



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico
Programa de Pós-Graduação Biologia Molecular e
Celular

**Análise da produção de biofilme em resposta a agentes
estressantes em *Staphylococcus aureus***

Glauco Nunes Rafero Barboza

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Matos Nogueira

Rio de Janeiro
2015

Glauco Nunes Rafero Barboza

**Análise da produção de biofilme em resposta a agentes
estressantes em *Staphylococcus aureus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Matos Nogueira

Rio de Janeiro
2015

Glauco Nunes Rafero Barboza

**Análise da produção de biofilme em resposta a agentes
estressantes em *Staphylococcus aureus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Banca examinadora:

Dr. Eduardo de Matos Nogueira (Doutor em Química Biológica) UNIRIO

Dr. Raphael Hirata Junior (Doutor em Ciências – Microbiologia) UERJ

Dra. Marcia Giambiagi de Marval (Doutora em Ciências Biológicas – Biofísica) UFRJ

Dr. Rafael Braga Gonçalves (Doutor em Química Biológica) UNIRIO (Suplente)

Barboza, Glauco Nunes Rafero.

Análise da produção de biofilme em resposta a agentes estressantes em *Staphylococcus aureus*/Glauco N. R. Barboza. – Rio de Janeiro, 2015.

viii. 76f. : il.

Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

1. *S. aureus*. 2. Biofilme. 3. Expressão Gênica

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que tive para trilhar o meu caminho e conseguir vitórias como essa. A minha esposa pelo amor e dedicação, me apoiando sempre, e por me dar seu sorriso lindo e sua confiança nos meus momentos difíceis. A minha mãe e a minha família, pela educação que me deram e pelo apoio que me ainda me dão em todas as minhas escolhas.

Aos meus amigos, e colegas de bancada, que entre muito trabalho no laboratório e algumas piadas, foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Faço aqui um agradecimento especial aos professores Renato e Agostinho, que foram além de ótimos mentores, excelentes colegas de bancada.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Eduardo Nogueira, que com sua paciência e dedicação foi fundamental para a elaboração desse trabalho. Ao PPGBMC pela oportunidade de fazer um curso de Mestrado com um nível tão bom como este aqui cursado.

A todos, que de alguma maneira, contribuíram para que eu chegasse até aqui, eu deixo meu muito obrigado.

RESUMO

Staphylococcus aureus é uma bactéria coco Gram Positivo, considerada um dos principais patógenos hospitalares. Essa bactéria possui uma gama de fatores de virulência, entre elas, a capacidade de produzir biofilme. O biofilme confere aos estafilococos resistência contra o sistema imune do hospedeiro e ação de antibióticos. Fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na produção de biofilme estafilocócico. Agentes antissépticos e antimicrobianos em concentrações subinibitórias podem induzir a bactéria a formar biofilmes. Em nossas amostras, os diferentes agentes estressantes (NaCl, etanol e Rifampicina) testados foram capazes de induzir a formação de biofilme em diferentes tempos. Algumas amostras responderam para todos os agentes estressantes, enquanto outras apenas para alguns deles. A Rifampicina e o NaCl induziram a formação de biofilme polissacarídico e proteico. Nosso estudo mostrou que esses biofilmes parecem ter mecanismos moleculares distintos em sua formação.

Abstract

Staphylococcus aureus is a Gram positive coccus considered a major nosocomial pathogen. This bacterium has an array of virulence factors, among them the ability to produce biofilm. The staphylococcal biofilm confers resistance to the immune system of the host and antibiotic action. Genetic and environmental factors are involved in the production of staphylococci biofilms. Antiseptics and antimicrobial agents in subinhibitory concentrations can induce bacteria to form biofilms. In our strains, the different stress agents (NaCl, ethanol and rifampicin) were tested to the ability of induce the biofilm formation in different times. Some strains responded to all stressors agents, while others just some of them. Rifampicin and NaCl induced the formation of polysaccharide and protein biofilms. Our study showed that biofilms, seem to have distinct molecular mechanisms in their formation.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.2 Biofilme.....	7
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Amostras Bacterianas.....	15
3.2 Análise Fenotípica da Formação do Biofilme	15
3.2.1 Preparo das amostras.....	15
3.2.2 Preparo da suspensão bacteriana.....	15
3.2.3 Teste de Detecção da Produção do Biofilme.....	16
3.3 Caracterização do Tipo de Biofilme	18
3.4 Teste em Ágar Vermelho Congo	18
3.5 Análise dos Domínios	19
3.6 Desenho dos oligos para análise de PCR em tempo real	19
3.7 Extração de RNA	19
3.8 Tratamento com DNase	21
3.9 Análise de expressão gênica	22
3.9.1 Preparo da 1ª fita	22
3.9.2 Preparo dos Oligos	23
3.9.3 PCR em Tempo Real	23
3.9.4 PCR para verificação dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	24
3.9.5 Análises Estatísticas	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Biofilme	26
4.2 Caracterização do tipo de biofilme	32
4.3 Teste em Ágar Vermelho Congo	35
4.4 Desenho dos oligos para análise de PCR em tempo real.....	36
4.5 Análise de expressão gênica	38
4.6 Análise por PCR da presença dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	44
5. DISCUSSÃO	45

6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8. ANEXO	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	21
Figura 2	37
Figura 3	44
Figura 4	47
Figura 5	51
Figura 6	69
Figura 7	70
Figura 8	72
Figura 9	73
Figura 10	75
Figura 11	76
Figura 12	79
Figura 13	80
Figura 14	82
Figura 15	83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	28
Gráfico 2	30
Gráfico 3	30
Gráfico 4	31
Gráfico 5	31
Gráfico 6	34
Gráfico 7	34
Gráfico 8	35
Gráfico 9	35
Gráfico 10	40
Gráfico 11	42
Gráfico 12	43

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1	23
Quadro 2	38
Quadro 3	68
Quadro 4	71
Quadro 5	74
Quadro 6	77
Quadro 7	81

Lista de Abreviaturas

AVC – Ágar Vermelho Congo

EtOH – Etanol

h – hora

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min. – minuto(s)

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina

MSSA – *Staphylococcus aureus* Sensíveis a Meticilina

NaCl – Cloreto de Sódio

NaIO₄ – Metaperiodato de Sódio

nm – Nanômetro

PBP (s) – Proteína (s) de Ligação com Penicilinas

PIA – Polissacarídeo de Adesão Intercelular

RIF – Rifampicina

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

TSA – Ágar Soja Trypticaseína

TSB – Caldo Soja Trypticaseína

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus*

Em 1881 Alexander Ogston nomeou o gênero *Staphylococcus* a partir do estudo de bactérias isoladas de abscessos. Essas bactérias formavam agrupamentos que lembravam cachos de uva (Santos *et al.*, 2007). Atualmente, o gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococaceae e é formada por 35 espécies. Estas são caracterizadas como cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos e produtores da catalase. Além disso, são capazes de crescer em meio de cultura contendo altas concentrações de NaCl e em temperaturas que variam de 18 a 40°C (Murray *et al.*, 2007).

Os Estafilococos são responsáveis por diversas doenças, dentre elas, infecções de sítio cirúrgico, endocardite e bacteremias hospitalares. Muitas delas estão associadas ao uso de próteses articulares, cateteres e *stents* (Casey *et al.*, 2007). Desde os anos 1700 são descritas doenças com características de infecções estafilocócicas, mas só a partir de 1880, Alexander Ogston passou a relacionar os Estafilococos a doenças neonatais (Shinefield & Ruff, 2009). Doenças estafilocócicas são comuns em enfermarias e hospitais, sobretudo em unidades de tratamento de queimados e centros cirúrgicos. A presença de feridas profundas e o frequente uso de dispositivos médicos invasivos, nesses ambientes, favorecem o crescimento dos Estafilococos.

Fatores ambientais e fatores intrínsecos dos Estafilococos parecem contribuir para sua rápida disseminação nos ambientes hospitalares. A persistência dos Estafilococos e o transporte de cepas por trabalhadores da área de saúde parecem ser contribuintes críticos para o início de surtos epidêmicos. As transferências de pacientes infectados entre hospitais também têm sido associadas à propagação de cepas estafilocócicas (Shinefield & Ruff, 2009).

A principal bactéria deste gênero, de importância médica, é *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria se diferencia das demais espécies estafilocócicas pela produção da coagulase, adesina que reage com a

prototrombina no sangue. É um importante patógeno humano, associado a uma grande variedade de doenças, tanto comunitárias quanto hospitalares (Deurenberg & Stobberingh, 2008). Essa espécie possui um grande número de fatores de virulência, que contribuem de forma decisiva para sua patogenicidade. Dentre estes fatores se destacam a Proteína-A, que tem capacidade de impedir a fagocitose por se ligar à porção Fc das imunoglobulinas, além de outras proteínas de superfície, como os receptores de colágeno e as proteínas de ligação à fibronectina. Além de enzimas extracelulares do tipo proteases, lípases, hialuronidase (Dinges *et al.*, 2000).

Toxinas estafilocócicas são outros importantes fatores de virulência produzidos por *S. aureus*. Entre elas encontram-se as Enterotoxinas, responsáveis por intoxicações alimentares estafilocócicas. Tais toxinas são termoestáveis, e se classificam em 14 tipos (A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J, K, L e M). Esta variedade de tipos permite a uma mesma cepa bacteriana produzir mais de um tipo de toxina (Lamaita *et al.*, 2005).

As intoxicações alimentares estafilocócicas possuem um período de incubação curto, variando de 15 minutos a 6 horas. Quando ingeridas pré-formadas no alimento, as toxinas podem causar vômitos e diarreia. O restabelecimento das pessoas contaminadas ocorre geralmente em um ou dois dias (Lamaita *et al.*, 2005).

Outra toxina produzida por *S. aureus* é a Toxina Esfoliativa, que é responsável pela Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica. Esta doença acomete geralmente recém-nascidos, e se caracteriza pela presença de eritemas, febre e sensibilidade da pele. Em um segundo momento formam-se bolhas generalizadas, de parede fina e cheias de líquido, que podem se romper facilmente, especialmente em regiões de atrito (Aalfs *et al.*, 2010).

S. aureus pode produzir ainda a TSST-1, toxina causadora da Síndrome do Choque Tóxico. Esta doença é conhecida desde os anos 1920 e despertou maior atenção no início da década de 1980, quando ocorreram surtos em mulheres, nos Estados Unidos, devido ao uso de tampões menstruais superabsorventes contaminados (Shinefield & Ruff, 2009). A Síndrome do

Choque Tóxico é uma doença aguda e se caracteriza pela presença de febre alta, hipotensão e choque, podendo envolver vários órgãos (Lamaita *et al.*, 2005).

A Leucocidina de Pantón Valentine (LPV) e a alfa-hemolisina também são importantes fatores de virulência de cepas de *S. aureus*. A LPV consiste em duas proteínas S e F, codificadas separadamente pelos genes *Luk S-PV* e *Luk F-PV*. Essas proteínas atuam de forma sinérgica na lise de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e monócitos. Amostras produtoras de LPV estão associadas a infecções necróticas da pele e do tecido subcutâneo, tais como furúnculo e abscessos e também a quadros graves de pneumonia hemorrágica necrotizante (Lina *et. al.*, 1999). Já a alfa-hemolisina é considerada a toxina mais bem estudada de *S. aureus*. Ela é secretada na forma de pentâmeros e hexâmeros capazes de provocar lise celular. Esses produtos promovem a formação de poros que geram influxo e efluxo de íons e pequenas moléculas em células eucarióticas e a morte de eritrócitos (Dinges *et. al.*, 2000).

Amostras de *S. aureus* podem ser encontradas colonizando de forma assintomática a pele e mucosas do homem. A cavidade nasal é o local onde esta bactéria pode ser isolada mais frequentemente (Wertheim *et al.*, 2005; Shinefield & Ruff, 2009). Esta situação caracteriza o estado de portador nasal. Profissionais da área da saúde portadores de *S. aureus* podem funcionar como disseminadores da bactéria no ambiente hospitalar (Todd *et al.*, 2008).

Para a tentativa de erradicação do estado de portador nasal de *S. aureus* a droga de escolha é a mupirocina, um medicamento de uso tópico. Este antimicrobiano é um metabólito (ácido pseudomônico A) obtido de *Pseudomonas fluorescens*, que apresenta baixo espectro de ação, atuando principalmente sobre bactérias Gram positivas, particularmente *Staphylococcus* (Oliveira & Paula, 2012). O uso desse antimicrobiano demonstrou que, na maioria dos pacientes submetidos ao tratamento, ocorreu o desaparecimento do microrganismo de outras regiões do corpo além da cavidade nasal (Reagan *et al.*, 1991). Entretanto, mesmo com o uso eficaz da mupirocina, estudos feitos por Reagan e colaboradores (1991) constataram que portadores saudáveis,

submetidos à terapia com o antimicrobiano para erradicação nasal de *S. aureus*, apresentaram percentual de 25 a 30% de recolonização por esta bactéria. Por outro lado, o uso ampliado da mupirocina tem sido associado à emergência de linhagens resistentes (Vasquez *et. al.*, 2000).

S. aureus pode causar doenças tanto comunitárias quanto hospitalares. As infecções ocorrem a partir da presença da bactéria na pele ou mucosas do indivíduo contaminado. Após a colonização inicial, geralmente assintomática, o micro-organismo pode causar doenças cutâneas, como foliculite, furúnculo e hordéolo, além de infecções de feridas e impetigo bolhoso. Quando as barreiras naturais do corpo são rompidas, geralmente por traumas ou procedimentos cirúrgicos, *S. aureus* pode invadir e infectar outras regiões do corpo, incluindo os ossos, ou até causar sepse (Santos *et. al.*, 2007).

Nos ambientes hospitalares *S. aureus* pode circular entre profissionais e pacientes, através da transmissão direta da bactéria pelo contato entre pessoas, principalmente pelas mãos (Shinefield & Ruff, 2009). Além disso, *S. aureus* assume importância devido ao amplo uso de dispositivos como cateteres, próteses, *stents* e outros implantes (Araujo *et. al.*, 2006). Estes dispositivos quando contaminados por *S. aureus*, causam infecções que envolvem diversos tipos de acometimentos de tecidos profundos. Dentre eles, endocardite em válvulas nativas e próteses, pielonefrite e abscesso pulmonar, osteomielite, artrite e peritonite (Casey *et. al.*, 2007).

As infecções hospitalares estão frequentemente associadas a procedimentos médicos invasivos. São bastante diversificadas, como infecções em sítios cirúrgicos, infecção da corrente sanguínea e pneumonia associada ao uso de respiradores. Tal amplitude de processos patológicos consolidou a importância do *S. aureus* como um dos mais frequentes agentes de infecções graves (Casey *et. al.*, 2007; Gordon, Lowy, 2008).

S. aureus está frequentemente associado a infecções relacionadas ao uso de implantes, devido à sua capacidade de aderir às superfícies destes materiais e de crescer formando biofilme em corpos estranhos (Knobloch *et. al.*, 2002; Cerca *et. al.*, 2005). Tanto a capacidade de aderir quanto a de

crescer formando biofilme, são apontadas como fatores de virulência. Assim, *S. aureus* se torna importante causador de infecções em feridas e osteomielite (Izano *et. al.*, 2008).

A capacidade de aderência a implantes médicos se deve ao fato de que poucas horas após sua colocação, estes dispositivos já se apresentam revestidos por proteínas plasmáticas e proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (Guo *et. al.*, 2007; Krepsky *et. al.*, 2003). Essas proteínas podem funcionar como receptores para componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz, conhecidos como MSCRAMM (“*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*”).

Com a emergência de *S. aureus* como patógeno hospitalar, surgiu à necessidade de se introduzir um antimicrobiano que tivesse efeito bactericida efetivo. A tentativa de erradicar esta bactéria começou com a introdução das sulfanilamidas no início da década de 1930. Entretanto, no final dessa década já eram isoladas amostras resistentes a esses quimioterápicos (Santos, *et. al.*, 2007).

Na década de 1940 se introduziu na prática clínica a Penicilina, descoberta em 1928 por Alexander Fleming, como um potente antimicrobiano de efeito bactericida. Ainda nesta década, alguns anos após o início do uso da penicilina, as primeiras amostras de *S. aureus* resistentes foram isoladas em hospitais. Já na década de 1950 se espalharam para a comunidade.

A resistência à Penicilina ocorre devido a algumas amostras de *S. aureus* produzirem β -lactamase, enzima capaz de inativar as penicilinas, promovendo a hidrólise do anel β -lactâmico (Chambers & De Leo, 2009).

O crescente número de amostras resistentes à penicilina fez com que em 1959 se introduzisse nos ambientes hospitalares uma penicilina modificada em laboratório. Surgia então a Meticilina, que era mais estável à ação das β -lactamases. Esta droga passou a ser utilizada para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* produtores de β -lactamases (Chambers & De Leo, 2009). Entretanto, pouco tempo após o início de seu uso, surgiram os primeiros isolados de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA), relatados no Reino

Unido, no início da década de 1960 (Jevons, 1961). Estas amostras passaram a circular por hospitais em toda a Europa e eventualmente foram relatados alguns isolados nos Estados Unidos (Chambers & De Leo, 2009).

A resistência de *S. aureus* à metilina e à oxacilina (droga derivada da metilina, utilizada atualmente) é mediada pela produção de Proteínas de Ligação com Penicilinas (PBPs) alteradas, com baixa afinidade de ligação a antimicrobianos β -lactâmicos. Essas proteínas, denominadas PBP2a ou PBP2', são codificadas pelo gene *mecA*, que foi descoberto na década de 1980 (Chambers & De Leo, 2009).

PBPs são proteínas de membrana que catalisam as reações de transpeptidação e transglicosilação, necessárias para que ocorram as ligações das cadeias de peptídeoglicano durante a síntese de parede celular (Lowy, 2003). Desta forma, amostras de *S. aureus* produtoras de PBP2a (PBP2') são resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos, sendo conhecidas como MRSA.

Atualmente as amostras MRSA chegam a representar até 45% do total de isolados de *S. aureus* nos ambientes hospitalares (Michelim *et al.*, 2005). Estas amostras frequentemente demonstram multi-resistência, sendo resistentes simultaneamente a drogas de outros grupos tais como macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, quinolonas, cotrimoxazol e tetraciclina (Michelim *et al.*, 2005).

A vancomicina é a principal alternativa terapêutica no combate a amostras MRSA (Michelim *et al.*, 2005). Entretanto, em 1997 foi isolada a primeira amostra de *S. aureus* com resistência intermediária a esta droga (CMI= 8-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo denominada amostra VISA (resistência intermediária à vancomicina) (Smith, Jarvis, 1999). Posteriormente, surgiram outras com resistência total à vancomicina (VRSA), apresentando CMI $\geq 128\mu\text{g}/\text{mL}$ (Walsh, Howe, 2002).

Cinco clones pandêmicos de MRSA já foram bem caracterizados, sendo eles os clones ibérico, brasileiro, húngaro, Nova York / Japão e o clone pediátrico. No Brasil o clone denominado BECC (Brazilian Epidemic Clonal Complex) já foi isolado por todo o país e inclusive em outros países como

Argentina, Uruguai, Paraguai, Portugal, Itália e República Tcheca (Amaral *et. al.*, 2005). A disseminação tão ampla deste clone de MRSA pode estar sendo facilitada por mecanismos de virulência que favoreçam a sua colonização na superfície da pele e mucosas.

Amaral e colaboradores (2005) demonstraram que a variante predominante do BECC (variante A1) tem maior capacidade de produzir biofilme e de aderir e invadir células epiteliais das vias aéreas, quando comparada com clones esporádicos de MRSA (BECC não A1). A partir de 1980 as amostras MRSA passaram a ser isolados com mais frequência em hospitais americanos e se espalharam para o mundo todo.

Na década de 1990 surgiram os primeiros casos de infecções comunitárias causadas por amostras MRSA, em comunidades indígenas australianas (Chambers & De Leo, 2009). As amostras MRSA passaram então a ser classificadas dependendo do ambiente em que eram adquiridas. As amostras adquiridas no ambiente hospitalar passaram a ser denominadas HA-MRSA, enquanto que as amostras adquiridas na comunidade foram classificadas como CA-MRSA.

1.2 Biofilme

Biofilme pode ser definido como uma comunidade bacteriana, englobada por uma matriz polimérica extracelular, produzida por estas bactérias, que cresce aderida a superfícies biológicas ou inertes (Aparna & Yadav, 2008). Essa matriz extracelular oferece proteção contra agentes antimicrobianos e contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (Kim *et. al.*, 2008), tornando muito difícil a erradicação de infecções causadas por bactérias que crescem formando biofilme (Rohde *et. al.*, 2007).

Em casos de infecções em próteses articulares ou cardíacas faz-se necessário a retirada cirúrgica do implante para eliminação do processo infeccioso (Araujo *et. al.*, 2006). O biofilme pode se formar tanto em tecidos vivos quanto em materiais inertes. Há estimativas de que em 65% das infecções bacterianas, pode-se observar a presença de biofilme (Smith *et. al.*, 2008).

A capacidade de crescer formando biofilme parece estar relacionada a aspectos de patogenicidade bacteriana, além de funcionar como um nicho de infecções crônicas. Isso porque o biofilme tem a característica de se desprender em fragmentos, podendo levar a infecção a outros sítios do corpo do hospedeiro. Quando isso ocorre, pode provocar embolização distal destes fragmentos (Shanks *et. al.*, 2006). Além disso, o biofilme pode estar envolvido na seleção de amostras com perfil mais amplo de resistência a antimicrobianos (Araujo *et. al.*, 2006), devido à barreira física criada por sua matriz, que impede o contato do antimicrobiano com as bactérias que estão inseridas no biofilme.

Para tentar tratar infecções causadas por *S. aureus* formando biofilme, a rifampicina vem sendo utilizada como alternativa terapêutica. Este antimicrobiano de amplo espectro atua impedindo a transcrição de RNA de bactérias Gram Positivas. Estudos apontam que a rifampicina possui propriedades anti-biofilme. Além disso, a Rifampicina se mostrou capaz de penetrar no biofilme e de erradicar *S. aureus* dentro do biofilme formado. Entretanto, há poucos estudos comprovando a eficácia de seu uso (Reiter *et. al.*, 2012).

