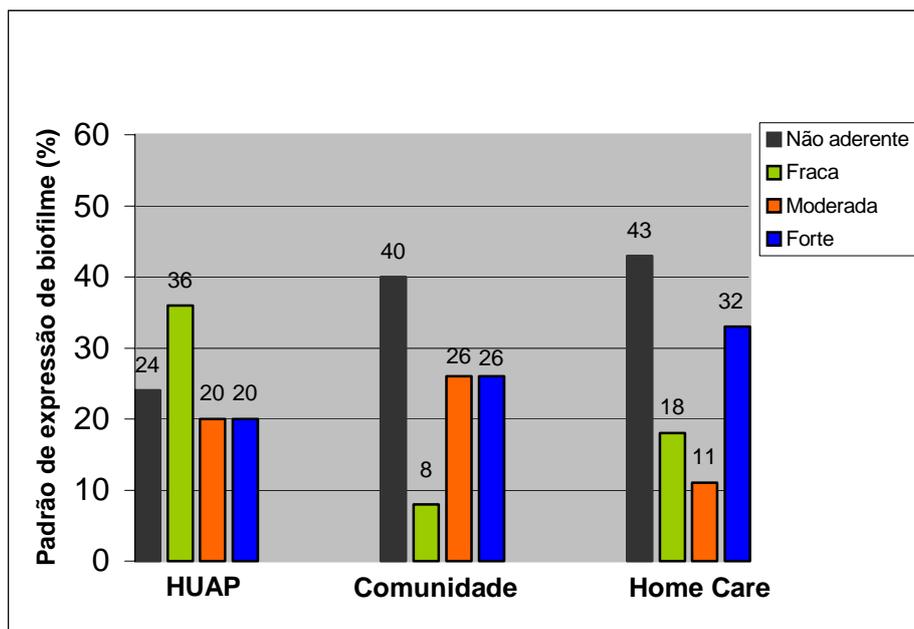
8.2 Figuras

Figura 1- Produção de biofilme pelas cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) nas diferentes populações estudadas.



Nota: HUAP: Hospital Universitário Antônio Pedro; Comunidade: Indivíduos sãos da comunidade; *Home care*: pacientes, profissionais de saúde e contactantes domiciliares de um sistema de *home care*.

Figura 2 - Padrão da expressão de biofilme das cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) nas diferentes populações estudadas.



Nota: HUAP: Hospital Universitário Antonio Pedro; Comunidade: Indivíduos sãos da comunidade e *Home care*: pacientes, profissionais de saúde e contactantes domiciliares de um sistema de *home care*.

Figura 3 – Produção de biofilme sobre superfície de poliestireno por cepas representativas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE).

