

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**

**POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM  
AMOSTRAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**MÔNICA RAFAELA ALMEIDA DA SILVA**

**JOÃO PESSOA/PB**

**2023**

**MÔNICA RAFAELA ALMEIDA DA SILVA**

**POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM  
AMOSTRAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Biomedicina como requisito parcial  
para obtenção de grau de Bacharel  
em Biomedicina da Universidade  
Federal da Paraíba/UFPB.  
Período: 2022.2

**Orientadora: Angela Camila  
Orbem Menegatti**

**JOÃO PESSOA/PB**

**2023**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586p Silva, Mônica Rafaela Almeida da.

Potencial de formação de biofilme em amostras de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* / Mônica Rafaela Almeida da Silva. - João Pessoa, 2023.

44 f. : il.

Orientadora : Angela Camila Orbem Menegatti.  
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Infecções bacterianas. 2. Biofilme. 3. Genótipo.  
4. Fenótipo. I. Menegatti, Angela Camila Orbem. II.  
Título.

UFPB/CCS

CDU 616.9

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MÔNICA RAFAELA ALMEIDA DA SILVA

**POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal da Paraíba.

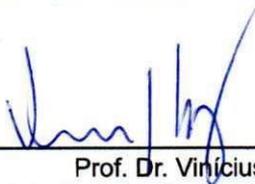
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Camila Orbem Menegatti

Aprovado em: 31 de maio de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Camila Orbem Menegatti (Orientadora)  
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Vinicius Pietta Perez  
Departamento de Fisiologia e Patologia – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr.<sup>a</sup> Leonor Alves de Oliveira da Silva  
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar os meus pais e minha irmã pelo apoio incondicional, não só nesse projeto, mas ao longo de toda a minha vida. Obrigada mainha e painho por não apenas me apoiarem, mas também por confiarem em mim e nas minhas escolhas.

Agradeço meus amigos, Bruno, Carol e Deborah que, apesar da distância se fazem presente todos os dias e continuam me apoiando em todas as etapas da minha vida.

Às amizades que construí aqui, Eduardo, Isis e Raquel, que ultrapassaram o limite da amizade e se tornaram minha família em João Pessoa, muito obrigada por todo o suporte, gargalhadas, conhecimento e companheirismo trocados ao longo desses cinco anos e que me ajudaram a seguir até aqui.

Agradeço minha orientadora, a Prof. Dra. Angela C. O. Menegatti por confiar no meu trabalho e repassar todo o conhecimento e orientação que me foi dado ao longo desse projeto.

A todos do grupo de pesquisa do Laboratório de Genética dos Microrganismos, em especial ao prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior. Aos funcionários do Departamento de Biologia Molecular do CCEN, em especial ao Bosco e Dione.

Aos meus colegas de curso que seguem sendo meus companheiros nessa jornada.

Ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza e à UFPB.