A formação do biofilme é um evento que envolve duas etapas. A primeira diz respeito à aderência da bactéria ao tecido ou estrutura inerte, sendo este um evento complexo, que envolve a participação de fatores inespecíficos (físico-químicos) e específicos (adesinas) (Palmer *et al.*, 2007; Aparna & Yadav, 2008). No que diz respeito aos fatores físico-químicos, as interações hidrofóbicas são as de maior destaque em eventos biológicos, tendo sido demonstrado que elas participam de forma importante numa grande variedade de infecções (Krepsky *et al.*, 2003).

Podemos definir hidrofobicidade como sendo a energia de atração entre células apolares ou levemente polarizadas, imersas em uma fase aquosa (Cerca *et al.*, 2005). Algumas substâncias presentes na parede celular da bactéria podem atuar juntamente com a hidrofobicidade, promovendo a ligação inicial a biomateriais.

As proteínas de superfície SSP1 e SSP2 (“*Staphylococcal Surface Protein*”) que formam estruturas semelhantes a fímbrias (Veenstra *et. al.*, 1996) e as autolisinas bifuncionais, que funcionam também como adesinas, tais como a AtlE (Heilmann *et. al.*, 2003), a Atl (Qin *et. al.*, 2007) e a AaE (Heilmann *et. al.*, 2003) são exemplos dessas substâncias.

As autolisinas são enzimas bacterianas que tem importante participação na divisão celular e na lise bacteriana induzida por antimicrobianos e também são apontadas como fatores de virulência, atuando na aderência da bactéria aos tecidos do hospedeiro. Essas proteínas com dupla função, de autolisinas/adesinas, já foram descritas também em outras bactérias, como *Streptococcus pneumoniae* e *Listeria monocytogenes*, além de estafilococos (Heilmann *et. al.*, 2003).

As proteínas podem funcionar como receptores para as MSCRAMM, por exemplo, a proteína Fbe, relacionada à ligação com o fibrinogênio; a proteína Ebp; a elastina e um conjunto de proteínas que apresentam repetições do dipeptídeo serina-aspartato, conhecidas como família Sdr (SdrF, SdrG e SdrH), que se ligam, particularmente, ao fibrinogênio (McCrea *et al.*, 2000; Rogers, 2009).

As autolisinas bifuncionais AtlE e AaE também possuem função de ligação a fatores do hospedeiro depositados na superfície dos biomateriais. A AtlE se liga à vitronectina (Rogers, 2009) e a autolisina AaE permite a ligação ao fibrinogênio, fibronectina e vitronectina (Heilmann *et al.*, 2003). Além destas substâncias, os ácidos teicóicos da parede celular, um componente estrutural do peptidoglicano, possibilitam a ligação à fibronectina (Hussain *et. al.*, 2001).

Em amostras PIA independentes, a formação do biofilme está relacionada a proteínas de superfície. A Proteína Associada à Acumulação (Aap) descrita em *S. epidermidis* (Hussain, *et al.*, 1997), a Proteína Associada a Biofilme (Bap) produzida por *S. aureus* (Cucarella, *et al.*, 2001), que posteriormente mostrou ser homóloga da Aap, e a Proteína de ligação à Matriz Extracelular (Embp) (Christner, *et. al.*, 2010), são exemplos de proteínas que atuam como matriz para a formação de biofilme. Ácidos teicóicos (Sadovskaya

et al., 2005) e DNA extracelular (Qin *et al.*, 2007) também podem funcionar como matrizes, mas são ancoradas por proteínas de superfície.

Uma vez aderida, a população bacteriana começa a se acumular formando grumos, por ação da aderência intercelular. Esse fenômeno é mediado por um polissacarídeo de superfície, o poli- β (1,6)-N-acetil-D-glicosamina (PNAG), denominado Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA) (Izano *et al.*, 2008).

A produção da PIA foi inicialmente descrita em *S. epidermidis* e posteriormente detectada também em *S. aureus* (Rohde *et al.*, 2007). A partir daí se estabelece uma estrutura complexa na qual a maioria das bactérias não tem contato direto com a superfície colonizada, mas é mantida por mecanismos de aderência intercelular.

Eventualmente células bacterianas podem se desprender do biofilme e atingir outros locais, disseminando a infecção (Sambanthamoorthy *et al.*, 2008). Além disso, já foram descritas amostras de estafilococos que tem grande capacidade de crescer formando biofilme, mas não são produtoras de PIA, ou que são deficientes na sua produção (O'gara, 2007; Izano *et al.*, 2008).

A produção de PIA é mediada por produtos do *locus* cromossomal *ica*, composto por quatro genes de aderência intercelular (*icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*) e um gene regulador *icaR*, organizados em um operon (Mateo *et al.*, 2008; Fey *et al.*, 1999). Sua produção envolve produtos codificados pelo operon *icaADBC* e regulados por um repressor transcricional, codificado pelo gene *icaR*.

O produto do gene *icaA* é uma proteína transmembrana, com atividade de N-acetilglicosamil transferase, que requer o produto do gene *icaD* para atividade ótima. O produto de *icaD* é uma chaperona que promove a inserção na membrana da proteína codificada por *icaA*.

A proteína codificada pelo gene *icaB* é secretada, sendo responsável pela desacetilação da molécula poli-N-acetilglicosamina. O produto de *icaC* é uma proteína transmembrana hipoteticamente envolvida na externalização e

alongamento do polissacarídeo, sendo essencial para a formação de uma PIA com comprimento integral e imuno-reativa (Rohde et al., 2010).

A expressão dos genes *ica*, que resultam na produção de PIA, é fortemente regulada e, pelo menos *in vitro*, parece ocorrer a nível transcricional (Cue et al., 2012). Embora os sinais de controle da produção de PIA/PNAG *in vivo* não sejam bem definidos, diferentes condições ambientais afetam a produção *in vitro*, como: altas temperaturas, anaerobiose, alta osmolaridade, glicose, etanol e outros antissépticos, concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos, anaerobiose. Todos podem induzir a produção de PIA/PNAG, embora haja variação entre as amostras no que diz respeito ao que as condições resultem em maior produção PIA/PNAG (Nuryastuti et al., 2011).

Knobloch e colaboradores (2002) demonstraram que a presença de ingredientes alcoólicos nos antissépticos tem efeito indutor de produção de biofilme por *S. epidermidis*. Ozturk e colaboradores (2014) mostraram que amostras MRSA podem ser induzidas a produzir biofilme na presença de maxifloxacina e rifampicina, em concentrações sub-inibitórias. Lim e colaboradores (2004) mostraram que a glicose e concentrações sub-inibitórias de NaCl induzem a formação de biofilme PIA independente em *S. aureus*.

A PIA é o componente dominante da matriz do biofilme produzido por *S. epidermidis*. Entretanto, este componente parece ser menos importante nos biofilmes produzidos por *S. aureus*. Muitos estudos têm demonstrado que material de origem protéica é o principal componente da matriz do biofilme de *S. aureus* (Kiedrovski et al., 2011).

Pozzi e colaboradores (2012) utilizando isolados clínicos de MRSA observaram um fenótipo de expressão de biofilme PIA independente, tendo as proteínas de ligação à fibronectina (FnBP A e B) e as autolisinas (Atls) como principais componentes do biofilme. A atividade autolítica das Atls e o DNA extracelular aparentemente estão envolvidos no primeiro estágio da produção de biofilme por MRSA, enquanto que as FnBPs promovem a acumulação intercelular e a maturação (Pozzi et al., 2012).

Amostras MSSA, ao contrário das MRSA, parecem expressar um biofilme dependente de PIA em superfícies hidrofílicas, e em superfícies hidrofóbicas um biofilme com Atl e PIA (Pozzi *et. al.*, 2012). Deste modo, a matriz do biofilme parece não ser formada por um único composto. A PIA, assim como diferentes proteínas e outros compostos podem estar presentes na matriz do biofilme, formando uma estrutura complexa.

Diferentes testes laboratoriais para a detecção da produção de biofilme foram estabelecidos. Os mais frequentemente utilizados são o teste qualitativo em tubo de ensaio e o teste quantitativo em placas de microdiluição (Christensen *et. al.*, 1985). O teste qualitativo consiste na detecção da matriz do biofilme aderida à parede do material inerte por coloração. O teste quantitativo é feito através da leitura espectrofotométrica do extrato alcoólico da matriz de biofilme corada. Esta técnica tem sido modificada por diversos investigadores, como Stepanovic' e colaboradores (2007).

O teste em placa de Ágar Vermelho Congo (AVC), criado por Freeman e colaboradores (1989), tem sido muito utilizado para a detecção fenotípica da produção de biofilme, sendo um método qualitativo, rápido e que apresenta reprodutibilidade (Los *et. al.*, 2010; Khan *et. al.*, 2011).

Os testes em tubo ou em placas de microdiluição detectam biofilme independente da composição química da matriz extracelular produzida pela bactéria. No caso do teste em placa de AVC, a principal matriz extracelular do biofilme detectado é constituída do produto do operon *icaRADBC*, ou seja, PIA (Los *et. al.*, 2010). Além destes testes fenotípicos, técnicas moleculares de PCR têm sido utilizadas como um método rápido para a detecção dos genes do operon *ica* (Arcioloa *et. al.*, 2001).

Diferentes mecanismos externos ao operon *ica* têm sido implicados na regulação da síntese de PIA e subsequentemente na produção de biofilme. Entre estes estão os produtos dos genes *sarA* e *sigB*, considerados genes reguladores dos determinantes de virulência de estafilococos (O'gara *et al.*, 2007).

Estudos já mostraram que SarA, uma proteína que regula positivamente a transcrição do locus *agr* de *S. aureus*, possui afinidade com o promotor do gene *icaA* em *S. epidermidis*. A homologia de SarA de *S. epidermidis* com *S. aureus* é de 84% (Fluckiger *et al.*, 2005).

Estudos feitos com a deleção de *sarA* em *S. epidermidis* mostraram que houve diminuição significativa da produção de PIA e IcaA, nessas amostras, sem que houvesse alteração da transcrição de *icaR* (Cue *et al.*, 2012). As regiões promotoras IcaR-IcaA possuem vários sítios de ligação para a proteína SarA, o que a torna um regulador positivo para PIA (Valle *et al.*, 2003).

O produto do gene *sigB* é um fator sigma alternativo, que em *S. aureus* é ativado mediante a um sinal de transdução em resposta a altas temperaturas, alta osmolaridade, antibióticos, ou pH extremo (Cue *et al.*, 2012). O gene *sigB* em diversos estudos é apontado como um regulador de diversos genes, entre eles, os genes envolvidos com a formação de biofilme. Rachid e colaboradores (2000) mostrou que *sigB* está envolvido na formação de biofilme na presença de NaCl em altas concentrações em amostras *S. aureus*. Cerca e colaboradores (2008) apresentou *sigB* como sendo um regulador positivo tanto para *icaADBC* quanto para *icaR* em amostras *S. aureus*. Entretanto, *sigB* parece estar também envolvido com a regulação de biofilme ica independente (Lauderdale *et al.*, 2009), o que torna difícil de definir o papel deste gene na regulação do biofilme.

Outros reguladores, como Rbf, LuxS, SpX, Ygs, entre outros, aparentemente também regulam de alguma forma a formação de biofilme em amostras de Estafilococos (Cue *et al.*, 2012). Isso torna ainda mais complexo o entendimento dos mecanismos que regem o biofilme estafilocócico. O mecanismo dos reguladores globais ainda não está totalmente esclarecido (Fey & Olson, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a produção e a regulação da formação de biofilme em *S.aureus* em resposta a agentes estressantes, utilizando técnicas de análises fenotípicas e moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência de agentes estressantes como anti-séptico (etanol), antibiótico (Rifampicina) e concentrações elevadas de NaCl na produção de biofilme em amostras *S. aureus*.
- Caracterizar a natureza do biofilme formado.
- Avaliar a expressão gênica dos genes *sarA*, *sigB*, *icaA* e *icaR* nas amostras *S. aureus* selecionadas crescidas na presença de diferentes agentes estressantes;
- Comparar o efeito dos agentes estressantes na expressão gênica destes genes e entre cepas selecionadas.

3. METODOLOGIA

3.1 Amostras Bacterianas

Foram utilizadas 16 amostras de *S. aureus* isoladas de materiais clínicos de pacientes internados no Hospital Geral dos Servidores do Estado (hospital terciário da rede pública federal), pertencentes a coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia Microbiana da UNIRIO.

3.2 Análise Fenotípica da Formação de Biofilme

3.2.1 Preparo das amostras

As amostras foram ativadas a partir de tubos estoque, em tubos de ensaio de vidro com dimensões 13x100 mm contendo meio Caldo Soja Trypticaseína (TSB) da marca ACUMEDIA, por 24 horas (h) a 37°C.

Após a ativação inicial as amostras foram repicadas para placas contendo meio Ágar Soja Trypticaseína (TSA) da marca ACUMEDIA, por 24 h a 37°C, para verificação da pureza das amostras.

Após a confirmação da pureza das amostras, foram selecionadas três colônias e as mesmas foram repicadas para um novo tubo de ensaio de vidro com dimensões 13x100 mm, denominado Tubo Teste, contendo meio TSB, por 24 h a 37°C.

3.2.2 Preparo da suspensão bacteriana

Foram preparados três tubos com soluções de TSB, contendo diferentes concentrações sub-inibitórias de: rifampicina (RIF) (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 ng/mL), etanol (EtOH) (2% e 4%) e NaCl (0,25%, 0,5%, 1%, 2% e 4%).

As amostras de *S. aureus* foram inoculadas, a partir do Tubo Teste, em três tubos idênticos, contendo as soluções, seguindo a proporção 1:100, ou

seja, 10 µL de cultura bacteriana em 1000 µL de solução. Os tubos foram identificados como: TSB; TSB+RIF 0,25; TSB+RIF 0,5; TSB+RIF 1; TSB+RIF 2; TSB+RIF 4; TSB+EtOH 2%; TSB+EtOH 4%; TSB+NaCl 0,25%; TSB+NaCl 0,5%; TSB+NaCl 1%; TSB+NaCl 2% e TSB+NaCl 4%.

- Distribuição em Microplaca

As suspensões bacterianas foram misturadas em agitador do tipo vortex e foram distribuídos 200 µL/poço, em quaduplicata, em uma placa de microtitulação de 96 poços fabricada pela empresa Nunc Thermo. As placas de 96 poços foram incubadas por diferentes tempos (6 h, 12 h, 16 h e 24 h) a 37°C.

- Distribuição em Tubos de Vidro

As suspensões bacterianas foram mantidas nos tubos em quaduplicata e incubadas por diferentes tempos (6 h, 12 h, 16 h e 24 h) a 37°C.

3.2.3 Teste de Detecção da Produção de Biofilme

- Em Microplaca

A produção de biofilme foi determinada seguindo a metodologia proposta por Milisavljevic' e colaboradores (2008), com algumas modificações, conforme descrito abaixo:

Primeiramente foi feita uma leitura da absorbância da placa de microtitulação em um equipamento leitor de ELISA da marca Thermo Plate modelo RT6000, utilizando um comprimento de onda de 620 nm (DO_{620}) para determinar o crescimento bacteriano.

A placa de microtitulação foi então, lavada três vezes com 200 µL/poço de água destilada, seguido de incubação a temperatura ambiente com 200 µL/poço de metanol, por 15 minutos (min.). Após esse tratamento a placa de microtitulação foi corada com 200 µL/poço de uma solução de cristal violeta de Hucker a 2% e incubada a temperatura ambiente por 10 min., seguido de

lavagem da placa com três litros de água destilada corrente para remoção do excesso de corante.

Foi adicionada a placa 200 µL/poço de etanol para extrair o corante aderido ao biofilme. A placa de microtitulação foi incubada por 25 min., com agitação em equipamento agitador orbital, seguido da leitura da absorbância em equipamento leitor de ELISA no comprimento de onda de 570 nm (DO_{eb}).

Os resultados foram tabelados e a classificação quanto a produção de biofilme foi uma adaptação do proposto por Stepanovic´ e colaboradores (2007), com um ponto de corte calculado para uma DO_{eb} de 0,500 de absorbância.

- Em Tubos de Vidro

A produção de biofilme foi determinada seguindo a metodologia proposta por Christensen e colaboradores (1988), com algumas modificações, conforme descrito abaixo:

Primeiramente foi feita a leitura da DO_g , pegando um dos tubos da quaduplicata e agitando em agitador do tipo vortex. A amostra foi lida em um equipamento espectrofotômetro, modelo IL-0082 Kasuaki, em um comprimento de onda de 620 nm para determinar o crescimento bacteriano.

Os outros três tubos foram então lavados, três vezes, com 2 mL de água destilada, seguido de incubação a temperatura ambiente com 2 mL de metanol, por 15 min. Após esse tratamento os tubos foram corados com 2 mL de solução de Cristal Violeta de Hucker a 2% por 10 min. Os tubos foram lavados com água destilada corrente para remoção do excesso de corante.

Foi adicionado aos tubos 2 mL de etanol, e estes foram agitados em agitador do tipo vortex, por 3 min., para a remoção total do corante aderido ao biofilme. Foi feita então, a leitura da absorbância do extrato alcoólico em equipamento espectrofotômetro com o comprimento de onda de 570 nm (DO_{eb}).

Os resultados foram tabelados e a classificação quanto a produção de biofilme foi uma adaptação do proposto por Stepanovic´ e colaboradores

(2007), com um ponto de corte calculado para uma DO_{eb} de 0,500 de absorbância.

3.3 Caracterização do Tipo de Biofilme

As amostras produtoras de biofilme foram preparadas conforme o item 3.2.2. Após a leitura da DO_g , as placas de microtitulação foram lavadas com 200 μ L/poço de água destilada e tratadas com 200 μ L/poço de uma solução de PBS pH7,4, nos quatro primeiros poços (1-4); 200 μ L/poço de metaperiodato de sódio ($NaIO_4$) 40mM nos quatro poços do meio (5-8) e 200 μ L/poço de Proteinase K 100 μ M nos últimos quatro poços (9-12), para degradação do biofilme produzido na placa.

As microplacas de 96 poços foram então, incubadas por 1 h a 37°C. Após isso, as placas foram lavadas e tratadas conforme o item 3.2.3. Os resultados foram tabelados e a razão entre a formação do biofilme induzido e a degradação do biofilme, com $NaIO_4$ ou Proteinase K, foi calculada em forma de porcentagem.

3.4 Teste em Ágar Vermelho Congo (AVC)

As amostras foram preparadas conforme o item 3.2.1. As placas de AVC foram preparadas conforme descrito a seguir. 25 mL de Ágar Infusão Cérebro e Coração (BHA), acrescidas de 0,25 mL de uma solução alcoólica, na proporção 1:1, de Vermelho Congo a 5%. Os agentes estressantes Rifampicina e NaCl foram adicionados ao meio, em diferentes tubos, nas concentrações 25 ng/mL e 0,25% respectivamente. Os meios foram então vertidos para placas de Petri de vidro, com 15 cm de diâmetro.

As cepas foram inoculadas na placa de AVC por gota de 10 μ L, em triplicata, e incubadas a 35°C por 24 h, seguida de incubação a temperatura ambiente por 24 h.

As colônias formadas na placa foram registradas em fotografia. A morfologia das colônias foi avaliada como lisa, para as amostras não produtoras de biofilme polissacarídico. As colônias rugosas, foram classificadas como amostras produtoras de biofilme.

As amostras produtoras de biofilme apresentam uma morfologia característica em meio Ágar Vermelho Congo (AVC). Neste teste, proposto por Freeman e colaboradores (1989), as amostras produtoras de biofilme polissacarídico apresentam colônias com coloração negra e textura rugosa.

Na fórmula que nós utilizamos para o teste AVC, retiramos a Glicose do meio, de forma a evitar a indução de biofilme por estresse osmótico da glicose. Assim, as colônias produtoras de biofilme polissacarídico não ganharam coloração negra, mas apresentaram a textura rugosa em suas colônias.

3.5 Análise dos domínios

As sequências dos genes *sarA*, *icaA*, *icaR*, *sigB* e *gyrB* foram obtidas através do site do genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e a análise dessas sequências foi feita pelas ferramentas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) e Pfam (<http://pfam.xfam.org/>).

3.6 Desenho dos oligos para análise de PCR em tempo real

Os oligos foram desenhados pelo software Primer Express, desenvolvido pela empresa Applied Biosystems[®].

3.7 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita a partir de culturas de *S. aureus*, crescidas em tubos de vidro 13x100 mm, contendo meios de cultura (TSB, TSB+RIF 0,25 ng/mL e TSB+NaCl 0,25%) a 37°C, em tempo de 12 h.

As culturas bacterianas foram homogeneizadas em agitador do tipo vortex e transferidas para um microtubo estéril de 1,5 mL de capacidade. Os microtubos foram centrifugados a 12000 g por 10 min. a 4°C, em centrífuga refrigerada, modelo Centrifuge 5430R da marca Eppendorf. Em seguida, foi descartado o sobrenadante da cultura e o pellet, contendo as células das amostras, foi utilizado para a extração de RNA pelo método do Fenol Ácido a 70°C.

Os microtubos contendo os pellets das amostras que não foram submetidas a extração de RNA logo após o tempo de incubação, foram congeladas em nitrogênio líquido (N₂) e conservados em freezer a -20°C ou -80°C para a posterior extração.

Os pellets foram ressuspensos em 150 µL de Água-DEPC e agitados em Vortex durante três minutos. Em seguida, foram adicionados 75 µL de Clorofórmio saturado com água-DEPC e 75 µL de Fenol Ácido pH 4,3 à suspensão bacteriana. Os microtubos foram agitados em vortex por 1 min. e incubados em banho-maria a 70°C por 30 min., com agitação em vortex de 1 min. a cada 5 min. de incubação.

Os tubos, após a incubação, foram centrifugados a 16000 g por 20 min. 150 µL da fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. A este, foi adicionado 300 µL de álcool isopropílico e em seguida o tubo foi agitado em Vortex por 3 min.

Os tubos foram então centrifugados a 16000 g por 20 min. O sobrenadante foi desprezado, e a lavagem do RNA foi feita adicionando-se 300 µL de Solução de Álcool Etilico 70% em Água-DEPC. A lavagem foi feita três vezes, centrifugando o microtubo a 8000 g por 10 minutos entre as lavagens.

Após a lavagem, o RNA foi centrifugado em uma centrífuga a vácuo, modelo Concentrator Plus da Eppendorf, para a secagem do RNA.