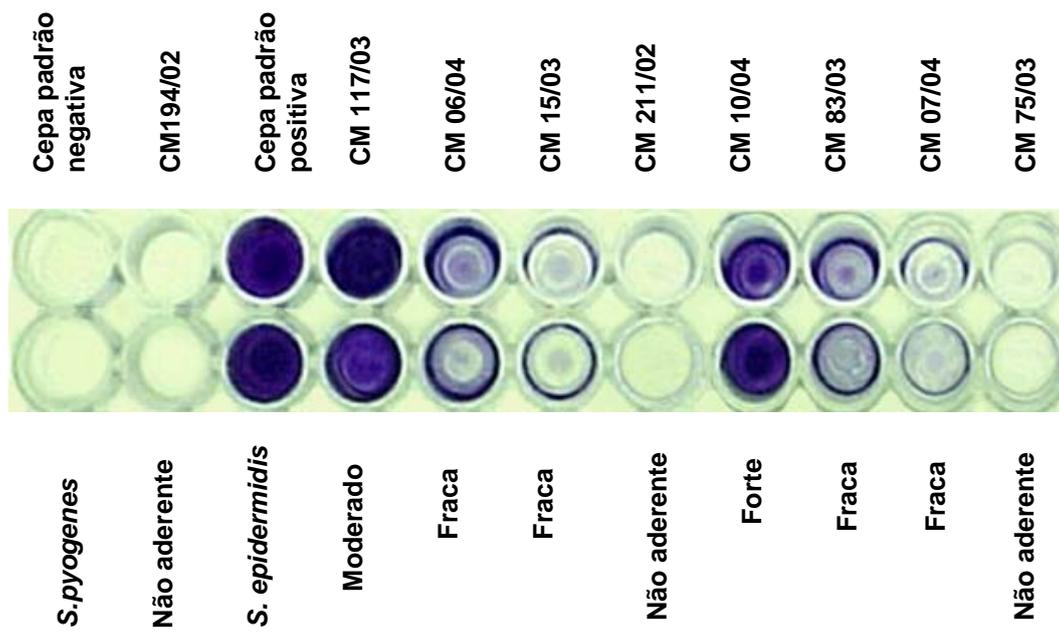
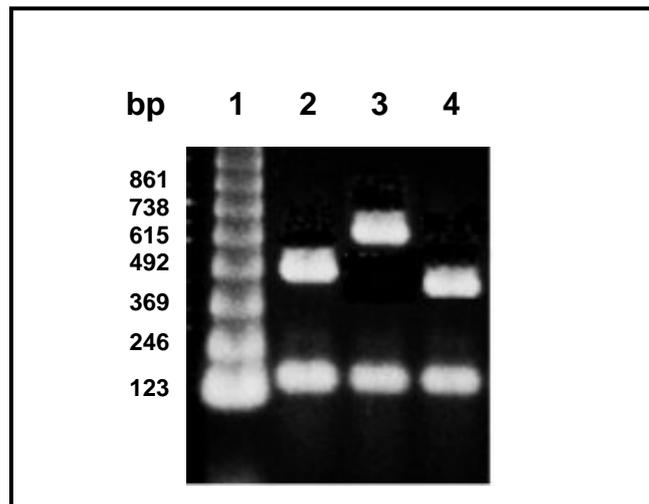


Figura 4A - Amplificação dos genes *icaAD*, *atIE* e *aap* em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilina (MRSE) através da reação em cadeia da polimerase.



Nota: Linha 1, padrão 123 *molecular size marker*; Linha 2, genes *icaAD* (496bp) e *mecA* (160bp); Linha 3, genes *aap* (719bp) e *mecA* (160bp); Linha 4, genes *atIE* (480bp) e *mecA* (160bp).

Figura 4B – Detecção do gene *icaAD* em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilina (MRSE), através da técnica de hibridização por *dot blot*, utilizando uma sonda específica para este gene.

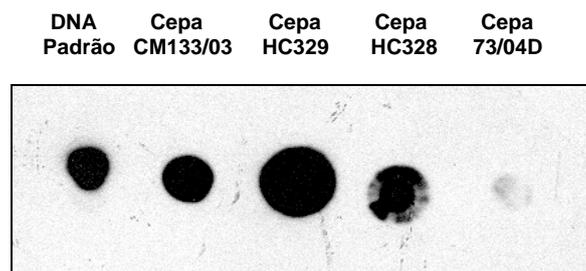
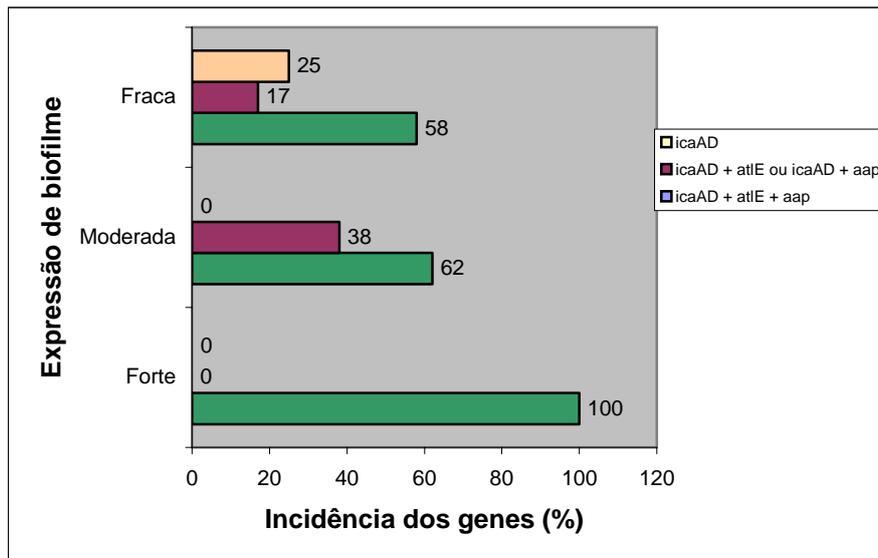


Figura 5 - Incidência dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap* em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) produtoras de biofilme.



