

**MATHEUS FELIPE LEAL DE BARROS**

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA POR CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis* ISOLADOS DE  
HEMOCULTURAS EM HOSPITAIS PÚBLICOS DA CIDADE DO RIO DE  
JANEIRO**

**NITEROI**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**MATHEUS FELIPE LEAL DE BARROS**

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA POR CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis* ISOLADOS DE  
HEMOCULTURAS EM HOSPITAIS PÚBLICOS DA CIDADE DO RIO DE  
JANEIRO**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-  
Graduação em Microbiologia e Parasitologia  
Aplicadas da Universidade Federal  
Fluminense para a obtenção do título de  
Mestre**

**Orientador:** *Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira*

**NITEROI**

**2009**

**MATHEUS FELIPE LEAL DE BARROS**

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA POR CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis* ISOLADOS DE  
HEMOCULTURAS EM HOSPITAIS PÚBLICOS DA CIDADE DO RIO DE  
JANEIRO**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-  
Graduação em Microbiologia e Parasitologia  
Aplicadas da Universidade Federal  
Fluminense para a obtenção do título de  
Mestre**

**Aprovada em março de 2009.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lenise Arneiro Teixeira  
UFF**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana Rocha Barros  
UFF**

---

**Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira  
UERJ**

**NITEROI**

**2009**

## AGRADECIMENTOS

### Agradeço:

Ào Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira, pelo apoio e orientação;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lenise Arneiro Teixeira, por sua ajuda e colaboração;

A equipe do laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional do Câncer em especial a Bióloga Lucia Maria Dias de Faria e Aline Trevizan da Silva Mendes pela doação e separação das amostras;

Aos meus amigos do laboratório de Enteropatógenos e Microbiologia de Alimentos em especial a Cecília Matheus Guimarães e Raquel de Souza Sant'Ana por sua colaboração;

Ao Prof. Dr José augusto Adler Pereira pela doação das amostras do HUPE;

Ao meu Pai Sr Jose Roberto Fantinatti de Barros, pelo incentivo e auxilio durante esses anos;

A minha namorada Adriana O. Braz por sua ajuda e compreensão.

A Universidade Federal Fluminense e ao programa de pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicada pelo apoio financeiro.

"Nossa dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar."

(William Shakespeare)

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | 7  |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....   | 9  |
| RESUMO .....   | 11 |
| ABSTRACT .....   | 12 |
| 1.0 INTRODUÇÃO.....  | 13 |
| 2.0 OBJETIVOS.....   | 16 |
| 3.0 – Revisão Bibliográfica .....  | 17 |
| 3.1    Conceito de biofilme .....  | 17 |
| 3.2    Composição do biofilme.....   | 18 |
| 3.3    Formação dos biofilmes .....  | 20 |
| 3.4    Fatores que influenciam no desenvolvimento dos biofilmes.....             | 22 |
| 3.5    Efeitos do Biofilme nas diversas áreas.....                               | 24 |
| 3.6    Gênero Staphylococcus .....   | 25 |
| 3.7    Fatores que comandam a aderência dos SCN às superfícies.....              | 26 |
| 3.8    Outras proteínas que contribuem para a formação de biofilme.....          | 27 |
| 3.9    Variação da expressão do biofilme.....                                    | 28 |
| 3.10   Resistência antimicrobiana .....  | 29 |
| ✓ Resistência a Aminoglicosídeos .....   | 29 |
| ✓ Resistência a mupirocina .....   | 30 |
| ✓ Resistência as Oxazolidinonas .....  | 31 |
| ✓ Resistência a fluoroquinolonas.....  | 31 |
| ✓ Resistência a macrolídeos.....   | 31 |
| ✓ Resistência as estreptograminas .....  | 32 |
| ✓ Resistência a $\beta$ -lactâmicos.....   | 33 |
| ✓ Resistência aos glicopeptídeos .....   | 34 |
| 4.0 METODOLOGIA.....   | 36 |
| -Avaliação genotípica da formação de biofilme e resistência antimicrobiana ..... | 40 |
| 5.0 RESULTADOS .....   | 43 |
| 5.1- Perfil de resistência antimicrobiana .....                                  | 43 |
| 5.1.1 Amostras isoladas do HUPE .....  | 43 |
| 5.1.2 Amostras isoladas do INCA .....  | 44 |
| 5.2. – Perfil genético das amostras .....  | 45 |
| 5.2.1-Amostras provenientes do HUPE.....   | 45 |
| 5.2.2- Amostras provenientes do INCA .....                                       | 46 |
| 5.3. – Avaliação fenotípica da formação de biofilme.....                         | 49 |
| 5.3.1- Amostras provenientes do HUPE.....  | 49 |
| 5.3.2 – Amostras provenientes do INCA.....                                       | 51 |
| 5.4 – Associação entre multiresistência e formação de biofilme .....             | 52 |
| 5.5 – Avaliação da diversidade genética das amostras.....                        | 54 |
| 6.0 DISCUSSÃO.....   | 60 |
| 7.0 CONCLUSÃO.....   | 64 |
| 9.0 BIBLIOGRAFIA.....  | 65 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| AAC               | acetiltransferase   |
| Aap               | accumulation associated protein / proteína associada ao acúmulo                               |
| ANT               | adenililtransferase   |
| APH               | fosfotransferase  |
| AtIE              | Autolisina do <i>Staphylococcus epidermidis</i>   |
| Bap               | <i>Biofilm associated protein</i> / proteína associada ao biofilme                            |
| CDC               | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> / Centro de prevenção e controle de doenças |
| CIM               | Concentração Inibitória Mínima  |
| CLSI              | Clinical Laboratory Standards Institute   |
| CTI               | Centro de Tratamento Intensivo  |
| DNA               | Deoxyribonucleic acid / ácido dextrorribonucleico   |
| dNTP              | Deoxinucleotídios trifosfatados   |
| DO                | Densidade ótica   |
| EPS               | Extracelular Polymeric Substances / Substância polimérica extracelular                        |
| HUPE              | Hospital Universitário Pedro Ernesto  |
| <i>Ica</i>        | <i>Intercellular adhesin</i> / adesina intercelular   |
| IH                | Infecção Hospitalar   |
| INCA              | Instituto Nacional do câncer  |
| IRS               | isoleucil RNAt-sintetase  |
| <i>mecA</i>       | Gene que codifica resistência à meticilina/oxacilina  |
| mg                | Miligrama   |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de magnésio   |
| MIC / CIM         | Concentração Inibitória Mínima  |
| mL                | Mililitros  |
| MLS <sub>B</sub>  | Macrolídeos-lincosamidas -streptogramina B  |
| mM                | Milimolar   |
| mRNA              | <i>RNA</i> mensageiro   |
| PBP               | <i>Penicillin-Binding Protein</i> / proteína ligadora de penicilina                           |
| PBS               | Phosphate buffered saline / tampão salina fosfatada   |
| PCR               | <i>Polymerase Chain Reaction</i> / reação em cadeia da polimerase                             |
| pH                | Potencial hidrogeniônico  |



|             |  |
|-------------|--|
| PIA         | <i>Polissaccharide Intercellular Adhesin</i> /Adesina Intercelular polissacaridica |
| PS/A        | <i>Polissaccharide/Adhesin</i> / adesina polissacaridica                           |
| pSK         | plasmideo conjugativo  |
| RAPD        | Random Amplified Polymorphic DNA   |
| RJ          | Rio de Janeiro   |
| RNA         | <i>Ribonucleic acid</i> /acido ribonucleico  |
| rRNA        | <i>RNA ribosomal</i>   |
| SCN         | Staphylococcus coagulase negativo  |
| Tn          | transposon   |
| tRNA        | <i>RNA transportador</i>   |
| TSA         | Trypticase Soy Agar /Agar tripticase de soja                                       |
| TSB         | Trypticase Soy Broth / caldo tripticase de soja                                    |
| <i>vanA</i> | Gene que codifica a resistência à vancomicina                                      |
| <i>vgaA</i> | Gene que codifica Resistência à estreptogramina A                                  |
| VISA        | <i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina intermediaria                             |
| VRSA        | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina                              |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Acumulação de biofilme ao longo do tempo  | 20 |
| Figura 2 - Principais processos envolvidos na formação de um biofilme  | 21 |
| Figura 3 - operon <i>ica</i> e as possíveis regiões de inserção de IS256   | 28 |
| Tabela 1 - Condições da reação de PCR  | 41 |
| Gráfico 1 - Percentual de amostras resistentes de <i>S.epidermidis</i> isoladas no Hospital Universitário Antonio Pedro, 2005  | 43 |
| Gráfico 2 - Percentual de amostras resistentes de <i>S.epidermidis</i> isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008  | 44 |
| Quadro 1 - Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras de <i>S.epidermidis</i> isoladas no Hospital Universitário Antonio Pedro,2005  | 45 |
| Gráfico 3 - Perfil genético das amostras de <i>S.epidermidis</i> isoladas no Hospital Universitário Antonio Pedro, 2005  | 46 |
| Gráfico 4 - Percentual de amostras positivas para genes associados a resistência e formação de biofilme.   | 47 |
| Quadro 2 - Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras de <i>S. epidermidis</i> isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008  | 48 |
| Quadro 3 - Classificação das amostras de <i>S. epidermidis</i> isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto,2005 segundo métodos fenotípicos para avaliação da formação de biofilme. | 49 |
| Gráfico 5 - Aderência de amostras de <i>S.epidermidis</i> isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2005, segundo a metodologia empregada.                                       | 50 |
| Gráfico 6 - Aderência de amostras de <i>S.epidermidis</i> isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2005, segundo a variação de intensidade                                      | 50 |
| Grafico7 - Comparação fenotípica de aderência por classificação de amostras isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008   | 51 |
| Gráfico 8 - Comparação fenotípica de aderência por metodologia das amostras isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008   | 52 |
| Quadro 4 - Associação entre a multirresistência e a capacidade de formação de biofilme.  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| Quadro 5 - Classificação das amostras segundo métodos fenotípicos para avaliação da formação de biofilme isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008 | 53 |
| Quadro 6 - Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras pertencentes ao tipo I  | 54 |
| Quadro 7 - Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras pertencentes ao tipo II   | 55 |
| Quadro 8 - Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras pertencentes ao tipo IV   | 56 |
| Quadro 9 - Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras pertencentes ao tipo VIII   | 57 |
| Figura 4 - Dendrograma mostrando a similaridade genética entre as amostras  | 58 |
| Figura 5 : Foto ilustrativa amplificação de RAPD com o primer 1252 amostras INCA  | 59 |
| Figura 6: Foto ilustrativa amplificação de RAPD com o primer 1254 amostras INCA   | 59 |

## RESUMO

*Staphylococcus epidermidis* está envolvido em infecções associadas a dispositivos médicos e sepse hospitalar. Sua capacidade de causar quadros persistentes e recorrentes se relaciona à formação de biofilmes, em superfícies inertes, como cateteres e próteses. A formação de biofilme é considerada o principal fator de virulência destas amostras, protegendo as células dos mecanismos de defesa do hospedeiro e da ação de antimicrobianos. O operon *ica* codifica um polissacarídeo extracelular de aderência, associado à formação de biofilme. Entretanto, amostras *ica*-negativas podem formar biofilme de maneira menos intensa, devido à presença de outras estruturas envolvidas na aderência tais como as proteínas codificadas pelos genes *atlE* (proteína envolvida na aderência inicial) *aap* (proteína associada a acúmulo) e *bap* (proteína associada ao biofilme) Outro fator importante nas infecções estafilocócicas é a multirresistência a antimicrobianos, em especial à oxacilina, codificada pelo gene *mecA*. **Objetivo:** detectar, em isolados de *S. epidermidis* oriundos de hemocultura, a presença dos genes *icaAD*, *atlE*, *aap*, *bap*, além do gene *mecA* e do perfil de susceptibilidade antimicrobiana. Neste estudo foram analisadas 76 amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemocultura, 60 de pacientes internados no Instituto Nacional do Câncer, RJ, e 16 internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), RJ. Foram testados 13 (treze) antibióticos pelo método de disco difusão de acordo com as regras do CLSI. Ensaios de PCR foram utilizados para a detecção dos genes. Das amostras estudadas 69 (90,7%) amostras foram resistentes a penicilina, 52 (68,4%) a oxacilina, 51 (67,1%) a eritromicina, 40 (52,6%) a gentamicina, 39 (51,3%) a clindamicina e ciprofloxacina, 28 (36,8%) a cloranfenicol, 16 (21%) a tetraciclina, 15 (19,7%) a mupirocina, 7 (9,2%) a rifampicina, 5 (6,6%) a teicoplanina e não foi detectada resistência a linezolida e vancomicina. 68,4% das amostras apresentaram positividade para o gene *mecA*, 89,5% para *atlE*, 38,1% para *aap* e *icaAD* e 3,9% foram positivas para o gene *bap*. Os ensaios de RAPD revelaram a diversidade das amostras dispostas em 25 tipos, no entanto, 43 (56,6%) das amostras se agruparam em quatro tipos principais.

## ABSTRACT

*Staphylococcus epidermidis* is involved in infections associated with medical devices and hospital sepsis. Their ability to cause persistent and reinicident infections is related to formation biofilms on inert surfaces such as catheters and prostheses. The formation of biofilms is considered the main virulence factor of these samples, protecting the cells of the host's defense mechanisms and the action of antimicrobials. The *ica* operon encodes an extracellular polysaccharide of adherence, associated with the formation of biofilms. However, *Ica* negative samples can form a less intense biofilms, due to the presence of other structures involved in adhesion such as the proteins encoded by genes *atle* (protein involved in initial adhesion) *aap* (protein associated with accumulation) and *bap* (biofilm associated protein ) Another important factor in staphylococcal infections is the multi drug resistance especially to oxacillin, encoded by the gene *mecA*. Objective: To detect, in isolates of *S. epidermidis* from blood culture, the presence of genes *icaAD*, *Atle*, *aap*, *bap*, and also the *mecA* gene and the antimicrobial susceptibility profile. This study analyzed 76 samples of *S. epidermidis* isolated from blood, 60 from patients at the Instituto Nacional do Câncer (INCA), RJ, and 16 at the Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), RJ. Thirteen antibiotics were tested by disk diffusion method according to the rules of the CLSI. PCR tests were used for the detection of genes. A total of 69 (90.7%) samples were resistant to penicillin, 52 (68.4%) to oxacillin, 51 (67.1%) to erythromycin, 40 (52.6%) to gentamicin, 39 (51, 3%) to clindamycin and ciprofloxacin, 28 (36.8%) to chloramphenicol, 16 (21%) to tetracycline, 15 (19.7%) to mupirocin, 7 (9.2%) to rifampicin, and 5 (6, 6%) to teicoplanin. Was not detected resistance to vancomycin and linezolid. 68.4% of samples were positive for the *mecA* gene, 89, 5% for *atle*, 38.1% for *aap* and *icaAD* and 3.9% were positive for the gene *bap*. RAPD Tests demonstrated the diversity of the samples prepared in 25 RAPD types, however, 43 (56.6%) of the samples are grouped into four main types.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes nos mais diversos habitats e são capazes de desenvolverem comportamentos bastante complexos. No ambiente aquoso apresentam-se na forma planctônica e na forma sésil. Na forma planctônica o microrganismo encontra-se em suspensão e dispersos no meio aquoso, enquanto que, na forma sésil encontram-se aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1987; CHARACKLIS *et al.*, 1989).

Um dos primeiros relatos científicos que associaram a produção de uma substância mucóide, conhecida como biofilme, produzida por estafilococos, como um possível fator de colonização foi o de Bayston e Penny em 1972, onde os autores reconheciam este produto formado como um dos fatores de virulência produzido por *Staphylococcus epidermidis* em uma amostra isolada de líquido cefalorraquidiano (CHRISTENSEN *et al.*, 1982).

Biofilme pode ser definido como uma matriz polimérica, gelatinosa aderida a uma superfície sólida, absorvente e porosa, normalmente imersa em meio líquido. É constituído principalmente por água, por substâncias poliméricas e em menor quantidade pelos microrganismos, tais como o *S. epidermidis*.

O gênero *Staphylococcus* é o mais importante membro da família Staphylococcaceae, constituída por cocos (0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$ ), Gram positivos que podem ser encontrados isolados, aos pares ou em grupamentos irregulares. São imóveis e não esporulados. São anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos com metabolismo fermentativo e respiratório. Estão associados à pele e membranas mucosas de animais vertebrados de sangue quente, podendo ser eventualmente isolados de produtos alimentares, poeira e água. Muitas espécies são patogênicas para o homem e animais.

O encontro de *Staphylococcus* sp. nos diferentes sítios anatômicos pode estar ou não envolvido em processos patológicos no hospedeiro. Análises de amostras clínicas, tais como trato respiratório, trato geniturinário, pele e olho demonstram que estes microrganismos são comumente encontrados em amostras clínicas e quando presentes podem estar envolvidos na produção de doenças. (BANNERMAN, 2003).

O *S. epidermidis* é o principal *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN) encontrado em amostras clínicas e as infecções causadas por este microrganismo são bastante variadas.

Eles estão comumente associados à formação de biofilme nos diversos tipos de dispositivos intracorpóreos. O agrupamento destes microorganismos em biofilme pode ainda, aumentar a resistência às drogas antimicrobianas, por dificultar a penetração das substâncias ativas.

A patogenicidade de *S. epidermidis* também está associada com a alta resistência aos antimicrobianos, principalmente à oxacilina, um beta-lactâmico, onde em alguns estudos tem sido descrita em 80% dos isolados clínicos (MICHELIM 2005). Esta resistência envolve a produção de uma nova proteína ligadora de penicilina (PBP, do inglês: “Penicillin- Binding Protein”).

Os estafilococos possuem cinco PBPs. As PBPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP 2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos. Esta proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos estafilococos meticilina a todos os antibióticos beta-lactâmicos (Chambers 1997).

Os estafilococos adquiriram resistência a praticamente todos os antibióticos disponíveis. Esta múltipla resistência está, certamente, relacionada à pressão seletiva exercida pela difusão de uso de drogas antimicrobianas no hospital.

De acordo com BOUZA (2002), as infecções associadas ao uso de dispositivos intravasculares representam de 10 a 20% de todas as infecções nosocomiais, causando aumento na taxa de mortalidade entre pacientes internados. A contaminação destes materiais acarreta grande prejuízo tanto ao paciente quanto à instituição, pois aumenta o tempo de permanência hospitalar e retarda o tratamento da doença de base ao qual foi o motivo de internação.

Segundo AGVALD – ÖHMAN (2004), o aumento no uso de cateteres intravasculares e de hemodiálise, próteses de válvulas cardíacas e de outros materiais implantados favorece o surgimento de infecções importantes causadas por SCN. Os pacientes mais vulneráveis a esse tipo de infecção são aqueles internados em unidades de terapia intensiva, unidades de

transplante e oncologia, já que na maioria das vezes são submetidos a tais procedimentos, além da imunossupressão e o uso de antimicrobianos de amplo espectro tornar estes pacientes especialmente vulneráveis.

A associação dos fenótipos de multirresistência e formação de biofilme entre amostras de SCN é um fator relevante que vem sendo investigado de modo crescente, principalmente em amostras de origem hospitalar. Adicionalmente abordagens que envolvam a avaliação de similaridade genética das amostras isoladas permitem inferências sobre a origem e dispersão destas amostras dentro e entre unidades hospitalares.



## 2.0 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a formação de biofilme e o perfil de resistência antimicrobiana de cepas nosocomiais de *S. epidermidis* isoladas de hemocultura.

O alcance deste objetivo desdobrou-se nos seguintes objetivos específicos:

- i) Avaliar comparativamente a capacidade de formação de biofilme entre cepas de *S. epidermidis* em dois hospitais públicos da cidade do Rio de Janeiro, perante a seis métodos fenotípicos;
- ii) Identificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas estudadas;
- iii) Pesquisar a ocorrência de genes associados à resistência antimicrobiana e a produção de biofilme;
- iv) Avaliar a associação entre a multirresistência e a capacidade de formação de biofilme;
- v) Avaliar a similaridade genética entre as cepas estudadas.

### **3.0 – Revisão Bibliográfica**

#### **3.1 Conceito de biofilme**

Existem várias definições de biofilme, mas no geral, estes podem ser definidos como sendo uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido e que é, essencialmente, constituída por um aglomerado de células microbianas, por água e pelos seus produtos de excreção (substâncias poliméricas extracelulares) (ALLISON, 2003; SUTHERLAND *et al.*, 2001). Um biofilme é considerado uma estrutura muito adsorvente e porosa (possui canais de água e poros) devido a ser constituído essencialmente por água (80 a 95% de água). Os microrganismos representam somente uma parte da massa de biofilme que, freqüentemente, é menor que 10%. As substâncias poliméricas extracelulares (“Extracellular Polymeric Substances” - EPS) formam um emaranhado que envolve todas as células microbianas representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme.