O RNA foi então ressuspensão em 100 µL de Água-DEPC e dosado em equipamento NanoDrop Thermo e equipamento Qubit 2.0[®], seguindo a orientação do fabricante. Além disso, foi feita corrida do RNA em gel de agarose para verificar a integridade do mesmo.

A corrida do RNA foi feita utilizando gel de Agarose a 1% em solução de TAE. O gel foi feito adicionando 0,7 g de Agarose em 70 mL de solução TAE 1X. A solução foi então aquecida em um forno de microondas até que ficasse totalmente homogênea. A solução de agarose foi então aplicada a uma forma, previamente tratada com solução detergente para manter a integridade do RNA, e deixada resfriar a temperatura ambiente. Depois de frio, o gel foi imerso em uma cuba de eletroforese, previamente tratada com solução detergente para manter a integridade do RNA, contendo TAE 1X.

Três microlitros da amostra de RNA foram adicionados a 1 µL de tampão de RNA e 2 µL de gel Red, diluído na proporção 1/500. As amostras foram então aplicadas ao gel de Agarose 1% na cuba de eletroforese e deixadas correr no gel por 30 min. a uma tensão de 100 Volts. O gel, ao final do tempo de corrida, foi levado para um equipamento fotodocumentador modelo L-PIX EX Loccus Biotecnologia[®], e a observação das bandas íntegras de RNA (23S e 16S) foi feita observando a imagem gerada pelo equipamento, conforme a figura 1 abaixo.

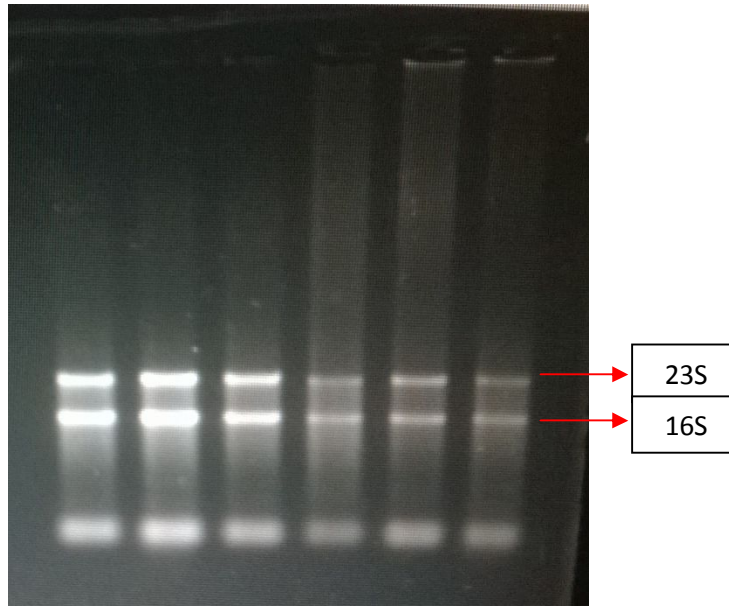


Figura 1: Gel de eletroforese mostrando as bandas 23S e 16S de RNA íntegro após a extração.

3.8 Tratamento com DNase

Após o cálculo da concentração, foi retirado um volume equivalente a 450µg de RNA e transferido para um microtubo de 1,5mL de capacidade. Este volume foi ajustado para 5 µL de RNA (acrescentando água-DEPC quando o volume da alíquota equivalente era menor que 5 µL, ou concentrando o volume retirado, em centrífuga a vácuo, até chegar a um volume final de 5 µL).

Após o ajuste do volume, foi adicionado para cada tubo de amostra, 1 µL de Tampão 10X, 1 µL de DNase 1 u/µL e 3 µL de água-DEPC. Todos os reagentes utilizados foram do Kit de tratamento com DNase da Promega.

Os tubos foram então homogeneizados em agitador tipo vortex e incubados a 37°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 1 µL da solução Stop Solution, e os tubos foram novamente levados a agitação em vortex e incubados a 65°C por 10 min. Os microtubos, após a incubação, foram armazenados em freezer a -20°C.

3.9 Análise de expressão gênica

3.9.1 Preparo da 1ª fita

Foi utilizado para esse experimento o Kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents, da Applied Biosystems. Para cada tubo, 4,5 µL de BUFFER 10X, 9,9 µL de MgCl₂ 25 mM, 9 µL de dNTP, 2,25 µL de Random Hexamer, 0,9 µL de Inibidor de RNase e 1,125 µL de MultiScript foram pipetados.

Para evitar erros de pipetagem de volumes pequenos, todos os reagentes foram calculados para a quantidade total de tubos para cada experimento. Os volumes calculados foram pipetados em um único tubo de 1,5 mL de capacidade, em forma de mix, e homogeneizados em agitador tipo vortex.

Volumes iguais do mix foram distribuídos para microtubos de 200 µL de capacidade. Em seguida, foi adicionado o RNA tratado com DNase, resultando em um volume final de 25 µL de Mix mais amostra. Todos os microtubos foram colocados em equipamento termociclador Veitri Thermo Cycler 96 well®, da Applied Biosystems®. A reação foi feita com um ciclo de 25°C/10 min., 48°C/30 min., 95°C/5 min. e 4°C sem tempo determinado. Após a reação, os tubos contendo as primeiras fitas de cDNA foram armazenadas em freezer a -20°C.

3.9.2 Preparo dos Oligos

Os oligos de iniciadores dos genes *sarA*, *sigB*, *icaA*, *icaR* e *gyrB* foram ressuspensos em tampão Tris EDTA 10mM pH 8,0, de forma que os oligos tivessem uma concentração final de 100µM. A partir dessas soluções, os oligos foram aliquotados em tubos de 1,5 mL, contendo os mesmos, diluídos a 10µM.

A partir dos oligos 10 µM, foi feita uma mistura de iniciadores de cada gene, misturando-se 8 µL do oligo Forward, 8 µL do oligo Reverse e 84 µL de Tris EDTA 10 mM pH 8,0.

3.9.3 PCR em Tempo Real

Foi feito uma mistura (MIX SGP) com o reagente SYBER GREEN® 2 µg/mL da Applied Biosystems® e a mistura de iniciadores, na proporção 10 µL de SYBER GREEN® e 5µL da mistura de iniciadores em um tubo novo de 1,5 mL, pra cada gene a ser testado.

Cada MIX SGP foi pipetado para uma Placa de 96 poços para reação de PCR em Tempo Real. Os poços foram preenchidos com 15 µL do MIX SGP, em triplicata.

Em seguida, as primeiras fitas foram diluídas, adicionando-se 75µL de Tris EDTA 10 µM pH 8,0 aos tubos. Os tubos foram então homogeneizados em Vortex e 5 µL da 1ª fita foi pipetada em cada poço da placa com o gene a ser avaliado, conforme mostra o quadro 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra TSB			Amostra NaCl			Amostra RIF			BRANCO sarA		
B	Amostra TSB			Amostra NaCl			Amostra RIF			BRANCO sigB		
C	Amostra TSB			Amostra NaCl			Amostra RIF			BRANCO icaA		
D	Amostra TSB			Amostra NaCl			Amostra RIF			BRANCO icaR		
E	Amostra TSB			Amostra NaCl			Amostra RIF			BRANCO gyrB		
F												
G												
H												

Quadro 1: Representação de uma placa de 96 poços para reação de PCR em tempo real.

A placa foi então vedada, com uma película óptica adesiva compatível com a placa, da Applied Biosystems®. Após isso, a placa foi centrifugada a 4500 xg a 4°C, por um minuto.

Após o preparo da placa, a mesma foi colocada em um equipamento de PCR em tempo real, modelo Step One Plus®, da Applied Biosystems®. A reação foi feita com um ciclo de 95°C/10 min., 40 ciclos de 95°C/15 s e 60°C/1 min., um ciclo de 95°C/15 s e 60°C/1 min.

Os dados gerados pelo equipamento foram coletados no computador e tabelados em arquivo Excel. Para o cálculo da expressão gênica foi usado o método de Livak (BioRad Guide, 2006). Este método foi escolhido devido o

teste de compatibilidade do gene constitutivo mostrar ser compatível com todos os genes de teste.

3.9.4 PCR para verificação dos genes *icaA* e *icaD*

Para verificar a presença do operon *ica* nas amostras bacterianas foram feitas análises de PCR para identificação dos genes *icaA* e *icaD*. As amostras foram cultivadas em meio TSB a 37°C por 24 h. Posteriormente, essas mesmas amostras foram repicadas para uma placa de TSA, cultivada a 37°C por 24 horas.

O DNA das amostras foi extraído a partir do crescimento bacteriano em placa. Foi preparada uma suspensão em tampão TE esterilizado (15 mM Tris e 0,1mM EDTA pH 7,5), correspondente à turvação padrão 6 da escala McFarland. Foram transferidos 600 µL da suspensão a um microtubo de 1,5 mL, que foi centrifugado a 14000 g, por 5 min., a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi ressuspenso em 200 µL de tampão TE, submetido à fervura por 10 min. Em seguida, o tubo foi mantido em banho de gelo por 30 minutos.

Os *debris* foram removidos ao serem centrifugados novamente, nas mesmas especificações, e 40 µL do sobrenadante (que contém o DNA) foi transferido para microtubos de 0,5 mL e mantidos a -20°C até o uso.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo 125 µM de dNTP (Invitrogen), 2,5 µL de Tampão para PCR (Invitrogen), 0,5 µL de oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*), iniciadores, (Invitrogen, diluído 1/10), 1U (0,2 µL) de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 1µL do DNA molde.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização do PCR foram:

- *icaA* (F) (5'-TCGCACTCTTTATTGATAGTCGCTACGAG-3') e
icaA (R) 5'-TGCGACAAGAACTACTGCTGCGTTAAT-3')
(Eleaume & Jabbouri, 2004).

- *icaD* (F) (5'-TGGTCAAGCC-CAGACAGAGGG-3'); *icaD* (R) (5'-TCGCGAAAATGCCCATAGTTTCA-3'), feitos no programa primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

As misturas de reação foram submetidas a 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 59°C por 45 s, e extensão a 72°C por 45 s. Os produtos amplificados foram submetidos à corrida em gel de agarose (Agargen) a 1,5% em tampão tris-borato EDTA (TBE) 0,5X (1X – 89mM Tris, 89mM ácido bórico e 0,05M EDTA pH 8,2) a 100 volts, sendo distribuídos 4µL do produto, 2 µL de Tampão de Carregamento e 2µL de Gel Red (1/500) em cada poço.

As imagens foram registradas em aparelho fotodocumentador. Foi utilizado como marcador de tamanho de DNA para a corrida eletroforética os tampões de carregamento 100bp *plus DNA ladder* e 1kb *plus DNA ladder* (Invitrogen).

3.9.5 Análises Estatísticas

Para a geração de gráficos e análise estatística, foi utilizado o software Gnumeric 6.0. Os testes estatísticos utilizados foram o ANOVA e o Teste-T.

4. RESULTADOS

4.1 Formação de biofilme induzido por agentes estressantes

Já foi demonstrado que diferentes agentes químicos, como antimicrobianos, etanol (EtOH) e cloreto de sódio (NaCl), são capazes de induzir biofilme em bactérias (Fey, Olson, 2010). Para estudar o efeito destes agentes na formação de biofilme em *S. aureus*, 16 amostras foram avaliadas seguindo o protocolo proposto por Milisavljevic e colaboradores (2008). Para ser considerada produtora de biofilme, a amostra tem que apresentar uma DO_{eb} maior 0,5. As amostras de *S. aureus* estudadas apresentaram diferentes

comportamentos quanto à formação de biofilme frente aos agentes estressantes testados. Na figura 1 é apresentada a indução de biofilme com o tempo de 24 horas.

As amostras SA06, SA18 e SA27 não responderam a nenhum dos agentes testados (gráfico1). As amostras 25923 e 43300 responderam a todos os agentes testados, entretanto, as mesmas já eram produtoras de biofilme na condição controle (TSB). As amostras SA01, SA03, SA10, SA12, SA13, SA15, SA40, SA50 SA53, SA60 e SA62 apresentaram indução em pelo menos um dos agentes estressantes testados. O teste mostrou que os agentes NaCl, EtOH e Rifampicina são capazes de induzir a formação de biofilme.

Todas as amostras testadas foram divididas em 6 grupos e classificadas quanto a resposta ao agente estressante na forma de biofilme (gráfico 2). As amostras ATCC 25923 e ATCC 43300 (13% do total) foram produtoras naturais de biofilme e também foram induzidas na presença dos agentes estressantes EtOH, NaCl e Rifampicina, em todas as concentrações testadas (grupo I).

O grupo II (SA06, SA18 e SA27), correspondente a 19%, é de amostras classificadas como biofilme negativo em todas as condições testadas. O grupo III (19%) é constituído das amostras SA01, SA03 e SA10; classificadas como biofilme negativo, mas que são induzidas a formar biofilme na presença de Rifampicina (RIF 4,0 ng/mL). O quarto grupo (19%) foi constituído de amostras biofilme negativo, mas que foram induzidas por Rifampicina e Etanol (SA13, SA50 e SA53).

O grupo V (cepa SA15) foi induzido na presença de Rifampicina e de NaCl. O sexto grupo (grupo VI) é composto de quatro amostras (25%) que foram classificadas como não produtoras de biofilme, mas que foram induzidas por todos os agentes testados.

Dos cinco grupos de amostras produtoras de biofilme, foram escolhidas duas amostras de cada grupo, para avaliar a capacidade de formar biofilme em tempos menores. Exceto pelo grupo V, que ficou representado por sua única amostra. O teste de biofilme foi feito utilizando o tempo de 12 horas. O gráfico 3

apresenta o resultado do teste, onde nove amostras são submetidas às mesmas condições utilizadas nos teste de 24 h.

As amostras do grupo I (25923 e 43300) apresentaram um comportamento de formação de biofilme muito semelhante com o que ocorreu no tempo de 24 horas. As amostras do grupo III (SA01 e SA10) foram produtoras de biofilme apenas na condição de Rifampicina a 4,0 ng/mL.

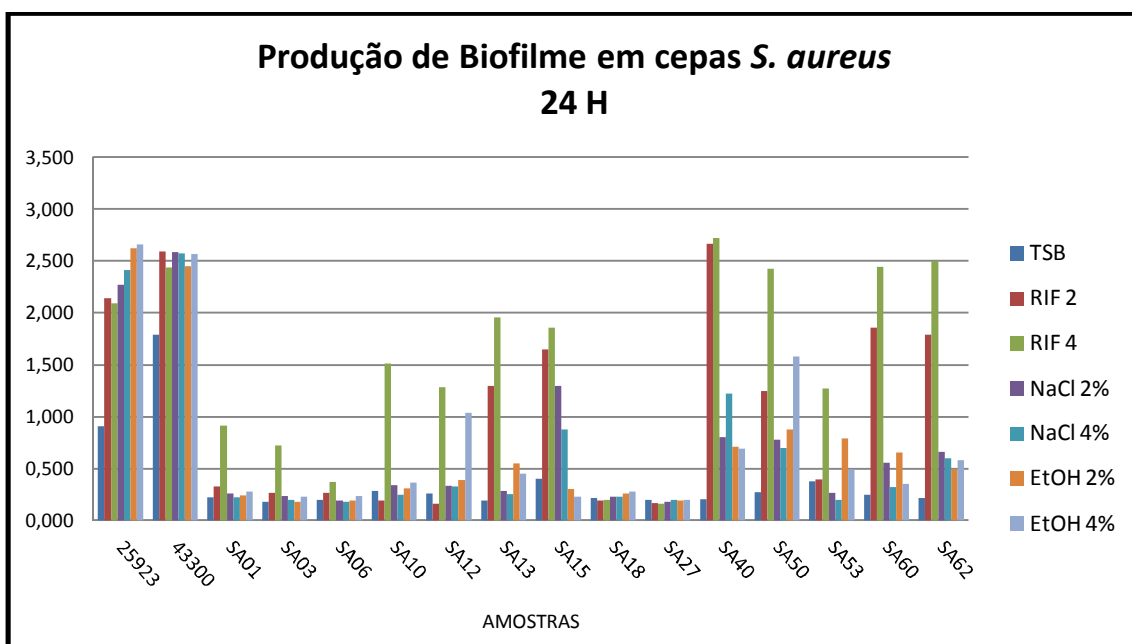


Gráfico 1: Gráfico de amostras produtoras de biofilme em diferentes concentrações de Rifampicina, NaCl e EtOH; As amostras foram cultivadas em um tempo de 24 horas. TSB= Condição Controle em meio Caldo Soja Trypticaseína; RIF 2= TSB+Rifampicina a 2,0 ng/mL; RIF 4= TSB+Rifampicina a 4,0 ng/mL; NaCl 2%= TSB+NaCl a 2%; NaCl 4%= TSB+NaCl a 4%; EtOH 2%= TSB+Etanol a 2%; EtOH 4%= TSB+EtOH a 4%

As amostras do grupo IV, V e VI mostraram ser induzidas pelos agentes estressantes, com uma maior produção nas maiores concentrações testadas, com exceção da amostra SA53 (grupo IV), que não foi capaz de produzir biofilme na presença de EtOH.

Testes posteriores de produção de biofilme foram realizados em menores concentrações de Rifampicina (0,25; 0,5; 2,0 e 1,0 ng/mL) e de NaCl (0,25%, 0,5%, 1% e 2%). Estes testes foram feitos utilizando um grupo de cinco amostras, com características distintas quanto a formação de biofilme. Nesses testes foram utilizados os tempos de 6 e 16 horas, para verificar a formação de biofilme em fases distintas do crescimento bacteriano. Os resultados estão ilustrados nos gráficos 4 e 5.

As amostras produtoras naturais de biofilme (25923 e 43300) submetidas ao teste com 6 horas de cultivo apresentaram formação de biofilme em grande quantidade (gráfico 4). Dentre as amostras induzidas (SA15 e SA40), somente a amostra SA40 foi capaz de produzir biofilme em 6 horas.

Além disso, apenas a Rifampicina (RIF 2, RIF 1 e RIF 0,5) foi capaz de induzir a formação de biofilme em SA40. A amostra SA18 foi utilizada como controle negativo.

O gráfico 5 mostra o resultado do teste de biofilme com 16 horas de crescimento bacteriano. As amostras formadoras naturais de biofilme (25923 e 43300) aumentaram a quantidade de biofilme na presença dos agentes estressantes. Todas as amostras induzidas (SA15 e SA40) apresentaram formação de biofilme nas condições de Rifampicina e NaCl, em suas diferentes concentrações. A amostra SA18 foi utilizada como controle negativo do teste.

Estes resultados mostram que amostras não produtoras podem ser induzidas a formar biofilme em tempos menores que 24 horas. Além disso, a formação de biofilme pode ser diagnosticada em tempos curtos.

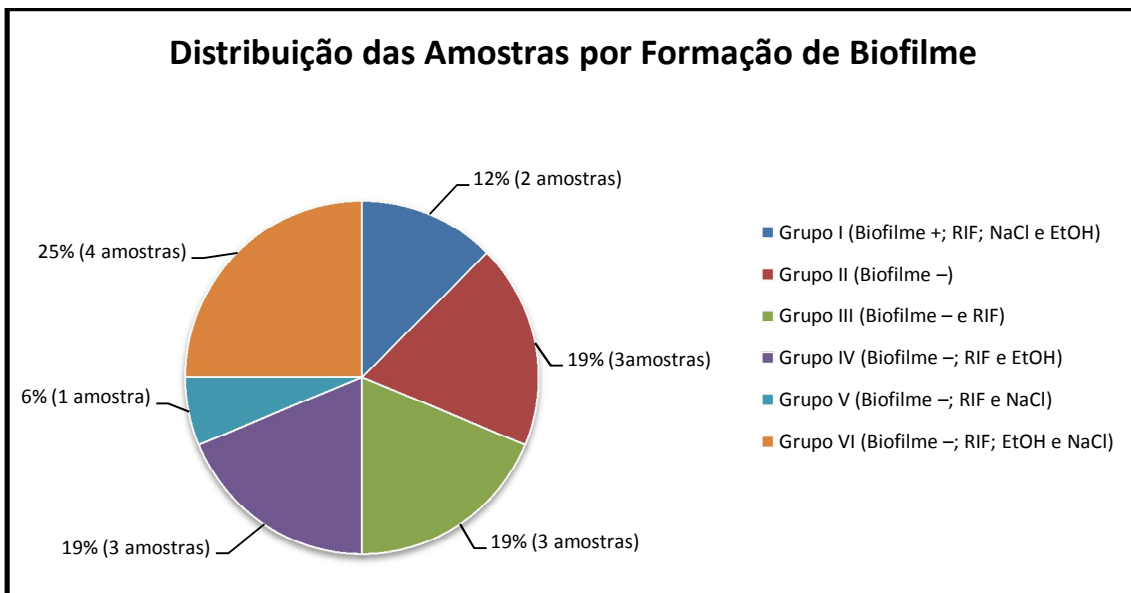


Gráfico 2: Distribuição das amostras por produção de biofilme. Biofilme + = Amostras naturalmente produtoras de biofilme; Biofilme - = Amostras não produtoras de biofilme; RIF = Amostras induzidas a formar biofilme na presença de Rifampicina; NaCl = Amostras induzidas a formar biofilme na presença de Cloreto de Sódio; EtOH = Amostras induzidas a formar biofilme na presença de Etanol.