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é uma espécie bacteriana encontrada na microbiota da pele e mucosas humanas, em algumas condições, essa espécie pode atuar como um patógeno, sendo responsável por diversas manifestações clínicas, como abscessos e furúnculos, além de estar relacionada a casos de meningites e bacteremias. Dentre seus diversos fatores de virulência têm-se a produção de biofilme. O biofilme pode ser entendido como um agregado de moléculas extracelulares, como polissacarídeos e DNA extracelular, e células bacterianas, cuja função é sobretudo de proteção dessas células, evitando a ação de fagócitos e antimicrobianos, portanto, dificultando a resolução da infecção. O objetivo dessa pesquisa foi detectar a presença de genes envolvidos na formação de biofilme em isolados clínicos de *S. aureus* e correlacionar com a capacidade de formação de biofilme *in vitro* por essas cepas. Para avaliar a formação de biofilme os isolados clínicos de *S. aureus* foram cultivados em caldo com Vermelho Congo e em microplaca para ensaio com 0,2% de safranina. PCR convencional foi utilizado para identificar os genes envolvidos no processo de formação do biofilme. Das amostras de *S. aureus*, um total de 15 cepas, foram isoladas no Hospital Universitário Lauro Wanderley no período de outubro/2022 a janeiro/2023. Todas as cepas apresentaram potencial para a formação de biofilme de acordo com o ensaio no caldo com Vermelho Congo. No ensaio quantitativo, pelo método de quantificação de biomassa pela safranina, 47% das cepas foram classificadas como moderadamente aderente, 33% como fortemente aderente e 20% como fracamente aderente. Conclui-se que a técnica com Vermelho Congo não apresenta correlação direta com os resultados de aderência. Das 15 amostras, 7 apresentam resistência à oxacilina, então, classificadas como MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*), destas 29% apresentaram biofilme fortemente aderente e 57% apresentam biofilme moderadamente aderente. Em relação a detecção dos genes envolvidos na produção de biofilme por PCR, encontramos *icaA* em 80% das cepas, *icaD* em 93%, *cna* em 80%, *fib* em 60%, *fnbA* em 73% e *bap* em 13%. Todas as cepas apresentaram pelo menos três genes envolvidos na formação de biofilme, corroborando os dados de classificação de aderência. Ainda, todas as cepas classificadas como moderadamente aderentes apresentam os genes *icaAD* e *cna*. Os isolados classificados como fortemente aderente foram isolados de amostras de secreção, escarro, nasal e sangue, porém, nas condições do estudo ainda não foi possível realizar uma correlação direta entre genótipo e fenótipo, o que demonstra que a regulação do biofilme é complexa e necessita de mais estudos.

**Palavras-chave:** infecções bacterianas; biofilme; genótipo; fenótipo.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a bacterial species found in the microbiota of the human skin and mucous membranes, under some conditions, this species can act as a pathogen, being responsible for several clinical manifestations, such as abscesses and boils, in addition to being related to cases of meningitis and bacteremia. Among its several virulence factors is the production of biofilm. The biofilm can be understood as an aggregate of extracellular molecules, such as polysaccharides and extracellular DNA, and bacterial cells, whose function is mainly to protect these cells, preventing the action of phagocytes and antimicrobials, therefore, making it difficult to resolve the infection. The objective of this research was to detect the presence of genes involved in biofilm formation in clinical isolates of *S. aureus* and to correlate with the ability of these strains to form biofilm in vitro. To evaluate biofilm formation, clinical isolates of *S. aureus* were cultivated in Congo Red broth and in microplates for assay with 0.2% safranin. Conventional PCR was used to identify the genes involved in the biofilm formation process. From the samples of *S. aureus*, a total of 15 strains were isolated at the University Hospital Lauro Wanderley from October/2022 to January/2023. All strains showed potential for biofilm formation according to the Congo Red broth assay. In the quantitative assay, using the method of quantification of biomass by safranin, 47% of the strains were classified as moderately adherent, 33% as strongly adherent and 20% as weakly adherent. It is concluded that the Congo Red technique does not present a direct correlation with the adherence results. Of the 15 samples, 7 showed resistance to oxacillin, so classified as MRSA (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*), of which 29% presented strongly adherent biofilm and 57% presented moderately adherent biofilm. Regarding the detection of genes involved in biofilm production by PCR, we found *icaA* in 80% of the strains, *icaD* in 93%, *cna* in 80%, *fib* in 60%, *fnbA* in 73% and *bap* in 13%. All strains had at least three genes involved in biofilm formation, corroborating the adherence classification data. Furthermore, all strains classified as moderately adherent present the *icaAD* and *cna* genes. The isolates classified as strongly adherent were isolated from secretion, sputum, nasal and blood samples, however, under the conditions of the study, it was still not possible to perform a direct correlation between genotype and phenotype, which demonstrates that the regulation of the biofilm is complex and requires of further studies.