No que diz respeito ao crescimento e a capacidade para resistir aos agentes biocidas, os microrganismos associados em biofilmes exibem um comportamento diferente daqueles na forma planctônica. Os mecanismos responsáveis pela resistência das bactérias dos biofilmes aos agentes antimicrobianos podem estar relacionados com limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular. (DONLAN & COSTERTON, 2002; GILBERT *et al.*, 2003).

Estima-se que mais de 90% dos microrganismos vivam sob a forma de biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1987) e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por bactérias (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990).

### 3.2 Composição do biofilme

A composição dos biofilmes é dependente das condições do meio (como a temperatura, composição do meio, pressão, pH e oxigênio dissolvido) (FLEMMING, 1991; O'TOOLE *et al.*, 2000) e são tipicamente constituídos por água, microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas. (CHARACKLIS, 1981).

A água é a fração mais significativa da massa total do biofilme, podendo variar entre 80 a 95% da massa total do biofilme (FLEMMING, 1996). Outros autores (CHRISTENSEN e CHARACKLIS, 1990; NEU, 1994; AZEREDO E OLIVEIRA, 2000), referem que a razão massa de água/massa de biofilme pode ser até próximo de 99% ou mesmo atingir valores superiores.

A matriz polimérica é a responsável pela morfologia, estrutura, coesão, integridade funcional dos biofilmes e a sua composição determinam a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (FLEMMING e WINGENDER, 1999).

De acordo com alguns autores esta matriz tem o potencial de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes (ELVERS e LAPPIN-SCOTT, 2000; GILBERT *et al.*, 1997; ALLISON, 2003).

Os microrganismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme (freqüentemente, menos de 10%), embora excretem as substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca do biofilme. Segundo FLEMMING (1993), as substâncias poliméricas extracelulares, vulgarmente designadas EPS, representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme. Já BAKKE *et al.* (1984) afirmam que a fração de EPS pode variar entre 50 e 90 % do total da matéria orgânica dos biofilmes.

Dos microrganismos freqüentemente encontrados num biofilme, bactérias são o grupo predominante. As elevadas taxas de reprodução, a grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares, são as principais características que fazem das bactérias organismos com grandes capacidades de produção de biofilme (CHARACKLIS *et al.*, 1990). *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, são os

gêneros mais comuns de bactérias produtoras de biofilme ainda que umas apresentem, naturalmente, uma maior aptidão que outras (Mattila-Sandholm, 1992; Wirtanen, 1995).

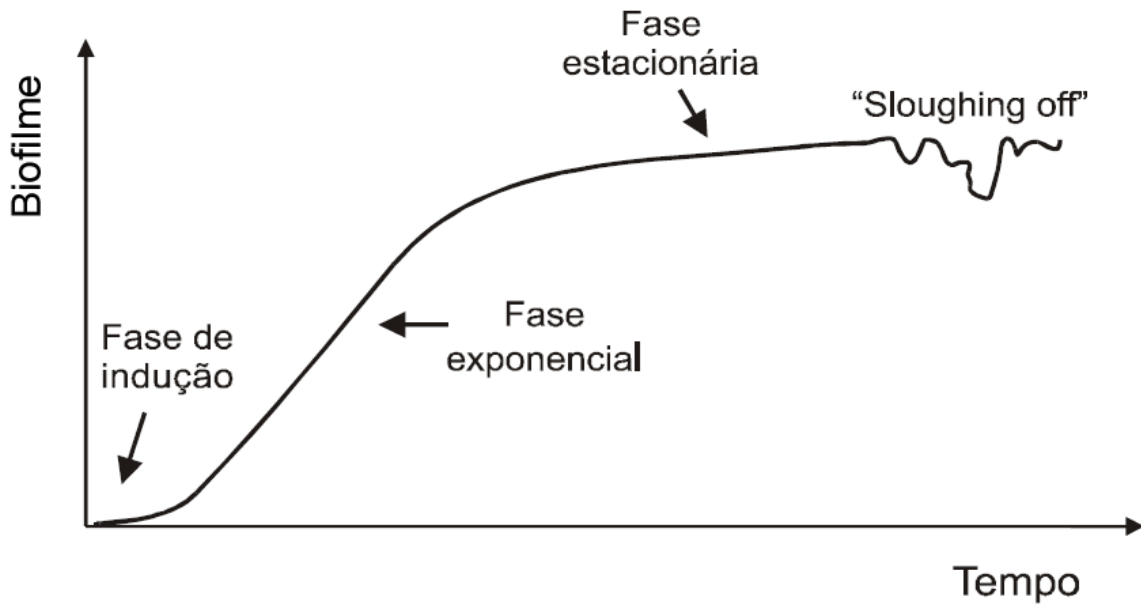
É enorme a diversidade de espécies microbianas que podem estar presentes nos biofilmes, tanto nos habitats naturais quanto nos criados pelo homem. Microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus são microrganismos freqüentemente encontrados em biofilmes (CHARACKLIS *et al.*, 1990), ainda que sejam as células bacterianas a predominar, mercê da sua maior versatilidade e resistência

Os polímeros extracelulares sintetizados pelos microrganismos constituem uma matriz de aspecto gelatinoso, fortemente hidratada, à qual COSTERTON (1978) apelidou de *glicocálice*. Estes polímeros extracelulares podem envolver firmemente cada uma das células como uma discreta camada de cobertura – *cápsula* – ou formarem filamentos que se estendem das células à medida que vão sendo produzidos, constituindo um emaranhado agregador das células constituintes do biofilme (designado, por vezes, por “slime”).

A composição química das EPS é muito heterogênea e complexa. Ainda que, de uma maneira geral, sejam os polissacarídeos a predominar (HORAN E ECCLES, 1986; WIMPENNY *et al.*, 1993), a matriz polimérica pode também ser constituída por proteínas, substâncias húmicas, ácidos nucléicos (DNA, RNA), (JAHN e NIELSEN, 1995), glicoproteínas, fosfolípidios (GEHRKE *et al.*, 1998), etc. HORAN e ECCLES (1986) referem-se que polissacarídeos podem constituir até 65% das EPS totais. Em estudos mais recentes, com biofilmes de *Pseudomonas putida*, JAHN *et al.* (1999) afirmam que são as proteínas a maior fração das EPS (até 75%) extraídas dos referidos biofilmes. Esta discrepância de valores constitui um indício inequívoco de que ainda há muito trabalho a realizar nesta área, não cabendo, porém, no âmbito do presente trabalho.

### 3.3 Formação dos biofilmes

De acordo com BOTT (1993), a acumulação de biofilme é um processo natural, que ocorre segundo um padrão sigmoidal (Figura 1), como resultado de um balanço entre vários processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem em simultâneo.



**Figura 1 - Acumulação de biofilme ao longo do tempo (PEREIRA, 2001).**

Os principais processos envolvidos na formação de um biofilme sobre uma superfície sólida em contato com um meio líquido são (Figura 2):

1- Adsorção de substâncias orgânicas dissolvidas a uma superfície sólida em contato com um meio aquoso, formando-se um “filme condicionador”;

2- Transporte de microrganismos e outras partículas do meio aquoso para a superfície sólida condicionada;

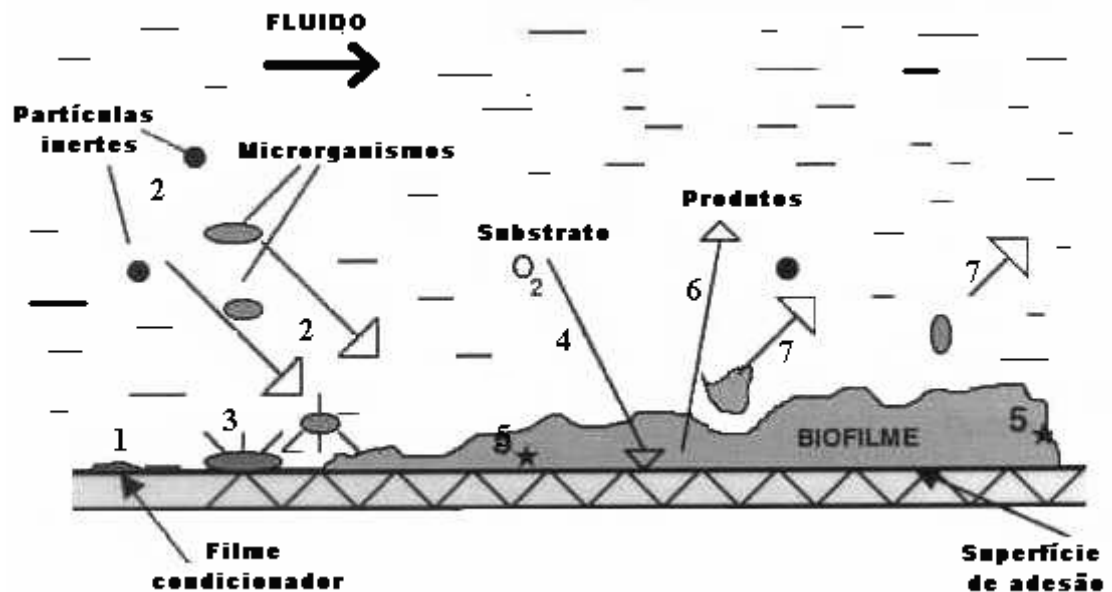
3- Adesão firme dos microrganismos à superfície;

4- Transporte de nutrientes da fase líquida para a interface líquido-biofilme, bem como no interior do filme microbiano;

5- Produção de biofilme devido ao consumo dos nutrientes, conseqüente crescimento e reprodução dos microrganismos aderidos e síntese de polímeros extracelulares;

6- Transporte de subprodutos do biofilme para o exterior;

7- Desprendimentos de porções de biofilme devido a fenômenos de erosão superficial ou descolamento súbito (“sloughing off”).



**Figura 2 - Principais processos envolvidos na formação de um biofilme (PEREIRA, 2001).**

Cada um destes processos contribui para o aumento (processos de deposição ou ganho) ou para a diminuição (processos de remoção, desprendimento ou perda) da quantidade de biomassa acumulada numa determinada superfície sólida, sendo o desenvolvimento de biofilme intimamente dependente, em cada instante do balanço entre os ganhos e as perdas de biomassa (GJALTEMA, 1996).

As condições hidrodinâmicas do meio líquido circundante influenciam todos os processos envolvidos no desenvolvimento do biofilme, pelo que, naturalmente, em fases específicas do desenvolvimento do biofilme, um dos processos (de deposição ou de remoção) pode predominar sobre os restantes, tornando-se o processo controlador do fenômeno global. Os processos que intervêm no crescimento biológico do biofilme estão associados aos mecanismos de transferência de massa do seio do líquido para a superfície do biofilme, que podem ocorrer por difusão molecular quando o fluido está estagnado ou escoar em regime

laminar, ou difusão turbulenta e convecção forçada quando o escoamento se dá em regime turbulento, seguidos de transporte no interior do biofilme e reação biológica (MELO, 1994). Como a maioria dos processos de desenvolvimento de biofilme ocorre de forma consecutiva, o processo mais lento influencia e limita a velocidade do processo global, tornando-se o processo limitante (CHARACKLIS, 1990).

A formação do “filme condicionador” ocorre rapidamente, após o transporte e adsorção à superfície sólida de íons e moléculas orgânicas dissolvidas no meio aquoso. Segundo MITTELMAN (1998), este é estabelecido nos primeiros 5 a 10 segundos após uma superfície sólida limpa ser colocada no meio aquoso. A velocidade de formação do “filme condicionador” é dependente da concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso e sua afinidade para o suporte sólido, das condições hidrodinâmicas do meio líquido (CHAMBERLAIN, 1992) e das características superficiais do suporte (carga superficial, energia livre de superfície, rugosidade) (MARSHALL e BLAINEY, 1990).

### **3.4 Fatores que influenciam no desenvolvimento dos biofilmes**

O desenvolvimento de um biofilme pode ser afetado por diversos fatores entre os quais se destacam:

- pH, temperatura;
- força iônica do meio;
- a velocidade de escoamento do líquido;
- a qualidade e concentração de nutrientes do meio líquido circundante;
- características dos microrganismos;
- material de construção e rugosidade da superfície sólida;
- presença de material particulado;
- presença de micronutrientes (magnésio, potássio, cálcio, sódio, etc.);
- presença de agentes antimicrobianos.

- presença de partículas inorgânicas.

O pH afeta a formação do biofilme, pois a maioria dos biofilmes naturais forma-se em valores de pH próximos da neutralidade. Desvios de pH para valores superiores ou inferiores a 7 irão, com certeza, afetar o desenvolvimento e atividade do biofilme (BOTT, 1995), pois o pH tem um efeito preponderante no metabolismo microbiano.

O pH também afeta as propriedades elétricas superficiais dos microrganismos e das superfícies sólidas, podendo aumentar ou diminuir a repulsão eletrostática entre as duas e deste modo interferir no processo de adesão.

O tipo de microrganismo afeta a formação de biofilmes porque se um microrganismo apresentar uma maior capacidade de produção de polímeros extracelulares, esse microrganismo irá aderir com maior facilidade a suportes sólidos por ligação entre as cadeias de polímeros situadas na parede do organismo e no suporte.

O tipo de material, composição e rugosidade são fatores importantes na formação de biofilme porque, em geral, as superfícies onde ocorre a deposição de microrganismos possuem irregularidades. Estudos efetuados permitiram concluir que a rugosidade e porosidade do suporte condicionam a adesão celular. A transferência de massa do seio do líquido para o suporte parece aumentar devido a uma intensificação da turbulência e/ou aumento da área de transferência de massa (VIEIRA, 1995). A rugosidade de uma superfície pode aumentar a retenção de microrganismos, pois proporciona locais de abrigo menos afetados pelas forças do fluido. Estudos demonstraram que suportes sólidos com poros de dimensões equivalentes a cerca de 4 a 5 vezes o comprimento dos microrganismos constituíam as melhores superfícies de adesão (VIEIRA, 1995). O efeito da rugosidade da superfície é importante quando ocorre a adesão da primeira camada de microrganismos, tendo menos influência quando uma superfície de adesão já tem biofilme formado.

Os efeitos de velocidade do líquido têm um papel significativo no desenvolvimento e estabilidade dos biofilmes (BOTT, 1993). A velocidade e turbulência da corrente líquida em contato com as superfícies sólidas interferem com os processos de adesão, transporte de nutrientes e de desprendimento dos microrganismos e, conseqüentemente, com o fenômeno de desenvolvimento do biofilme.



### 3.5 Efeitos do Biofilme nas diversas áreas

Os biofilmes podem ter efeitos prejudiciais em diversas áreas industriais bem como no meio ambiente e saúde.

Quando a produção de biofilme é indesejada, este é designado, freqüentemente, por “sujeira biológica” (em inglês, “biofouling”), podendo ocorrer em inúmeras situações, como nos permutadores de calor em centrais térmicas de produção de energia; circuitos de transporte de água (tubos, válvulas), diminuindo a qualidade da água (aumentando, conseqüentemente, os riscos da saúde pública); torres de arrefecimento, como nos equipamentos de processamento do leite (tanques de armazenagem, pasteurizadores), assim como na deterioração de diferentes superfícies de equipamentos (corrosão). No setor industrial, a principal conseqüência da “sujidade biológica” é econômica, devido à redução do desempenho dos processos, à diminuição da eficiência de operação dos equipamentos e aos danos nas superfícies sólidas onde se acumulam. Como tal há perdas de energia, verificando-se aumento no consumo energético e diminuição da qualidade dos produtos, bem como, despesas acrescidas de limpeza e manutenção através da substituição precoce de peças deterioradas dos equipamentos (CHARACKLIS, 1990).

Igualmente considerados indesejáveis e extremamente prejudiciais à saúde, são as películas bacterianas que se desenvolvem nos dentes, originando a cárie dentária e outras doenças da boca, nos pulmões, nos cateteres urinários, nos cateteres venosos, nas lentes de contato, podendo originar infecções graves, por exemplo, em tecidos (osteomielite e endocardite) e rejeições do material das próteses (COSTERTON *et al.*, 1987; MORTON e SURMAN, 1994; NEU, 1996).

### 3.6 Gênero *Staphylococcus*

*Staphylococcus* spp são membros da família Micrococcaceae e classificados como cocos Gram-positivos em forma de cacho, catalase-positivos, e podem ser divididos em dois grupos com base na produção da coagulase; as espécies coagulase-negativas são distinguidas de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) pela sua incapacidade de coagular plasma de coelho (WHITENER, 1993).

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

Entre seus representantes, *S. aureus* é a espécie mais virulenta e o patógeno mais importante, porém a incidência de infecções causadas por SCN vem aumentando em todo o mundo (SAKAI, 2004).

Os SCN são um dos mais importantes patógenos nosocomiais freqüentemente envolvidos em infecções associadas com corpos estranhos implantados. A aderência das bactérias ao polímero provavelmente ocorre pela contaminação com pequena quantidade de bactérias da microbiota endógena do paciente durante o implante do material (EIFF, 1999). O mecanismo pelo qual SCN interagem com o material protético e formam o que hoje é conhecido como biofilme ainda está sendo compreendido.

A formação do biofilme é considerada o principal fator de virulência dos SCN e as mais importantes infecções causadas por estes microrganismos são infecções envolvendo corpos estranhos, pois o biofilme confere proteção aos microrganismos contra mecanismos de defesa imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos (CAFISO, *et al*, 2004; MULDER e DEGENER, 1998; MICHELIM, 2005).

Os SCN são reconhecidos como clinicamente importantes, principalmente quando estão envolvidos em infecções de próteses e equipamentos médicos, uma vez que geram doenças graves e morte. No passado esta capacidade em causarem doença era inesperada,

principalmente por representarem um grupo de microrganismos considerados não virulentos (CHRISTENSEN *et al.*, 1982; 1993; CHRISTENSEN *et al.*, 1994).

Dados do “National Nosocomial Infection Surveillance System” revelaram que os SCN correspondem a 33,5 % das infecções de corrente sanguínea, sendo estes os microrganismos mais isolados. Em segundo lugar encontram-se *S. aureus* com 13,4 % e em terceiro lugar *Enterococcus sp* com 12,8 %. Esses dados de vigilância nacional demonstram ainda o aumento de resistência a antimicrobianos nos isolados de SCN, principalmente para oxacilina, onde, de 1.881 microrganismos isolados 49% (922 isolados) apresentaram-se resistentes a este antimicrobiano (WEBER *et al.*, 1999).

Os SCN, particularmente *S. epidermidis*, são os maiores causadores de infecções de próteses e são a causa principal de infecção por cateteres intravasculares (CHEESBOUGER *et al.*, 1986; JONES *et al.*, 1986; SHERETZ *et al.*, 1983).

*S. epidermidis* diferencia-se bioquimicamente das demais espécies estafilocócicas por apresentar reação positiva para as provas de: catalase, urease, fosfatase alcalina e reação negativa para as provas de: oxidase pirrolidonilarilamidase, coagulase e fator *clumping*. Apresenta resistência a polimixina B e é sensível novobiocina. Quanto à utilização aeróbica de açúcares, metaboliza sacarose, manose e maltose, o que não ocorre com a trealose e o manitol (KLOOS *et al.*, 1994).

No curso das infecções relacionadas aos dispositivos prostéticos, dois distintos estágios ocorrem sucessivamente: a) a aderência primária da bactéria às proteínas séricas do paciente, que previamente recobrem o biomaterial inserido (VEENSTRAS *et al.*, 1996); b) a formação de agrupamento bacteriano em multi-camadas, mediado pela produção do polissacarídeo extracelular

### **3.7 Fatores que comandam a aderência dos SCN às superfícies**

As bactérias produzem múltiplas adesinas e algumas são reguladas em nível transcricional, permitindo que os microrganismos escolham a forma sésil ou planctônica, dependendo das diferentes influências do meio. O processo de formação do biofilme e seu desprendimento podem ser regulados por comunicação célula a célula e pela densidade da população formada. Dentro do biofilme maduro há diferenças no crescimento bacteriano,

produção metabólica, pH, nível de oxigênio, síntese de polímeros extracelulares entre outras situações que permitem a estabilidade e a persistência do biofilme (MORALES *et al.*, 2004)

A matriz extracelular produzida pelas células estafilocócicas denominada “polysaccharide intercellular adhesin” (PIA) é produzida pela enzima N-acetilglucosaminiltransferase (MACK *et al.*, 1999), que é codificada por um operon denominado “intercellular adhesion” (*ica*), composto de quatro genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*, e uma região promotora denominada *icaR* (HEILMANN *et al.*, 1996; GERKE *et al.*, 1998; CRAMTON *et al.*, 2001). A seqüência de genes *Ica* é freqüentemente ausente nas cepas comensais (ZHANG *et al.*, 2003). O gene *icaA* é o principal fator associado a síntese de PIA (MACK *et al.*, 2000), embora a co-expressão dos quatro genes seja absolutamente necessária para esta síntese (GERKE *et al.*, 1998).