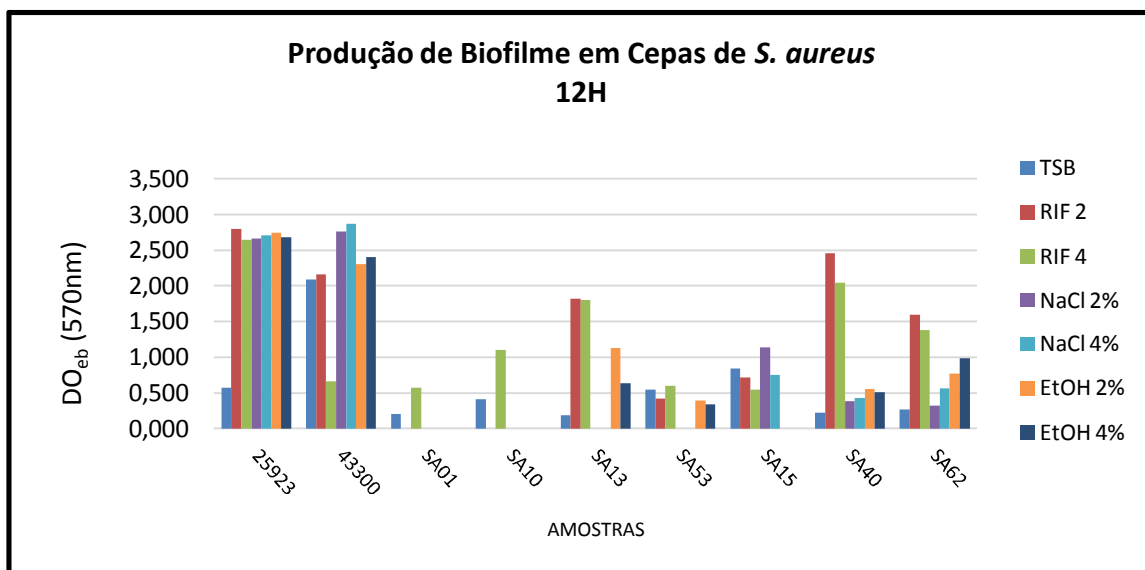


Gráfico 3: Amostras formadoras de Biofilme em diferentes concentrações de Rifampicina, NaCl e EtOH, crescidas em 12 horas. . TSB= Condição Controle em meio Caldo Soja Trypticaseína; RIF 2= TSB+Rifampicina a 2,0 ng/mL; RIF 4= TSB+Rifampicina a 4,0 ng/mL; NaCl 2%= TSB+NaCl a 2%; NaCl 4%= TSB+NaCl a 4%; EtOH 2%= TSB+Etanol a 2%; EtOH 4%= TSB+EtOH a 4%

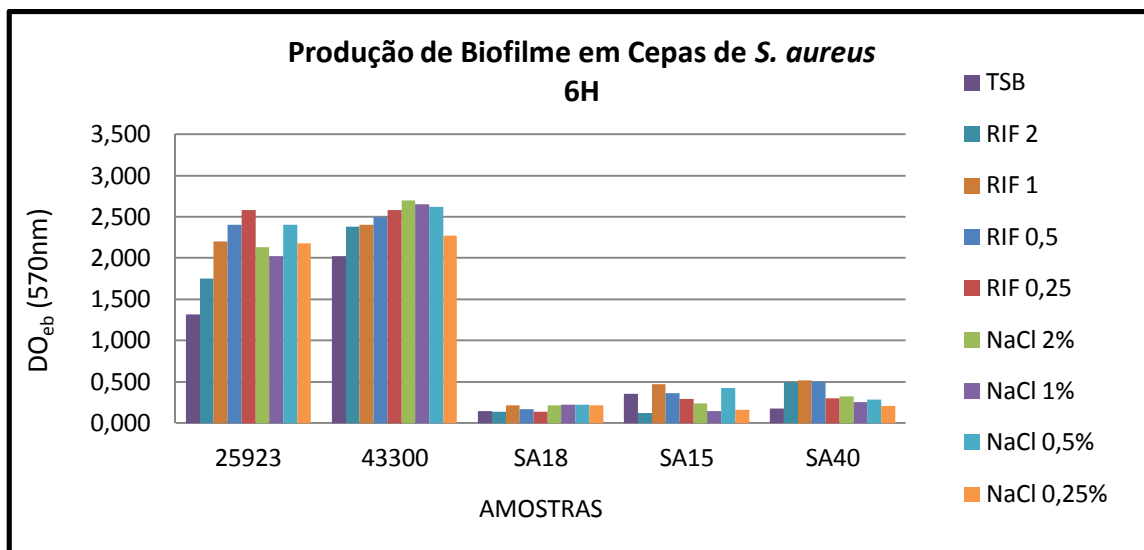


Gráfico 4: Amostras Formadoras de biofilme em diferentes concentrações de Rifampicina e NaCl com 6 horas de crescimento. TSB= Condição Controle em meio Caldo Soja Trypticaseína; RIF 2= TSB+Rifampicina a 2,0 ng/mL; RIF 1= TSB+Rifampicina a 1,0 ng/mL; RIF 0,5= TSB+Rifampicina a 0,5 ng/mL; RIF 0,25= TSB+Rifampicina a 0,25 ng/mL; NaCl 2%= TSB+NaCl a 2%; NaCl 1%= TSB+NaCl a 1%; NaCl 0,5%= TSB+NaCl a 0,5%; NaCl 0,25%= TSB+NaCl a 0,25%

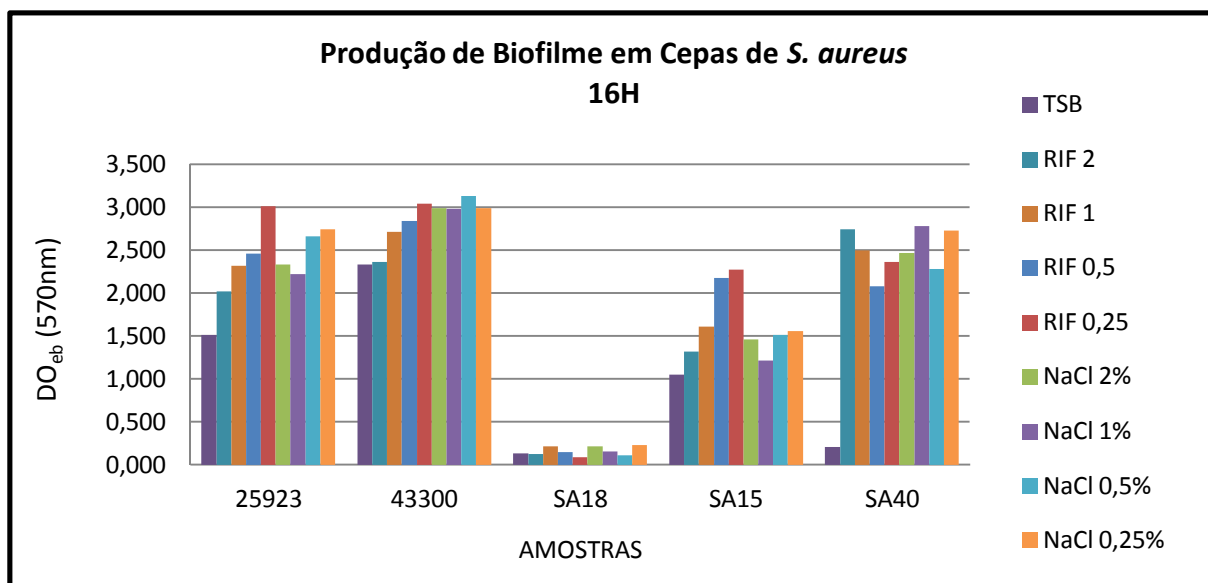


Gráfico 5: Amostras formadoras de biofilme em diferentes concentrações de Rifampicina e NaCl crescidas em um tempo de 16 horas. TSB= Condição Controle em meio Caldo Soja Trypticaseína; RIF 2= TSB+Rifampicina a 2,0 ng/mL; RIF 1= TSB+Rifampicina a 1,0 ng/mL; RIF 0,5= TSB+Rifampicina a 0,5 ng/mL; RIF 0,25= TSB+Rifampicina a 0,25 ng/mL; NaCl 2%= TSB+NaCl a 2%; NaCl 1%= TSB+NaCl a 1%; NaCl 0,5%= TSB+NaCl a 0,5%; NaCl 0,25%= TSB+NaCl a 0,25%

4.2 Caracterização do tipo de biofilme

O biofilme estafilocócico, por se tratar de uma estrutura complexa, pode ter a origem de sua matriz composta de diferentes substâncias. Em se tratando de biofilme formado por *S. aureus*, podemos destacar a PIA, a proteína Bap, e até mesmo DNA extracelular como substâncias que podem compor a matriz do biofilme. Nós tratamos as placas de microtitulação com PBS pH 7, NaIO₄ e Proteinase K.

O NaIO₄ oxida o grupamento hidroxil dos carboidratos (Woodward, Young, Bloodgood, 1985), isso desfaz a matriz do biofilme polissacarídico. A Proteinase K decompõe proteínas que formam o biofilme proteico e por isso também são utilizadas em experimentos de degradação de biofilmes. Tais reagentes também foram recentemente utilizados por Szczuka, Telega e Kaznowski (2014) para degradação de biofilme estafilocócico.

As amostras que obtiveram uma diminuição do valor da DO_{eb} em NaIO₄, em comparação com o biofilme no PBS, maior que 50% foram consideradas produtoras de biofilme polissacarídico. As amostras que obtiveram uma diminuição do valor da DO_{eb} em Proteinase K, em comparação com o biofilme no PBS, maior que 50% foram consideradas produtoras de biofilme proteico.

Todos os tempos utilizados para os testes de formação de biofilme (6, 12, 16 e 24 horas) também foram utilizados para a caracterizar a composição do biofilme formado.

No gráfico 6 são apresentados os dados para 24 h de indução. As amostras produtoras naturais de biofilme (25923 e 43300) apresentaram pelo menos 50% de diminuição na DO_{eb} em NaIO₄ em todas as condições testadas (Rifampicina, NaCl e EtOH). As amostras produtoras de biofilme somente na presença de Rifampicina (SA01 e SA10) apresentaram resultado positivo para polissacarídeo. As amostras SA13 e SA53 apresentaram resultado positivo para biofilme polissacarídico em Rifampicina e EtOH 2%. Não houve redução de 50% na DO_{eb} para nenhum dos reagentes testados (NaIO₄ e Proteinase K) para as amostras SA13 e SA53 em EtOH 4%.

As amostras SA40 e SA62 apresentaram resultado positivo para biofilme polissacarídico em todas as condições testadas, com exceção da condição controle, em todos os tempos testados. A amostra SA15 apresentou redução de 50% na DOeb após o tratamento com Proteinase K nas condições de Rifampicina e de NaCl nos tempos de 6, 12 e 24 horas. No tempo de 16 horas a amostra SA15 reduziu 40% da quantidade de biofilme na presença de NaIO_4 e mais de 50% na presença de Proteinase K.

No gráfico 7 são apresentados os dados de incubação com 12 horas e com as mesmas amostras de 24 horas. No gráfico 8 são apresentados os dados de composição com o tempo de 6 horas com as amostras SA15 e SA40. No gráfico 9 são apresentados os dados de composição com o tempo de 16 horas com as amostras SA15 e SA40. Esses resultados mantiveram o mesmo padrão de composição que quando comparados com as mesmas amostras crescidas com o tempo de 24 horas.

Vale ressaltar que a amostra SA15 teve uma inibição de 21% em NaCl e 16% em Rifampicina em 6 horas, estímulo de 20% em NaCl e inibição de 21% em Rifampicina em 12 horas, inibição de 46% em NaCl e 45% em Rifampicina em 16 horas e inibição de 20% em NaCl e 36% em Rifampicina em 24 horas com NaIO_4 . Esses dados sugerem que essa amostra, apesar de ter uma composição predominantemente protéica, pode também ter uma matriz de biofilme com uma parte de PIA.

Os resultados sugerem que um mesmo agente indutor pode influenciar a formação de biofilme de diferentes composições, dependendo da cepa. Além disso, a composição do biofilme não se altera com o passar do tempo.

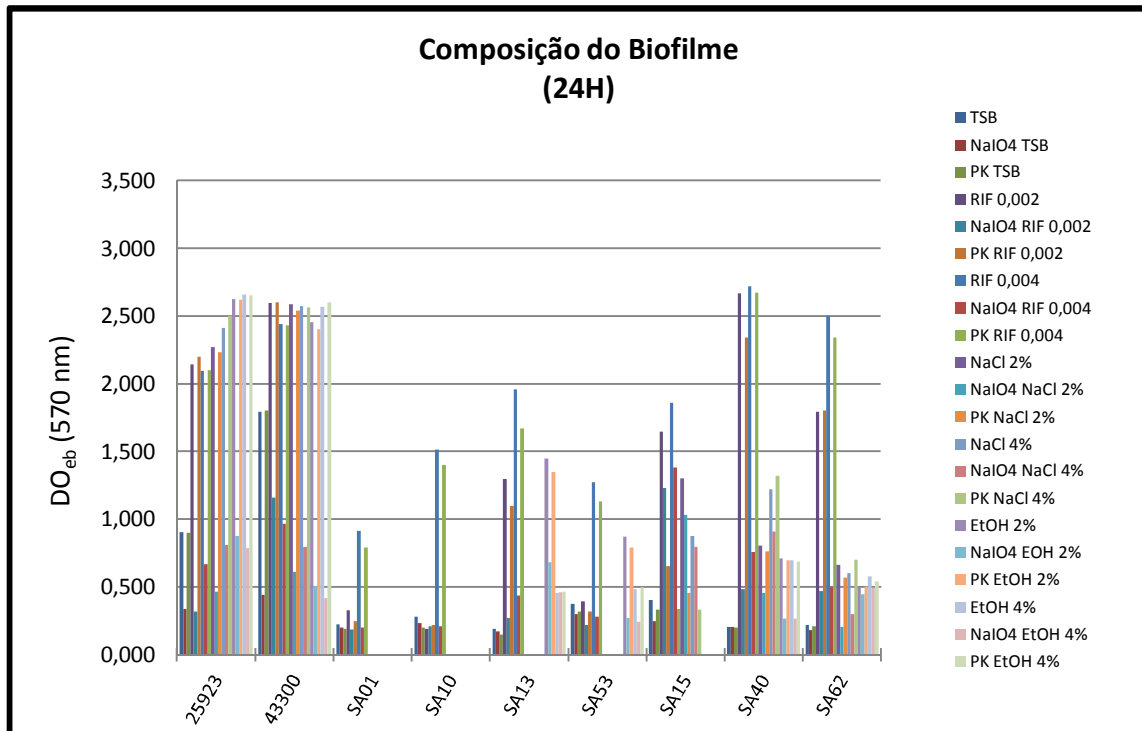


Gráfico 6: Teste de Decomposição de Biofilme em 24 horas de crescimento bacteriano. TSB = Condição Controle; Todas as condições NaIO₄ = biofilme tratado na condição indicada com NaIO₄ 40 mM; Todas as condições PK = Biofilme na condição indicada tratado com Proteinase K a 100 µM.

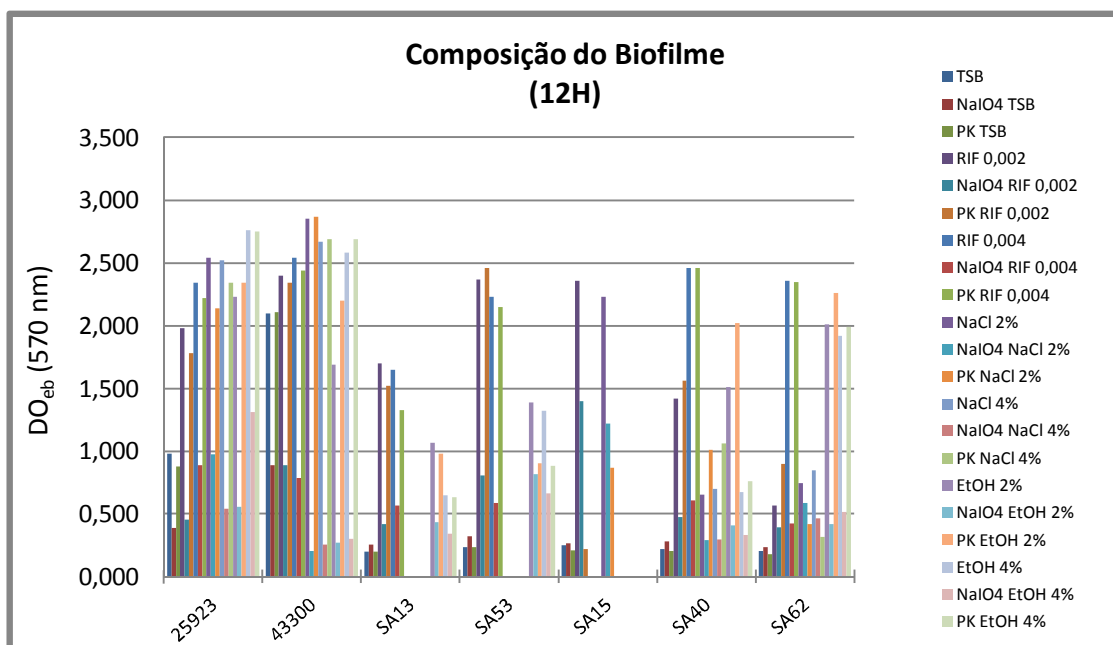


Gráfico 7: Teste de Decomposição de Biofilme em 12 horas de crescimento bacteriano. TSB = Condição Controle; Todas as condições NaIO₄ = biofilme tratado na condição indicada com NaIO₄ 40 mM; Todas as condições PK = Biofilme na condição indicada tratado com Proteinase K a 100 µM.

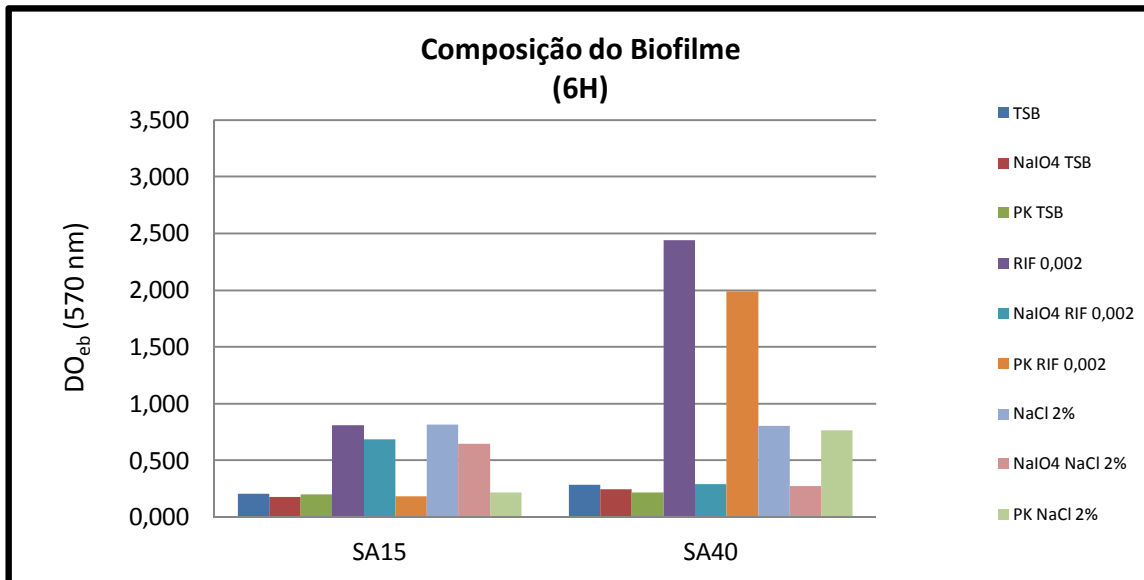


Gráfico 8: Teste de Decomposição de Biofilme em 6 horas de crescimento bacteriano. TSB = Condição Controle; Todas as condições NaIO₄ = biofilme tratado na condição indicada com NaIO₄ 40 mM; Todas as condições PK = Biofilme na condição indicada tratado com Proteinase K a 100 µM.

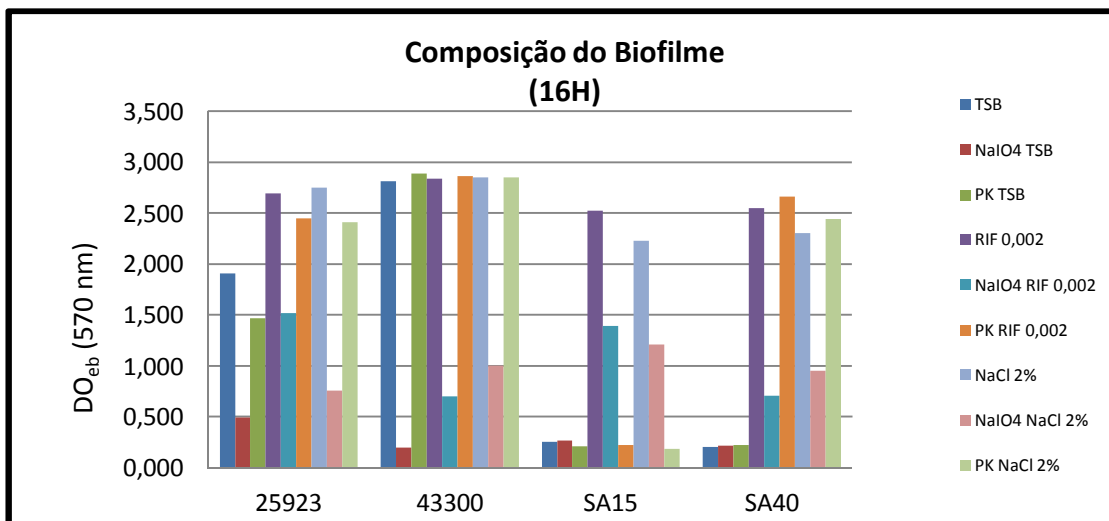


Gráfico 9: Teste de Decomposição de Biofilme em 16 horas de crescimento bacteriano. TSB = Condição Controle; Todas as condições NaIO₄ = biofilme tratado na condição indicada com NaIO₄ 40 mM; Todas as condições PK = Biofilme na condição indicada tratado com Proteinase K a 100 µM.

4.3 Teste em Ágar Vermelho Congo

A figura 2 apresenta as amostras produtoras de biofilme polissacarídico com suas colônias características. A amostra SA40 possui uma textura lisa na

condição controle (TSB), e passa a apresentar uma textura rugosa nas condições de Rifampicina e NaCl. A cepa SA15 não apresentou colônias rugosas em nenhuma das condições testadas. A amostra ATCC 25923 apresenta um formato de colônias rugosas nas três condições testadas (TSB, Rifampicina e NaCl).

O teste em AVC confirmou a composição do biofilme testada nos experimentos anteriores de degradação em NaIO₄ e Proteinase K. As amostras polissacarídicas mantiveram as características do tipo de biofilme que elas produzem. A falta de Glicose não interferiu no diagnóstico do teste em AVC.

4.4 Desenho dos oligos para análise de PCR em tempo real

Já foi demonstrado que o operon *icaADBC* é regulado transcricionalmente durante a formação do biofilme (Rohde *et al.*, 2010). O etanol e o NaCl já foram demonstrados como indutores de reguladores globais como SarA e SigB para amostras *Staphylococcus epidermidis* (Milisavljevic *et al.*, 2008). Entretanto, ainda é desconhecido como a rifampicina atua na regulação da expressão do operon *ica*.