**Keywords:** bacterial infections; biofilm; genotype; phenotype.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios do desenvolvimento do biofilme .....	15
Figura 2 – Resultados da caracterização com Vermelho Congo.....	31
Figura 3 – Amplificação dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> em isolados clínicos de <i>S. aureus</i> .....	35

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Origem dos tipos de isolados clínicos de *S. aureus*.....27

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Genes associados à formação de biofilme em <i>S. aureus</i> .....	17
Quadro 2 – Oligonucleotídeos para detecção dos genes associados à formação de biofilme .....	23
Quadro 3 – Classificação da aderência do biofilme.....	26
Quadro 4 – Antibióticos utilizados no TSA para isolados clínicos de <i>S. aureus</i> .	28
Quadro 5 – Perfil do potencial de formação de biofilme dos isolados clínicos de <i>S. aureus</i> .....	30

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.2 Fatores de virulência e resistência antimicrobiana do <i>S. aureus</i> .....	13
2.3 Biofilme de <i>S. aureus</i> .....	14
2.4 Genes que regulam a expressão de biofilme em <i>S. aureus</i> .....	16
2.5 Infecções hospitalares associadas ao <i>S. aureus</i> .....	17
2.6 Tratamento de infecções por <i>S. aureus</i> e futuras perspectivas .....	18
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral .....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos .....	21
4.2 Local da pesquisa.....	21
4.3 Obtenção das amostras .....	21
4.4 Determinação do genótipo dos isolados clínicos de <i>S.aureus</i> .....	22
4.5 Caracterização da produção de biofilme .....	24
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma espécie bacteriana comumente encontrada na microbiota da pele. Todavia, sob algumas condições, ela pode se apresentar como um microrganismo patogênico, produzindo diversas infecções, como meningites, bacteremias e infecções na pele.

O desenvolvimento dessas infecções é baseado em alguns fatores de virulência apresentados por essa espécie, como a produção de enzimas e toxinas, mecanismos de resistência a antimicrobianos e a formação de biofilme.

Esse último pode ser definido como uma estrutura composta por polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e algumas proteínas que contribuem para a adesão do biofilme em superfícies bióticas e/ou abióticas. Para tanto, esse biofilme está sob a influência de diversos genes e seus produtos gênicos.

Como mencionado, o biofilme é considerado um dos fatores de virulência em casos de infecção de *S. aureus* e é visto com preocupação pelas equipes de saúde, especialmente considerando pacientes que inspiram mais cuidados como aqueles com imunodepressão e paciente internados, que por algum motivo precisam realizar procedimentos como traqueostomia e/ou intubação. Isso porque, estes tornam-se mais suscetíveis a essas infecções com produção de biofilme.

Além disso, o biofilme pode ser considerado um obstáculo no tratamento dessas infecções visto que sua própria estrutura favorece a proteção das células bacterianas, protegendo-as da ação de antimicrobianos, assim como do sistema imunológico do paciente. Dessa forma, as infecções causadas por *S. aureus* acabam resultando em um tratamento prolongado, gerando mais gastos para o sistema de saúde, além de elevar também as taxas de mortalidade e morbidade.

Nesse sentido, faz-se necessário estudos que abordem a formação do biofilme, pela sua relevância como fator de virulência, correlacionado dados do genótipo e fenótipo da espécie *S. aureus* circulantes na comunidade hospitalar.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus* é um gênero bacteriano que engloba bactérias que apresentam como características morfológicas o formato de cocos e arranjadas em grupos, similares a cachos de uva. Além disso, esse gênero apresenta na composição de sua parede celular a presença de uma espessa camada de moléculas conhecidas como peptidoglicanos, inseridos nesses peptidoglicanos têm-se moléculas conhecidas como ácido lipoteicoico (KONEMAN *et al.*, 2008).

A presença desses peptidoglicanos é um dos fatores que explica a classificação de gram-positiva, frente à coloração de Gram, que essa espécie recebe. Isso pode ser explicado pois é nessa camada de peptidoglicano que o corante utilizado na técnica de coloração de Gram, violeta genciana, irá se aderir. Por conta de sua espessura maior, do que aquela presente nas bactérias gram-negativas, na etapa de descoloração muito do corante ainda permanece nas gram-positivas, e, portanto, elas adquirem a coloração violeta do corante, sendo consideradas gram-positivas (KONEMAN *et al.*, 2008).