### 3.8 Outras proteínas que contribuem para a formação de biofilme

Recentemente GILL *et al.* (2005), realizando a análise genômica de cepas de *S. epidermidis*, comparando cepas produtoras e não produtoras de biofilme revelaram que além do operon *icaADBC*, as cepas produtoras de biofilme apresentam uma proteína de parede celular associada a biofilme (Bap), contida em uma ilha de patogenicidade SaPI<sub>bov2</sub>, que previamente havia sido identificada em cepas de *S. aureus* relacionadas à mastite bovina, e está associada à primeira fase de aderência a superfícies de poliestireno.

Existem proteínas que também parecem ser essenciais para a formação de biofilme em *S. epidermidis*. Uma proteína extracelular de 140 kDa (“accumulation-associated protein” – AAP), aparenta ser essencial para o crescimento acumulativo de cepas de *S. epidermidis* em superfície de polímeros, visto que sua ausência em um mutante não permitiu a aderência da cepa. Tem sido proposto que AAP tem um papel na ancoragem do PIA na superfície celular. (SCHUMACHER-PERDREAU *et al.* 1994; HUSSAIN *et al.* 1997).

O *S. epidermidis* produz uma proteína de superfície que esta envolvida na interação com fatores do hospedeiro e na formação do biofilme em biomateriais revestidos por proteínas. A aderência de isolados clínicos de SCN é alcançada pela ligação da fibronectina à superfície do material. A autolisina *atlE* de *S. epidermidis* não esta somente envolvida na

aderência inicial das células com a superfície de biomateriais, mas também liga-se a matriz extracelular protéica da vibronectina.

Um papel central na patogênese dos estafilococos tem sido atribuída ao Quórum sense através do sistema gene acessório regulador (AGR). Há evidências de que o gene *agr* pode influenciar no comportamento e patogênese de biofilm-associados a *S. aureus* e *S. epidermidis* e podem contribuir para a natureza crônica de alguns biofilmes e infecções associadas. Na verdade, muitos dos produtos envolvidos no desenvolvimento do biofilme, incluindo alfa toxinas, adesinas associadas a superfície, hemolisinas, e a autolisina *Atle* (em *S. epidermidis*), são regulados pelo sistema *agr*, pelo menos *in vitro*.

### 3.9 Variação da expressão do biofilme

Nem sempre a presença do operon *ica* remete à sua expressão fenotípica. Cepas de *S. epidermidis* provenientes de um mesmo clone sofrem mudanças quanto à: produção de biofilme, morfologia da colônia, taxa de crescimento e susceptibilidade a antimicrobianos (CHRISTENSEN *et al*, 1987; ZIEBURN *et al*, 1997). A alteração quanto à produção de biofilme e demais características fenotípicas a ela relacionadas se devem a inserção e excisão alternada e reversivelmente de um elemento genético móvel, a seqüência de inserção 256 (IS256), em diferentes locais do operon *ica*, (Figura 3), principalmente em *icaC*, interrompendo ou diminuindo a síntese de PIA (ZIEBURN *et al*, 1999; HANDKE *et al*, 2004).

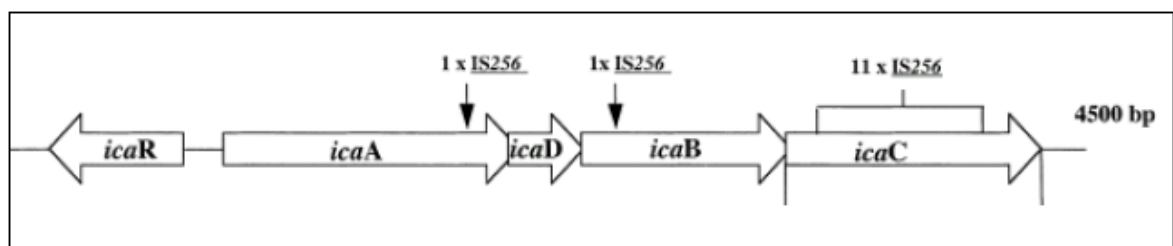


Figura 3- Operon *ica* e as possíveis regiões de inserção de IS256. (ZIEBUHR *et al*, 1999)

### 3.10 Resistência antimicrobiana

Nos anos 40 do século passado ocorreu o aparecimento de *Staphylococcus* sp resistentes à penicilina, em 1944 Kirby publicou a primeira descrição de penicilinase produzida por *S.aureus*. Já nos anos 60 verificou-se o aparecimento de *Staphylococcus* sp. resistentes à meticilina. Em 1996 foi relatado um caso de infecção por *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) no Japão, e em junho de 2002 nos EUA, oito amostras isoladas de pacientes internados foram confirmadas como resistentes intermediários a vancomicina e no mesmo ano foi confirmado um caso de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) isolado de cateter em um paciente diabético. (MMWR, 2002, MMWR, 1997, CHAMBERS, 2001).

O aumento da resistência aos antimicrobianos tem se tornado um grave problema nas duas últimas décadas, em que, as bactérias Gram positivas têm contribuído de maneira muito significativa para este aumento.

Os mecanismos de resistência a antimicrobianos podem ser gerados por: mutação, presença de genes de resistência; troca de material genético. A pressão seletiva pelo uso excessivo de antibióticos (principalmente em ambientes hospitalares) colabora com o aumento da multirresistência (FILE Jr., 1999; WITTE, 2000).

Os genes que codificam resistência a antimicrobianos estão em elementos genéticos móveis (transposons) e podem estar localizados em cromossomo ou em plasmídios. O DNA cromossômico é relativamente mais estável, enquanto o DNA plasmidial é facilmente transportado de uma linhagem para outra por conjugação bacteriana, permitindo uma transferência de genes, incluindo os de resistência a antimicrobianos (KONEMAN *et al.*, 1997).

#### ✓ Resistência a Aminoglicosídeos

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos em *Staphylococcus* é a inativação das drogas por enzimas celulares modificadoras dos aminoglicosídeos. Diversos *loci* distintos que codificam estas enzimas foram caracterizados em *Staphylococcus*, os mais importante destas regiões codificam atividades para as enzimas acetiltransferase (AAC), adenililtransferase (ANT) e fosfotransferase (APH). Os aminoglicosídeos, modificados em grupos aminos pela enzima AAC ou em grupos hidroxilas pela enzima ANT ou APH, perdem

a habilidade de se ligar aos ribossomos e assim não inibem mais a síntese protéica das células bacterianas. (SCHMITZ *et al.*, 1999, NEVES *et al* 2007)

A resistência à gentamicina e concomitante resistência à tobramicina e kanamicina em *Staphylococcus* são mediada pela atividade de uma enzima bifuncional. Os genes *aac (6')-Ie + aph (2'')* que codificam esta enzima bifuncional e estão inseridos no transposon Tn4001. Elementos semelhantes ao Tn4001 estão amplamente distribuídos entre *S. aureus* e SCN. O Tn4001 foi encontrado na família de plasmídios pSK1, plasmídios conjugativos como o pSK23 e em outros locais do cromossomo. (SCHMITZ *et al.*, 1999)

Resistência à neomicina e kanamicina conferida por uma enzima APH (3')-III também tem sido descrito em *Staphylococcus*. O gene APH (3')-IIIa é responsável por este fenótipo e está localizado no transposon Tn5405, que pode ser localizado no cromossomo ou em plasmídios. (SCHMITZ *et al.*, 1999)

A genética de resistência à estreptomicina é um pouco mais complexa, sendo associada ao gene *ant(6)-Ia*, um gene de resistência chamado *str* e mutações cromossômicas nos genes (*strA*), *APH(3')-III* e *ant (4')-Ia*. (SCHMITZ *et al.*, 1999).

#### ✓ **Resistência a mupirocina**

A mupirocina é um antibiótico produzido por *Pseudomonas fluorescens*. Esse antibiótico age por ligação competitiva à enzima isoleucil RNAt-sintetase (IRS), inibindo com isso a síntese protéica (NUNES *et al.*, 1999).

GILBART *et al* em 1993 dividiram as cepas resistentes à mupirocina em dois grupos, de acordo com o nível de resistência. Cepas com baixo nível de resistência ( $MIC \geq 8$  a  $\leq 256$   $\mu\text{g/mL}$ ) produzem uma enzima IRS modificada com baixa afinidade pela mupirocina. Essa modificação ocorre devido a mutação no gene cromossômico *ileS* que codifica a isoleucil RNAt-sintetase. O mecanismo de baixo nível de resistência à mupirocina ainda não está completamente esclarecido. Cepas com alto nível de resistência ( $MIC \geq 512$   $\mu\text{g/mL}$ ) apresentam um gene adicional (*ileS-2*) localizado em um plasmídio conjugativo. Alguns estudos demonstraram a presença de uma cópia cromossômica do gene *ileS-2* codificando baixo nível de resistência, assim os autores sugerem que o baixo nível de resistência difere da resistência de alto nível somente pela localização ou número de cópias do gene *ileS-2* (RAMSEY *et al.*, 1996; NUNES *et al.*, 1999).

### ✓ Resistência as Oxazolidinonas

As oxazolidinonas são uma classe de antimicrobianos que atuam na fase tardia da síntese protéica, tendo um efeito bacteriostático sobre a célula bacteriana. O primeiro antimicrobiano representante dessa classe foi a linezolida. Estudos sugerem que linezolida inibe a síntese protéica através da ligação à subunidade 50s no domínio V do 23S rRNA perto da interface com a subunidade 30s, assim bloqueando a formação do fMet-tRNA<sub>ribosome</sub>-mRNA (FUNG *et al* 2001).

### ✓ Resistência a fluoroquinolonas

Os mecanismos mais comuns de resistência dos *Staphylococcus* à fluoroquinolona envolvem mutações da topoisomerase IV ou DNA girase, que presumivelmente reduzem a afinidade destas enzimas alvo para fluoroquinolonas. O segundo mecanismo, conhecido como bomba de efluxo, proporciona um menor grau de resistência das cepas, funciona envolvendo uma superexpressão da bomba de efluxo, ao qual é codificada pelo gen *norA* (multidrug efluxo *norA*).

Bombas de efluxo *norA* eliminam uma variedade de compostos tóxicos, incluindo fluoroquinolonas, da célula bacteriana para o meio exterior, reduzindo assim a concentração citoplasmática da droga, na célula bacteriana ( MARKHAM *et al.*1996, KAATZ *et al* 1995).

### ✓ Resistência a macrolídeos

A forma mais freqüente de resistência aos macrolídeos é a combinação de resistência macrolídeos-lincosamidas -streptogramin B (MLS<sub>B</sub>). Neste caso, o mecanismo envolve a dimetilação na porção 23S rRNA por uma metilase específica, resultando em ribossomos que não se liga mais a MLS<sub>B</sub> (DUVAL, 1985, PECHÈRE, 2001)

Esta metilação é codificada pelos genes *erm*. Em *S. epidermidis* *ermC*, está localizado em cromossomo ou plasmídeo. Apenas dois relatos indicaram resistência a macrolídeos que pode ocorrer por um mecanismo de redução da entrada de antibiótico nas células por bomba de efluxo codificada pelo gene *msrA*. Um caso envolve um isolado clínico de *S. epidermidis* contendo plasmídeo pNE24. (GOLDMAN *et al.*,1990, SJÖLUND *et al* 2005).



### ✓ Resistência as estreptograminas

As estreptograminas constituem um grupo de antibióticos formados por uma mistura de duas classes de componentes quimicamente distintos, designados estreptograminas A e B (TAVARES. 2002).

A ligação desses componentes à subunidade 50S do ribossomo bacteriano causa inibição da síntese de proteínas. Isoladamente, cada componente apresenta moderada atividade bacteriostática, mas a combinação demonstra efeito sinérgico bactericida, que tem sido atribuído à ligação sinérgicas desses componentes com seu sítio de ação localizado no ribossomo (BEYER *et al.* 1998).

Uma vez que as estreptograminas A e B são quimicamente distintas e têm diferentes sítios de ligação, os mecanismos de resistência dessas duas estreptograminas são diferentes. Tem sido relatada a existência, em estafilococos, de resistência a cada componente das estreptograminas (LINA *et al.* 1999)

O tipo mais comum de resistência a estreptogramina B está relacionado com a produção de metilases ribossomais codificadas pelo gene *erm*. A resistência resulta na diminuição da ligação da estreptogramina B com o ribossomo bacteriano.

A atividade sinérgica inibitória dos dois componentes das estreptograminas é conservada mesmo quando o RNAr 23S é modificado pela ação de metilases *erm*, no entanto a atividade bactericida resultante da combinação das duas estreptograminas é alterada. Em contraste com essa situação, a resistência a estreptogramina A aparenta suprimir, pelo menos em parte, o sinergismo mostrado pela combinação das estreptograminas (ALLIGNET *et al.*, 1996). A resistência à estreptogramina A é geralmente causada por genes que codificam acetiltransferases (*vatA*, *vatB* e *vatC* ) ou genes que codificam bombas de efluxo (*vgaA* e *vgaBA*) (ALLIGNET *et al.* 1995, 1997).

A resistência à estreptogramina A é frequentemente associada à inativação da estreptogramina B por liases codificadas pelos genes *vgb*, o que resulta em um alto nível de resistência à mistura de estreptograminas (MUKHTAR *et al.* 2001).

A detecção de resistência em *Staphylococcus aureus* durante a terapia com quinupristina-dalfopristina tem sido raramente relatada. Em um caso de falha após o

tratamento com quinupristina-dalfopristina, a resistência se deu em virtude da aquisição do gene *vat* (KEHOE *et al.* 2003).

#### ✓ Resistência a $\beta$ -lactâmicos

A resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é causada pela alteração das proteínas de ligação de penicilinas (PBPs), relacionada à baixa afinidade deste antimicrobiano a estas proteínas, ou pela produção de enzimas de  $\beta$ -lactamases. (CHAMBERS, 1997)

O antimicrobiano oxacilina é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico (Penicilina M) sintético (3-fenil-5-metil-4-isoxazolilpenicilina) muito utilizado na prática médica para tratamento hospitalar de infecções causadas por *Staphylococcus* spp (GILBERT *et al.*, 2003).

O mecanismo pelo qual a oxacilina inibe o crescimento bacteriano dos *Staphylococcus* está baseado na inibição da síntese da parede celular pela ligação deste antimicrobiano à proteína ligadora de penicilina (PBP) presente na parede celular destes microrganismos. Estas proteínas possuem atividade bioquímica similar à das serina proteases, pois catalizam a reação de transpeptidase que faz a ligação cruzada dos peptidoglicanos da parede celular. As quatro principais PBPs são PBP 1, 2, 3 e 4 e são produzidas tanto por isolados de *Staphylococcus* sensíveis como resistentes (CHAMBERS, 1997).

Para que os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos atuem é necessário que estes penetrem na célula bacteriana através de sua parede celular, inativando alvos específicos localizados na superfície interna da parede celular bacteriana. Se este mecanismo não estiver afetado o antibiótico deverá ligar-se as PBP. Os antibióticos possuem afinidades variáveis às PBPs, onde alterações dessas afinidades ou aquisição de PBPs suplementares sem afinidades pelo antibiótico resultarão em uma resistência adquirida via mutação, a qual poderá ser transmitida verticalmente. Quando o antibiótico  $\beta$ -lactâmico se liga a um ou mais receptores de penicilina a reação de transpeptidação é inibida e a síntese do peptidoglicano é bloqueada e, na seqüência, ocorre a inativação das enzimas autolíticas da parede celular. No caso de *Staphylococcus* spp o principal mecanismo de resistência para oxacilina é a alteração das PBPs (AMATO NETO *et al.*, 1994; CHAMBERS, 1997).

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp é heterogênea, conferida principalmente pelo gene *mecA*, correlacionado à baixa afinidade deste antimicrobiano à proteína PBP 2a. Um segundo mecanismo de resistência, independente do gene *mecA*, é a hiperprodução de  $\beta$ -lactamases (MARTINEAU et al., 2000a). Um outro mecanismo de resistência descrito é a alteração de outras PBPs (PETERSSON et al., 1999; PETINAKI et al., 2001). As PBPs são subdivididas em 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A PBP 2<sup>a</sup> apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos, ela alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, já descrito anteriormente. E por último a PBP 2 e PBP 2' que ocorre hiperprodução das proteínas ligadoras de penicilinas, espessamento da parede celular e aprisionamento das drogas. (Chambers 1997).

#### ✓ Resistência aos glicopeptídeos

Os primeiros relatos de sensibilidade diminuída à vancomicina foram descritos primeiramente em *S. haemolyticus* (SCHWALBE et al., 1987), em seguida para *S. aureus* (MMWR, 1997) e em *S. epidermidis* demonstrando resistência heterogênea (SIERADZKI et al., 1999), onde o mecanismo de resistência envolvido foi um espessamento da parede celular destes isolados, uma vez que estes não apresentaram gene de resistência à glicopeptídeos envolvidos, mas todos estes isolados eram oxacilina resistentes (TENOVER et al., 2001). Os primeiros relatos de resistência à vancomicina e teicoplanina foram descritos em 1988 em isolados de *Enterococcus* spp. (LECLERCQ et al., 1988) portadores do gene *vanA*, o qual codifica a resistência a esta classe de drogas. A disseminação clonal de *E. faecalis* resistentes a vancomicina, através do genótipo *vanA* já é uma realidade no Brasil (MORETTI et al., 2004) e uma das principais recomendações e preocupações do CDC já em 1995 era a possibilidade da transferência deste gene de resistência para *Staphylococcus* spp (MMWR, 1995). Com o primeiro relato em 2002 e, até a data deste estudo são relatados 3 casos de *S. aureus* resistentes à vancomicina na literatura (MMWR, 2004), os quais eram resistentes a oxacilina e a vancomicina/teicoplanina sendo portadores do gene *mecA* e do gene *vanA* respectivamente. Devido a maior incidência de *Staphylococcus* spp, de uma maneira geral, em amostras clínicas e o seu elevado grau de resistência a antimicrobianos de escolha primária, se faz necessário o uso empírico de vancomicina para tratamento das diversas infecções causadas por estes microrganismos. Embora o seu uso seja muitas vezes necessário, o

emprego deste antibiótico em larga escala pode acarretar o efeito da pressão seletiva levando ao aparecimento de isolados, principalmente SCN, com sensibilidade diminuída ou mesmo com perfil de resistência a este grupo de drogas. Os SCN podem ser considerados como reservatórios de genes de resistência a diversos antibióticos no ambiente hospitalar podendo, portanto, transferir esses fatores a outros patógenos hospitalares (CERCENADO *et al.*, 1996; TENOVER *et al.*, 1998; SIERADZKI *et al.*, 1999).

## 4.0 METODOLOGIA

### - Amostras bacterianas

Amostras bacterianas de *Staphylococcus epidermidis*, de origem hospitalar, provenientes de ao menos duas hemoculturas positivas, foram obtidas nos laboratórios de Bacteriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro no ano de 2005 com 16 amostras e do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Nacional do Câncer (INCA) no ano de 2008 com 60 amostras – HCI mediante autorização da chefia de cada laboratório. O protocolo da pesquisa foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INCA sob registro no CEP nº 122/07.

### - Critérios de exclusão

Não foram utilizadas amostras bacterianas que:

- Foram provenientes de outros materiais que não de hemoculturas;
- Apresentaram testes positivos ou duvidosos para o teste da coagulase;
- Não confirmaram identificação como *S. epidermidis*.
- Não apresentaram duas ou mais hemoculturas positivas

### - Identificação do *S. epidermidis*

As cepas de *S. epidermidis* foram identificadas pelo sistema automatizado de identificação da bioMérieux, VITEK 2 e confirmadas em laboratório pelos testes de: urease, produção de acetoína, coagulase e fermentação do manitol.

### - Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de sensibilidade antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2007). Os antibióticos utilizados foram: tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 U), vancomicina (30 µg), oxacilina (1 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), mupirocina (5 µg), clindamicina (2 µg), ciprofloxacina (5 µg), linezolida (30µg), teicoplanina (30µg) e Rifampicina (5 µg)

**- Avaliação fenotípica da formação de biofilme:**

- **Ensaio com Agar vermelho Congo**

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

As cepas de *Staphylococcus epidermidis* foram semeadas em ágar vermelho congo e incubadas em aerobiose a 37°C, em estufa bacteriológica, por 24 horas e a seguir a temperatura ambiente por 18 horas. Após este período foi realizada a leitura das placas para verificar a produção de “slime”. A presença de colônias negras com consistência cristalina seca indica um resultado positivo, isto é, colônia produtora de “slime”. As colônias não produtoras de “slime” são vermelhas e indicam resultado negativo para o teste.

O preparo do meio foi realizado da seguinte forma:

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

pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

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

- **Ensaio de aderência em tubo**

Tubos de plástico tipo Eppendorf (AXIGEN) foram utilizados no ensaio de aderência. As cepas de *S. epidermidis* foram inoculadas em tubos contendo 2,0mL de caldo tripticase soja (TSB) com 0,25% de glicose e incubados a 35-37°C, em estufa bacteriológica, por 24 horas. Após este período a cultura em TSB foi diluída a 1:100 em um novo TSB. A seguir uma alíquotas de 1 ml de cada cultura diluída foram transferidas para Tubos de plástico tipo Eppendorf e em seguida incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24hs, posteriormente o

conteúdo dos tubos foram retirados, e 1ml de cristal violeta de Gram foi adicionado em cada tubo para corar.