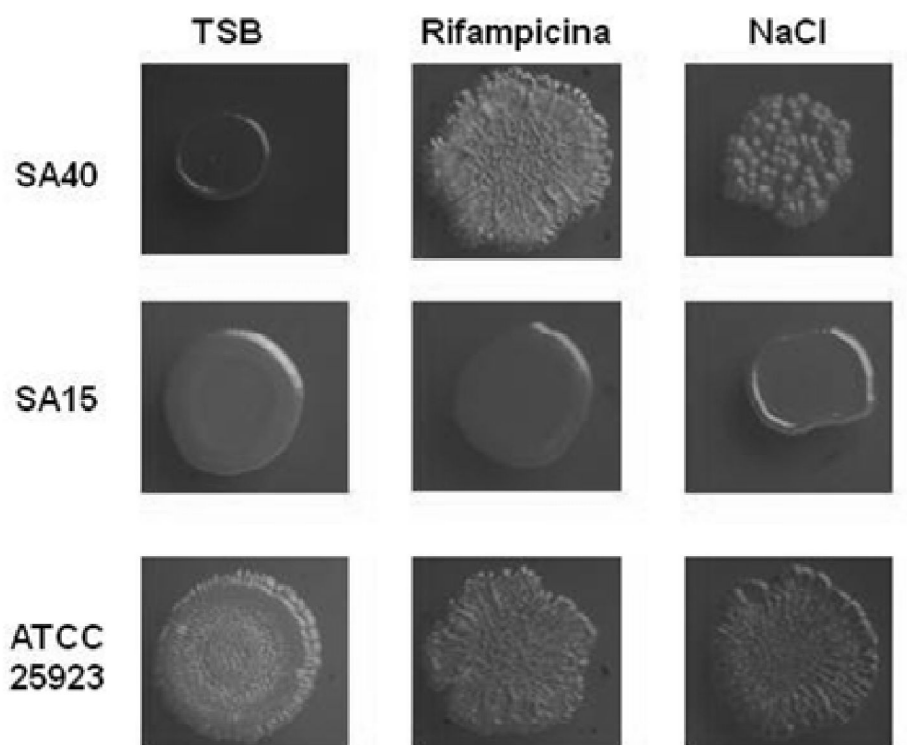


Figura 2: Teste em Agar Vermelho Congo sem Glicose na presença de Rifampicina e NaCl. Colônias lisas = Amostras não produtoras de biofilme polissacarídico. Colônias rugosas = Amostras produtoras de biofilme polissacarídico.

Alguns agentes estressantes são capazes de regular a expressão desse operon (Fey, Olson, 2010). Para confirmar que as sequências dos genes *icaA*, *icaR*, *sarA*, *sigB* e *gyrB* transcrevem as mesmas proteínas, tanto em *S. aureus* quanto em *S. epidermidis*, procuramos avaliar os domínios das proteínas destes genes em *S. epidermidis* e *S. aureus* através das ferramentas InterPro e Pfam. As análises realizadas sugerem que os homólogos identificados possuem os mesmos domínios das proteínas de *S. aureus* em *S. epidermidis* (ANEXO I). Uma vez confirmada a função dos genes, através da identificação dos domínios, nós desenhamos oligos para PCR em tempo real usando o programa PrimerExpress® da Applied® (Quadro 2).

Primer <i>S. aureus</i>	Sequencia	Programa
AmbicaA (F)	5' TTGGGAGGTCTTTGGAAGCA 3'	Primer Express
AmbicaA (R)	5' GTAATACTTCGTGTCCCCCTTGA 3'	Primer Express
AmbicaR (F)	5' GAATCAAAGATAAAGATGACAAAAGAAGAC 3'	Primer Express
AmbicaR (R)	5' TCCACTGCTCCAAATTTTTGC 3'	Primer Express
AmbgyrB (F)	5' ATCGGTGGCGACTTTGATCT 3'	Primer Express
AmbgyrB (R)	5' CACATCGGCATCAGTCATAATGA 3'	Primer Express
AmbsigB (F)	5' GATACGCTCACCTGTCTTTTTG 3'	Primer Express
AmbsigB (R)	5' TCGCGAACGAGAAATCATACAA 3'	Primer Express
AmbsarA (F)	5' CTTTCATCATGCTCATTACGTTTTTT 3'	Primer Express
AmbsarA (R)	5' CATTAAACTACAAACAACCACAAGTTG 3'	Primer Express

Quadro 2: Desenho dos oligos para PCR em tempo real.

4.5 Análise de expressão gênica

A análise de expressão gênica foi feita com duas amostras contrastantes com relação à composição do biofilme (SA40 e SA15). Estas amostras não formam biofilme na condição Controle (TSB), mas são induzidas a formarem biofilme na presença de Rifampicina e NaCl.

Para poder utilizar a técnica da PCR em tempo real na avaliação da regulação dos indutores de biofilme, nós avaliamos a compatibilidade dos ensaios para os genes alvo com o gene constitutivo (*gyrB*). Para isso foram feitas diluições seriadas das 1ª fitas e realizamos a PCR em tempo real para cada gene. Nossos resultados nos mostram que os ensaios são compatíveis

(gráfico 10) e podemos utilizar a fórmula de Livak para o cálculo da expressão gênica.

Foram comparadas a expressão dos genes *icaR*, *sarA*, *sigB* e *icaA* nessas amostras, para avaliar como a Rifampicina e o NaCl agem molecularmente na indução de biofilme. O gráfico 11 apresenta os resultados obtidos.

A amostra SA40 teve a expressão de *icaA* aumentada mais de duas vezes na presença de NaCl, enquanto que *icaR* teve sua expressão reprimida 50%. Na amostra SA15, o aumento da expressão de *icaA* foi de apenas 20%, enquanto *icaR* não teve uma diferença significativa comparada ao controle.

Na presença de Rifampicina a amostra SA40 teve um aumento da expressão do gene *icaA* de cerca de 60%, enquanto *icaR* não teve uma diferença significativa comparada ao controle. A amostra SA15, nessa mesma condição experimental, teve um aumento de seis vezes da expressão de *icaA* enquanto que o gene *icaR* não apresentou diferença significativa comparada à condição controle.

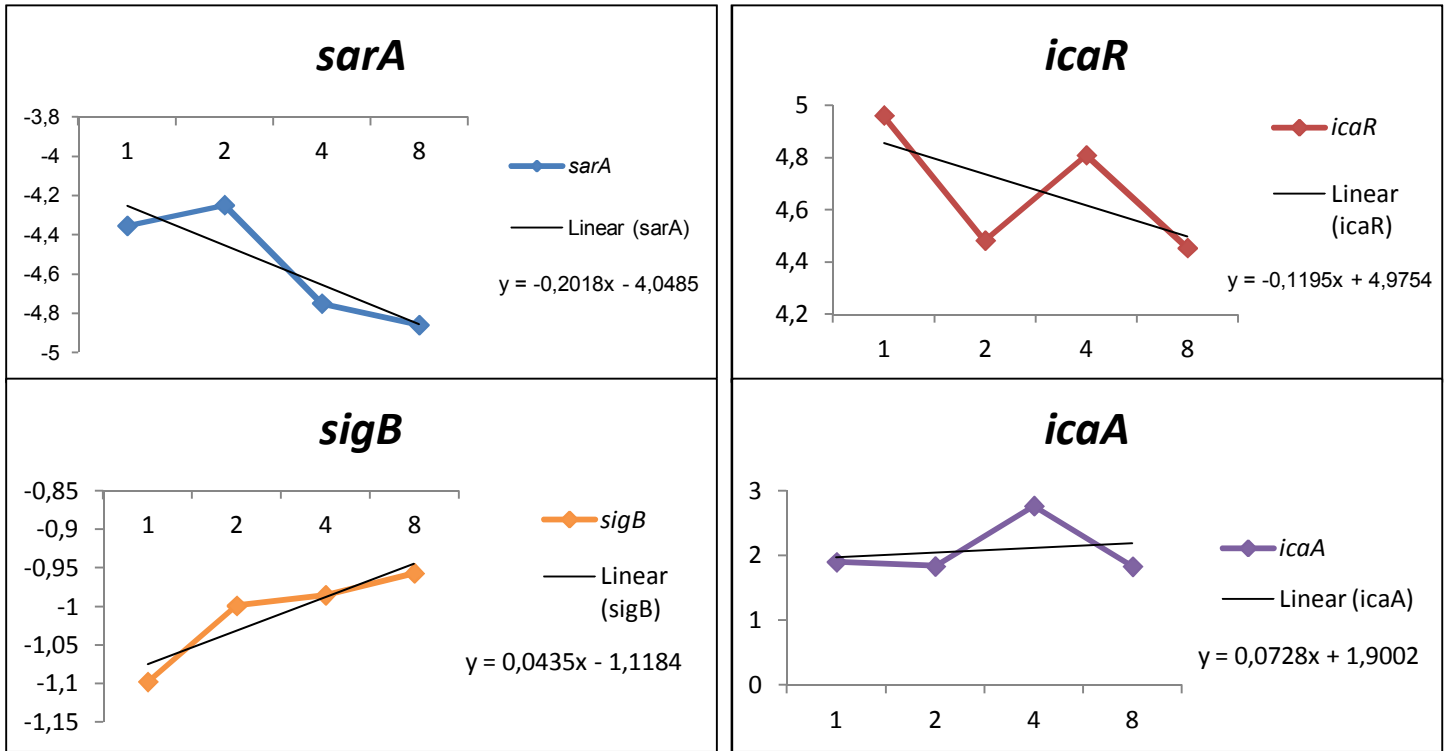


Gráfico 10: Testes de compatibilidade dos genes alvo. O eixo Y representa a expressão relativa do gene. O eixo X representa o número de diluições. Para o ensaio ser considerado compatível, a equação da reta ($y = ax + b$) tem que ter "a" entre -0,1 e 0,1.

A proteína reguladora de genes de virulência, SarA, atua diretamente no promotor do gene *icaA*. Nossos resultados mostraram que o gene *sarA* teve um aumento de cerca de 20% de expressão na amostra SA40, apenas na presença de NaCl. Não houve diferença significativa da expressão deste gene na presença de Rifampicina. Na amostra SA15, houve uma repressão de 80% de *sarA* em NaCl e uma repressão de cerca de 60% em Rifampicina.

SA40 mostrou uma repressão de 72% do gene *sigB* na presença de NaCl. Essa mesma amostra, na presença de Rifampicina, aumentou a expressão de *sigB* em 62%. Na amostra SA15, houve uma indução de cerca de 40% da expressão de *sigB* na presença de NaCl e Rifampicina.

Nossos resultados sugerem que os agentes estressantes testados regulam diferentemente os genes avaliados na amostra SA40, e que parece existir uma diferença na regulação destes genes entre os diferentes tipos de biofilme.

Para confirmar a importância dos resultados obtidos, nós comparamos a expressão desses genes entre a amostra SA40 e uma amostra naturalmente formadora de biofilme (43300) na condição controle em 12 horas de crescimento, onde SA40 não forma biofilme.

A expressão de *icaA* e *sarA* é maior na amostra produtora (43300) e de *icaR* e *sigB* é menor, quando comparados com a amostra SA40 em 12 horas de incubação com TSB. Apenas a diferença de expressão de *icaR* é significativa. Os dados encontrados são semelhantes aos obtidos na amostra SA40 crescida na presença de NaCl (gráfico 12).

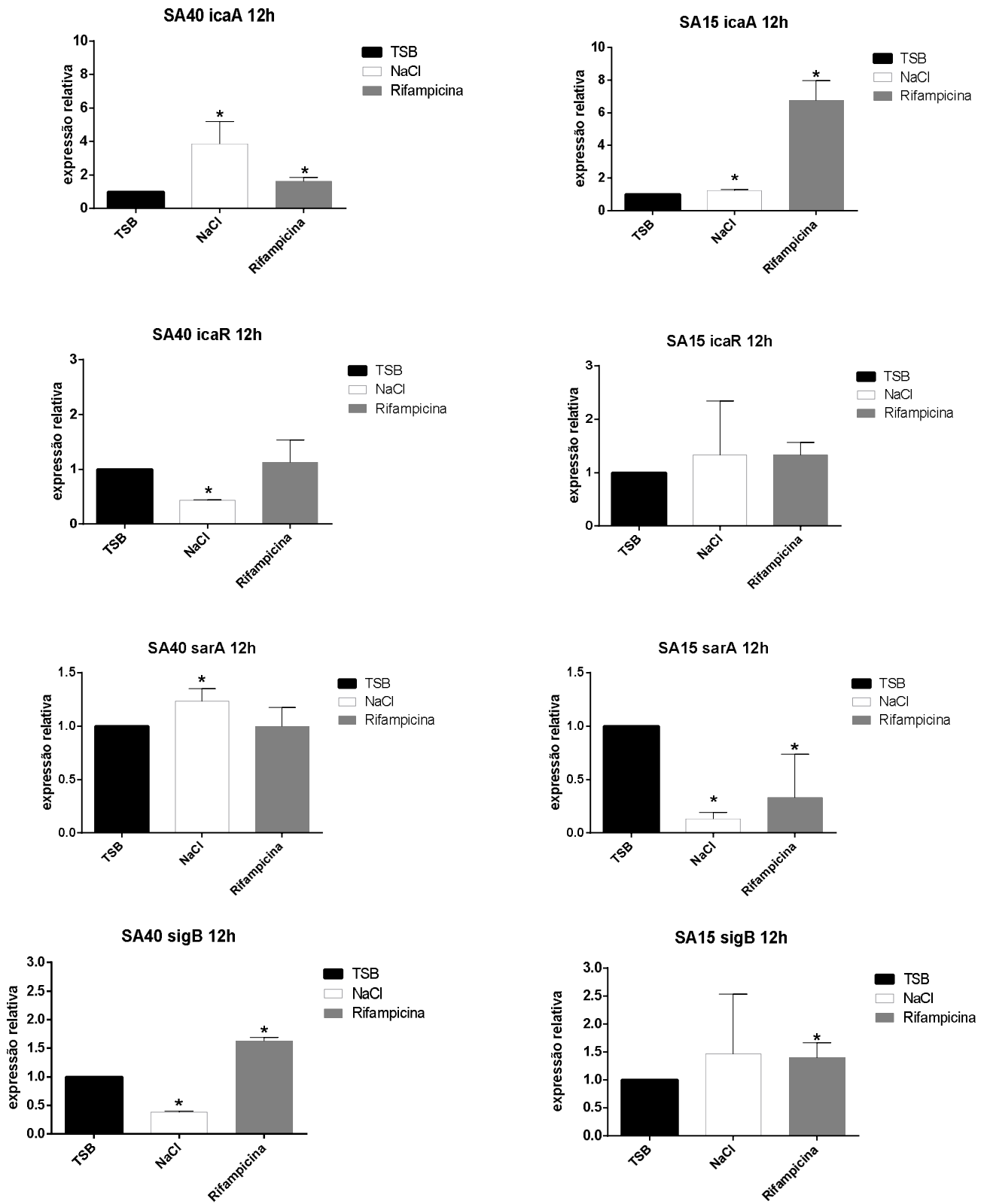


Gráfico 11: Análise da expressão gênica das amostras SA40 e SA15 na presença de NaCl 0,25% e Rifampicina 0,25 ng/mL em cultura de 12 horas. Os asteriscos indicam que o nível de expressão gênica é significativo.

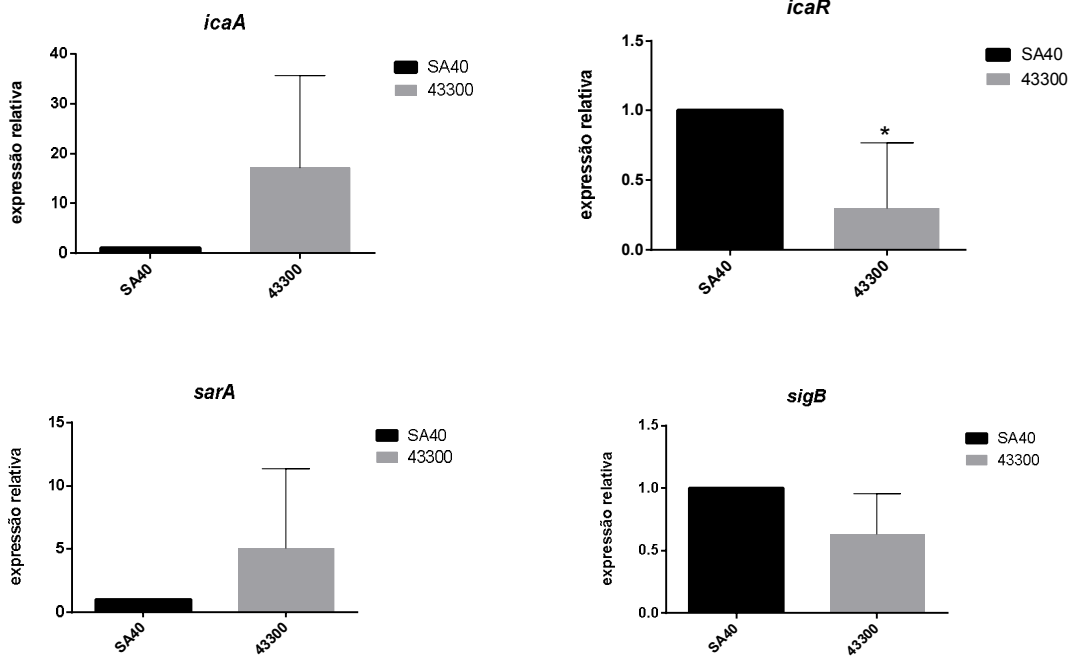


Gráfico 12: Análise da expressão gênica das amostras SA40 e ATCC43300 na condição Controle (TSB) em cultura de 12 horas. Os asteriscos indicam que o nível de expressão gênica é significativo.

4.6 Análise por PCR da presença dos genes *icaA* e *icaD*

Testes de PCR convencional para os genes *icaA* e *icaD* foram feitos posteriormente para confirmar a presença do operon *ica*. A figura 3 mostra os resultados obtidos. O tamanho esperado para o produto da PCR usando os oligos para a amplificação do gene *icaA* é 113 pb e para o gene *icaD* é 230 pb. As amostras SA15 e SA40 apresentaram bandas de 113 e 230 pb respectivamente. Estes resultados sugerem que a presença do operon *ica* não é o suficiente para que *S. aureus* produza biofilme. Além disso, cepas que produzem biofilme proteico também podem conter o operon *ica*.

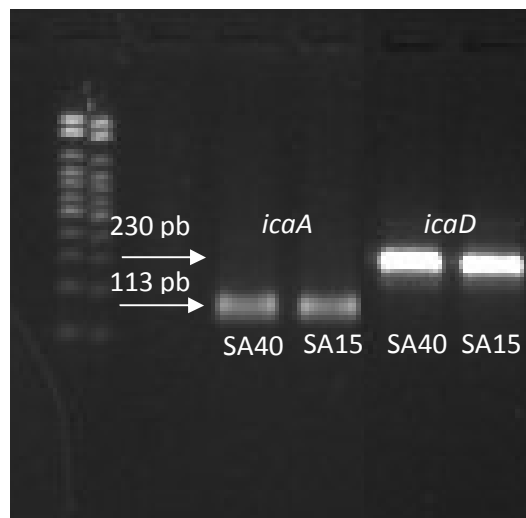


Figura 3: Corrida em gel de eletroforese com os amplificados do DNA das amostras SA15 e SA40 utilizando iniciadores para *icaA* e *icaD*.

5. DISCUSSÃO

Já é bem descrito que amostras de estafilococos são capazes de produzir biofilme. Em condições de estresse, como na presença de NaCl e Etanol, amostras de *Staphylococcus aureus* podem ser induzidas a formar biofilme (O'Neill *et al.*, 2007). Entretanto, apenas um pequeno grupo de amostras mostrou ser naturalmente formador de biofilme. A maior parte das amostras testadas foi capaz de formar biofilme na presença de agentes estressantes.

A capacidade de formar biofilme na presença de meio com diferentes concentrações de NaCl (0,25% a 4%) corroboram com os resultados encontrados por Lim e colaboradores (2004). Eles observaram a indução da formação de biofilme em diferentes concentrações de NaCl (0 a 5,6%) e encontraram uma maior taxa de indução de biofilme entre 1,6% e 4,8% de NaCl. Nossa maior taxa de formação de biofilme na presença de NaCl foi na concentração de 4%, se enquadrando no intervalo de concentrações descrito acima. O'Neill e colaboradores (2007) também observou indução de biofilme em 44% de amostras *S. aureus* MSSA na presença de NaCl a 4%. O que ratifica a veracidade da capacidade de o NaCl em altas concentrações, induzir a formação de biofilme em amostras estafilocócicas.

Em estudo realizado por Conlon e colaboradores (2002), amostras de *S. epidermidis* foram induzidas a formar biofilme polissacarídico em meio suplementado com 4% de Etanol. Lim e colaboradores (2004) observaram a formação de biofilme induzido por concentrações de Etanol maiores que 4% em amostras *S. aureus*. Nossos dados se assemelham aos dados descritos acima, apontando para uma indução de Etanol, em concentrações de 2% e 4% na formação de biofilme polissacarídico por amostras *S. aureus*.

Não foi possível confirmar a composição do biofilme formado por algumas amostras (SA13 e SA53) na presença de Etanol a 4%. Entretanto, os resultados obtidos com Etanol a 2% estão em concordância com as afirmativas descritas acima.

Um estudo recente feito por Ozturk e colaboradores (2014), apresentou pela primeira vez o efeito da Rifampicina na formação de biofilme. Utilizando doses com concentrações na faixa MIC, $\frac{1}{2}$ MIC e $\frac{1}{4}$ MIC (concentrações não mostradas), o grupo de pesquisadores identificaram duas amostras induzidas a formar biofilme. Este foi o primeiro relato da capacidade de *S. aureus* de formar biofilme na presença de Rifampicina.

Todas as nossas amostras foram capazes de formar biofilme na presença de Rifampicina com concentrações de 0,25 a 4,0 ng/mL. Em sua maioria, estes biofilmes eram de composição polissacarídica, o que nunca havia sido mostrado na literatura. Nossos resultados nos leva a acreditar que de alguma forma, a Rifampicina estaria agindo no operon *ica*. Este é o primeiro relato de que a Rifampicina induz *S. aureus* a formar biofilme polissacarídico.