Para classificar uma espécie dentro do gênero *Staphylococcus* dois testes bioquímicos são comumente empregados, o teste de catalase e o teste da coagulase. No primeiro uma amostra bacteriana é posta em contato com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 3%, caso ocorra a formação de bolhas ( $O_2$ ) a espécie é classificada como catalase positiva, pois expressa a enzima catalase, responsável pela conversão de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . No teste da coagulase, busca-se diferenciar a espécie *S. aureus* (coagulase positiva) das demais espécies (coagulase negativa). Para tanto, coloca-se a amostra em estudo em contato com plasma de coelho colhido com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), caso ocorra a formação de um coágulo identifica-se como coagulase positiva (KONEMAN *et al.*, 2008).

A espécie *S. aureus* foi isolada pela primeira vez em 1880, pelo cirurgião Alexander Ogston, de infecção de feridas cirúrgicas (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Sabe-se hoje que o *S. aureus* é uma espécie que compõe a microbiota da pele e de mucosas, porém, em algumas situações essa espécie comporta-se como

um patógeno, podendo ocasionar algumas infecções na pele, que vão desde foliculites até furúnculos e abscessos. Além dessas citadas, a espécie pode ser responsável por meningites, endocardites, osteomielites e bacteremias. Outras manifestações oriundas dessa bactéria estão relacionadas à presença de toxinas produzidas, como intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e a síndrome do choque tóxico estafilocócico (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Uma análise sistemática feita em 2019 apontou que as infecções bacterianas são a segunda causa de morte no mundo. Dentre as espécies investigadas, *S. aureus* foi a única associada com mais de 1 milhão de mortes, sendo considerada a espécie bacteriana líder em mortalidade em pelo menos 135 países, dentre eles o Brasil (IKUTA *et al.*, 2022).

Outro ponto levantado no estudo foi acerca da importância da identificação e caracterização do patógeno em caso de infecção bacteriana. Isso porque, ao realizar essa especificação pode ser investigado também características como o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Nesse sentido, ao isolar *S. aureus* e traçar esse perfil pode-se estabelecer a terapêutica mais adequada ao paciente, o que reduz o uso inapropriado ou ineficaz de antimicrobianos diminuindo conseqüentemente a rapidez da disseminação de uma possível resistência, como a encontrada em MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) (IKUTA *et al.*, 2022)

## 2.2 Fatores de virulência e resistência antimicrobiana do *S. aureus*

Para estabelecer o processo infeccioso a espécie *S. aureus* conta com a presença de vários fatores de virulência. A exemplo desses fatores, como mencionado acima, têm-se as toxinas relacionadas às intoxicações como a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), responsável pela Síndrome de Choque Tóxico, e enterotoxinas, responsáveis pelas intoxicações alimentares (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

Outra toxina produzida por essa espécie é a  $\alpha$ -toxina, também conhecida como hemolisina, essa proteína causa danos a diversos tipos celulares do hospedeiro. A função dessa substância é a formação de poros nas membranas

plasmáticas para captação de nutrientes, o que ocasiona a lise e eventual morte celular, lesando o tecido em questão (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Outro exemplo de hemolisina é a  $\beta$ -Toxina (Hlb), que atua hidrolisando a esfingomielina, um componente presente na membrana plasmática. A ação dessa toxina é bem visualizada quando a espécie *S. aureus* é semeada em meio ágar sangue e por conta dessa hemolisina é produzido então halos correspondentes a  $\alpha$ -hemólise (ASTLEY *et al.*, 2019).

Além das toxinas, o *S. aureus* possui uma cápsula polissacarídica como mecanismo de virulência, a cápsula atua protegendo a célula bacteriana de uma eventual fagocitose. Além disso, os peptidoglicanos da sua parede celular também são considerados fatores de virulência, pois agem ativando a via alternativa do complemento e estimulam a produção de citocinas, como a IL-1, pelo hospedeiro, o que pode levar a manifestações clínicas, como febre e a liberação de mediadores inflamatórios, por conta desse aumento (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