Nota: A detecção dos referidos genes foi realizada através das técnicas de PCR e confirmada, caso necessária, por hibridização DNA/DNA.

Figura 6 - Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), isolados de pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro.

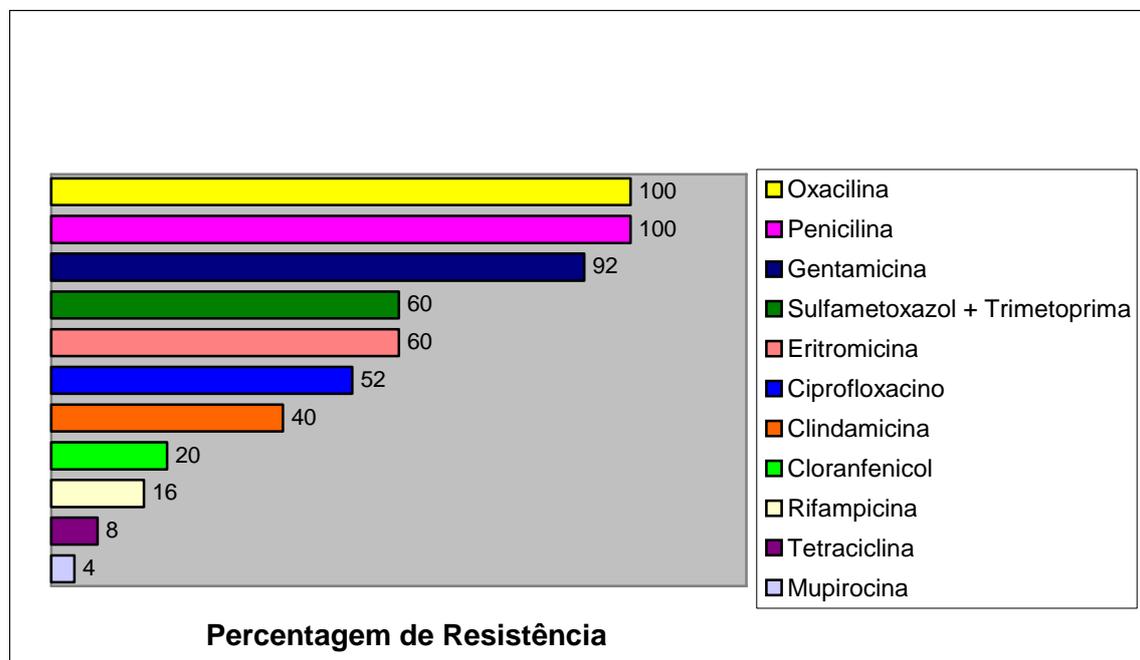


Figura 7 – Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilina (MRSE), obtidos de indivíduos sãos da comunidade.