Além de aumentar a capacidade de formação de biofilme, a Rifampicina, em concentrações muito baixas, como as utilizadas em nossos estudos, pode induzir bactérias não produtoras a formar biofilme. Isso nos faz refletir sobre o uso indevido de Rifampicina como alternativa terapêutica para o tratamento.

Nossos resultados também apontam para a capacidade de *S. aureus* formar biofilme naturalmente e na presença de agentes estressantes (Rifampicina, NaCl e Etanol) em culturas com tempos de 6, 12 e 16 horas de crescimento. Até o momento, este é o primeiro relato de detecção de biofilme em curtos espaços de tempo.

O fato de *S. aureus* ser capaz de produzir biofilme precocemente pode ser vantajoso. Se aplicado às principais metodologias utilizadas no laboratório, um diagnóstico com tempos menores de cultura diminuiria consideravelmente o tempo total de obtenção do resultado.

Rachid e colaboradores (2000), utilizando um gene repórter (*lacZ*) sob o controle do promotor de *ica*, em amostras *S. epidermidis*, mostraram que a alta concentração de NaCl (4 e 5%) ativa a expressão de *ica*. O’Gara (2007) aponta para a capacidade de o NaCl ativar SigB, que por sua vez estimula SarA, um regulador positivo de *icaADBC* tanto em *S. epidermidis* quanto em *S. aureus*.

Análises moleculares de *S. aureus* feitas por Lim e colaboradores (2004) mostram que o NaCl pode também induzir a formação de biofilme proteico, através da ativação de Rbf. Esta proteína estaria responsável por regular a fase de acumulação celular em biofilmes PIA independente.

Rachid e colaboradores, no mesmo trabalho publicado em 2000, mostram que concentrações sub MIC (valores não mostrados) de Tetraciclina, Ofloxacina e Quinopristina-dalfopristina são capazes de aumentar a expressão do promotor de *ica* em até 11 vezes.

Nossa amostra SA40, induzida a formar um biofilme polissacarídico, tem o gene *icaA* estimulado na presença de NaCl. O que corrobora com o proposto por Rachid e colaboradores (2000). O regulador positivo para IcaA, o gene *sarA*, também aparece sendo estimulado em NaCl. Este efeito se aproxima do modelo de formação de biofilme PIA dependente na presença de NaCl, proposto por O’Gara (2007) mostrado abaixo:

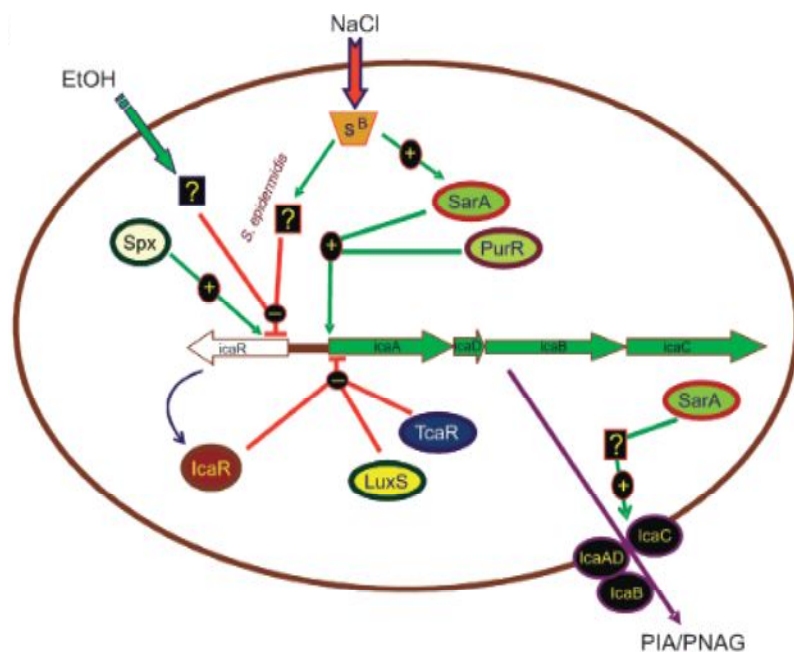


Figura 4: Modelo de produção de biofilme PIA proposto por O'gara, J. P. (2007).

Além disso, SA40, na presença de NaCl, apresenta o *icaR* sendo reprimido. *icaR* é um regulador transcricional de *icaADBC*, que reprime a transcrição de PIA. A diminuição da expressão de *icaR* na presença de NaCl e o aumento da expressão de *icaA* e *sarA*, na presença deste mesmo sal, pode indicar que *sarA* pode estar, ao mesmo tempo, regulando positivamente a expressão de *icaA* e negativamente a expressão de *icaR*.

Não há dados na literatura que indiquem que SarA reprime diretamente *icaR*. Entretanto, como já citado, *icaR* pode ser regulado por agentes estressantes, sendo reprimido por etanol. Além disso, SarA é capaz de reprimir a produção de proteases extracelulares (O'gara, 2007).

Nossos resultados apontam para uma regulação direta do NaCl sobre SarA, ao contrário do que a literatura apresenta. Na presença deste sal, *sigB* encontra-se reprimido em nossos testes. Mas o modelo de indução proposto por O'Gara (2007) coloca o NaCl como sendo um indutor de SigB, e este sim, estimula a regulação por SarA.

A Rifampicina foi capaz de aumentar a expressão de *icaA*, tanto na amostra polissacarídica (SA40) quanto na amostra protéica (SA15), podendo estar agindo diretamente na transcrição deste gene. Para a amostra SA40, esta afirmativa se baseia no fato de a Rifampicina não alterar a expressão de *sarA* e *icaR*. Entretanto, não há dados na literatura que possa dar pistas de que isso realmente ocorra. Há indícios de que este antimicrobiano também possa estar agindo de forma indireta na formação do biofilme polissacarídico, através do aumento da expressão de *sigB* em SA40.

Na presença de Rifampicina, não houve alteração da expressão de *icaR* em relação ao controle com TSB em nenhuma das amostras (SA40 e SA15). Esse dado indica que, na presença de Rifampicina, *icaR* não está regulando a produção de biofilme. Não há dados na literatura que indiquem que *icaR* pode ser regulado direta ou indiretamente pela Rifampicina.

Segundo Valle e colaboradores (2007), SigB atua como regulador indireto da formação de biofilme PIA na presença de NaCl. Para estes

pesquisadores, *sigB* impede a transposição de um elemento de inserção (*IS256*) no operon *icaADBC*.

Em nossos estudos, a Rifampicina aumenta a expressão de *sigB* na amostra SA40. Entretanto, não encontramos dados na literatura que associam antimicrobianos como estimuladores de *sigB* ou de qualquer outro gene regulador de PIA. Esse é o primeiro relato que mostra a Rifampicina estimulando a expressão de *icaA* e *sigB* em uma amostra formadora de biofilme polissacarídico.

Interessantemente, apesar de ser uma amostra produtora de biofilme proteico, SA15 possui, pelo menos em parte, genes do operon *icaADBC* (fig. 3). Dados da literatura mostram que a cepa *S. epidermidis* RP62A possui em sua matriz de biofilme, além do componente PIA, ácidos teicóicos extracelular e proteínas (Frank & Patel, 2007). Tais dados indicam a possibilidade de que outros componentes possam fazer parte da matriz do biofilme dessa amostra.

O'Neill e colaboradores (2007) mostraram que algumas cepas de *S. aureus* MRSA, mesmo expressando os genes do operon *ica*, formavam biofilme em meio com NaCl, mas não do tipo PIA. Isto explicaria o fenômeno observado nos experimentos com a amostra SA15.

Na presença de Rifampicina, a amostra SA15 aumentou a expressão de *icaA*, enquanto que *icaR* não apresentou alteração do nível de expressão deste gene. Não há dados na literatura que indiquem que a Rifampicina possa induzir a formação de biofilme proteico.

Entretanto, podemos levantar a hipótese de que a Rifampicina, neste caso, estaria regulando positivamente *icaA*. Mas como o trabalho de O'Neill e colaboradores (2007) sugere, esse aumento de expressão de *icaA*, por um motivo desconhecido, não resulta em formação de biofilme do tipo PIA.

Outra hipótese para esse fenômeno é a de que a PIA estaria presente na composição do biofilme, porém em quantidades menores que a encontrada no biofilme polissacarídico. Esta teoria se firma no fato de a amostra SA15 apresentar até 40% de degradação no teste com NaIO₄ em 12 e 16 horas de

cultura, apesar de não alterar a textura da colônia no teste com Ágar Vermelho Congo. Não encontramos dados na literatura que elucidassem estas hipóteses.

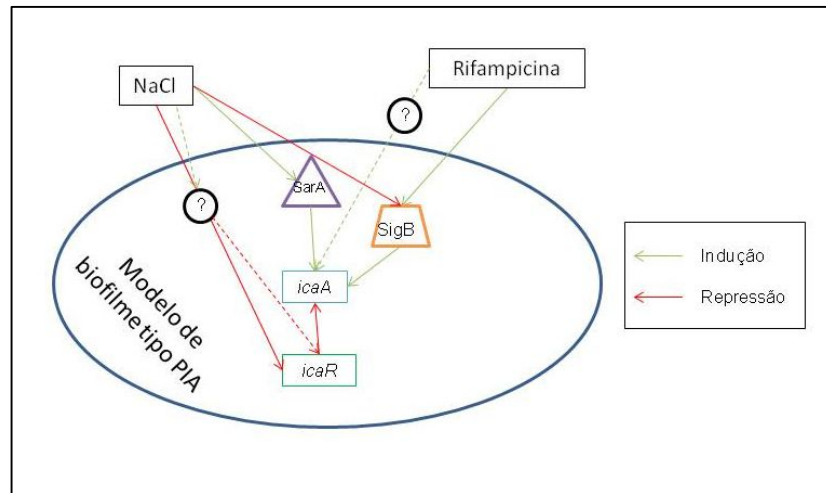
Não observamos alteração significativa no nível de expressão de *sigB* na amostra formadora de biofilme proteico (SA15) em NaCl. Entretanto, Houston e colaboradores (2011), utilizando *S. aureus* produtores de biofilme proteico, mostraram, molecularmente, que a expressão de *sigB* estimula a produção de biofilme. Eles observaram que mutantes, deficientes de SigB, têm uma maior expressão do gene da autolisina (*alt*) que as bactérias normais (que expressavam SigB). Nesse caso, SigB funcionaria como um regulador indireto da formação de biofilme proteico. Pois a diminuição na taxa de produção de AtIs resulta em um aumento da aderência primária da bactéria.

Assim como na amostra SA40, na presença de Rifampicina, SA15 tem o nível de expressão de *sigB* aumentado. Este estímulo de *sigB* pela Rifampicina reforçaria a hipótese de que este antimicrobiano estimula a produção de PIA via SigB. Isso, somado ao fato de que *icaA* também aparece aumentado na amostra SA15 na presença de Rifampicina (mesmo que isso não resulte na formação de biofilme PIA).

Na amostra SA15, *sarA* é reprimido na presença de NaCl e de Rifampicina. Essa diminuição poderia explicar o aumento da produção de biofilme proteico. Segundo Houston e colaboradores (2011), SarA regula positivamente a transcrição de genes de proteases. Essa característica levaria a um impedimento na formação de biofilmes proteicos caso *sarA* fosse super expresso na amostra SA15. Não há dados na literatura que relacionem a Rifampicina como agente estimulador de biofilme proteico. Esse é o primeiro relato de que a Rifampicina pode induzir a formação deste tipo de biofilme.

Para melhor entender os efeitos da Rifampicina e do NaCl sobre os reguladores globais *sarA* e *sigB* e os genes *icaA* e *icaR*, propomos os modelos ilustrados abaixo:

a)



b)

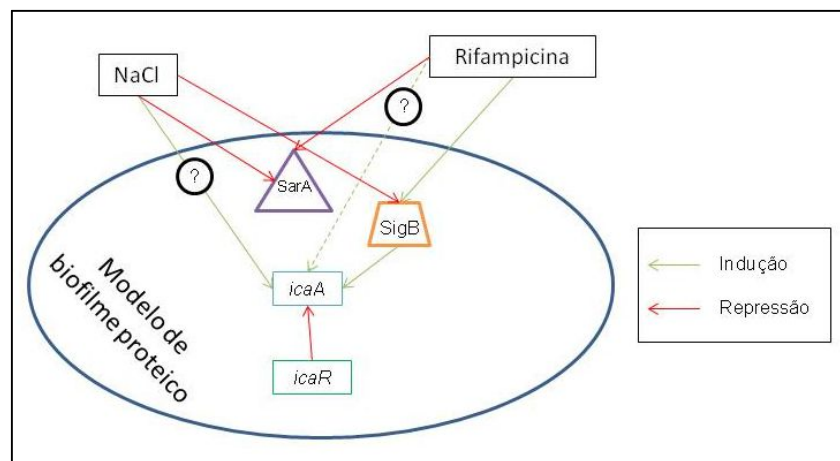


Figura 5: Modelo de regulação de biofilme tipo PIA (a) e biofilme proteico (b), utilizando a Rifampicina e o NaCl como agentes estressantes.

6. CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados, podemos concluir que:

Concentrações sub-inibitórias de Etanol, NaCl e Rifampicina, cultivadas induzem a formação de biofilme em *Staphylococcus aureus* em diferentes tempos.

NaCl e Rifampicina podem induzir a formação de biofilme tanto polissacarídica quanto proteica.

Os genes *icaR*, *sarA* e *sigB* respondem de maneira distinta ao NaCl e à Rifampicina.

A Rifampicina aparenta estimular a expressão de *icaA* através de um mecanismo diferente dos mecanismos já descritos na literatura consultada.

Os biofilmes, proteico e PIA, parecem ter mecanismos moleculares distintos em sua formação na presença de NaCl e de Rifampicina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalfs, A., S.; Otkarina, D., A., M.; Diercks, G., F., H.; Jonkman, M., F.; Pas, H., H. (2010) Staphylococcal scalded skin syndrome: loss of desmoglein 1 in patient skin. *EJD.*, (4) 20.
- Amaral, M. M.; Coelho, L. R.; Flores, R. P.; Souza, R. R.; Silva-Carvalho, M. C.; Teixeira, L. A.; Ferreira-Carvalho, B. T.; Figueiredo, A. M. S. (2005) 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.*, (5) 192: 801-810.
- Aparna, M. S.; Yadav, S. (2008) Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.*, (6) 12: 526-530.
- Araujo, G. L.; Coelho, L. R.; De Carvalho, C. B.; Maciel, R. M.; Coronado, A. Z.; Rozenbaum, R.; Ferreira-Carvalho, B. T.; Figueiredo, A. M. S.; Teixeira, L. A. (2006) Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J Antimicrob Chemother.*, (5) 57: 855-864.
- Arciola, C., R.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. (2001) Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. *JCM.*, (6) 39: 2151–2156.
- Beenken, K.E.; Dunman, P. M.; Mcaleese, F.; Macapagal, D.; Murphy, E.; Projan, S. J.; Murphy, E.; Projan, S. J.; Blevins, J. S.; Smeltzer, M. S. (2004) Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology.*, (14) 186: 4665-4684.
- Blanc, D., S.; Wengler, A.; Bille, J. (2003) Evaluation of a novel medium for screening specimens from hospitalized patients to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JCM.*, 41: 3499-3502.

Boucher, H., W.; Corey, G., R. (2008) Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. CID., 46: S344–S349.

Bradley, S., F.; Ramsey, M., A.; Morton, T., M.; Kauffam, C., A. (1995) Mupirocin resistance: clinical and molecular epidemiology. Infect. Control. Hosp. Epidemiol, 16: 354-358.

Brito, D., D; Dolinger, E., J., O.; Machado, F., L.; Abdallah, V., O., S.; Filho, P., P. G. (2007) Formação de biofilme em amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de sepse relacionada a cateter vascular central em neonatos críticos. Arq Ciênc Saúde. (2) 14: 76-80.

Bubeck, J., W.; Bae, T.; Otto, M.; Deleo, F., R.; Schneewind, O. (2007) Poring over pores: α -hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. NPG., (12) 13.

Cameron D., R.; Howden, B., P.; Peleg, A., Y. (2011) The Interface Between Antibiotic Resistance and Virulence in *Staphylococcus aureus* and Its Impact Upon Clinical Outcomes. CID., (6) 53: 576–582.

Casey, A. L.; Lambert, P. A.; Elliott, T. S. J. (2007) Staphylococci. Int J Antimicrob Agents., (3) 29: S23-S32.

Cerca, N.; Pier, G. B.; Vilanova, M.; Oliveira, R.; Azeredo, J. (2005) Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Res. Microbiol., (4) 156: 506-514.

Cerca, N.; Brooks, J. A.; Jefferson, K. K. (2008) Regulation of the Intercellular Adhesin Locus Regulator (*icaR*) by SarA, δ^B , and IcaR in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology., (19) 190: 6530-6533.

Chambers H., F.; Deleo, F., R. (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. NATURE Reviews., 7: 629-641.

Chambers, H., F. (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerging Infectious Diseases, (2) 7: 178-182.

Christensen, G. D.; Simpson, W. A.; Bisno, A. L.; Beachey, E. H. (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.*, (1) 37: 318-326.

Christensen, G. D.; Simpson, W. A.; Younger, J. J.; Baddour, L. M.; Barrett, F. F.; Melton, D. M.; Beachey, E. H. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.*, (6) 22: 996-1006.

Christner, M., Franke, G. C., Schommer, N.N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., Kroll, G., Schulze, C., Buck, F., Mack, D., Aepfelbacher, M., Rohde, H. (2010) The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular Microbiology.*, 75: 187–207.

Conlon, K. M.; Humphreys, H.; O'gara, J. P. (2004) Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 Represent Novel Mechanisms of Biofilm Phenotypic Variation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, (18) 186: 6208-6219.

Cramton, S. E.; Gerke, C.; Schnell, N. F.; Nichols, W. W.; Götz, F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.*, (10) 67: 5427-5433.

Cucarella, C.; Solano, C.; Valle, J.; Amorena, B.; Lasa, I.; Penadés, J. R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.*, (9) 183: 2888-2896.

Cue, D.; Lei, M. G.; Lee, C. Y. (2012) Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.*, (2) 38.

David, M., Z.; Daum R., S. (2010) Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* (3) 23: 616-687.

Deurenberg, R. H.; Stobberingh, E. E. (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.*, (6) 8: 747-763.

Diekema, D., J.; Pfaller, M., A.; Schmitz, F., J.; Smayevsky, J.; Bell, J.; Jones, R., N.; Beach, M. (2001) Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *CID.*, (2) 32: S114–S132.

Dietrich, D., W.; Auld, D., B.; Mermel L., A. (2004) Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Southern New England Children. *Pediatrics.*, 113: 346-353.

Dinges, M., M.; Orwin, P., M.; Schlievert, P., M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbial. Rev.*, 13: 16-34.

Dulon, M.; Haamann, F.; Peters, C.; Schablon, A.; Nienhaus, A. (2011) MRSA prevalence in european healthcare settings: a review. *BMC Infectious Diseases.*, (11) 138: 1-13.

Eleaume, H.; Jabbouri, S. (2004) Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. *Journal of Microbiological Methods.*, 59: 363-370.

Fernandes, R., C., S., C.; Silva, D., P., C.; Gomes, A., M.; Carvalho, P., G.; Fernandes, C.; Nakata, T., Y.; Araújo, L., C.; Medina-Acosta, E. (2007) Transmissão vertical do HIV e sífilis congênita em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro: desafios e estratégias para superar os obstáculos na prevenção, vigilância e tratamento. *Revista Científica da FMC.*, (2) 2: 2-9.

Fey, P. D.; Ulphani, J. S.; Götz, F.; Heilmann, C.; Mack, D.; Rupp, M. E. (1999) Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.*, (6) 179: 1561-1564.

Fey, P.D.; Olson, M. E. (2010) Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.*, 5: 917–933.

Fluckiger, U.; Ulrich, M.; Steinhuber, A.; Doring, G.; Mack, D.; Landmann, R.; Goerke, C.; Wolz, C. (2005) Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect. Immun.*, 73: 1811-1819.

Frank, A., L.; Marcinak, J., F.; Mangat, P., D.; Tjhio, J., T.; Kelkar, S.; Schreckenberger, P., C. (2002) Clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Pediatric Infect. Dis. J.*, 21: 530–534.

Frank, K., L.; Patel, R. (2007) Poly-*N*-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC*-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infection and Immunity.*, (10) 75: 4728–4742.

Freeman, D.J.; Falkiner, F.R; Keane C.T. (1989) New Method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, 42: 872-874.

French, G., L.; Phillips, I. (1996) Nosocomial infections and antimicrobial resistance. In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Williams & Wilkins Company., Baltimore, USA., 980-1000.

Gordon, R., J.; Lowy, F., D. (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.*, (5) 46: S350-S359.

Guo, B.; Zhao, X.; Shi, Y.; Zhu, D.; Zhang, Y. (2007) Pathogenic implication of a fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* in a rat model of intravascular-catheter-associated infection. *Infect Immun.*, (6) 75: 2991-2995.

Hanssen A. M.; Kjeldsen, G.; Sollid, J., U., E. (2004) Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative

Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrob. Agents Chemother.*, (1) 48: 285–296.

Harvey, J.; Keenan, K. P.; Gilmour, A. (2007) Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.*, (4) 24: 380-392.

Heilmann, C.; Thumm, G.; Chhatwal, G. S.; Hartleib, J.; Uekötter, A.; Peters, G. (2003) Identification and characterization of a novel autolysin (*aae*) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.*, (10) 149: 2769-2778.

Herold, B.C.; Immergluck, L.C.; Maranam, M.C.; Laudergale, D.S.; Gaskin, R.E.; Boyle-Vayra, S.; Daum, R.S. (1998) Community-acquirede methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA.*, 279: 593-598.

Houston, P.; Rowe, S. E.; Pozzi, C.; Waters, E. M.; O'gara, J.P. (2011) Essential Role for the Major Autolysin in the Fibronectin-Binding Protein-Mediated *Staphylococcus aureus* Biofilm Phenotype. *Infection and Immunity*, 1153–1165.

Hussain, M.; Herrmann, M.; Von Eiff, C.; Perdreau-Remington, F.; Peters, G. (1997) A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun.*, (2) 65: 519-524.

Hussain, M.; Heilmann, C.; Peters, G.; Herrmann, M. (2001) Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog.*, (6) 31: 261-270.