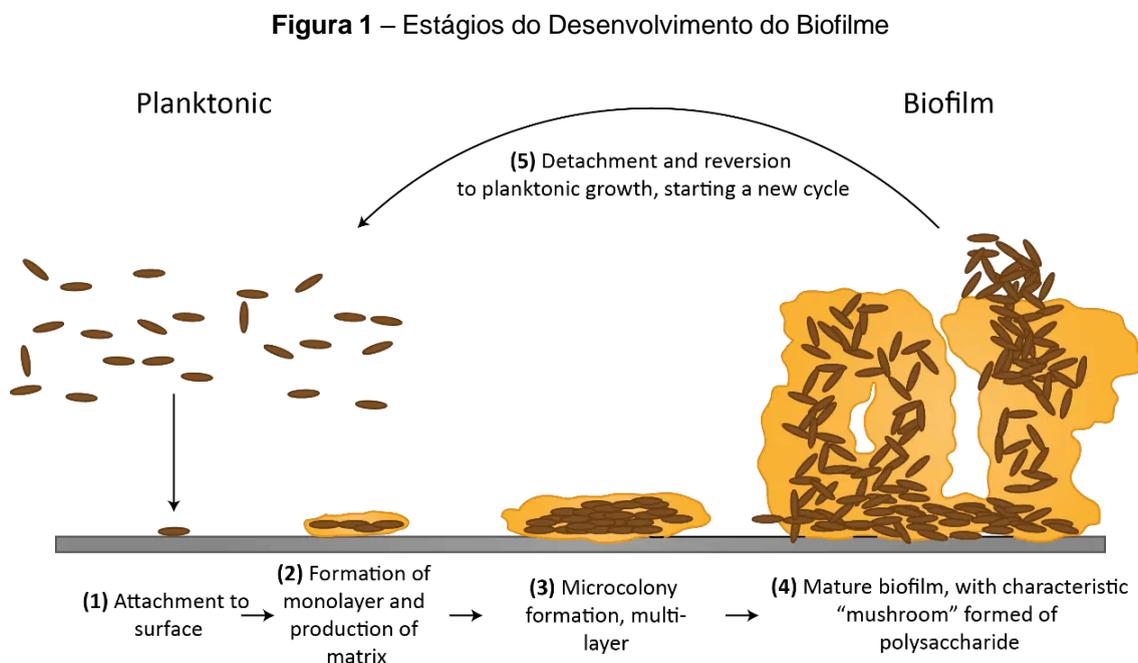
Uma outra classe de fatores de virulência são as moléculas conhecidas como adesinas. Essas moléculas têm como função interagir com a matriz extracelular, por meio de componentes da matriz como a fibronectina, sendo relacionadas também com a formação e estabelecimento do biofilme, também considerado um mecanismo de virulência (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Outro fator que contribui para a patogenicidade e sucesso da infecção causa pelo *S. aureus* é a sua notória capacidade de se tornar resistente a antibióticos por diferentes mecanismos. Nesse contexto, alguns dos mecanismos apresentados são a alteração da permeabilidade a membrana a um antimicrobiano, modificações do alvo do antibiótico e a expressão de bombas de efluxo. Sendo esse último mecanismo o principal em casos de multirresistência (RODRIGUES, 2022).

### 2.3 Biofilme de *S. aureus*

Como mencionado anteriormente, o biofilme pode ser classificado como um fator de virulência do *S. aureus*. De maneira genérica, o biofilme é descrito como uma estrutura microbiana formada a partir da multiplicação de bactérias que em seguida se aderem à alguma superfície biótica, como o tecido do

hospedeiro, ou abiótica, como instrumentos médicos, por meio da secreção de uma matriz extracelular (SWOLANA *et al.*, 2021). A Figura 1 ilustra os estágios de formação desse biofilme.



Legenda: (1) Adesão a superfície, (2) Formação de uma monocamada e produção da matriz extracelular, (3) Multiplicação e formação de uma microcolônia com multicamadas, (4) Biofilme madurado com sua matriz composta por polissacarídeos e muitas camadas e (5) Destacamento de parte desse biofilme e reversão para as células planctônicas que irão reiniciar esse ciclo.

Fonte: Baniya, 2022.

Sabe-se que a matriz extracelular do biofilme é composta por polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA), além de proteínas. Essa estrutura age como uma barreira frente às moléculas do sistema imune do hospedeiro e à terapia antimicrobiana, protegendo as células planctônicas e acentuando o quadro da infecção (REYNOLDS; KOLLEF, 2021). Por conta dessa estratégia, estima-se que mais de 65% das infecções bacterianas tenham associação com a produção de biofilme (GRAF *et al.*, 2019).