O crescimento aderente foi considerado quando apresentou revestimento à superfície interior do tubo. A presença de um anel na interface líquido-ar, não foi considerada como indicativo de crescimento aderente.

- **Ensaio de aderência em placas de poliestireno(TPP)**

Os ensaios de aderência em placas de poliestireno foram realizados utilizando uma etapa comum de inoculação e incubação, porém com o emprego de três métodos distintos de avaliação descritos brevemente a seguir:

### **1. Método de Christensen**

As cepas de *Staphylococcus epidermidis* foram inoculadas em tubos com tampa de rosca contendo 2,0mL de caldo TSB com 0,25% de glicose e incubados a 35-37°C, em estufa bacteriológica, por 24 horas. Após este período a cultura em TSB foi diluída a 1:100 em um novo TSB. A seguir alíquotas de 200µL de cada cultura diluída foram transferidas para cada um dos poços (96 poços com fundo em U) da placa de poliestireno esterilizada. A seguir estas placas foram incubadas por 18 horas a 37°C. Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado com uma pipeta automática os poços foram lavados duas vezes com 200µL de tampão fosfato salina (PBS). A secagem da placa foi realizada em estufa a 60°C. A seguir, os poços foram corados com Cristal Violeta de Gram por 1 minuto e lavados com água destilada.

A densidade óptica (D.O.) dos filmes bacterianos aderidos e corados foi lida com o auxílio de um leitor para ELISA em filtro de 620 nm e as cepas classificadas em quatro categorias de acordo com a média da DO obtida nas triplicatas:

**Não aderente (NA)**=  $DO \leq DO_{CN}$  ,

**Fracamente aderente (FA+)** =  $DO_{CN} < DO < 2 \times DO_{CN}$  ,

**Moderadamente aderente (MA++)** =  $2 \times DO_{CN} < DO < 4 \times DO_{CN}$

**Fortemente aderente (FOA+++)** =  $4 \times DO_{CN} \leq DO$ . (CHRISTENSEN *et al.* 1985)

## 2. Método de Amaral (Unidade de Biofilme)

Após incubação por 20 h a 37 °C. A densidade ótica provocada pelo crescimento bacteriano ( $DO_c$ ) foi determinada em leitor de ELISA a 620nm. Após esta leitura, a placa foi lavada duas vezes com solução salina e as bactérias fixadas à placa a 65 °C por 1 h. Em seguida, 200  $\mu$ L de solução de cristal violeta para Gram foram adicionados a cada poço, por 1 min. A placa foi então lavada duas vezes com água destilada estéril e a água evaporada a 60 °C. A densidade ótica do biofilme ( $DO_b$ ) foi medida a 620 nm e as cepas classificadas segundo Amaral, Coelho & Flores, 2005. *S. epidermidis* 70D e *Streptococcus pyogenes* 75194 foram usados como controle positivo e negativo do teste, respectivamente. O critério para classificação da produção de biofilme foi baseado nos resultados obtidos para o controle negativo (*S. pyogenes*). A unidade de biofilme (UB) foi calculada usando a fórmula  $DO_b / DO_c$

Assim, tomando-se por base a medida de UB para o controle negativo as cepas que apresentaram  $UB < 2 \times UBCN$  foram definidas como não aderentes e as que apresentaram resultados iguais ou maiores que  $2x UBCN$  foram classificadas como aderentes e discriminadas conforme segue:  $2x UBCN \leq UB < 4 \times UBCN$  como fracamente aderentes;  $4x UBCN \leq UB < 8x UBCN$  como moderadamente aderentes e  $UB \geq 8x UBCN$  como fortemente aderentes (AMARAL, COELHO & FLORES, 2005).

## 3. Método de Djordjevic

Após incubação por 20 h a 37 °C, o conteúdo de cada poço foi aspirado com uma pipeta automática os poços foram lavados duas vezes com 200 $\mu$ L de tampão fosfato salina (PBS). A secagem da placa foi realizada em estufa a 60°C . A seguir, os poços foram corados com Cristal Violeta de Gram por 1 minuto e lavados com água destilada.

A placa foi seca em estufa a 60°C e o corante impregnado nas células bacterianas foi eluído com 200  $\mu$ L de etanol absoluto. Uma alíquota de 150  $\mu$ L da solução contida em cada um dos poços da placa será transferida para outra placa limpa e seca. A DO será quantificada através de um leitor de ELISA com comprimento de onda de 620 nm e as cepas classificadas



em quatro categorias de acordo com a média da DO obtida nas triplicatas: Não aderente (NA) –  $DO \leq DO_{CN}$  , fracamente aderente (FA) -  $DO_{CN} < DO < 2 \times DO_{CN}$  , moderadamente aderente (MA) -  $2 \times DO_{CN} < DO < 4 \times DO_{CN}$  ou fortemente aderente (FOA) -  $4 \times DO_{CN} \leq DO$ . (DJORDJEVIC et al 2002)

### **-Avaliação genotípica da formação de biofilme e resistência antimicrobiana**

- **Extração do DNA Total**

A extração do DNA foi realizada através da lise total por fervura. Resumidamente, as cepas bacterianas foram crescidas até atingir a fase estacionária em 2 ml de TSB a 37 °C por 24 horas e após este período foram inoculadas em placas de Agar Trypticase de soja e novamente incubadas por 24 horas a 37°C, em seguida a placa foi lavada com 1 ml de PBS e uma alíquota de 50 µl deste lavado foi diluído em microtubos contendo 500 µl de PBS. A amostra foi então fervida por 10 minutos e centrifugada por 1min a 12.000 x g, o sobrenadante foi então removido e transferido para outro microtubo, para ser estocado a -20°C.

- **Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação do DNA.**

Os fragmentos contendo os genes *icaAD*; *Meca*, *atlE*, *aap* e *bap* foram amplificados, a partir de DNA genômico de cepas de *S. epidermidis* isoladas de hemocultura, por PCR utilizando-se os iniciadores específicos para a amplificação dos genes em estudo (FIGURA 1). As condições de reação foram iguais para todos os iniciadores, onde foram utilizados os seguintes reagentes da empresa INVITROGEN: 1,5mM de magnésio, 1U de Taq polimerase, 25 pmol de cada iniciador, 200 µM de DNTP , 5µl de tampão de PCR 10X , 5µ de DNA molde e água ultrapura q.s.p 50µl .

Foram realizados 30 ciclos de amplificação em termociclador em termociclador PTC-100 (MJ Research<sup>®</sup>, INC, Waltham, EUA) consistindo nas seguintes etapas: 94°C por 30segundos, 55°C por 30segundos e 72°C por 1 minuto como ilustrado na (tabela 1). Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados em gel de agarose 1%.

**Tabela 1: condições da reação de PCR**

| Primer         | sequencia do primer 5' -3'  | Amplicon (bp) | Genebank referência | Denaturação |           | Anelamento |           | extensão |           |
|----------------|-----------------------------|---------------|---------------------|-------------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|
|                |                             |               |                     | T(°c)       | Tempo (s) | T (°c)     | Tempo (s) | T (°c)   | Tempo (s) |
| <i>mecA-F</i>  | TCCAGATTACAACCTTCACCAGG     | 160           | YO68000             | 94          | 30        | 55         | 30        | 72       | 60        |
| <i>mecA-R</i>  | CCACTTCATATCTTGTAACG        |               | YO68000             | 94          | 30        | 55         | 30        | 72       | 60        |
| <i>icaAD-F</i> | TAGTAATCACAGCCAACATCTT      | 496           | AY382582            | 94          | 30        | 55         | 30        | 72       | 60        |
| <i>icaAD-R</i> | AAACAAACTCATCCATCCGAAT      |               | AY382582            | 94          | 30        | 55         | 30        | 72       | 60        |
| <i>atlE-F</i>  | GCTAAGGCACCAGTAAAAAGT       | 480           | U71377              | 94          | 30        | 55         | 30        | 72       | 60        |
| <i>atlE-R</i>  | GACCTCATCTTGTTTTACCCA       |               | U17378              | 94          | 30        | 55         | 30        | 72       | 60        |
| <i>aap-F</i>   | CAACGAAGGCAGAAGAAGGA        | 719           | AJ249487            | 94          | 30        | 55         | 30        | 72       | 60        |
| <i>aap-R</i>   | CATCCCCATCTTTCTTGCTG        |               | AJ249488            | 94          | 30        | 55         | 30        | 72       | 60        |
| <i>sasp-6m</i> | CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC | 971           | AF288402            | 94          | 20        | 42         | 20        | 72       | 50        |
| <i>sasp-7c</i> | GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC  |               | AF288402            | 94          | 20        | 42         | 20        | 72       | 50        |

### - Avaliação da similaridade genética entre as amostras

Para avaliar a similaridade genética entre as amostras foi utilizada a técnica de RAPD como descrito a seguir:

- **Padronização do DNA para realização da técnica de RAPD**

A extração de DNA total foi realizada como descrito por Pacheco (1997). Após incubação por 24 h a 37 °C, algumas colônias isoladas em placas com TSA foram removidas e diluídas em 3 mL de PBS. A seguir, 400 µL desta suspensão foram adicionados a 3,6 mL de PBS (diluição 1:10) e a densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ) medida. Com auxílio da fórmula abaixo, obteve-se o volume necessário da suspensão de células para a fervura.

Fórmula: 
$$DO \text{ encontrada} \frac{\text{ } 200 \mu\text{L}}{0,4 \text{ } \times}$$

O volume calculado da suspensão de células em PBS foi transferido para um Eppendorff e centrifugado por 2 min a 12.000 xg. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o sedimento re-suspensão em 200 µL de PBS. A amostra foi então fervida por 10 min e após centrifugação por 1 min a 12.000 xg, o sobrenadante foi removido e transferido para outro Eppendorff, para ser estocado a - 20 °C.

- **“Random Amplification of Polymorphic DNA” (RAPD) PCR**

As reações de RAPD foram realizadas com duas seqüências iniciadoras distintas em reações separadas: 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3') e 1252 (5'-GTGGATGCGA-3'). A reação, num volume final de 30 microlitros e água destilada ultra-pura, era composta dos seguintes componentes (Invitrogen do Brasil, São Paulo-SP): tris-HCL(ph8,4) 20mM; KCl, 50mM; MgCl<sub>2</sub> 3mM; 250µM de cada um dos deoxinucleotídios trifosfatados (dNTP), 30pmol do iniciador, 1U de Taq polimerase e 3 µL do lisado bacteriano(DNA molde). A reação de amplificação ocorreu em termociclador PTC-100 (MJ Research<sup>®</sup>, INC, Waltham, EUA) consistindo nas seguintes etapas: 4ciclos de 94°C, 37°C e 72°C por 5 minutos cada, seguido de 30 ciclos com as mesmas temperaturas mas com tempos de 1,1 e 2 minutos, respectivamente, seguindo-se uma etapa final de extensão a 72°C por 10minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em cuba HMEDI15 (Biosystems, Curitiba, Brasil) a 70V por aproximadamente 4horas, utilizando-se em cada corrida um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen do Brasil, São Paulo-SP). Após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL) todos os géis foram fotografados sob luz ultravioleta para posterior interpretação e análise.

Na caracterização das amostras considerou-se como de mesmo tipo RAPD (designado por números romanos) aquelas que apresentassem índice de similaridade acima de 75% (GRIF *et al.*, 1998). Os subtipos, apresentando ao menos uma banda polimórfica, foram designados por letras minúsculas.

Os perfis genéticos das amostras foram comparados através do programa RAPDistance versão 1.03 (ARMSTRONG *et al.* 1994), utilizando-se como algoritmo de similaridade o coeficiente de Jaccard . A matriz de distâncias gerada pelo programa foi utilizada para a construção de um dendrograma, empregando o método UPGMA (agrupamento pareado por médias aritméticas) com o auxílio do programa MEGA (KUMAR *et al.*, 1993).

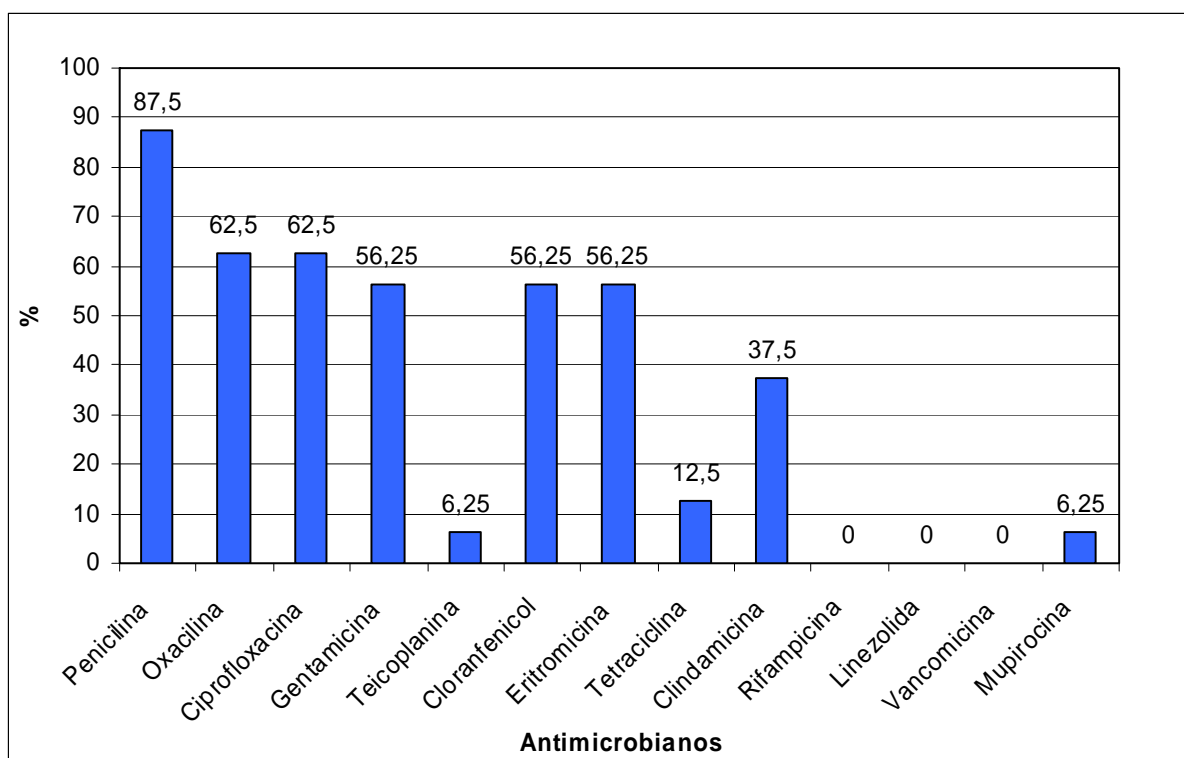
## 5.0 RESULTADOS

### 5.1- Perfil de resistência antimicrobiana

#### 5.1.1 Amostras isoladas do HUPE

Das 16 amostras estudadas foi observada 87,5% de resistência a Penicilina; 62,5% resistentes a Ciprofloxacina; e a Oxacilina; 56,2% resistentes a Gentamicina, Cloranfenicol e Eritromicina; 37,5% a Clindamicina; 12,5% a Tetraciclina; 6,2% a Teicoplanina e Mupirocina, não sendo observada resistência para Linezolida, Vancomicina e Rifampicina. (Gráfico 1)

**Gráfico 1 - Percentual de amostras resistentes de *S.epidermidis* isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2005.**



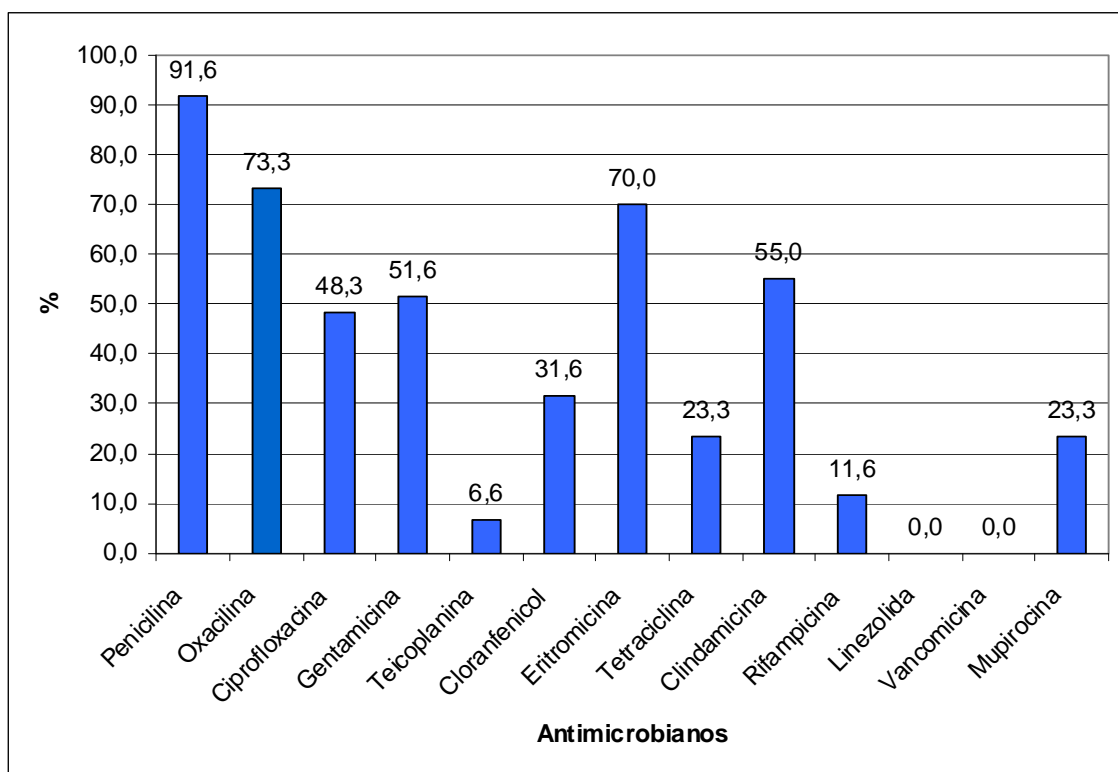
Foi possível, ainda, observar que 13 destas amostras (81%) apresentaram – se resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos e uma delas foi suscetível apenas a rifampicina, linezolida e vancomicina.

### 5.1.2 Amostras isoladas do INCA

Das 60 amostras obtidas no INCA 91,6% apresentaram resistência à Penicilina; 73,3% à oxacilina; 70% à Eritromicina; 55% à Clindamicina; 51,6% à Gentamicina; 48,3% à Ciprofloxacina; 31,6% à Cloranfenicol; 23,3% à Tetraciclina; 23,3% à Mupirocina e 6,6% de resistência para a Teicoplanina. Não houve resistência para Vancomicina e linezolida( gráfico 2, quadro 2 e 3)

Foi possível observar que 51 destas amostras (81,5%) apresentaram – se resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos.

**Gráfico 2 -Percentual de amostras resistentes de *S.epidermidis* isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008**



## 5.2. – Perfil genético das amostras

### 5.2.1-Amostras provenientes do HUPE

Foram utilizados cinco alvos para a avaliação do perfil genético das amostras, sendo um (*mecA*) associado a resistência a oxacilina e os outros quatro associados ao potencial formador de biofilme.