Izano, E. A.; Amarante, M. A.; Kher, W. B.; Kaplan, J. B. (2008) Differential roles of poly-n-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular dna in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.*, (2) 74: 470-476.

Jefferson, K., K.; Goldmann, D.; Pier, A., G., B. (2005) Use of Confocal Microscopy To Analyze the Rate of Vancomycin Penetration through

Staphylococcus aureus Biofilms. Antimicrob. Agents Chemother., (6) 49: 2467-2473.

Jevons, P., M. (1961) "Celbenin" – resistant *Staphylococci*. Br. Med. J., 1: 124-125.

Khan, F.; Shukla, I.; Rizvi., M.; Mansoor., T.; Sharma., S. C. (2011) Deteccion of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections? Trends in Medical Research.

Kiedrowski, M., R.; Kavanaugh, J., S.; Malone, C., L.; Mootz, J., M.; Voyich, J., M.; Smeltzer, M., S.; Bayles, K., W.; Horswill, A., R. (2011) Nuclease Modulates Biofilm Formation in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Plos One., (6) 11.

Kim, J.; Kim, C.; Hacker, J.; Ziebuhr, W.; Lee, B. K.; Cho, S. (2008) Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. J Microbiol Biotechnol., (1) 18: 28-34.

Knobloch, J. K.; Horstkotte, M. A.; Rohde, H.; Mack, D. (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Med Microbiol Immunol., (2) 191: 101-106.

Kocianova, S.; Vuong, C.; Yao, Y.; Voyich, J., M.; Fischer, E., R.; Frank R. Deleo, F., R.; Otto, M. (2005) Key role of poly- γ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. J. Clin. Invest., (3) 115: 688–694.

Köck, R.; Mellmann, A.; Frieder Schaumburg, F.; Friedrich, A., W.; Kipp, F.; Karsten, B. (2011) The Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. Dtsch Arztebl Int., (45) 108: 761–767.

Koneman, E.; Winn, W., Jr.; Allen, S.; Janda, W.; Procop, G.; Schreckenberger, P.; Woods, G. (2006) Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Ed. Lippincott Williams & Wilkins., ed. 6, cap. 12, parte 1, p. 623-625.

Krepesky, N.; Rocha Ferreira, R. B.; Ferreira Nunes, A. P.; Casado Lins, U. G.; Costa E Silva Filho, F.; De Mattos-Guaraldi, A. L.; Netto-Santos, K. R. (2003) Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* brazilian isolates. *Curr Microbiol.*, (4) 46: 280-286.

Lamaita, H., C.; Cerqueira, M., M., O., P.; Carmo, L., S.; Santos, D., A.; Penna, C., F., A., M.; Souza, M., R. (2005) Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,(5) 57: 702-709.

Lamaro-Cardoso J.; Castanheira, M.; Oliveira, R., M.; Silva, S., A.; Pignatari, A., C., C.; Mendes, R., E.; Pimenta, F., C.; Andrade, A., L., S., S. (2007) Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease.*, (4) 57: 467-470.

Lauderdale, K. J.; Boles, B. R.; Cheung, A. L.; Horswill, A. R.(2009) Interconnections between Sigma B, *agr*, and Proteolytic Activity in *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *Infection and Immunity.*, (4) 77: 1623-1635.

Lim, Y.; Jana, M.; Loung, T. T.; Lee, C. Y. (2004) Control of Glucose and NaCl induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology.*, (3) 186: 722-729.

Lina, G.; Piémont, Y.; Godail-Gamot, F.; Bes, M.; Peter, M. O.; Gauduchon, V.; Vandenesch, F.; Etienne, J. (1999) Involvement of Panton Valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.*, 29: 1128-1132.

Los, R.; Sawicki, R.; Juda, M.; Stankevic, M.; Rybojad, P.; Sawicki, M.; Malm, A.; Ginalska, G. (2010) A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.*, 310: 97–103.

Lowy, F., D. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.*, (9) 111: 1265–1273.

Marcinak, J., F.; Frank, A., L. (2003) Treatment of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 16: 265–269.

Martineau, F.; Picard, F. J.; Lansac, N.; Ménard, C.; Roy, P. H.; Ouellette, M.; Bergeron, M. G. (2000) Correlation between the resistance genotype determined by multiplex pcr assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, (2) 44: 231-238.

Mateo, M.; Maestre, J. R.; Aguilar, L.; Giménez, M. J.; Granizo, J. J.; Prieto, J. (2008) Strong slime production is a marker of clinical significance in *Staphylococcus epidermidis* isolated from intravascular catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, (4) 27: 311-314.

Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D., J.; Fatma, T.; Rattan, A. (2006) Detection of Biofilm Formation Among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods. *Indian Journal of Medical Microbiology.*, (1) 24: 25-29.

Mccrea, K. W.; Hartford, O.; Davis, S.; Eidhin, D. N.; Lina, G.; Speziale, P.; Foster, T. J.; Höök, M. (2000) The serine-aspartate repeat (sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.*, (7) 146: 1535-1546.

Michelim, L.; Lahude, M.; Araújo, P.; Giovanaz, D.; Mulher, G.; Delamare, A.; Costa, S.; Escheverrigaray, S. (2005) Patogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 36: 17-23.

Milisavljevic, V.; Tran, L. P.; Batmalle, C., Bootsma, H. J. (2008) Benzyl alcohol and ethanol can enhance the pathogenic potential of clinical *Staphylococcus epidermidis* strains. *AJIC.*, (8) 36.

Miller, L., G.; Diep, B. (2008) Colonization, Fomites, and Virulence: Rethinking the Pathogenesis of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases.*, 46: 752–60.

Miller, L., G.; Kaplan, S., L. (2009) *Staphylococcus aureus*: A Community Pathogen. *Infect Dis Clin N Am.*, 23: 35–52.

Miragaia, M.; Couto, I.; De Lencastre H. (2005) Genetic Diversity among Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microbial Drug Resistance.*, (2) 11: 83-94.

Mirani, Z., A.; Khan, M., N.; Aziz, M.; Naz, A., S.; Khan, S., I. (2012) Effect of Stress on Biofilm Formation by *icaA* Positive and Negative Strains of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan.*, (1) 22: 10-14.

Moreno, F.; Crisp, C.; Jorgensen, J., H.; Patterson, J., E. (1995) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin. Infect. Dis.*, 21: 1308-1312.

Moussallem, B., C.; Kury, C., M., H.; Acosta, E., M. (2007) Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus spp.* isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. *Revista Científica da FMC.*, (2) 2: 2-9.

Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A.; Tenover, R.H. (2003) *Staphylococcus; Micrococcus*; and other catalase-positive cocci that grow aerobically. in: *Manual of Clinical Microbiology*; 8th ed., p. 384-404.; ASM PRESS; Washington; DC.; USA.

Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Landry, M. L. & Pfaller M. A. (2007) *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., ASM Press, Washington, DC, USA.

Nuryastuti, T.; Krom, B. P.; Aman, A. T.; Busscher, H. J.; Van Der Mei, H. C. (2011) *Ica*-expression and gentamicin susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on orthopedic implant biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research.*, (2) 96A: 365-371.

O'gara, J. P. (2007) Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett., (2) 270: 179-188.

Oliveira, A.C.; Paula, A. O. (2012) Decolonization of *Staphylococcus aureus* carriers: indications, advantages and limitations. Texto Contexto Enferm., (2) 21: 448-457;

O'Neill, E.; Pozzi, C.; Houston, P.; Smyth, D.; Humphreys, H.; Robinson, D. A.; O'gara, J. P. (2007) Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections. Journal of Clinical Microbiology., (5) 45: 1379-1388.

Otto, M. (2009) *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. NATURE Reviews., 7: 555-567.

Otto, M. (2012) Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Semin Immunopathol., 34: 201–214.

Ozturk, I.; Yurtman, A. N.; Erac, B.; Gul-Yurtserver, S.; Ermertcan, S; Hosgor-Limoncu, M.(2014) *In vitro* effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. Bratisl Lek Listy., (8) 115: 483-486.

Palmer, J.; Flint, S.; Brooks, J. (2007) Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. J Ind Microbiol Biotechnol., (9) 34: 577-588.

Pozzi, C.; Waters, E., M.; Rudkin, J., K.; Schaeffer, C., R.; Lohan, A., J.; Tong, P.; Loftus, B., J.; Pier, G., B.; Fey, P., D.; Massey, R., C.; O'gara, J., P. (2012) Methicillin Resistance Alters the Biofilm Phenotype and Attenuates Virulence in *Staphylococcus aureus* Device-Associated Infections. PLOS Pathog., (4) 8.

Presterl, E.; Suchomel, M.; Eder, M.; Reichmann, S.; Lassnigg, A.; Graninger, W.; Rotter, M. (2007) Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother., (2) 60: 417-420.

Qin, Z.; Ou, Y.; Yang, L.; Zhu, Y.; Tolker-Nielsen, T.; Molin, S.; Qu, D. (2007) Role of autolysin-mediated dna release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.*, (7) 153: 2083-2092.

Rachid, S.; Ohlsen, K.; Witte, W.; Hacker, J.; Ziebuhr, W. (2000) Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (12) 44: 3357-3363.

Reagan, D., R.; Doebbleling, B., N.; Pfaller, M., A.; Houston, A., K.; Hollis, R., J.; Wenzel, R., P. (1991) Elimination of coincident *S. aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. *Ann. Intern. Med.*, 114: 101-106.

Reiter, K. C.; Sambrano, G. E.; Villa, B.; Paim, T. G. S.; Oliveira, C. F.; D'azevedo, P. A. (2012) Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. (4) 45: 471-474.

Ribeiro, A.; Dias, C.; Silva-Carvalho, M., C.; Berquo, L.; Ferreira, F., A.; Santos, R., N., S.; Carvalho, B., T., F.; Figueiredo, A., M. (2005) First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *JCM*, 1985–1988.

Rogers, K. L.; Fey, P. D.; Rupp, M. E. (2009) Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am.*, (1) 23: 73-98.

Rohde, H.; Burandt, E. C.; Siemssen, N.; Frommelt, L.; Burdelski, C.; Wurster, S.; Scherpe, S.; Davies, A. P.; Harris, L. G.; Horstkotte, M. A.; Knobloch, J. K.; Rangunath, C.; Kaplan, J. B.; Mack, D. (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials.*, (9) 28: 1711-1720.

Rohde, H.; Frankenberger, S.; Zähringer, U.; Mack, D. (2010) Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to

Staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of biomaterial associated infections. *European Journal of Cell Biology.*, 89: 103-111.

Rosenberg, M. Gutnick, D & Rosenberg, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbon: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 9: 29-33.

Rosenberg, M. (1981) Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol.*, (2) 42: 375-377.

Rudkin, J., K.; Edwards, A., M.; Bowden, M., G.; Brown, E., L.; Pozzi, C.; Waters, E., M.; Chan, W., C.; Williams, P.; O'gara, P., J.; Massey, R., C. (2012) Methicillin Resistance Reduces the Virulence of Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Interfering With the agr Quorum Sensing System. *JID.*, 205: 798–806.

Rupp, M. E.; Archer, G. L. (1992) Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.*, (10) 60: 4322-4327.

Sadovskaya, I.; Vinogradov, E.; Flahaut, S.; Kogan, G.; Jabbouri, S. (2005) Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun.*, (5) 73: 3007-3017.

Safdar, N.; Maki, D.G. (2002) The commonality of risk for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, Gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann. Intern. Med.*

Said-Salim, B.; Mathema, B.; Braughton, K.; Davis, S.; Sinsimer, D.; Eisner, W.; Likhoshvay, Y.; Deleo, F., R.; Kreiswirth, B., N. (2005) Differential Distribution and Expression of Panton-Valentine Leucocidin among Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *JCM*, (7) 43: 3373–3379.

Sambanthamoorthy, K.; Schwartz, A.; Nagarajan, V.; Elasri, M. O. (2008) The role of msa in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *BMC Microbiol.*, 8: 221.

Santos, A., L.; Santos, D., O.; Freitas, C., C.; Ferreira, B., L., A.; Afonso, I., F.; Rodrigues, C., R.; Castro, H., C. (2007) *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol Med Lab., (6) 43: 413-423.

Shanks, R., M., Q.; Sargent, J., L.; Martinez, R., M.; Graber, M., L.; O'toole, G., A. (2006) Catheter lock solutions influence staphylococcal biofilm formation on abiotic surfaces. NDT., 21: 2247–2255.

Shinefield, H., R.; Ruff, N., L. (2009) Staphylococcal Infections: A Historical Perspective. Infect Dis Clin N Am., 23: 1–15.

Shopsin, B.; Kreiswirth, B. (2001) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis., 7: 323-326.

Silva, E., C., B., F.; Samico, T., M.; Cardoso, R., R.; Rabelo, M., A.; Bezerra Neto, A., M.; Melo, F., L.; Lopes, A., C., S.; Aca, I., S.; Maciel, M., A., V. (2011) Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. Rev Esc Enferm USP., (1) 46: 132-137.

Smith, T.; Jarvis, W. (1999) Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. Microb. Infect., 1: 795-805.

Smith, K.; Perez, A.; Ramage, G.; Lappin, D.; Gemmell, C. G.; Lang, S. (2008) Biofilm formation by scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol., (8) 57: 1018-1023.

Stepanović, S.; Vuković.; Dakic, I.; Savic, B.; Svabic-Vlahovic, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods., (2) 40: 175-179.

Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Apmis., (8) 115: 891-899.

Szczuka E, Telega K, Kaznowski A. (2014) Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiologica.*, 60: 1-5.

Thurlow L., R.; Hanke, M., L.; Fritz, T.; Angle, A.; Aldrich, A.; Williams, S., H.; Engebretsen, I., L.; Bayles, K., W.; Horswill, A., R.; Kielian, T. (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J Immunol.* (11) 186: 6585–6596.

Todd, E. C. D.; Greig, J. D.; Bartleson, C. A.; Michaels, B. S. (2008) Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. part 4. infective doses and pathogen carriage. *J Food Prot.*, 71: 2339-2373.

Valle, J.; Toledo-Arana, A.; Bersain, C.; Chigo, J. M.; Amorena, B.; Penadés, J. R.; Lasa, I. (2003) SarA and not sB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology.* 48: 1075-1087.

Valle, J.; Vergara-Irigaray, M.; Merino, N.; Penade's, J. R.; Lasa, I. (2007) δ^B Regulates IS256-Mediated *Staphylococcus aureus* Biofilm Phenotypic Variation. *Journal of Bacteriology.*, 189: 2886-2896.

Van Pelt, C.; Nouwen, J.; Lugtenburg, E.; Van Der Schee, C.; De Marie, S.; Schuijff, P.; Verbrugh, H.; Löwenberg, B.; Van Belkum, A.; Vos, M. (2003) Strict infection control measures do not prevent clonal spread of coagulase negative staphylococci colonizing central venous catheters in neutropenic hematologic patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 38: 153-158.

Vasquez, J., E.; Walker, E., S.; Franzus, B., W.; Overbay, B., K. (2000) The epidemiology of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a veterans' affairs hospital. *Inf Con Hosp Epidemiol.*, 21: 459-464.

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

Vila, J.; Soriano, A.; Mensa, J. (2008) Molecular basis of microbial adherence to prosthetic materials. role of biofilms in prosthesis-associated infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 26: 48-54.

Vos, M., C.; Ott, A.; Verbrugh, H., A. (2005) Successful search-and-destroy policy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 2034-2035.

Vuong, C.; Kocianova, S.; Voyich, J. M.; Yao, Y.; Fischer, E. R.; Deleo, F. R.; Otto, M. (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.*, 52: 54881-54886.

Walsh, T. R.; Howe, R. A. (2002) The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.*, 56: 657-675.

Watkins, R. R.; David, M. Z.; Salata, R. A. (2012) Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology Papers in Press.*, 1-30.

Wertheim, H., F., L.; Van Leeuwen, W., B.; Snijders, S.; Vos, M., C.; Voss, A.; Vandembroucke-Grauls, C., M., J., E.; Kluytmans, J., A., W.; Verbrugh, H., A.; Van Belkum, A. (2005) Associations between *Staphylococcus aureus* Genotype, Infection, and In-Hospital Mortality: A Nested Case-Control Study. *JID.*, 192: 1196–1200.

Wertheim, H. F. L.; Melles, D. C.; Vos, M. C.; Van Leeuwen, W.; Van Belkum, A.; Verbrugh, H. A.; Nouwen, J. L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.*, 12: 751-762.

Williams, R., E., O. (1963) Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol. Rev.*, 27: 56-71.

Woodward, M. P., Young Jr, W.W., Bloodgood, R. A. (1985) Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *Journal of Immunological Methods.*, 78 : 143-153.

8. ANEXO

Quadro 3: Análise BLAST entre sequências do gene *gyrB* em *S. aureus* e *S. epidermidis*

Análise BLAST da sequência do gene <i>gyrB</i> em <i>S. aureus</i>					
Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. haemolyticus</i>	1784	1784	100%	0.0	83%
<i>S. hominis</i>	1707	1707	100%	0.0	83%
<i>S. saprophyticus</i>	1615	1615	99%	0.0	82%
<i>S. carnosus</i>	1491	1491	99%	0.0	81%
<i>Lactococcus garviae</i>	209	209	17%	6E-50	78%

Análise BLAST da sequência do gene <i>gyrB</i> em <i>S. epidermidis</i>					
Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. haemolyticus</i>	1901	1901	99%	0.0	84%
<i>S. hominis</i>	1857	1857	99%	0.0	84%
<i>S. aureus</i>	1818	1818	99%	0.0	84%
<i>S. lugdunenses</i>	1735	1735	99%	0.0	83%
<i>S. saprophyticus</i>	1443	1443	99%	0.0	80%
<i>S. carnosus</i>	1417	1417	99%	0.0	80%

Figura 6: Análise InterPro da sequência de GyrB em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise mostra que as duas proteínas possuem os mesmos domínios.

a)



b)



Figura 7: Análise Pfam de GyrB em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise confirma que as proteínas das duas espécies possuem os mesmos domínios.

a)

Sequence search results
[Show](#) the detailed description of this results page.
 We found **20** Pfam-A matches to your search sequence (**19** significant and **1** insignificant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
HATPase_c	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase	Domain	CL0025	159	242	161	230	3	62	38.2	8.4e-10	n/a	Show
HATPase_c	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase	Domain	CL0025	296	420	301	418	20	107	37.0	2e-09	n/a	Show
DNA_gyraseB	DNA gyrase B	Domain	n/a	712	783	712	781	1	73	75.1	3.3e-21	n/a	Show
DNA_gyraseB	DNA gyrase B	Domain	n/a	778	843	779	841	8	73	63.1	1.6e-17	n/a	Show
DNA_gyraseB	DNA gyrase B	Domain	n/a	836	966	838	964	7	135	151.1	1.5e-44	n/a	Show
DNA_gyraseB	DNA gyrase B	Domain	n/a	956	1027	956	1025	68	136	67.9	5.2e-19	n/a	Show
DNA_gyraseB	DNA gyrase B	Domain	n/a	1016	1122	1016	1121	68	172	107.2	4.7e-31	n/a	Show
DNA_gyraseB	DNA gyrase B	Domain	n/a	1137	1182	1142	1181	133	172	21.0	0.00014	n/a	Show
DNA_gyraseB	DNA gyrase B	Domain	n/a	1197	1242	1202	1241	133	172	21.0	0.00014	n/a	Show
Toprim	Toprim domain	Family	CL0413	1270	1325	1270	1309	1	38	23.4	3.6e-05	n/a	Show
Toprim	Toprim domain	Family	CL0413	1330	1385	1330	1369	1	20	23.4	3.6e-05	n/a	Show

b)

Sequence search results
[Show](#) the detailed description of this results page.
 We found **4** Pfam-A matches to your search sequence (**all** significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
HATPase_c	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase	Domain	CL0025	39	182	41	180	3	109	62.2	2.9e-17	n/a	Show
DNA_gyraseB	DNA gyrase B	Domain	n/a	231	401	231	400	1	172	202.9	1.9e-60	n/a	Show
Toprim	Toprim domain	Family	CL0413	429	541	429	541	1	88	72.0	2.4e-20	n/a	Show
DNA_gyraseB_C	DNA gyrase B subunit, carboxyl terminus	Family	n/a	569	633	572	633	4	65	100.1	3.7e-29	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk
 The Wellcome Trust

Quadro 4: Análise BLAST da sequência de *icaA* em *S. aureus* e *S. epidermidis*

Análise BLAST da sequência do gene *icaA* em *S. aureus*

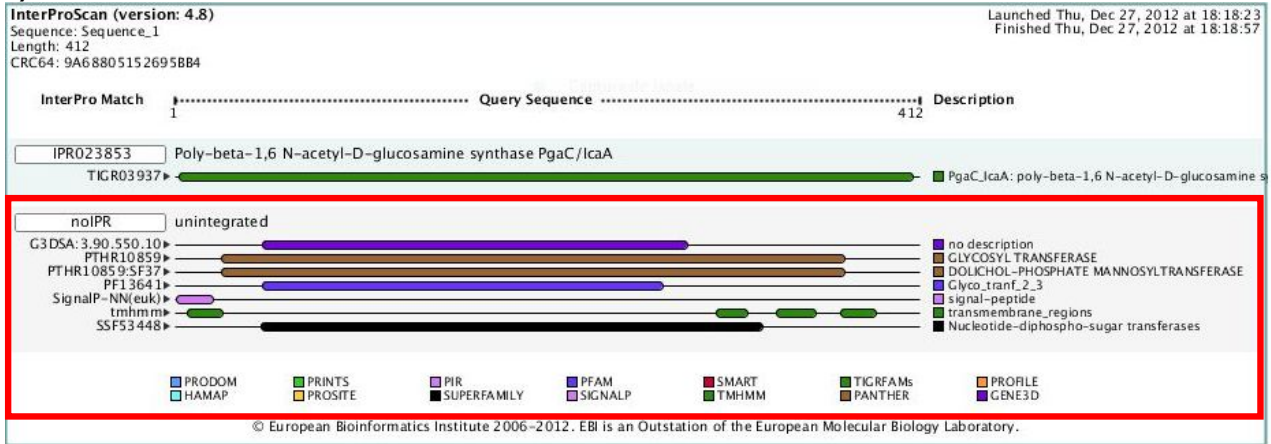
Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. aureus</i> USA300	2289	2289	100%	0.0	100%
<i>S. aureus</i> VC40	2289	2289	100%	0.0	100%
<i>S. caprae</i>	794	794	99%	0.0	78%
<i>S. saprophyticus</i>	688	688	30%	0.0	100%
<i>S. simulans</i>	682	682	30%	0.0	99%