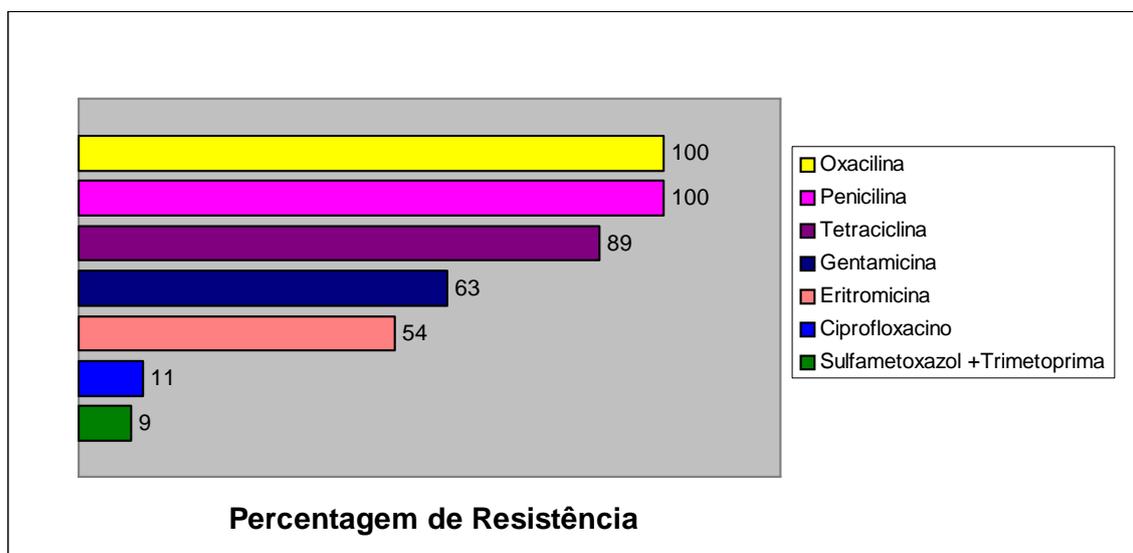


Figura 8 – Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), obtidos de pacientes de um sistema *home care*.

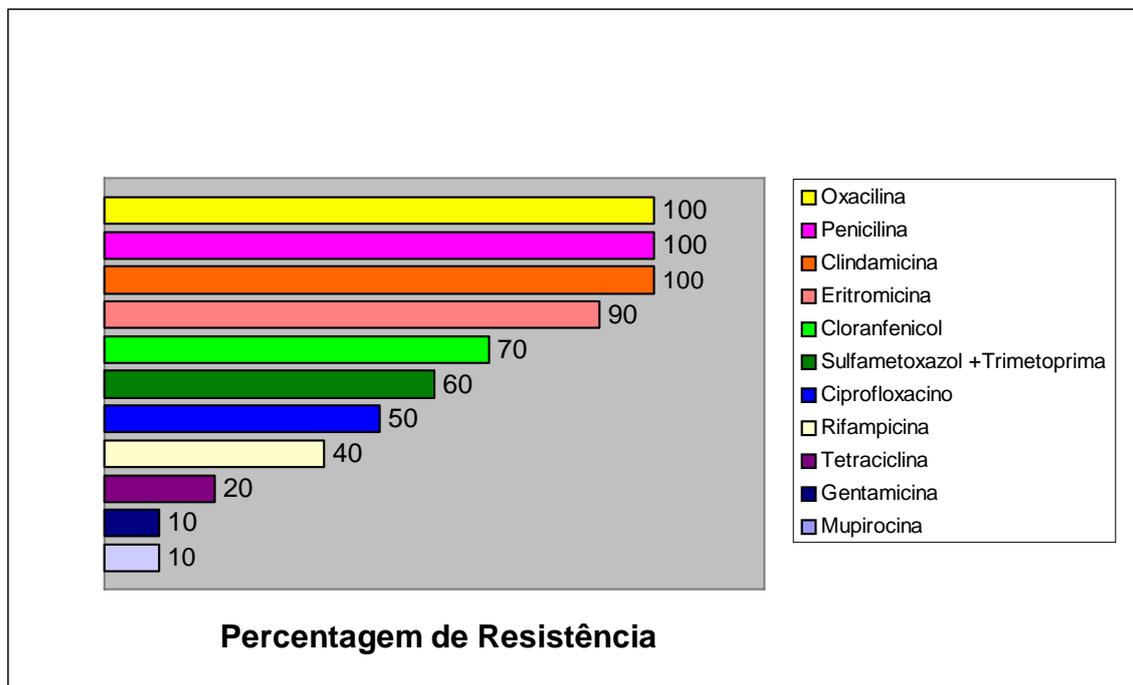


Figura 9 – Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilina (MRSE), obtidos de profissionais de saúde de um sistema *home care*.