Das amostras estudadas 75% apresentaram positividade para *atle* ; 63,3% para o gene *mecA*; 31% para *ica AD* e para *aap*. Todas as amostras apresentaram negatividade para o gene *bap*.( quadro 1, gráfico 3 )

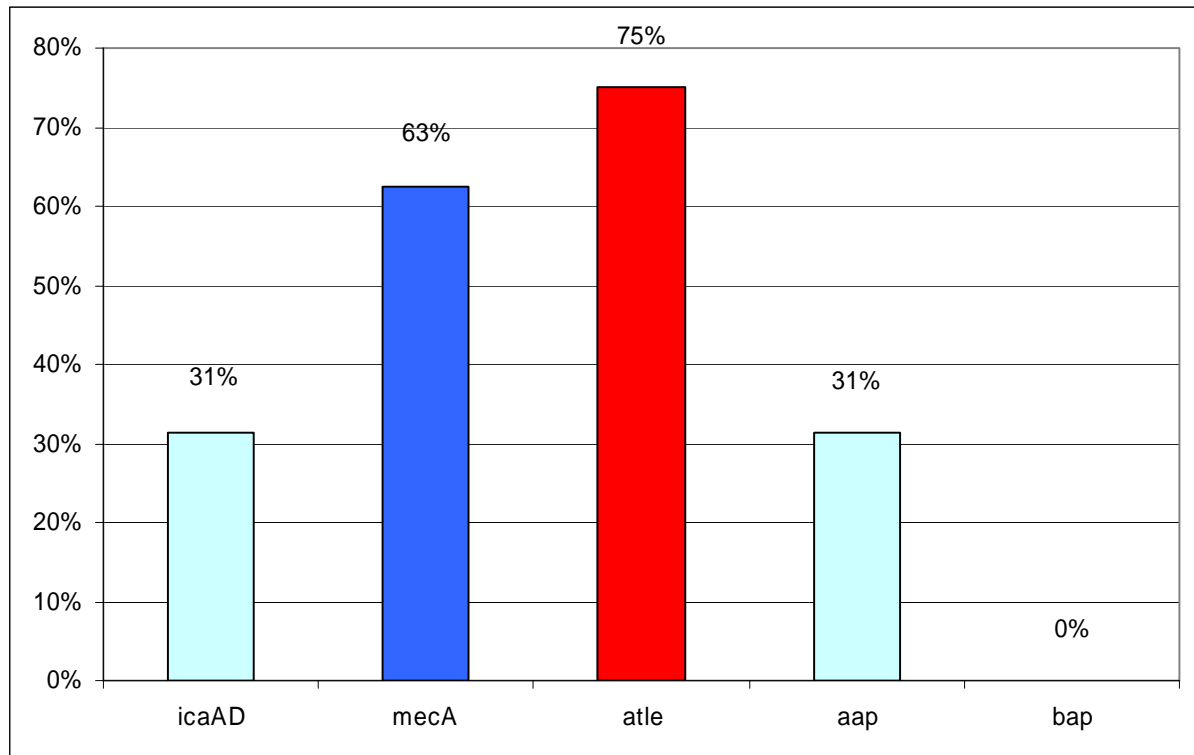
**Quadro 1- Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras de *S. epidermidis* isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2005**

|                 | Amostras       | M3 | M4 | M5 | M8 | M9 | M10 | M11 | M13 | M14 | M15 | M16 | M17 | M18 | M21 | M22 | M24 |   |
|-----------------|----------------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| Genes           | <i>icaAD</i>   | -  | -  | +  | -  | -  | -   | +   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | +   |   |
|                 | <i>mecA</i>    | +  | -  | +  | -  | -  | +   | -   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   |   |
|                 | <i>atle</i>    | +  | +  | +  | -  | +  | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   |   |
|                 | <i>aap</i>     | -  | +  | +  | -  | -  | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | + |
|                 | <i>bap</i>     | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| Antimicrobianos | Penicilina     | R  | R  | R  | R  | R  | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   |   |
|                 | Oxacilina      | R  | S  | R  | S  | S  | R   | S   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | S   |   |
|                 | Ciprofloxacina | R  | S  | R  | S  | S  | R   | R   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | R   |   |
|                 | Gentamicina    | S  | S  | R  | S  | S  | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | S   |   |
|                 | Teicoplanina   | S  | S  | S  | S  | S  | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |   |
|                 | Cloranfenicol  | R  | S  | R  | S  | S  | R   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | S   |   |
|                 | Eritromicina   | R  | R  | R  | S  | S  | R   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | R   |   |
|                 | Tetraciclina   | S  | S  | S  | S  | S  | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |   |
|                 | Clindamicina   | R  | S  | R  | S  | S  | R   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | S   |   |
|                 | Rifampicina    | S  | S  | S  | S  | S  | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |   |
|                 | Linezolid      | S  | S  | S  | S  | S  | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |   |
|                 | Vancomicina    | S  | S  | S  | S  | S  | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |   |
| Mupirocina      | S              | S  | S  | S  | S  | S  | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |     |   |

Todas amostras resistentes oxacilina também foram positivas para o gene *mecA*. O gene *icaAD* foi detectado em cinco cepas, porém apenas uma era também positiva a *mecA*.

Dentre as amostras estudadas 43,7% apresentaram dois ou mais genes para formação de biofilme. Duas amostras não apresentaram positividade para nenhum gene em estudo.

**Gráfico 3 - Perfil genético das amostras de *S. epidermidis* isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2005.**



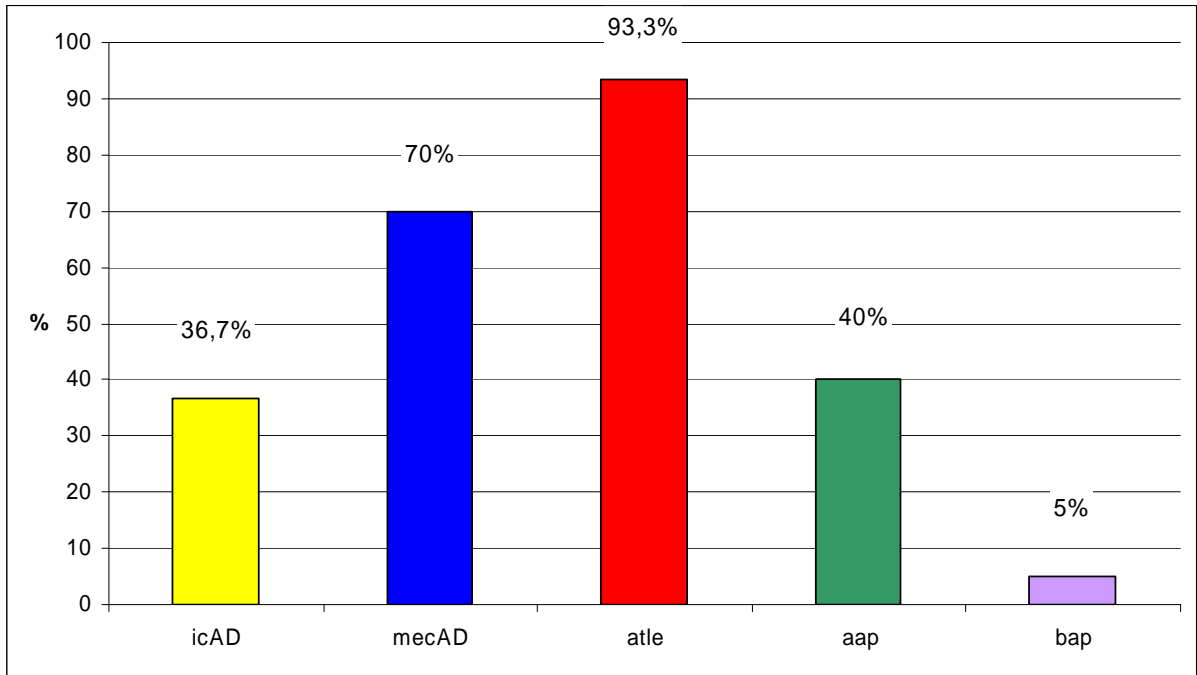
### 5.2.2- Amostras provenientes do INCA

Das 60 amostras estudadas 93,3% apresentaram positividade para *atle*; 70% positividade para *mecA*; 40% para o gene *aap*; 40% para *icaAD* e 5% para o gene *bap*. (quadro 2 e 3, gráfico 4)

Dentre as amostras estudadas 53,3% (32 amostras) apresentaram dois ou mais genes para formação de biofilme. E uma amostra apresentou positividade para todos os genes formadores de biofilme.

Apenas duas amostras foram resistentes a oxacilina porém não apresentaram positividade para o gene *mecA*.

**Gráfico 4: percentual de amostras positivas para genes associados a resistência e formação de biofilme.**





Quadro 2 - Perfil genético e resistência antimicrobiana de 60 amostras de *S. epidermidis* isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008

| Amostras       | I1  | I2  | I3  | I4  | I5  | I6   | I7   | I9   | I11 | I14 | I15 | I17 | I18 | I21 | I22 | I23 | I24 | I25 | I26 | I28 | I29 | I30 | I31 | I32 | I33 | I34 | I35 | I36 | I37 | I39  |   |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|---|
| icAD           | +   | +   | -   | -   | +   | +    | -    | -    | -   | +   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   | +   | -    |   |
| mecA           | +   | +   | +   | -   | +   | +    | -    | +    | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   | +    | - |
| atle           | +   | +   | +   | +   | +   | +    | +    | +    | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +    | + |
| aap            | +   | +   | -   | -   | +   | +    | -    | -    | -   | +   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | +    | + |
| bap            | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | +    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    |   |
| Penicilina     | R   | R   | R   | R   | R   | R    | R    | R    | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | R    | S |
| Oxacilina      | R   | R   | R   | S   | R   | R    | S    | R    | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | R   | R    | S |
| Eritromicina   | R   | R   | R   | S   | R   | R    | S    | R    | S   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | R    | R |
| Rifampicina    | S   | S   | S   | S   | R   | R    | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S |
| Vancomicina    | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S |
| Clindamicina   | R   | R   | S   | S   | R   | R    | S    | R    | S   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | R   | R    |   |
| Gerntamicina   | R   | R   | S   | S   | R   | R    | S    | R    | S   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | S   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | R    | S |
| Ciprofloxacina | R   | R   | S   | S   | R   | R    | S    | R    | S   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | R    | S |
| Clorafenicol   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | R    | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | S    | S |
| Tetraciclina   | R   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | S    | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S    | S |
| Mupirocina     | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | R    | S |
| Linezolid      | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S |
| Teicoplanina   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S |
| Amostras       | I40 | I42 | I43 | I44 | I46 | I49B | I50A | I51A | I59 | I62 | I63 | I64 | I69 | I70 | I72 | I73 | I74 | I75 | I77 | I82 | I83 | I88 | I89 | I90 | I92 | I93 | I95 | I96 | I97 | I101 |   |
| icAD           | -   | -   | +   | -   | -   | -    | -    | -    | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | -    |   |
| mecA           | +   | +   | -   | -   | +   | +    | +    | +    | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +    | + |
| atle           | +   | +   | +   | +   | +   | +    | +    | +    | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +    | + |
| aap            | -   | +   | -   | -   | -   | +    | -    | -    | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -    |   |
| bap            | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | -    | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    |   |
| Penicilina     | R   | R   | R   | S   | R   | R    | R    | R    | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R    | R |
| Oxacilina      | R   | R   | R   | S   | S   | R    | R    | R    | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R    | R |
| Eritromicina   | R   | S   | R   | R   | S   | S    | S    | R    | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R    | R |
| Rifampicina    | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | S    | S |
| Vancomicina    | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S |
| Clindamicina   | R   | S   | S   | S   | S   | S    | R    | R    | R   | R   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | S    | R |
| Gentamicina    | R   | S   | S   | S   | S   | S    | R    | R    | R   | R   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | S    | R |
| Ciprofloxacina | S   | S   | S   | S   | S   | S    | R    | R    | R   | R   | R   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | S    | R |
| Clorafenicol   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | R    | S    | R   | R   | R   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | R |
| Tetraciclina   | S   | S   | S   | S   | S   | R    | S    | S    | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S |
| Mupirocina     | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | R    | R   | R   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | S    | S |
| Linezolid      | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S |
| Teicoplanina   | S   | R   | S   | S   | S   | S    | R    | S    | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S |

### 5.3. – Avaliação fenotípica da formação de biofilme

#### 5.3.1- Amostras provenientes do HUPE

Foram utilizados cinco métodos para avaliação de formação de biofilme. Destes métodos o de Christensen apresentou maior discriminação na detecção das variações de produção de biofilme (QUADRO 3).

**Quadro 3 - Classificação das amostras de *S. epidermidis* isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2005 segundo métodos fenotípicos para avaliação da formação de biofilme.**

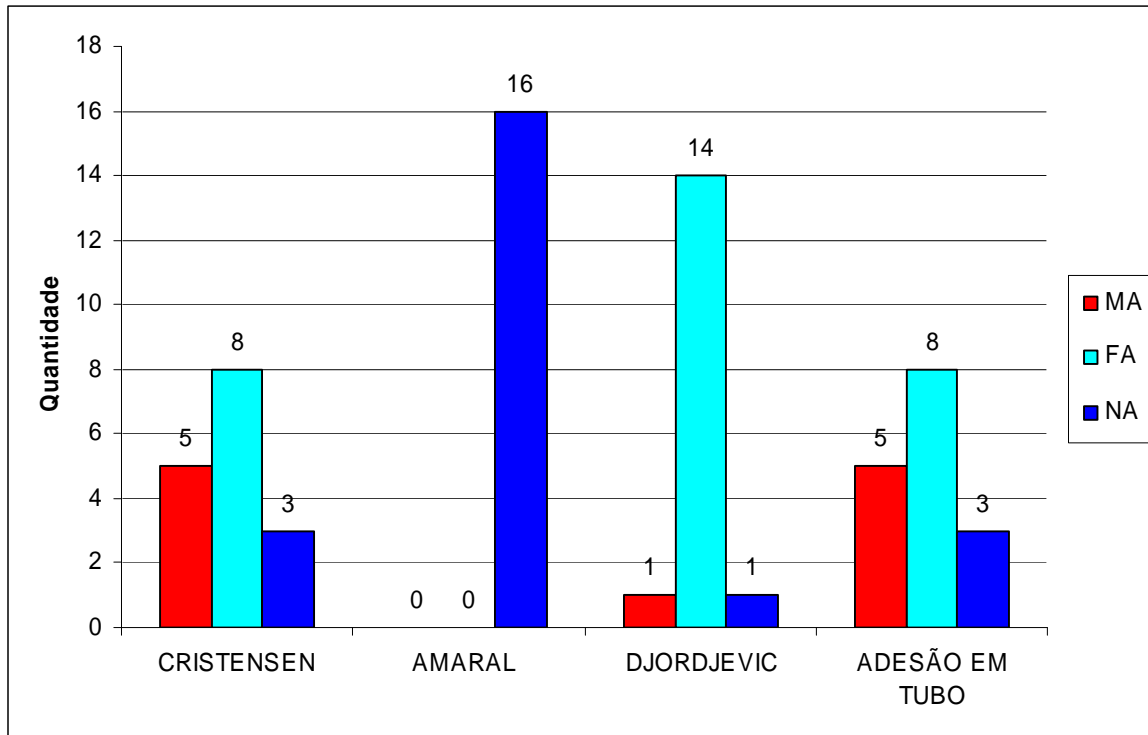
| AM  | CRISTENSEN | AMARAL | DJORDJEVIC | ADESÃO EM TUBO | VERMELHO CONGO |
|-----|------------|--------|------------|----------------|----------------|
| M3  | MA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| M4  | MA         | NA     | FA         | MA             | -              |
| M5  | MA         | NA     | FA         | MA             | +              |
| M8  | FA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| M9  | MA         | NA     | MA         | MA             | -              |
| M10 | MA         | NA     | FA         | MA             | -              |
| M11 | FA         | NA     | NA         | FA             | -              |
| M13 | FA         | NA     | FA         | MA             | +              |
| M14 | NA         | NA     | FA         | NA             | +              |
| M15 | FA         | NA     | FA         | NA             | -              |
| M16 | FA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| M17 | FA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| M18 | NA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| M21 | NA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| M22 | FA         | NA     | FA         | NA             | +              |
| M24 | FA         | NA     | FA         | FA             | +              |

**Legenda:**

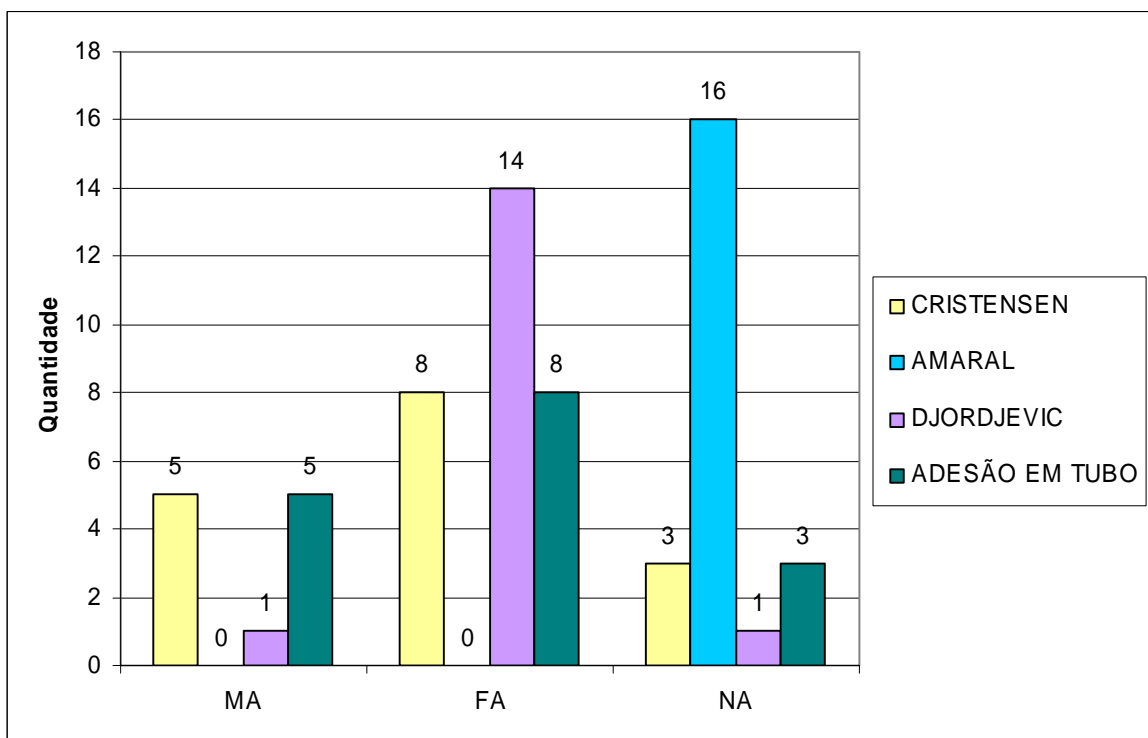
**AM** – Amostra      **NA** – não aderente      **FA** – fracamente aderente      **MA** – moderadamente aderente

De acordo com os gráficos 5 e 6 foi observado que pelo método de Christensen 5 amostras apresentou moderadamente aderente; 8 amostras fracamente aderente e 3 não aderente, enquanto que no método de Amaral todas foram consideradas não aderente, já pelo método de Djordjevic 1 foi considerada moderadamente aderente; 14 fracamente aderente e 1 não aderente. Pelo método de adesão em tubo 5 foram consideradas moderadamente aderente; 8 fracamente aderente e 3 não aderentes. O método de Vermelho Congo apresentou 5 amostras produtoras de slime (quadro 3).

**Gráfico 5 - Aderência de amostras de *S.epidermidis* isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2005, segundo a metodologia empregada.**



**Gráfico 6 - Aderência de amostras de *S.epidermidis* isoladas no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2005, segundo a variação de intensidade**



**Legenda:** NA – não aderente FA – fracamente aderente MA – moderadamente aderente

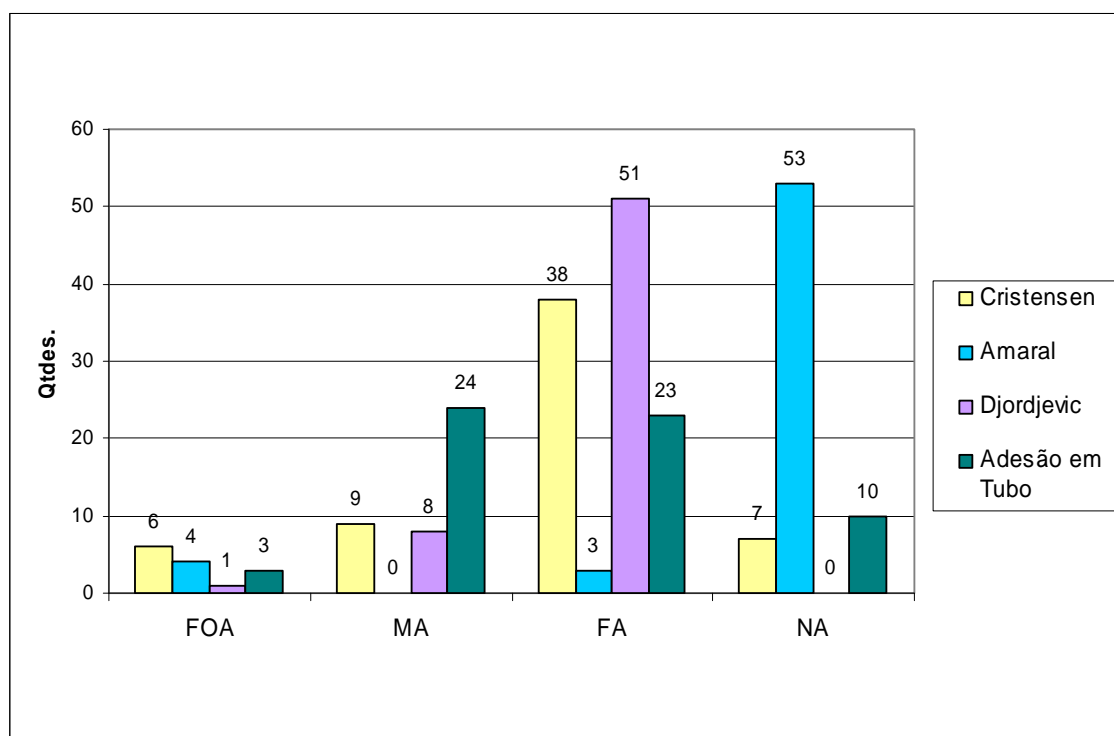
### 5.3.2 – Amostras provenientes do INCA

De acordo com o quadro 4 e gráficos 7 e 8 foi observado que o método de Cristensen apresentou 38 amostras fracamente aderentes; 9 amostras moderadamente aderentes, 7 não aderentes e 6 fortemente aderentes enquanto que no método de Amaral, 53 amostras foram consideradas não aderentes, 4 fortemente aderente e 3 fracamente aderente, já pelo método de Djordjevic observa – se que 51 amostras foram consideradas fracamente aderente; 8 moderadamente aderente e 1 fortemente aderente. Pelo método de adesão em tubo 24 foram consideradas moderadamente aderentes; 23 fracamente aderentes; 10 amostras não aderentes e 3 fortemente aderentes.