Análise BLAST da sequência do gene *icaA* em *S. epidermidis*

Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. epidermidis</i> RP62A	2289	2289	100%	0.0	100%
<i>S. haemolyticus</i>	2178	2178	100%	0.0	98%
<i>S. capitis</i>	959	959	99%	0.0	81%
<i>S. caprae</i>	833	833	99%	0.0	79%
<i>S. condimentii</i>	665	665	30%	0.0	99%
<i>S. sciuri</i>	95.3	95.3	28%	1E-15	73%

Figura 8: Análise InterPro da sequência de IcaA em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise mostra que as duas proteínas possuem os mesmos domínios (quadrado vermelho).

a)



b)



Figura 9: Análise Pfam de IcaA em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise confirma que as proteínas das duas espécies possuem os mesmos domínios.

a)

wellcome trust
sanger
institute

HOME | SEARCH | BROWSE | FTP | HELP | ABOUT

Pfam
keyword search Go

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.
We found 2 Pfam-A matches to your search sequence (1 significant and 1 insignificant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
Glyco_tranf_2_3	Glycosyltransferase like family 2	Domain	CL0110	47	270	49	270	3	230	123.5	9.8e-36	n/a	Show

Insignificant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
DUF393	Protein of unknown function, DUF393	Family	n/a	88	173	93	168	16	94	14.9	0.04	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk
The Wellcome Trust

b)

wellcome trust
sanger
institute

HOME | SEARCH | BROWSE | FTP | HELP | ABOUT

Pfam
keyword search Go

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.
We found 9 Pfam-A matches to your search sequence (5 significant and 4 insignificant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
Glycos_transf_2	Glycosyl transferase family 2	Family	CL0110	170	245	171	241	2	73	64.0	1.2e-17	n/a	Show
Glycos_transf_2	Glycosyl transferase family 2	Family	CL0110	299	419	300	408	11	120	91.0	6e-26	n/a	Show
Chitin_synth_2	Chitin synthase	Family	CL0110	410	478	413	473	188	249	28.5	4.4e-07	n/a	Show
Glyco_trans_2_3	Glycosyl transferase family group 2	Domain	CL0110	489	604	489	595	1	106	50.4	1.9e-13	n/a	Show
Glyco_trans_2_3	Glycosyl transferase family group 2	Domain	CL0110	650	781	656	770	47	164	56.7	2.2e-15	n/a	Show

Insignificant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
NAD_binding_2	NAD binding domain of 6-phosphogluconate dehydrogenase	Domain	CL0063	149	247	159	241	48	130	11.4	0.19	n/a	Show
Glyco_trans_2_3	Glycosyl transferase family group 2	Domain	CL0110	591	664	596	655	47	106	24.3	1.9e-05	n/a	Show
Glyco_trans_2_3	Glycosyl transferase family group 2	Domain	CL0110	768	841	780	830	111	164	14.2	0.024	n/a	Show
Glyco_tranf_2_3	Glycosyltransferase like family 2	Domain	CL0110	815	870	837	870	197	230	11.5	0.17	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk
The Wellcome Trust

Quadro 5: Análise BLAST da sequência de *icaR* em *S. aureus* e *S. epidermidis*

Análise BLAST da sequência do gene <i>icaR</i> em <i>S. aureus</i>
--

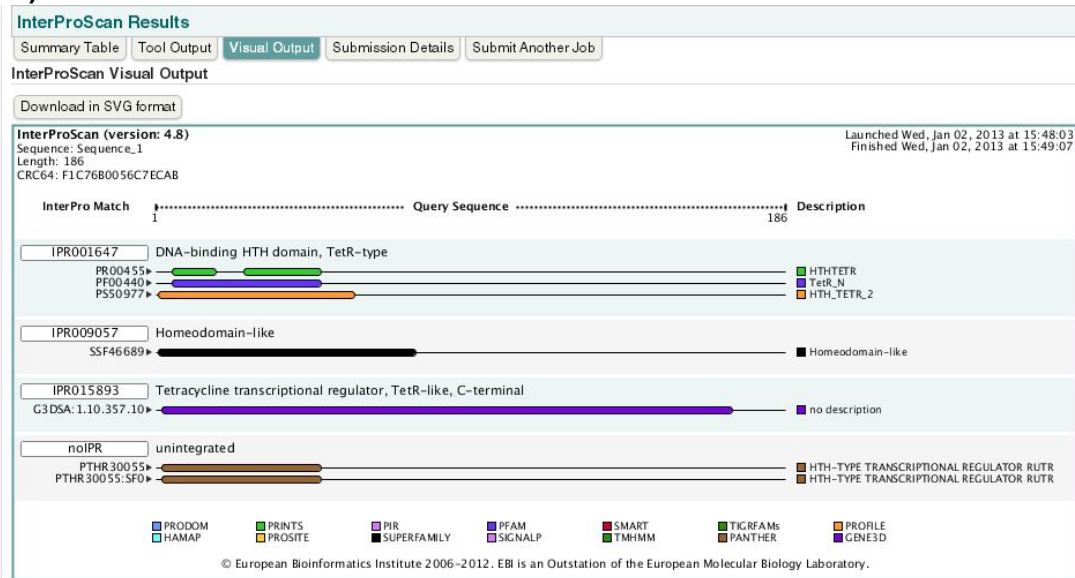
Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. haemolyticus</i>	159	159	53%	2E-35	77%
<i>S. epidermidis</i>	159	159	53%	2E-35	77%
<i>S. aureus</i> VC40	1037	1037	100%	0.0	100%
<i>S. aureus</i> USA300	1037	1037	100%	0.0	100%
<i>S. aureus</i> NEWMAN	1037	1037	100%	0.0	100%

Análise BLAST da sequência do gene <i>icaR</i> em <i>S. epidermidis</i>

Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. haemolyticus</i>	1009	1009	100%	0.0	99%
<i>S. aureus</i> T0131	171	171	53%	8E-39	77%
<i>S. aureus</i> VC40	159	159	53%	2E-35	77%
<i>S. aureus</i> USA300	159	159	53%	2E-35	77%
<i>S. aureus</i> MSHR1132	152	152	21%	3E-33	89%

Figura 10: Análise InterPro da sequência de IcaR em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise mostra que as duas proteínas possuem os mesmos domínios.

a)



b)

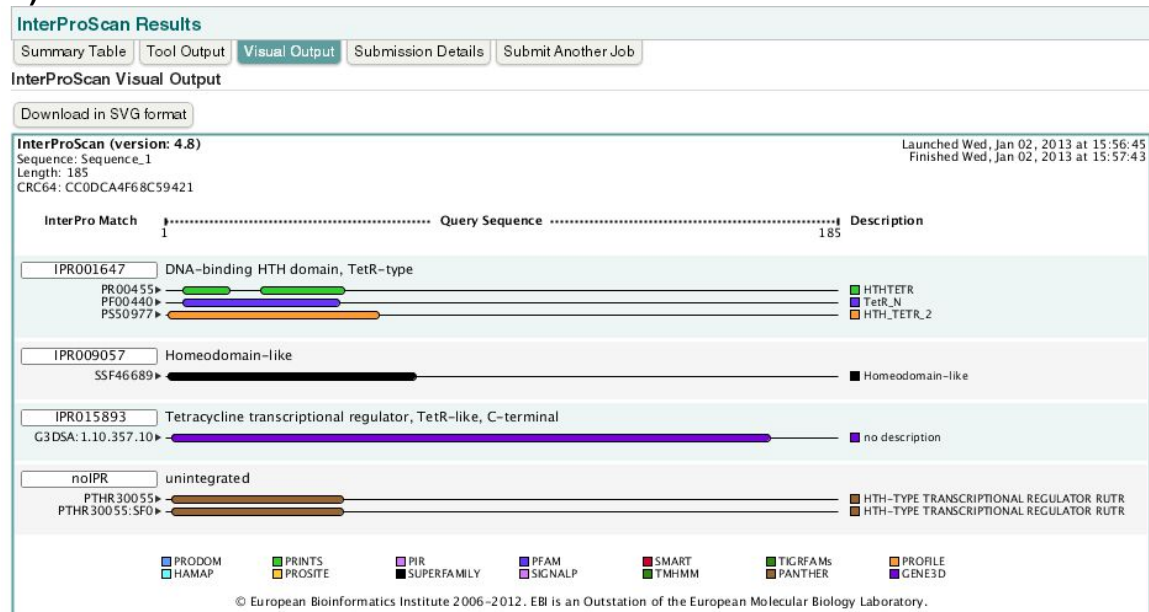


Figura 11: Análise Pfam de IcaR em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise confirma que as proteínas das duas espécies possuem os mesmos domínios.

a)

wellcome trust
sanger
institute

HOME | SEARCH | BROWSE | FTP | HELP | ABOUT

Pfam
keyword search Go

Sequence search results
[Show](#) the detailed description of this results page.
 We found 2 Pfam-A matches to your search sequence (1 significant and 1 insignificant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
TetR_N	Bacterial regulatory proteins, tetR family	Domain	CL0123	5	50	5	49	1	45	59.5	1.6e-16	n/a	Show

Insignificant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
DUF2110	Uncharacterized protein conserved in archaea (DUF2110)	Family	CL0021	101	181	104	177	5	78	11.3	0.18	n/a	Show

b)

wellcome trust
sanger
institute

HOME | SEARCH | BROWSE | FTP | HELP | ABOUT

Pfam
keyword search Go

Sequence search results
[Show](#) the detailed description of this results page.
 We found 3 Pfam-A matches to your search sequence (1 significant and 2 insignificant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
TetR_N	Bacterial regulatory proteins, tetR family	Domain	CL0123	5	50	5	48	1	44	55.5	2.8e-15	n/a	Show

Insignificant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
DUF3800	Protein of unknown function (DUF3800)	Family	n/a	4	176	28	146	60	162	12.7	0.067	n/a	Show
ARPC4	ARP2/3 complex 20 kDa subunit (ARPC4)	Family	n/a	23	116	48	100	107	157	12.9	0.046	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk
 The Wellcome Trust

Quadro 6: Análise BLAST da sequência de *sigB* em *S. aureus* e *S. epidermidis*

Análise BLAST da sequência do gene *sigB* em *S. aureus*

Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. aureus</i> VC40	1424	1424	100%	0.0	100%
<i>S. haemolyticus</i>	713	713	98%	0.0	84%
<i>S. epidermidis</i> RP62A	682	682	98%	0.0	83%
<i>S. aureus</i> USA300	1424	1424	100%	0.0	100%
<i>S. aureus</i> T0301	1424	1424	100%	0.0	100%

Análise BLAST da sequência do gene *sigB* em *S. epidermidis*

Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. haemolyticus</i>	721	721	100%	0.0	84%
<i>S. lugdunenses</i>	682	682	100%	0.0	83%

Figura 12: Análise InterPro da sequência de SigB em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise mostra que as duas proteínas possuem os mesmos domínios (marcado em vermelho).

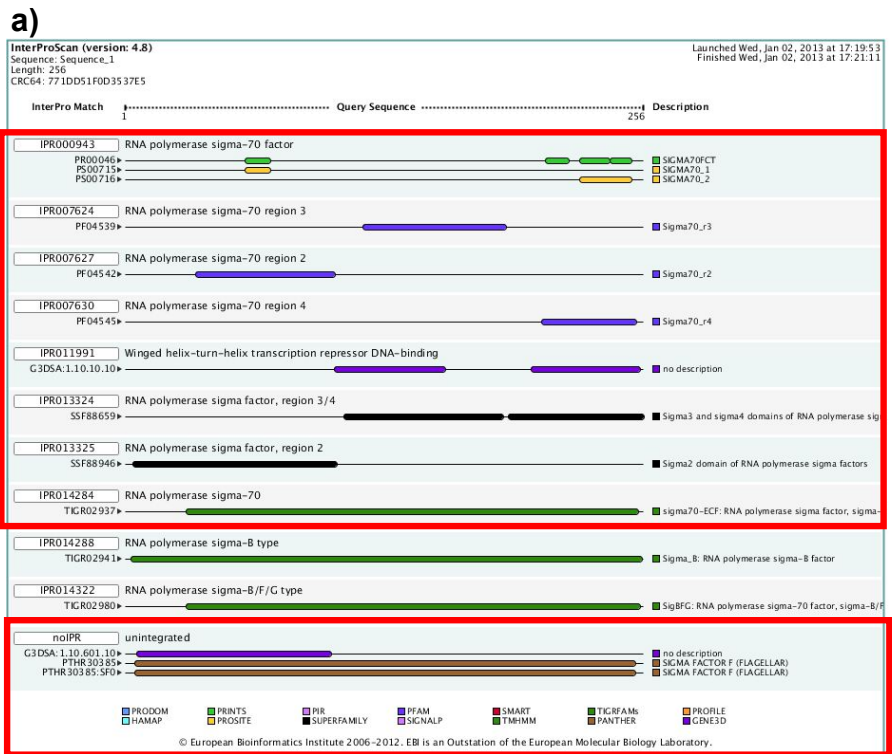


Figura 13: Análise Pfam de SigB em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise confirma que as proteínas das duas espécies possuem os mesmos domínios.

a)

Sequence search results
[Show](#) the detailed description of this results page.
 We found 4 Pfam-A matches to your search sequence (3 significant and 1 insignificant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
Sigma70_r2	Sigma-70 region 2	Domain	CL0123	35	105	35	104	1	70	58.4	3.4e-16	n/a	Show
Sigma70_r3	Sigma-70 region 3	Family	CL0123	114	191	117	188	4	76	65.4	2.8e-18	n/a	Show
Sigma70_r4	Sigma-70, region 4	Domain	CL0123	203	252	205	252	3	50	54.7	3.8e-15	n/a	Show

Insignificant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
Packaging_F1	DNA packaging protein F1	Family	n/a	113	220	117	163	7	53	13.5	0.053	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk
 The Wellcome Trust

b)

Sequence search results
[Show](#) the detailed description of this results page.
 We found 15 Pfam-A matches to your search sequence (9 significant and 6 insignificant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
Sigma70_r2	Sigma-70 region 2	Domain	CL0123	155	225	155	224	1	70	57.7	5.9e-16	n/a	Show
Sigma70_r2	Sigma-70 region 2	Domain	CL0123	241	285	241	284	27	70	29.0	5.1e-07	n/a	Show
Sigma70_r2	Sigma-70 region 2	Domain	CL0123	301	345	301	344	27	70	29.0	5.1e-07	n/a	Show
Sigma70_r3	Sigma-70 region 3	Family	CL0123	354	421	357	410	4	65	56.4	1.0e-15	n/a	Show
Sigma70_r3	Sigma-70 region 3	Family	CL0123	418	481	421	478	8	65	50.0	1.9e-13	n/a	Show
Sigma70_r3	Sigma-70 region 3	Family	CL0123	479	550	481	548	8	76	52.3	3.4e-14	n/a	Show
Sigma70_r4	Sigma-70, region 4	Domain	CL0123	563	601	566	600	4	38	37.8	7.3e-10	n/a	Show
Sigma70_r4	Sigma-70, region 4	Domain	CL0123	623	661	626	660	4	38	37.8	7.3e-10	n/a	Show
Sigma70_r4	Sigma-70, region 4	Domain	CL0123	683	732	686	732	4	50	53.0	1.4e-14	n/a	Show

Insignificant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
HTH_16	Helix-turn-helix domain	Domain	CL0123	19	59	26	50	9	33	12.6	0.087	n/a	Show
HpaB_N	4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase N terminal	Family	n/a	33	153	40	147	33	136	9.7	0.45	n/a	Show
DUF2120	Uncharacterized protein conserved in archaea (DUF2120)	Family	n/a	33	187	40	172	6	119	9.2	0.99	n/a	Show
HTH_16	Helix-turn-helix domain	Domain	CL0123	79	119	86	110	9	33	12.6	0.087	n/a	Show
DUF4144	protein structure with unknown function	Family	n/a	88	167	90	156	25	89	10.0	0.74	n/a	Show
HTH_Tnp_1	Transposase	Family	CL0123	122	168	130	153	34	57	9.4	0.89	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk
 The Wellcome Trust

Quadro 7: Análise BLAST da sequência de *sarA* em *S. aureus* e *S. epidermidis*

Análise BLAST da sequência do gene *sarA* em *S. aureus*

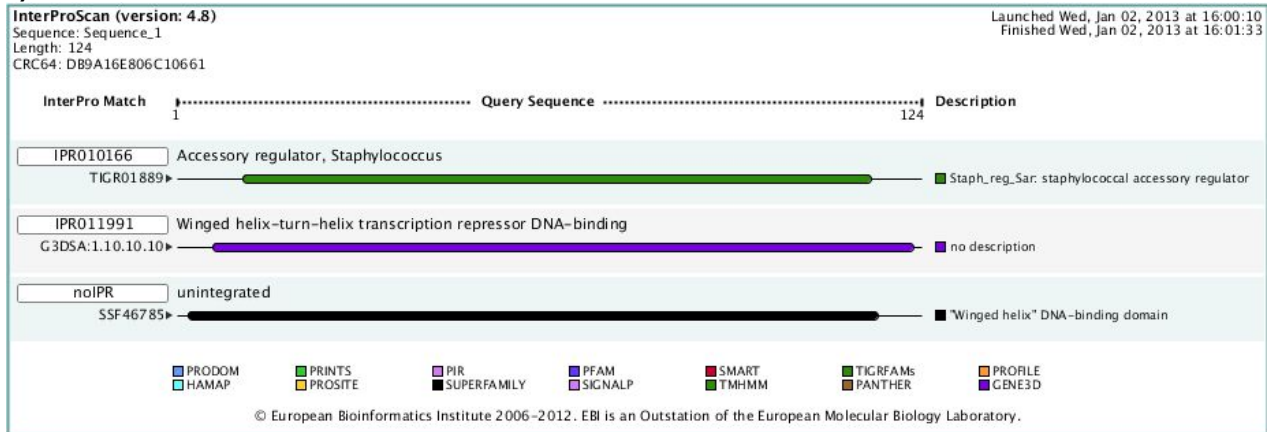
Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. haemolyticus</i>	361	361	100%	3E-96	84%
<i>S. carnosus</i>	254	254	71%	5E-64	84%
<i>S. aureus</i> ST228	693	693	100%	0.0	100%
<i>S. aureus</i> VC40	693	693	100%	0.0	100%
<i>S. aureus</i> USA300	693	693	100%	0.0	100%
<i>S. aureus</i> JH1	693	693	100%	0.0	100%

Análise BLAST da sequência do gene *sarA* em *S. epidermidis*

Espécie	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
<i>S. epidermidis</i> RP62A	693	693	100%	0.0	100%
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	693	693	100%	0.0	100%
<i>S. haemolyticus</i>	350	350	100%	6E-93	84%

Figura 14: Análise InterPro da sequência de SarA em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise mostra que as duas proteínas possuem os mesmos domínios (marcado em vermelho).

a)



b)

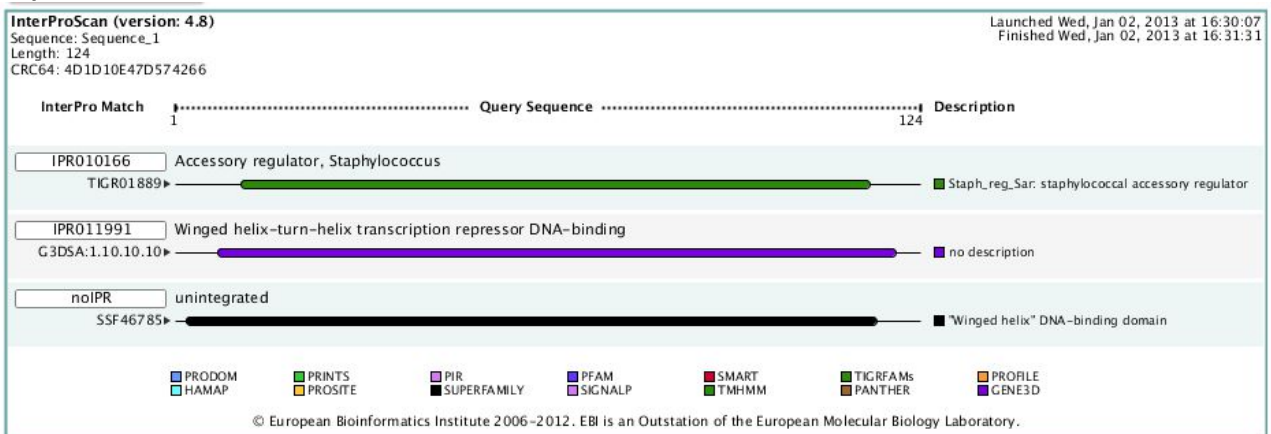


Figura 15: Análise Pfam de SarA em *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). A análise confirma que as proteínas das duas espécies possuem os mesmos domínios(marcadoe em vermelho).

a)

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 4 Pfam-A matches to your search sequence (there were **no** significant matches). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Insignificant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
AAA_23	AAA domain	Family	CL0023	2	123	15	123	115	202	12.5	0.12	n/a	Show
PAZ	PAZ domain	Family	n/a	9	120	20	103	15	97	9.7	0.47	n/a	Show
MarR_2	MarR family	Family	CL0123	30	91	32	90	3	61	18.9	0.0008	n/a	Show
Bro-N	BRO family, N-terminal domain	Family	n/a	38	120	41	83	4	44	11.5	0.25	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk

The Wellcome Trust

b)

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 6 Pfam-A matches to your search sequence (there were **no** significant matches). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Insignificant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
SRF-TF	SRF-type transcription factor (DNA-binding and dimerisation domain)	Domain	n/a	11	51	14	33	9	28	13.8	0.022	n/a	Show
MarR	MarR family	Family	CL0123	32	92	35	92	4	59	20.2	0.00032	n/a	Show
PAZ	PAZ domain	Family	n/a	9	121	37	103	32	97	12.4	0.067	n/a	Show
DerD	Discriminatory sulfite reductase D (DerD)	Family	n/a	25	81	20	78	6	48	11.2	0.26	n/a	Show
Bro-N	BRO family, N-terminal domain	Family	n/a	38	122	42	87	5	46	13.1	0.081	n/a	Show
DUF4303	Domain of unknown function (DUF4303)	Family	n/a	26	114	67	113	108	154	11.3	0.18	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk

The Wellcome Trust