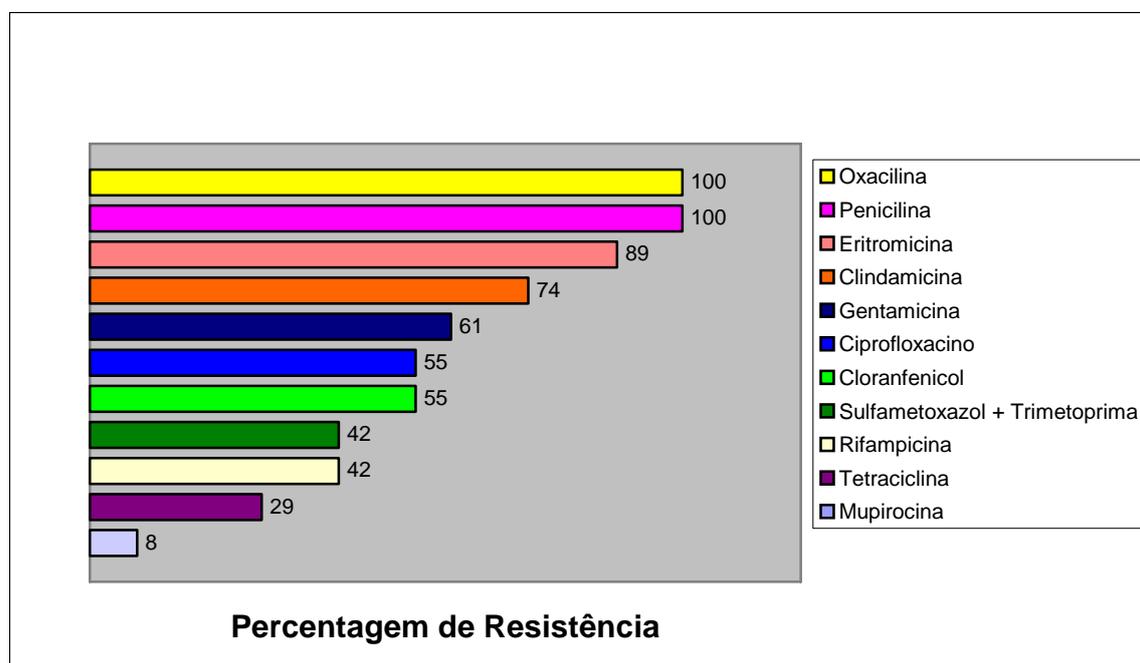


Figura 10 – Perfil de resistência a antimicrobianos dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilina (MRSE), obtidos de contactantes domiciliares de um sistema *home care*.