O método de Vermelho Congo apresentou 25 amostras foram consideradas aderentes.

O quadro 6, gráfico 7 demonstram que das amostras analisadas 04 independentemente do método utilizado apresentaram moderada ou forte capacidade de adesão a placa de poliestireno, o que representa potencial formação de biofilme

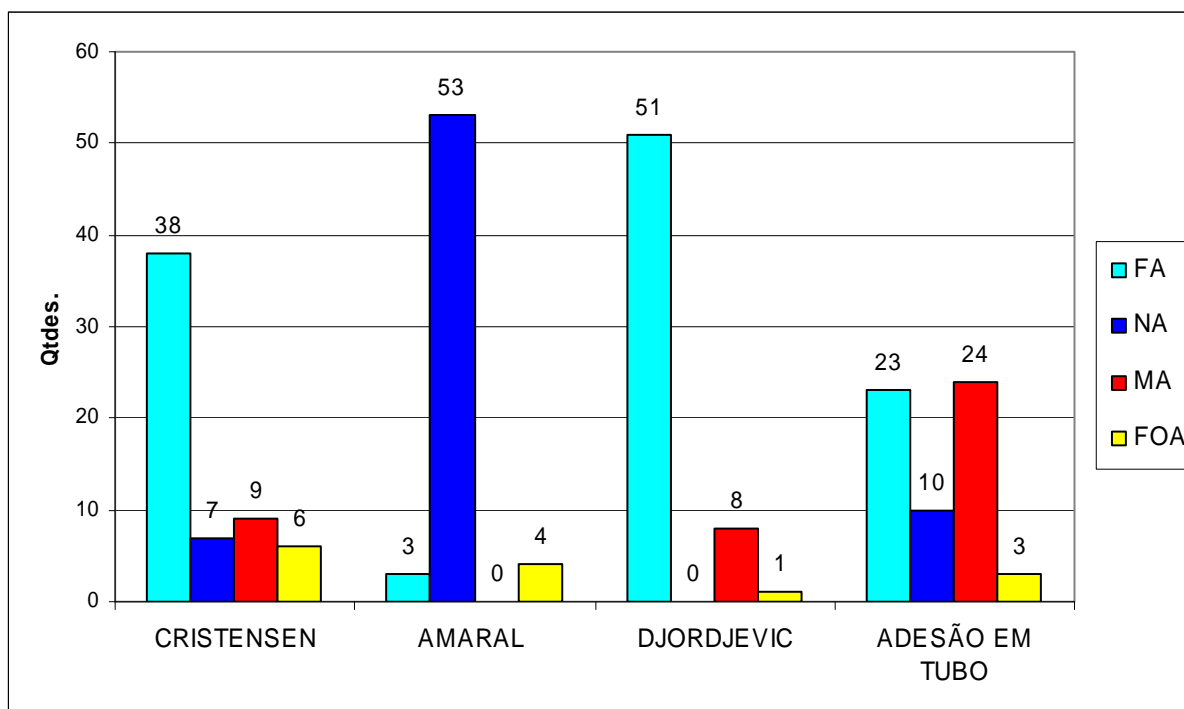
**Gráfico 7: comparação fenotípica de aderência por classificação amostras isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008**



**Legenda:**

**AM** – Amostra      **NA** – não aderente    **FA** – fracamente aderente    **MA** – moderadamente aderente    **FOA** – Fortemente aderente

**Gráfico 8: Comparação fenotípica de aderência por metodologia Amostras isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008**



**Legenda:**

AM – Amostra NA – não aderente FA – fracamente aderente MA – moderadamente aderente FOA – Fortemente aderente

**5.4 – Associação entre multiresistência e formação de biofilme**

A grande maioria das amostras estudadas (60/76  $p < 0,05$ ) apresentou simultaneamente, potencial para formação de biofilme (revelado pela presença de ao menos um gene associado a esta característica) e multiresistência a antimicrobianos.

**Quadro 4: Associação entre a multirresistência e a capacidade de formação de biofilme.**

| Biofilme         | +  | - | total |
|------------------|----|---|-------|
| Multiresistência |    |   |       |
| +                | 60 | 4 | 64    |
| -                | 9  | 3 | 12    |
| Total            | 69 | 7 | 76    |

A grande maioria das amostras estudadas (60/76  $p < 0,05$ ) apresentou simultaneamente, potencial para formação de biofilme (revelado pela presença de ao menos um gene associado a esta característica) e multiresistência a antimicrobianos.

**Quadro 5 : classificação das amostras segundo metodos fenotipicos para avaliação da formação de biofilme isoladas no Instituto Nacional do Câncer, 2008**

| AM | CRISTENSEN | AMARAL | DJORDJEVIC | ADESÃO EM TUBO | VERMELHO CONGO |
|----|------------|--------|------------|----------------|----------------|
| 1  | MA         | NA     | FA         | MA             | +              |
| 2  | FA         | NA     | FA         | MA             | -              |
| 3  | FA         | NA     | FA         | NA             | -              |
| 4  | FA         | NA     | FA         | MA             | -              |
| 5  | FA         | NA     | FA         | NA             | -              |
| 6  | MA         | NA     | FA         | NA             | -              |
| 7  | FA         | NA     | FA         | MA             | -              |
| 9  | MA         | FA     | FA         | MA             | -              |
| 11 | NA         | NA     | FA         | NA             | -              |
| 14 | FOA        | FOA    | MA         | FOA            | +              |
| 15 | MA         | FA     | FA         | MA             | -              |
| 17 | FOA        | FOA    | MA         | MA             | +              |
| 18 | FA         | NA     | FA         | MA             | +              |
| 21 | FA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| 22 | FA         | NA     | FA         | NA             | +              |
| 23 | FA         | NA     | FA         | FA             | +              |
| 24 | MA         | NA     | FA         | MA             | +              |
| 25 | FA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| 26 | FOA        | NA     | MA         | MA             | +              |
| 28 | MA         | NA     | FA         | MA             | +              |
| 29 | FA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| 30 | FA         | NA     | FA         | MA             | -              |
| 31 | FA         | NA     | FA         | MA             | -              |
| 32 | FOA        | FOA    | MA         | FOA            | +              |
| 33 | FA         | NA     | FA         | FA             | +              |
| 34 | FA         | NA     | FA         | FA             | -              |
| 35 | FA         | NA     | FA         | FA             | +              |
| 36 | FA         | NA     | FA         | MA             | -              |
| 37 | FA         | NA     | FA         | FA             | +              |
| 39 | FA         | NA     | FA         | MA             | +              |

| AM  | CRISTENSEN | AMARAL | DJORDJEVIC | ADESÃO EM | VERMELHO CONGO |
|-----|------------|--------|------------|-----------|----------------|
| 40  | MA         | FA     | MA         | MA        | +              |
| 42  | FA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 43  | FA         | NA     | FA         | MA        | -              |
| 44  | FA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 46  | FA         | NA     | FA         | MA        | -              |
| 49b | FA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 50a | FA         | NA     | FA         | FA        | +              |
| 51a | FA         | NA     | FA         | MA        | -              |
| 59  | FA         | NA     | FA         | FA        | +              |
| 62  | FA         | NA     | FA         | MA        | +              |
| 63  | FA         | NA     | FA         | MA        | -              |
| 64  | FA         | NA     | FA         | FA        | +              |
| 69  | FOA        | NA     | FA         | MA        | +              |
| 70  | NA         | NA     | MA         | NA        | +              |
| 72  | FA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 73  | MA         | NA     | FA         | MA        | -              |
| 74  | FA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 75  | FOA        | FOA    | FOA        | FOA       | +              |
| 77  | NA         | NA     | FA         | NA        | -              |
| 82  | FA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 83  | NA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 88  | FA         | NA     | MA         | NA        | -              |
| 89  | FA         | NA     | MA         | NA        | -              |
| 90  | FA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 92  | MA         | NA     | FA         | MA        | +              |
| 93  | NA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 95  | NA         | NA     | FA         | NA        | -              |
| 96  | NA         | NA     | FA         | FA        | +              |
| 97  | FA         | NA     | FA         | FA        | -              |
| 101 | FA         | NA     | FA         | FA        | +              |

**Legenda:**AM – Amostra NA – não aderente FA – fracamente aderente MA – moderadamente aderente FOA – Fortemente aderente

## 5.5 – Avaliação da diversidade genética das amostras

Os ensaios de RAPD revelaram a diversidade das amostras dispostas em 25 tipos RAPD. No entanto, 43 (56,6%) das amostras se agruparam nos tipos I, II, IV e VIII (Figura 3). Além disso, a maioria das amostras provenientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto (37,5 %) foram alocadas no tipo IV.

Apesar da similaridade detectada nestes grupos, tais amostras não apresentaram um perfil homogêneo quanto a resistência antimicrobiana ou a ocorrência de genes associados à formação de biofilme (Quadros 5 a 8). (Figura 4)

Tipo I: amostras I51a, I51b, I 28, I63, I25, I62, I32, I74, I64, I90 e I93.

**Quadro 6: Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras pertencentes ao tipo I**

|                 | Amostras       | I51A | I51B | I28 | I63 | I25 | I62 | I32 | I74 | I64 | I90 | I93 |
|-----------------|----------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Genes           | icAD           | -    | -    | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   |
|                 | mecA           | +    | +    | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   |
|                 | atle           | +    | +    | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
|                 | aap            | -    | -    | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   |
|                 | bap            | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   |
| Antimicrobianos | Penicilina     | R    | R    | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   |
|                 | Oxacilina      | R    | R    | R   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Eritromicina   | R    | R    | R   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Rifampicina    | R    | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Vancomicina    | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Clindamicina   | R    | R    | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Gentamicina    | R    | R    | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Ciprofloxacina | R    | R    | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Clorafenicol   | S    | S    | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Tetraciclina   | S    | S    | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
|                 | Mupirocina     | R    | R    | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Linezolida     | S    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| Teicoplanina    | S              | S    | S    | R   | S   | R   | S   | S   | S   | R   | S   |     |

**Legenda:** M – amostras HUPE      I – amostras INCA

TypoII : amostras: I36, I50a, I32, I34, I31, I39, I24, I40, I28 e I30

**Quadro 7: Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras pertencentes ao tipo II**

| Amostras        | I36            | I50A | I32 | I34 | I31 | I39 | I24 | I40 | I28 | I30 |
|-----------------|----------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Genes           | icAD           | -    | -   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -   |
|                 | mecA           | +    | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | -   |
|                 | atle           | +    | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   |
|                 | aap            | -    | -   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   |
|                 | bap            | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Antimicrobianos | Penicilina     | R    | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   |
|                 | Oxacilina      | R    | R   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | S   |
|                 | Eritromicina   | R    | S   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | S   |
|                 | Rifampicina    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Vancomicina    | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Clindamicina   | R    | R   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   |
|                 | Gentamicina    | S    | R   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   |
|                 | Ciprofloxacina | S    | R   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   |
|                 | Clorafenicol   | R    | R   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | R   |
|                 | Tetraciclina   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
|                 | Mupirocina     | S    | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   |
|                 | Linezolida     | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| Teicoplanina    | S              | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |     |

**Legenda:** M – amostras HUPE      I – amostras INCA



Tipo IV: M1 ,M2, M3, M10, M14, M12, I7, I73, I83, I77, I6, I95, I88, I92

**Quadro 8: Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras pertencentes ao tipo IV**

|                 | Amostras       | M1 | M2 | M3 | M15 | M21 | M17 | I7 | I73 | I83 | I77 | I6 | I95 | I88 | I92 |
|-----------------|----------------|----|----|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| Genes           | icAD           | -  | -  | +  | +   | -   | -   | -  | -   | +   | +   | +  | +   | +   | +   |
|                 | mecA           | +  | -  | +  | +   | +   | +   | -  | +   | +   | +   | +  | +   | +   | +   |
|                 | atle           | +  | +  | +  | +   | +   | +   | +  | +   | +   | +   | +  | +   | +   | +   |
|                 | aap            | -  | +  | +  | +   | -   | -   | -  | -   | +   | -   | +  | -   | +   | +   |
|                 | bap            | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -  | -   | +   | -   | -  | -   | -   | -   |
| Antimicrobianos | Penicilina     | R  | R  | R  | R   | R   | R   | R  | R   | R   | R   | R  | R   | R   | R   |
|                 | Oxacilina      | R  | S  | R  | R   | R   | S   | S  | R   | R   | R   | R  | R   | R   | R   |
|                 | Eritromicina   | R  | S  | R  | R   | R   | S   | S  | S   | R   | R   | R  | R   | R   | R   |
|                 | Rifampicina    | S  | S  | R  | R   | R   | R   | S  | S   | S   | R   | R  | R   | R   | S   |
|                 | Vancomicina    | S  | S  | S  | S   | S   | S   | S  | S   | S   | S   | S  | S   | S   | S   |
|                 | Clindamicina   | R  | S  | R  | R   | R   | S   | S  | S   | R   | R   | R  | R   | R   | R   |
|                 | Gentamicina    | R  | R  | R  | R   | S   | S   | S  | S   | R   | S   | R  | R   | R   | R   |
|                 | Ciprofloxacina | S  | S  | S  | R   | S   | S   | S  | R   | R   | R   | R  | R   | R   | R   |
|                 | Clorafenicol   | R  | S  | R  | R   | S   | S   | S  | R   | S   | R   | S  | S   | R   | S   |
|                 | Tetraciclina   | S  | S  | S  | S   | S   | S   | S  | S   | S   | S   | S  | S   | R   | S   |
|                 | Mupirocina     | S  | S  | S  | S   | S   | R   | S  | S   | R   | S   | S  | R   | R   | R   |
|                 | Linezolida     | S  | S  | S  | S   | S   | S   | S  | S   | S   | S   | S  | S   | S   | S   |
| Teicoplanina    | S              | S  | S  | S  | S   | S   | S   | S  | S   | S   | S   | S  | S   | S   |     |

**Legenda:** M – amostras HUPE      I – amostras INCA

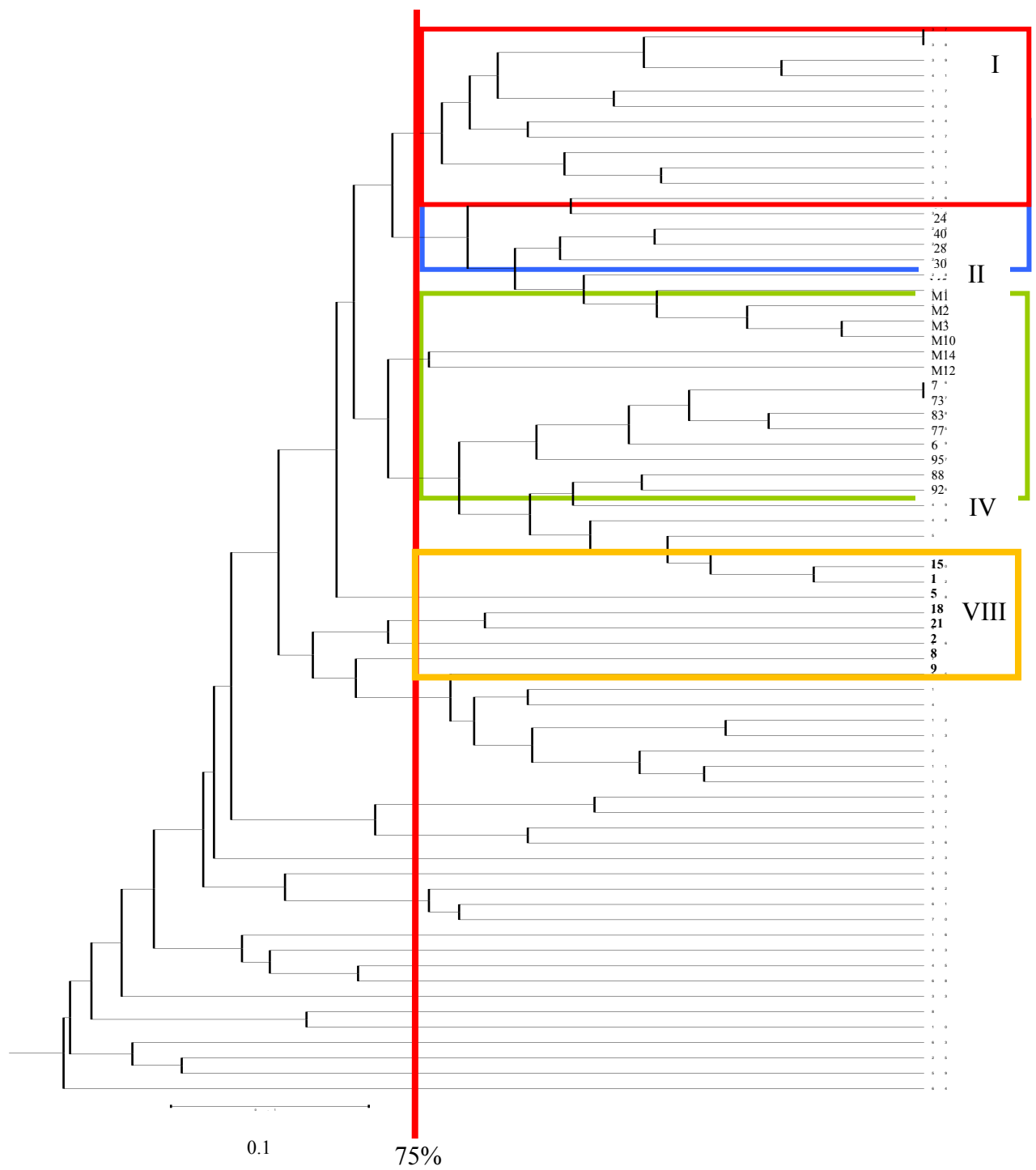
Tipo VIII: amostras: I15, I1, I5, I18, I21, I2, I8, I9.