Uma das etapas cruciais para a formação do biofilme é a adesão da bactéria a alguma superfície, seja ela do hospedeiro ou algum instrumento médico. Para tanto é necessário que ocorra interações entre as moléculas da

superfície alvo e as células bacterianas. Essa interação é mediada por diversas proteínas de adesão presentes na superfície da célula bacteriana, a exemplo de seus ligantes temos a elastina, fibronectina, colágeno e outros da matriz extracelular do hospedeiro, essas proteínas recebem a nomenclatura, em inglês, de *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs) (NOURBAKSH; NAMVAR, 2016).

#### 2.4 Genes que regulam a expressão de biofilme em *S. aureus*

A expressão de moléculas de superfície que são responsáveis pela adesão aos componentes da matriz extracelular é mediada por uma série de genes. O gene *elastin binding protein (ebps)* codifica a proteína que irá se ligar à elastina, o gene *fibronectin binding protein (fnb)* codifica, por sua vez, uma proteína que irá se ligar à fibronectina. É por meio dessas proteínas que a célula irá se aderir às moléculas da matriz do hospedeiro e, então, formar o biofilme (DEMIR *et al.*, 2020).

Além desses, outros genes envolvidos no processo de formação do biofilme são do operon de adesão intracelular (*ica*) e o gene da proteína associada ao biofilme (*bap*). A família de genes *ica* está relacionada, por exemplo, à expressão de enzimas que serão responsáveis pela produção de polissacarídeos de adesão (PIA) (ALABDULLATIF; ALZHRANI, 2022).

Enquanto o gene *bap* é responsável por codificar uma proteína de ancoragem que está relacionada à instalação do biofilme independente do PIA (TORRES *et al.*, 2019). Dessa forma, o produto do gene *bap* pode promover a fixação primária do biofilme, inclusive em substâncias inertes, o que acentua o processo infeccioso (SALINA *et al.*, 2020). Outros genes envolvidos no processo de formação do biofilme estão listados no quadro 1.

**Quadro 1** – Genes associados à formação de biofilme em *S. aureus*.

<b>Genes</b>	<b>Produto gênico</b>	<b>Ref.</b>
<i>icaA</i>	N-acetilglicosamina transferase	KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, (2018)
<i>icaD</i>	Expressão do polissacarídeo capsular	KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, (2018)
<i>fib</i>	Proteína ligadora de fibrinogênio	KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, (2018)
<i>bap</i>	Proteína associada ao biofilme	DEMIR <i>et al.</i> (2020)
<i>cna</i>	Proteína ligadora de colágeno	DEMIR <i>et al.</i> (2020)
<i>fnbA</i>	Proteína ligadora de fibronectina	DEMIR <i>et al.</i> (2020)

Fonte: Própria autora, 2023

## 2.5 Infecções hospitalares associadas ao *S. aureus*

De acordo com a Portaria nº 2.616 do Ministério da Saúde, são consideradas infecções hospitalares, nosocomiais ou infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) as infecções que se manifestam durante a internação ou após o período de alta hospitalar (BRASIL, 1998).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada 100 pacientes internados, sete de países desenvolvidos e 15 de países em desenvolvimento irão evoluir para o quadro de infecção hospitalar (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2022). Esse dado é bastante preocupante, pois esse tipo de infecção pode levar a um aumento das taxas de morbidade e mortalidade, além de que esse quadro clínico gera um custo ao sistema de saúde local, pois espera-se um prolongamento no tempo de interação somado ao tratamento a ser empregado (LIMA *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o *S. aureus* apresenta-se como um dos principais agentes causadores desse tipo de infecção, visto que uma característica muito presente nos isolados é a resistência a antimicrobianos. Em especial, a resistência à meticilina, vista com preocupação pelas autoridades de saúde em decorrência da sua associação com o aumento da mortalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Foi identificado um aumento crescente dessa resistência em isolados obtidos a partir de amostras da ala ortopédica de um hospital na China. Ainda segundo esse estudo, a resistência a outros antimicrobianos, como penicilina e ampicilina, também foi identificada com porcentagens superando 90% das amostras para ambos os medicamentos (YANG *et al.*, 2021). Em 2016 no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, essa resistência já ultrapassava mais de 50% em UTIs adulto (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o *S. aureus* apresenta-se como um dos principais agentes causadores de infecção hospitalar. E um estudo feito por Raveendra e colaboradores (2021) foi observado que essa espécie foi a terceira mais encontrada em pacientes submetidos a traqueostomia. Sendo identificado também a presença de biofilme em 57% da população testada.