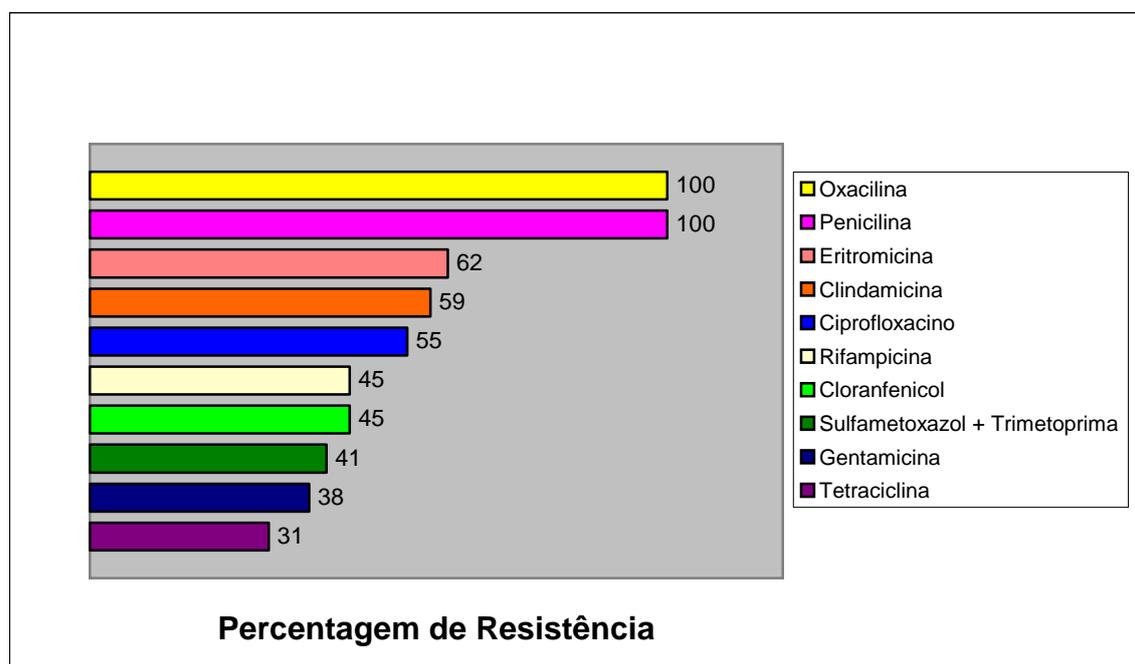


Figura 11 – Percentagens de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), que apresentaram diferenças significativas entre o grupo associado ao sistema de saúde (ASS) e associado a indivíduos sãos da comunidade (AC)

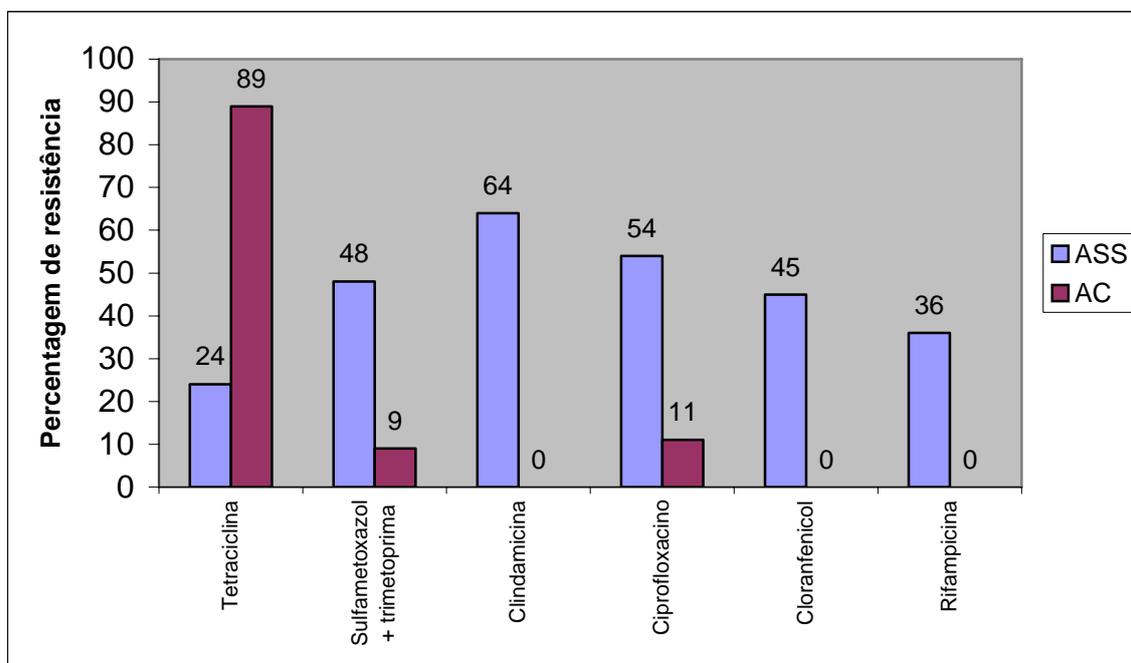
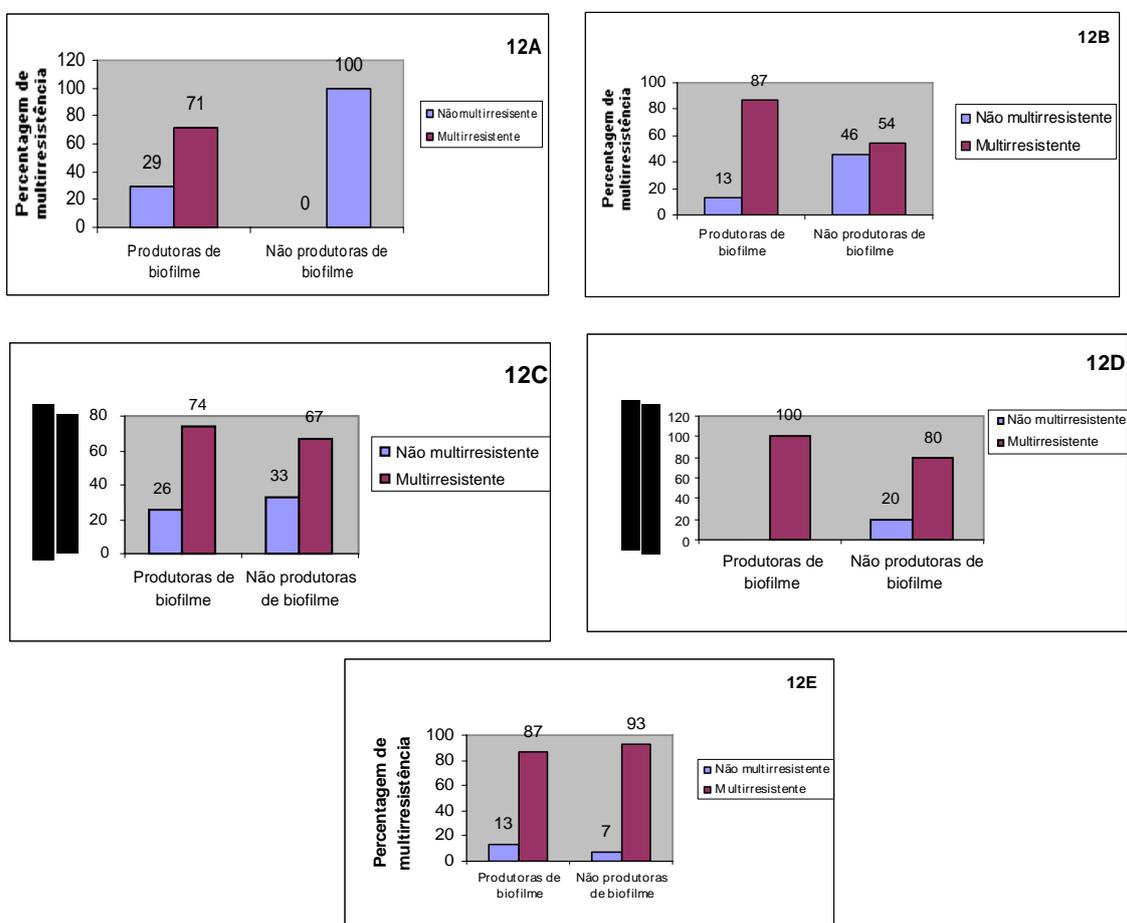