**Quadro 9: Perfil genético e resistência antimicrobiana de amostras pertencentes ao tipo VIII**

| Amostras        |                | I23 | I1 | I5 | I18 | I21 | I2 | I17 | I22 |
|-----------------|----------------|-----|----|----|-----|-----|----|-----|-----|
| Genes           | icAD           | -   | +  | +  | -   | -   | +  | +   | +   |
|                 | mecAD          | +   | +  | +  | +   | +   | +  | +   | +   |
|                 | atle           | +   | +  | +  | +   | +   | +  | +   | +   |
|                 | aap            | +   | +  | +  | +   | -   | +  | -   | +   |
|                 | bap            | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -   |
| Antimicrobianos | Penicilina     | R   | R  | R  | R   | R   | R  | R   | R   |
|                 | Oxacilina      | R   | R  | R  | R   | R   | R  | R   | R   |
|                 | Eritromicina   | S   | R  | R  | R   | S   | R  | R   | R   |
|                 | Rifampicina    | S   | S  | R  | S   | S   | S  | S   | S   |
|                 | Vancomicina    | S   | S  | S  | S   | S   | S  | S   | S   |
|                 | Clindamicina   | S   | R  | R  | R   | S   | R  | R   | R   |
|                 | Gerntamicina   | S   | R  | R  | R   | S   | R  | S   | R   |
|                 | Ciprofloxacina | S   | R  | R  | R   | S   | R  | R   | R   |
|                 | Clorafenicol   | R   | S  | S  | S   | S   | S  | S   | S   |
|                 | Tetraciclina   | S   | R  | S  | S   | R   | S  | S   | S   |
|                 | Mupironcina    | S   | S  | S  | S   | S   | S  | S   | R   |
|                 | Linezolida     | S   | S  | S  | S   | S   | S  | S   | S   |
|                 | Teicoplanina   | S   | S  | S  | S   | S   | S  | S   | S   |

**Legenda:** M – amostras HUPE      I – amostras INCA

A maioria das amostras provenientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto foram pertencentes ao Tipo IV. A comparação da similaridade genética com o perfil genético e resistência antimicrobiana das amostras não demonstrou um padrão significativo



**Figura 4 Dendrograma mostrando a similaridade genética entre as amostras**

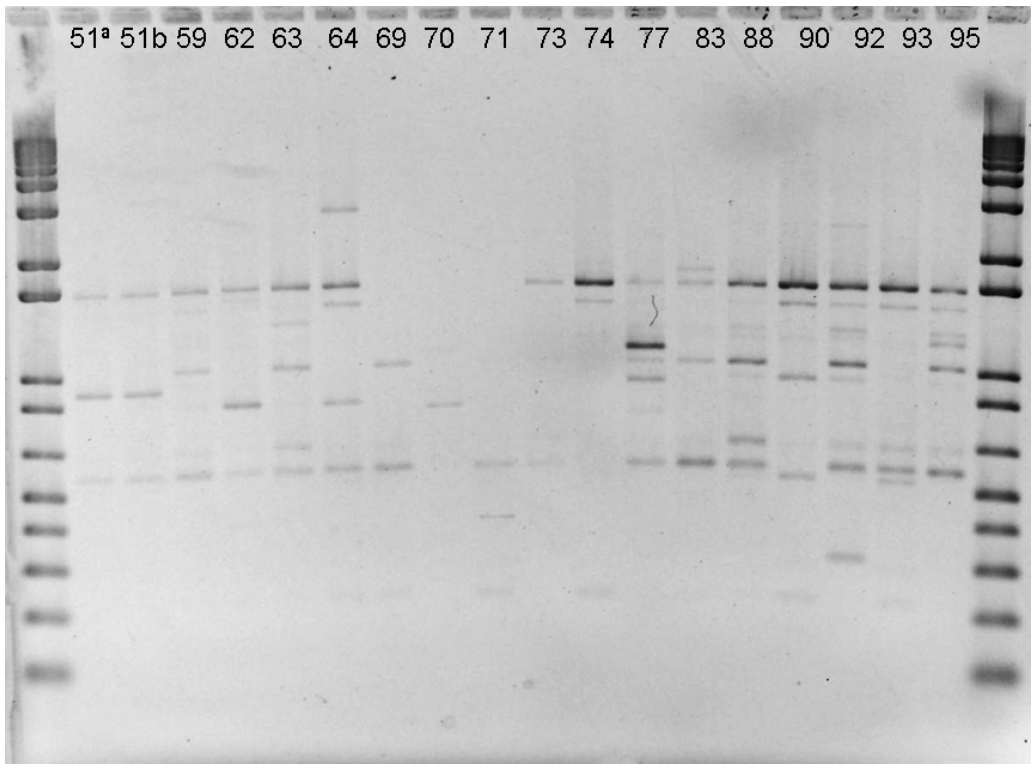


Figura 5 : Foto ilustrativa amplificação de RAPD com o primer 1252 amostras INCA

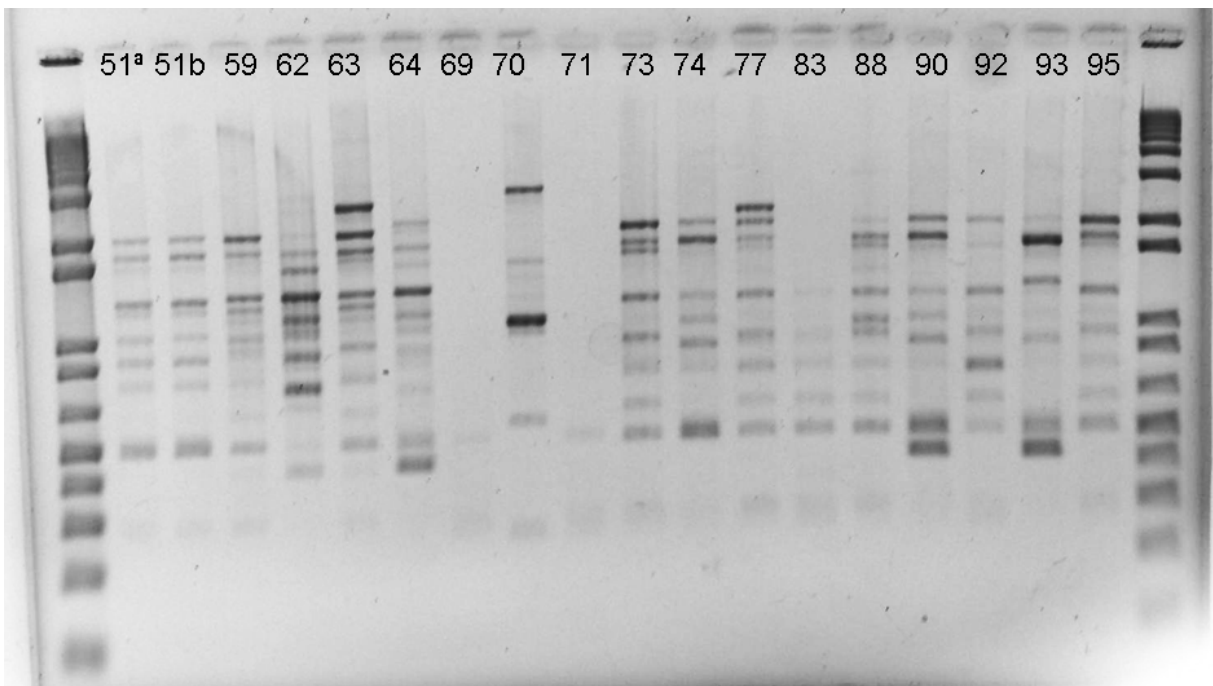


Figura 6: Foto ilustrativa amplificação de RAPD com o primer 1254 amostras INCA

## 6.0 DISCUSSÃO

Os SCN até a década de 1970 eram considerados como comensais e não sendo levados em consideração nos resultados de exames microbiológicos. No entanto, nas últimas décadas, estas bactérias têm sido consideradas como patógenos, em crescente incidência, causando doenças significativas, geralmente como consequência de uma quebra nas defesas normais do hospedeiro, que foi submetido a procedimentos invasivos como o implante de cateteres, drenos e próteses ou, em pacientes imunocomprometidos, sendo atualmente consideradas um dos principais grupos bacterianos responsáveis pelas complicações infecciosas hospitalares. (ARCHER LG, 2000; PICAZO JJ, *et al* 2003)

Em relação às espécies encontradas e seu significado clínico, Weinstein *et al.*(1998) observaram que, de 285 SCN isolados em hemoculturas em New Jersey (EUA), no período de 1992 a 1995, 67,7% (193) foram classificados como contaminantes, enquanto 32,3% (92) como clinicamente significativos. Devido a este fator, só foram consideradas neste trabalho amostras que se mostraram positivas em mais de um frasco de hemocultura, diminuindo com isso a interferência de contaminantes saprofitas da pele.

Vários estudos têm demonstrado a participação dos SCN isolados em hemoculturas. SADER *et al.*(2004) mostraram que, de 9059 bacteriemias verdadeiras, os SCN foram responsáveis por 13,5% dos casos. MULLER-SERIEYS *et al.* (2004) descreveram o isolamento de 43,5% dos ECN em hemoculturas, enquanto ALCARÁZ *et al.*(2003) encontraram 31,1%..

Nas últimas décadas, também foi observado um aumento substancial na frequência de resistência à metilina e na multirresistência entre os SCN (DE MATTOS *et al.*, 2003). O número de cepas de *S. epidermidis* multirresistentes que colonizam a pele de pacientes hospitalizados, de profissionais de saúde e até mesmo de pessoas saudáveis da comunidade vem aumentando nos últimos anos.

Métodos moleculares para detecção de resistência à oxacilina, como a PCR para o gene *mecA*, são mais sensíveis que os métodos fenotípicos e por essa razão são utilizados como padrão ouro para avaliação da sensibilidade e especificidade de outros métodos (HUSSAIN, 2000-b, FERREIRA, 2003). Esta mesma metodologia foi utilizada neste trabalho, onde foi encontrado 52 amostras (68,4%) para gene *mecA* positivos.

Duas amostras foram Resistentes a oxacilina mas não apresentaram positividade para o gene *mecA*, isto pode ter sido provocado pela hiperprodução de beta-lactamases ou modificação do sitio alvo.

Baixas taxas de resistência à mupirocina foram observadas em estudo realizado por KRESKEN et al., 2004; em laboratórios da Europa. Este estudo teve um universo de 456 cepas de *S. epidermidis*. A resistência à mupirocina foi detectada somente nas cepas resistentes à oxacilina e as taxas de resistências apresentadas foram de 4,5%. Neste trabalho foram verificados 15 (19,7%) amostras resistentes à mupirocina, resultado este similar ao encontrado por RITO et al (2008), em estudo realizado em hospital universitário no Brasil.

O aumento na resistência a teicoplanina vem crescendo e preocupando todo o mundo, em estudo feito em hospitais da França por Trueba et al (2006) com 300 amostras de *S. epidermidis* oxacilina resistentes mostrou que 55% destas amostras foram resistentes a teicoplanina, porém sensíveis a vancomicina, em nosso estudo apenas 7,9% das amostras apresentaram-se resistentes a teicoplanina e sensíveis a vancomicina.

A capacidade de produzir biofilme pelas cepas do gênero *Staphylococcus* é também considerada um fator preponderante na patogenia destes microrganismos (VANDEESCASTELLE et al., 2003). Dessa forma, sem a proteção do biofilme, estas bactérias estariam susceptíveis às defesas imunológicas do hospedeiro ou mesmo aos antimicrobianos (LI et al., 2005).

Em trabalho apresentado por ADAM et al (2002) foi demonstrado que cepas de *S. epidermidis* constituindo organizações em biofilme, são mais resistentes a antimicrobianos quando comparadas com as mesmas cepas em forma planctônica, e que esta resistência pode ser aumentada pela presença de outros microrganismos. Em pesquisas realizada por YAO et al., 2005 foi demonstrado que mecanismos de repressão e superexpressão de genes essenciais à fisiologia celular estão diretamente relacionados à resistência em biofilme. Como a expressão de biofilme é uma condição variável, a susceptibilidade aos antimicrobianos agregada a este mecanismo também se faz instável.

HEILMAN et al., 2003 faz referência a uma autolisina presente em *Staphylococcus* a autolisina AtlE, codificada pelo gene cromossômico *altE*, que tem papel nos estágios iniciais da aderência do *Staphylococcus* às superfícies hidrofóbicas dos dispositivos médicos. Em

nosso estudo 69 (90,8%) das amostras apresentaram positividade para o gene *altE*. Similar ao encontrado por ARAUJO et al, 2006, em um trabalho realizado no Rio de Janeiro, onde 86% das amostras foram positivas para o mesmo gene.

Proteínas também parecem estar envolvidas na fase de acumulação do biofilme. Um exemplo é uma proteína de 140 kDa associada à acumulação-Aap . Estudos demonstram que cepas de *S. epidermidis* mutantes que não expressam o gene *aap*, apresentam uma redução drástica desta fase (HUSSAIN et al., 1997). Em trabalho realizado por ARAUJO et al., 2006 foram detectados 82% de amostras positivas para o gene *aap*, já neste estudo foram encontradas 28 (38.8%) amostras positivas.

Alguns estudos demonstraram que a expressão de biofilme pode variar entre isolados da mesma cepa (DEIGHTON et al, 1992, ZIEBUHR et al, 1997,1999). Esta variação fenotípica da expressão de biofilme foi atribuída a um processo reversível de inativação do gene *icaC* pela inserção e excisão do transposon IS256 (ZIEBUHR et al, 1999).

HANDKE et al, 2004, demonstraram dois outros mecanismos de alteração na expressão de biofilme em isolados que não apresentavam o transposon IS256: a) baixos níveis de expressão do gene *icaA*; b) mutações no gene *icaD* e na região terminal do gene *icaA* .Este fenômeno facilita a dispersão natural de células não aderentes de *S. epidermidis* propiciando a colonização de outras áreas não comprometidas. Estes tipos de alterações podem ter ocorrido nas cepas em estudo, pois podemos observar que algumas cepas mesmo apresentando positividade para o gene *ica* demonstraram-se fracamente produtoras de biofilme em ambos os métodos fenotípicos utilizados.

GILL et al (2005), realizando a análise genômica de cepas de *S. epidermidis* comparando cepas produtoras e não produtoras de biofilme, revelaram que além do operon *ica ADBC*, as cepas produtoras de biofilme apresentam uma proteína de parede celular associada a biofilme (Bap), que previamente havia sido identificada em cepas de *S. aureus* relacionadas à mastite bovina, e está associada a aderência de superfícies de poliestireno.Em nosso estudo só foram observadas 3 amostras positivas para este gene.

Na comparação da metodologia para a formação de biofilme, a interpretação dos resultados pode variar de acordo com o método escolhido, porém os métodos de Christensen e Djordjevic foram os métodos que mais se aproximaram um do outro e tiveram um maior

poder discriminatório entre as amostras. O ensaio com Agar vermelho congo foi de difícil interpretação e muitas vezes não concordava com os resultados obtidos nos ensaios de aderência.

A análise genotípica para formação de biofilme foi mais sensível quando comparada com as metodologias fenotípicas pois muitas amostras apresentaram 2 ou mais genes para formação de biofilme porem foram considerados fenotipicamente fracamente ,moderadamente ou até mesmo não aderentes.

A associação entre a produção de biofilme e resistência antimicrobiana pode ser comprovada uma vez que 60/76 ( $p < 0,05$ ) amostras apresentaram positividade para pelo menos um gene de formação de biofilme e foram consideradas multiresistentes.

As relações de similaridade pela técnica de RAPD foram capazes de discriminar e agrupar os isolados, a utilização de dois iniciadores aumentou o poder discriminatório da técnica. A análise do dendrograma revelou a distribuição dos isolados em diferentes perfis moleculares com algum grau de similaridade verificando assim o alto poder discriminatório da técnica, podendo diferenciar as amostras em 25 Tipos, dentre eles os tipos I, II, IV e VIII reuniram a maior parte das amostras.

Infecções bacterianas na região de implantes de materiais médicos como cateteres e próteses artificiais representam um sério problema na área médica. Pesquisas realizadas nos EUA verificaram que, quando se consideram todos os materiais médicos implantados, o número de infecções associadas a implantes pode chegar a um milhão por ano (HENTRICH & SCHOENFISCH, 2006).

Um dos maiores desafios para clínicos e microbiologistas continua a ser a separação entre as cepas patogênicas, isto é, as que são clinicamente significativas daquelas consideradas como contaminantes dos meios de cultura, contaminação esta ocorrida durante os procedimentos habituais de coleta dos materiais biológicos. Estas culturas contaminadas representam um aumento da duração da internação, bem como altos custos dos setores de farmácia e laboratório.



## 7.0 CONCLUSÃO

- ✓ As amostras provenientes do INCA apresentaram um maior potencial de FORMAÇÃO DE BIOFILME quando comparadas com as amostras da UERJ,
- ✓ Verificou-se o alto índice de resistência a oxacilina e ausência de resistência a vancomicina e linezolida nos isolados estudados.
- ✓ A ocorrência do gene *mecA* associado à resistência antimicrobiana e genes relacionados com a produção de biofilme foram frequentemente observados;
- ✓ Foi observado que a multiresistência e a potencial formação de biofilme estão associadas nas amostras de *S. epidermidis* estudadas.
- ✓ Os testes fenotípicos para detecção de aderência não são homogêneos quanto aos resultados, reforçando a avaliação através de marcadores genéticos de melhor reprodutibilidade.
- ✓ Apesar da diversidade genética observada entre as amostras, amostras com grande similaridade genética se mostraram presentes em ambos os hospitais estudados, demonstrando a provável circulação de amostras entre estes hospitais

## 9.0 BIBLIOGRAFIA

- ✓ ADAM, B., BAILLIE, G. S., DOUGLAS, J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 51, 344-9, 2002.
- ✓ AGVALD-ÖHMAN, C.; LUND, B.; EDLUND, C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. *Critical Care*, v. 8, n. 1, p.42-47, 2004.
- ✓ ALCARÁZ LE, SATORRES SE, LUCERO RM, PUIG DE CENTORBI ON. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from nosocomial specimens. *Braz J Microbiol.*;34(1):45- 51; jan-abr 2003.
- ✓ ALLIGNET J, AUBERT S, MORVAN A, SOLH NE. Distribution of genes encoding resistance to streptogramin A and related compounds among staphylococci resistant to these antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2523-2528, 1996.
- ✓ ALLIGNET J, SOLH NE. Characterization of a new staphylococcal gene, *vgaB*, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Gene* 202: 133-138, 1997.
- ✓ ALLIGNET J, SOLH NE. Diversity among the gram-positive acetyltransferases inactivating streptogramin A and structurally related compounds and characterization of a new staphylococcal determinant, *vatB*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2027-2036, 1995.
- ✓ ALLISON, D. G. The Biofilm Matrix. *Biofouling. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. 19, 139-150,2003
- ✓ AMARAL, M. M.; COELHO, L. R.; FLORES, R. P. 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.*, p. 801-810, Set. 2005.
- ✓ AMATO NETO, V.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J. S.; BALDY, J. L. S. *Antibióticos na prática médica*. 4a ed. São Paulo: Roca., 283p; 1994.
- ✓ ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., GAMBERINI, S., CERVELLATI, M., DONATI, E., MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials*, 23, 4233-9, 2002.

- ✓ ARMSTRONG, J.; GIBBS, A.; PEAKALL, R. & WEILLER, G. RAPDistance program version 1.03 for the analysis of patterns of RAPD fragments. Australian National University, Canberra, Australia, 1994.
- ✓ AZEREDO, J. AND OLIVEIRA R. “Exopolymers in Bacterial Adhesion: Interpretation in Terms of DLVO and XDLVO Theories”. *Coll Surf B: Biont*, 14, 141-148, 1999.
- ✓ AZEREDO, J. E OLIVEIRA, R. The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. *Biofouling*, 16(1), 17-27; 2000.
- ✓ BAKKE, R., TRULEAR, M. G., ROBINSON, J. A. E CHARACKLIS, W. G. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in steady state. *Biotech. and Bioeng.*, 26, 1418-1424; 1984.
- ✓ BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th. ed. Washington: ASM Press, p. 384-404, 2003.
- ✓ BEYER D, PEPPER K. The streptogramin antibiotics: up-date on their mechanism of action. *Expert Opin Investig Drugs* 7: 591-599, 1998.
- ✓ BOTT, T. R. “Aspects of Biofilm Formation and Destruction”. *Corrosion Reviews*, 11,1-24,1993.
- ✓ BOTT, T. R. *Fouling of Heat Exchangers*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B. V; 1995.
- ✓ BOUZA, E; BURRILLO, A; MUÑOZ, P. CATHETER – related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Chest*, Northbrook, v. 112, p. 235-243, 2002.
- ✓ CAFISO, V.; BERTUCCIO, M.S.; CAMPANILE, F.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.G.; SELAN, M.A.; NICOLETTI, G.; STEFANII, S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin. Microbial. Infect.*, v. 10, p. 1081-1088, 2004.
- ✓ CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Brief report: vancomycin –resistant *Staphylococcus aureus* --- New York, 2004. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 53(15): 322-3, 2004.
- ✓ CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 46(27): 626-628, 635, 1997.

- ✓ CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Recommendation for preventing the spread of vancomycin resistance recommendations of the hospital infection control practices advisory committee (HICPAC). *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 44(RR12): 1-13, 1995.
- ✓ CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Staphylococcus aureus resistant to vancomycin ---United States, 2002. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 51(26): 565-7, 2002.
- ✓ CERCENADO, E.; GARCÍA-LEONI, M. E.; DÍAZ, M. D.; SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; CATALÁN, P.; BERNALDO DE QUIRÓS, J. C. L.; BOUZA, E. Emergence of teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 34(7): 1765-8, 1996.
- ✓ CHAMBERLAIN, A. H. L., 1992. The Role of Adsorbed layers in bacterial adhesion. In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. *Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 59-67.
- ✓ CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10(4): 781-91, 1997.
- ✓ CHAMBERS.H.F. The Changing Epidemiology of Staphylococcus aureus?. *Emerging infectious diseases*. Special Issue Vol. 7, No. 2 Mar–Apr 2001
- ✓ CHARACKLIS, W. G. “Fouling Biofilm Development: a Process Analysis”. *Biotech. Bioeng.*, 23, 1923-1960, 1981.
- ✓ CHARACKLIS, W. G. 1990. Laboratory biofilm reactors. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: Jonh Wiley and Sons, Inc, 55-89.
- ✓ CHARACKLIS, W. G., MARSHALL, K. C. Biofilm: A basis for an interdisciplinary approach. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C (eds) *Biofilms*. John Wiley and Sons Inc. New York, 1990.
- ✓ CHARACKLIS, W. G., Wilderer, P. A. *Structure and Function of Biofilms*. New York: John Wiley & Sons, New York, 1989.
- ✓ CHEESBOUGER, J.S.; FINCH, R.G.; BURDEN, R.P. A prospective study of the mechanisms of infection associated with hemodialysis catheters. *J. Infect. Dis.*, v. 154, p. 579-589, 1986.
- ✓ CHRISTENSEN, G. D., W. A. SIMPSON, A. L. BISNO, AND E. H. BEACHEY. Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37:318-326;1982.

- ✓ CHRISTENSEN, G.D. Comparison of microbiologic characteristics of pathogenic and saprophytic coagulase-negative staphylococci from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 5, p. 197-205, 1986.
- ✓ CHRISTENSEN, G.D.; Baldassari, L.; Simpsom, W.A. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: BISNO, A.L.; WALDVOGEL, F.A. *Infec associated with indwelling medical devices*. 2nd. ed. Washington: ASM Press. p. 45-78; 1994
- ✓ CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J.J.; BADDOUR, L.M.; BARRETT, F.F.; MELTON, D.M.; BEACHEY, E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 22, n. 6, p. 996-1006, Dec. 1985.
- ✓ Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.2007
- ✓ COSTERTON, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M.e Marrie, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Ver. Microbiol.* 41, 435-464; 1987.
- ✓ COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G. E CHENG, K.-J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86-95.
- ✓ COSTERTON, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin Scott, H. M. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 711-745;1995.
- ✓ CRAMTON, S.E.; ULRICH, M.; GÖTZ, F.; DÖRING, G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 4079-4085, 2001.
- ✓ CRHISTENSEN, G. D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smoth surfaces. *Infection and Immunity*, v. 37, n.1, p. 318-326, 1982.
- ✓ DE ARAUJO, G.L. et al. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidemidis* are also equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J. Antimicrobiol. Chem.*, v. 57, p. 855-864, 2006.
- ✓ DEIGHTON, M., PEARSON, S., CAPSTICK, J., SPELMAN, D., BORLAND, R. DJORDJEVIC, D., M. WIEDMANN, AND L. A. MCLANDBOROUGH. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2950-2958; 2002.

- ✓ DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 167-193, 2002.
- ✓ DUVAL, J. Evolution and epidemiology of MLS resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 16(Suppl. A):137-149;1985.
- ✓ ELVERS, K. E.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms and biofouling. *Encyclop of Microbiol.* 1, 478-485, 2000.
- ✓ FERREIRA, R.B.R. et al. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screen test by using different concentrations of oxacillin. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.8, p.3609-3614, 2003.
- ✓ FILE Jr., T. M. Overview of resistance in the 1990s. *CHEST*, 115: 3s-8s. Supplement, 1999.
- ✓ FLEMMING, H-C. E SCHAULE, G. Measures against biofouling. In: Heitz, E., Flemming, H-C. e Sand, W. eds. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Springer-Verlag, 121-139; 1996.
- ✓ FLEMMING, H-C., "Biofilms and Environmental Protection". *Water Science and Technology*, 27 (7-8), 1-10, 1993.
- ✓ FLEMMING, H-C., WINGENDER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilme construction material. In: Weber, J., W. eds. *Biofouling and Materials: COST 520 Workshop*. Bern: EDMZ, 2-18, 1999.
- ✓ FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 42, n.8, p. 872-874, Aug. 1989.
- ✓ FUNG H.B.; KIRSCHENBAUM H.L.; OJOFEITIMI B.O. Linezolid: an oxazolidinone antimicrobial agent *Clin Ther.*;23(3):356-91; Mar 2001.
- ✓ GEHRKE, T., TELEGDI, J., THIERRY, D. E SAND, W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2743-2747; 1998.
- ✓ GERKE, C., KRAFT, A, SUBMUTH, R., SCHWEITZER, GOTZ, F. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18586-93, 1998.

- ✓ GILBART J, PERRY CR, SLOCOMBE B High-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: evidence for two distinct isoleucyl-tRNA synthetases. *Antimicrob Agents Chemother* 37:32–38;1993.
- ✓ GILBERT, D. N.; MOELLERING Jr., R. C.; SANDE, M. A. *The Sanford: Guia para terapia antimicrobiana*. 33a ed. Rio de Janeiro: EPUC, 2003. 150p.
- ✓ GILBERT, P.; DAS, J. R.; FOLEY, I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160-167, 1997.
- ✓ GILL SR, FOUTS DE, ARCHER GL, MONGODIN EF, DEBOY RT, RAVEL J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol.* 187(7): 2426-38; 2005.
- ✓ GJALTEMA, A. “Biofilm Development: Growth versus Detachment”. Dissertação de Doutorado. Delft: Technische Universiteit Delft, Netherlands, 1996.
- ✓ GOLDMAN. R. C.; CAPOBIANCO. J. O. Role of an Energy-Dependent Efflux Pump in Plasmid pNE24-Mediated Resistance to 14- and 15-Membered Macrolides in *Staphylococcus epidermidis*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, p. 1973-1980 , Oct. 1990.
- ✓ GRIF, K.; KARCH, H.; SCHNEIDER, C.; DASCHNER, F. D.; BEUTIN, L.; CHEASTY, T.; SMITH, H.; ROWE, B.; DIERICH, M. P. & ALLERBERGER, F. Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 32: 165-176, 1998.
- ✓ HANDKE, L. D., CONLON, K. M., SLATER, S. R., ELBARUNI, S., FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H., et al. Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates, *Journal of Medical Microbiology*, 53, 367-74, 2004.
- ✓ HANDKE, L.D.; CONLON, K.M.; SLATER, S.R.; ELBARUNI, S.; FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; GILES, W.P.; RUPP, M.E.; FEY, P.D.; O’GARA, J.P. Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. *J. Med. Microbiol.*, v. 53, p. 367-374, 2004.
- ✓ HEILMANN, C., SCHWEITZER, O., GERKE, C., VANITTANAKON, N., MACK, D., GOTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesin in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology*, 20(5), 1081-1091, 1996.

- ✓ HEILMMAN, C.; THUMM, G. et al. Identification and characterization of a novel autolysin (AAe) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis* . *Microbiology*, 149, 2769-78, 2003.
- ✓ HENTRICH, E.M.; SCHOENFISCH, M.H. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chemic. Soc. Rev.*, v .35, p. 780-789. 2006.
- ✓ HORAN, N. J. E ECCLES. C. R. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Water Research*, 20, 1427-1432; 1986.
- ✓ HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Ver. Med.*, v. 50, p. 223-236, 1999.
- ✓ HUSSAIN M, HERRMANN M, VON EIFF C et al. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun*; 65: 519–24; 1997.
- ✓ HUSSAIN M, HERRMANN M, VON EIFF C, PERDREAU-REMINGTON F, PETERS G.A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun*. 65(2):519-24; 1997.
- ✓ 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.*, v. 65, p. 519-24, Fev. 1997.
- ✓ HUSSAIN, Z., L. STOAKES, S. GARROW, S. LONGO, V. FITZGERALD, AND R. LANNIGAN. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol*. 38:2051-2054; 2000.
- ✓ JAHN, A. E NIELSEN, P. H. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilmes using a cation exchange resin. *Wat. Sci. Tech*, 32(8), 157-164; 1995.
- ✓ JAHN, A., GRIEBE, T. E NIELSEN, P. H. Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling*, 14(1), 49-57; 1999.
- ✓ JONES, P.G.; HOPFER, R.L.; ELTING, L.; JACKSON, J.A.; FAINSTEIN, V.; BODEY, G.P. Semiquantitative cultures of intravascular catheters from cancer patients. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 4, p. 299-306, 1986.
- ✓ KAATZ, G.; SEO, S.M.; Inducible NorA-Mediated Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Vol. 39, No. 12, p. 2650–2655; Dec. 1995.



- ✓ KEHOE LE, SNIDWONGSE J, COURVALIN P, RAFFERTY JB, MURRAY IA. Structural basis of quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacterial pathogens. *J Biol Chem* 278: 29963-29970, 2003.
- ✓ KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 7, p. 117-140, 1994.
- ✓ KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. *Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5th.ed. Philadelphia: Lippincott/ Williams & Wilkins, 1395p; 1997.
- ✓ KRESKEN, M.; HAFNER, D.; SCHMITZ, F. J.; WICHELHAUS, T. A.; PAUL-EHRLICH-SOCIETY FOR CHEMOTHERAPY. Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. *Int. J. Antimicrob. Ag.* vol. 23, n. 6, p. 577-81, Jun. 2004.
- ✓ KRESKEN, M.; HAFNER, D.; SCHMITZ, F. J.; WICHELHAUS, T. A.; PAUL-EHRLICH-SOCIETY FOR CHEMOTHERAPY. Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. *Int. J. Antimicrob. Ag.* vol. 23, n. 6, p. 577-81, Jun. 2004.
- ✓ KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.02. The Pennsylvania State University. University Park, PA, USA, 1993.
- ✓ Leclercq, R.; Derlot, E.; Durval, J.; Courvalin, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.*, 319: 157-61, 1988.
- ✓ LI, H. et al. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 3188-91, Maio 2005.
- ✓ LINA G, QUAGLIA A, REVERDY ME, LECLERCQ R, VANDENESCH F, ETIENNE J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1062-1066, 1999.
- ✓ MACK, D., RIEDEWALD, J., ROHDE, H., MAGNUS, T., FEUCHT, H. H., ELSNER, H. A., et al. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infection and Immunity*, 67, 1004-1008, 1999.
- ✓ MACK, D., ROHEDE, H., DOBINSKY, S., RIEDEWALD, J., NEDELMANN, M., KNOBLOCH, J. K.- M. et al. Identification of three essential regulatory gene loci

- ✓ MARKHAM, P.N; NEYFAKH, A. A Inhibition of the Multidrug Transporter NorA Prevents Emergence of Norfloxacin Resistance in *Staphylococcus aureus* antimicrobial agents and chemotherapy, , p. 2673–2674; Nov. 1996.
- ✓ MARSHALL, K .C. E BLAINEY, B. L.. Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion. In: Flemming H-C, Geesey G G (eds) *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Springer, Heidelberg, pp 29-45; 1990.
- ✓ MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; GRENIER, L.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; The ESPRIT trial; BERGERON, M. G. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v. 46, p. 527-533, 2000a.
- ✓ MATTILA-SANDHOLM, T. E WIRTANEN, G. Biofilm Formation in the Industry: a review. *Food Review International*. 8, 573-603, 1992.
- ✓ MELO, L. F. “Biofilmes e o Controlo da Poluição”. *Boletim de Biotecnologia*, 48, 16-25, 1994.
- ✓ MICHELIN, L. Et Al. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 17-23, 2005.
- ✓ MITTELMAN, M. W.. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81, 2760-2764; 1998.
- ✓ MORALES, M.; MÉNDEZ-ALVAREZ, S.; MARTIN-LÓPEZ, J.V.; MARRERO, C.; FREYTES, C.O. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support care cancer*, v. 12, p. 701-707, 2004.
- ✓ MORETTI, M. L.; BRATFICH, O. J.; STUCCHI, R. B.; LEVI, C.; LEVIN, A. S.; DUBOC, G. M.; VORMITTAG, E.; BLUM-MENEZES, D. Clonal dissemination of vanA type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* between hospitals of two cities located 100 Km apart. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37(9): 1339-43, 2004.
- ✓ MORTON, L. H. G.; SURMAN, S. B. Biofilms in biodeterioration – a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1994.

- ✓ MUKHTAR TA, KOTEVA KP, HUGHER DW, WRIGHT GD. VgB from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis. *Biochemistry* 40: 8877-8886, 2001.
- ✓ MULDER, J. G.; DEGENER, J. E. Slime-producing properties of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 4, n. 12, p.689-694, 1998.
- ✓ MULLER-SERIEYS C, DRUGEON HB, ETIENNE J, LASCOLS C, LECLERCQ R, NGUYEN J, SOUSSY CJ. Activity of linezolid against Gram positive cocci isolated in French hospitals as determined by three in-vitro susceptibility testing methods. *Clin Microbiol Infect.* 10(3):242-6; 2004.
- ✓ NEU, T. R.. Ecophysiology and structure – biofilms and microbial mats. In: Krumbein, W. E., Paterson, D. M. e Stal, L. J. eds. *Biostabilization of Sediments*. Oldenburg, Germany: Verlag, 9-15; 1994.
- ✓ NEU, T. R. Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interface. *Microbiol. Rev.* 60, 151-166, 1996.
- ✓ NEVES M.C.; ROSSI JÚNIOR O.D.; ALVES E.C.C.; LEMOS M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.3, p.207-213, jul./set., 2007
- ✓ NUNES, E. L. C.; SANTOS, K. R. N.; MONDINO, P. J. J.; BASTOS, M. C. F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Detection of ileS-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, New York, v. 34, p. 77-81, 1999.
- ✓ PECHÈRE, J. C.; Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18; S25–S28; 2001.
- ✓ PEREIRA, M. O.. “Comparação da Eficiência de Dois Biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em Sistemas de Biofilme”. Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal 2001.
- ✓ PETERSSON, A. C.; KAMME, C.; MIÖRNER, H. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. *J.Clin. Microbiol.*, 37(6): 2047-50, 1999.
- ✓ PETINAKI, E.; Dimitracopoulos, G.; Spiliopoulou, I. Decreased affinity of PBP3 to methicillin in a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* with borderline resistance to methicillin and free of the *mecA* gene *Microb. Drug Resist.*, 7(3): 297- 00, 2001.

- ✓ PICAZO JJ, BETRIU C, RODRIGUES-AVIAL I, AZAHARES E, SANCHEZ BA. Surveillance for antimicrobiol Clin. VIRA Study. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2002 Dic;20(10):503-10. Erratum in: *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Jan; 21(1):68;2003.
- ✓ RAMSEY, M. A.; BRADLEY, S. F.; KAUFFMAN, C. A.; MORTON, T. M. Identification of chromosomal location of mupA gene, encoding low-level mupirocin resistance in staphylococcal isolates. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, Washington, v. 40, p. 2820-2823, 1996.
- ✓ RITO,P.N. caracterização de cepas de staphylococcus resistentes à meticilina quanto a produção de biofilme, resistência a antimicrobianos e realização do perfil e da tipificação clonal.2008. 84f. dissertação( mestrado em vigilância sanitária) – programa de pós-graduação em vigilância sanitária instituto nacional de controle de qualidade em saúde fundação oswaldo cruz .rio de janeiro; 2008.
- ✓ SADER HS, JONES RN, GALES AC, SILVA JB, PIGNATARI AC. SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.* 8(1):25-79; 2004.
- ✓ SADER HS, JONES RN, GALES AC, SILVA JB, PIGNATARI AC. SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.*; 8(1):25-79; 2004.
- ✓ SADER, H.S.; STREIT, J.M.; FRITSCHÉ, T.R.; JONES, R.N. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). *Clin Microbiol Infect.*12(9):844-52. 2004
- ✓ SAKAI, H., PROCOP, G. W., KOBAYASHI, N., TOGAWA, D., WILSON, D. A., BORDEN, L., KREBS, V., BAUER, T. W. Simultaneous Detection of Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci in Positive Blood Cultures by Real-Time PCR with Two Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Sets *J. Clin. Microbiol*42: 5739-5744 . 2004.
- ✓ SCHMITZ, F.J.; FLUIT, A.D.C.; GONDOLF, M.; BEYRAU, R.; LINDENLAUF, E.; VERHOEF, J.; HEINZ, H.P.; JONES, M.E. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.43, n.2, p.253-259, 1999.

- ✓ SCHUMACHER-PERDREAU F, HEILMANN C, PETERS G, GÖTZ F, PULVERER G. Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. *FEMS Microbiol Lett.* 15;117(1):71-8;1994
- ✓ SCHWALBE, R. S.; STAPLETON, J. T.; GILLIGAN, P. H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N. Engl. J. Med.*, 316(15): 927-31, 1987.
- ✓ SHERETZ, R.J.; HOPFER, R.L.; ELTING, L.; JACKSON, J.A.; THOMANN, C.A.; MATTERN, W.D. Infections associated with subclavian Uldall catheters. *Arch. Intern. Med.*, v. 143, p. 52-56, 1983.
- ✓ SIERADZKI, K.; ROBERTS, R. B.; SERUR, D.; HARGRAVE, J.; TOMASZ. A. Heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 37(1): 39- 44, 1999.
- ✓ SJÖLUND, M.; TANO, E.; BLASER, M.J.; ANDERSSON, D.I.; ENGSTRAND, L. Persistence of resistant *Staphylococcus epidermidis* after single course of clarithromycin. *Emerging infectious diseases* 11(9):1389-93, 2005 Sep
- ✓ SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 147, 3-9. 2001.
- ✓ TAVARES W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos, 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
- ✓ TENOVER, F. C.; BIDDLE, J. W.; LANCASTER, M. V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(2): 327-32, 2001.
- ✓ TENOVER, F. C.; LANCASTER, M. V.; HILL, B. C.; STEWARD, C. D.; STOCKER, S. A.; HANCOCK, G. A.; O'HARA, C. M.; MCALLISTER, S. K.; CLARK, N. C.; SIERADZKI, K.; ROBERTS, R. B.; SERUR, D.; HARGRAVE, J.; TOMASZ. A. Heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 37(1): 39- 44, 1999.
- ✓ TENOVER, F. C.; LANCASTER, M. V.; HILL, B. C.; STEWARD, C. D.; STOCKER, S. A.; HANCOCK, G. A.; O'HARA, C. M.; McALLISTER, S. K.; CLARK, N. C.; HIRAMATSU, K. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.*, 36(4): 1020-7, 1998.

- ✓ TRUEBA, F; GARRABE, E; HADEF, R; FABRE, R; CAVALLO, J-D; TSVETKOVA, K; CHESNEAU, O. High Prevalence of Teicoplanin Resistance among *Staphylococcus epidermidis* Strains in a 5-Year Retrospective Study. *J Clin Microbiol.*; 44(5): 1922–1923 May 2006.
- ✓ 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.* 1;188(5):730-7.2003.
- ✓ VEENSTRA, G. J. C., CREMERS, F. F. M., VAN DIJK, H., FLEER, A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, 178(2), 537-41, 1996.
- ✓ VIEIRA, M. J. Dissertação de Doutoramento: Estudo da formação de biofilmes biológicos por *Pseudomonas fluorescens* e dos efeitos associados à transferência de massa interna e à incorporação de partículas de caulino. Universidade do Minho. Braga. Portugal, 1995.
- ✓ VON EIFF, C.; PETERS, G. HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis.*, v. 2, p. 677-685, 2002.
- ✓ WEBER, D. J.; RAASCH, R.; RUTALA, W. A. Nosocomial infections in the ICU. The growing importance of antibiotic-resistant pathogens. *Chest*, 115(Suppl): 34s-40s, 1999.
- ✓ WEINSTEIN MP, Mirrett S, Van Pelt L, McKinnon M, Zimmer BL, Kloos W, Reller B. Clinical Importance of identifying Coagulase-negative Staphylococci Isolated from Blood Cultures: Evaluation of MicroScan Rapid and Dried Overnight Gram-Positive Panels versus a Conventional Reference method. *J Clin Microb.* 36(7):2089-92. 1998 July.
- ✓ WHITENER, C. et al. Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: microbiologic, epidemiologic, and clinical considerations. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 7, n. 1, p. 81-96, 1993.
- ✓ WIMPENNEY, J. W. T., PETERS, A. E SCOURFIELD, M. A. The Physiology and biochemistry of biofilm. In: Characklis, W. G. e Wilderer, P. A. eds. *Structure and Function of Biofilms*. Dahlem Workshop, John Wiley and Sons, Inc, 111-127; 1993.
- ✓ WIRTANEN, G. Biofilm formation and its elimination from food processing equipment. VTT Publications, Espoo, Finland. 1995.
- ✓ WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.14, n.4, p.321-325, 2000.

- ✓ YAO, Y., STURDEVANT, D. E., OTTO, M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *Journal of Infection Disease*, 191, 289-98, 2005.
- ✓ ZHANG, Y. Q.; REN, S. X.; LI, H. L.; WANG, Y. X.; FU, G.; YANG, J.; QIN, Z. Q.; MIAO, Y. G.; WANG, W. Y.; CHEN, R. S.; SHEN, Y.; CHEN, Z.; YUAN, Z. H.; ZHAO, G. P.; QU, D.; DANCHIN, A.; WEN, Y. M. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.*, 49(6): 1577-93, 2003.
- ✓ ZIEBUHR, W., HEILMANN, C., GÖTZ, F., MEYER, P., WILMS, K., STRAUBE, E. et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infection and Immunity*, 65(3), 890-6. 1997.
- ✓ ZIEBUHR, W., KRIMMER, V., RACHID, S., LÖBNER, I., GÖTZ, F., HACKER, J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular Microbiology*, 32(2), 345-56, 1999.
- ✓ ZIEBUHR, W.; HEILMANN, C.; GOTZ, F.; MEYER, P.; WIMS, K.; STRAUBE, E.; HACKER, J. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *S. epidermidis* blood culture strain and mucosal isolates. *Infect. Immun.*, v. 65, p. 890-896, 1997.
- ✓ ZIEBUHR, W.; KRIMMER, V.; RACHID, S.; LÖBNER, I.; GÖTZ, F.; HACKER, J. A Novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.*, v. 32, p. 345-356, 1999.

# 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](#)