Figura 12 - Relação entre a produção de biofilme e multirresistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) isoladas de: (A) indivíduos sãos da comunidade, (B) contactantes domiciliares de um sistema *home care*, (C) pacientes do HUAP, (D) pacientes de um sistema *home care* e (E) profissionais de saúde de um sistema *home care*.



Nota: A produção de biofilme foi analisada em superfícies de poliestireno, conforme Materiais e Métodos.

9 ANEXO

9.1 Questionário

Projeto: Monitoramento epidemiológico de *Staphylococcus spp* e *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos utilizados na cidade de Niterói, RJ.

- Aprovado pelo CONEP da UFF em 27/06/01

Coordenadora: Dra. Lenise Arneiro Teixeira

Data:

Dados do Paciente:

Nome:

Idade:

Endereço:

Telefone:

Sexo:

Data de nascimento:

Local da coleta:

- 1. Fez ou faz uso de antimicrobiano com frequência?**
- 2. Qual o antimicrobiano usado? Por quê?**
- 3. Quando e por quanto tempo foi utilizado o antimicrobiano?**
- 4. Qual é a sua profissão? (do pai ou da mãe quando menor)**
- 5. Já trabalhou em hospital? Quando? Por quanto tempo?**
- 6. Comumente, tem contato com pessoas que freqüentam hospital?**
- 7. Já foi hospitalizado alguma vez? Durante quanto tempo? Quando? Por quê?**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)