## 2.6 Tratamento de infecções por *S. aureus* e futuras perspectivas

Em 1928, Alexander Fleming descobriu o potencial antimicrobiano presente em fungos do gênero *Penicillium*. A partir de então o tratamento de muitas infecções, incluindo aquelas originadas de *S. aureus*, foi revolucionado com a implementação do extrato deste fungo, a penicilina. Decorridos 95 anos dessa descoberta, hoje enfrenta-se uma resistência a antimicrobianos que inviabiliza o uso da penicilina para o tratamento dessas infecções (GAYNES, 2017).

Além da penicilina, ao longo dos anos outros antimicrobianos foram descobertos e então classificados de acordo com o seu mecanismo de ação. No contexto do tratamento de infecções de *S. aureus* as classes mais empregadas são os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, macrolídeos e glicopeptídeos, a exemplo da vancomicina. Todavia, assim como para a

penicilina, tem-se isolado cepas de *S. aureus* que apresentam multirresistência à essas classes. O que torna cada vez mais difícil o tratamento para essas infecções (ZHOU *et al.*, 2018).

Existe uma urgência para novas estratégias para o tratamento contra *S. aureus*, especialmente como o aumento da prevalência de MSRA. O desafio no tratamento é ainda mais complicado quando se trata do biofilme. Como mencionado anteriormente, uma das funções do biofilme é a proteção das células planctônicas contra a ação de antimicrobianos, tal ação é feita por meio da barreira formada pelo biofilme que age dificultando a difusão do antimicrobiano (RAAFAT *et al.*, 2019).

A terapia anti-biofilme ainda não é bem estabelecida, sendo feito o uso de antimicrobianos e, em alguns casos, sendo necessário fazer o uso de intervenção cirúrgica (ARCHER *et al.*, 2011). Contudo, por conta da relevância médica, já estão sendo conduzidos estudos que exploram o potencial de produtos naturais, bem como, de substâncias sintéticas como agentes inibitórios da produção do biofilme (KOT *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2021).

Na busca por fármacos anti-biofilme, algumas das substâncias testadas são: prata, terti-butil benzoquinona, EDTA e outros. Essas substâncias apresentam como alvos no geral as enzimas, alterando seu funcionamento, inibindo a expressão de proteínas envolvidas no agregamento celular e proteínas envolvidas na biossíntese do biofilme (MOHAMMED *et al.*, 2018).

Uma outra alternativa que tem sido estudo é o emprego de bacteriófagos. Esses vírus foram empregados no século 20, principalmente em países do Leste Europeu em algumas infecções e agora estão sendo avaliados para uso no tratamento de infecções bacterianas causada por *S. aureus* e também em seu biofilme (ÁLVAREZ *et al.*, 2019).

Os bacteriófagos se mostram promissores pois, diferentemente dos antibióticos, essas estruturas podem ser adaptadas para penetrar em biofilmes, o que aumenta sua ação contra bactérias, além de terem a habilidade de se autoreplicar, o que favorece o aumento da concentração de fagos no local da infecção, sendo diferente da ação de antibióticos que têm sua concentração diminuída ao decorrer do tempo. Além disso, a ação dos bacteriófagos independe do fenótipo de resistência antimicrobiana (ÁLVAREZ *et al.*, 2019).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Detectar genes envolvidos na formação de biofilme em isolados clínicos de *S. aureus* e correlacionar com a capacidade de formação de biofilme por estas cepas *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Detectar os genes *icaA*, *icaD*, *fnbA*, *fib*, *cna* e *Bap* em isolados clínicos de *S. aureus*;
- Caracterizar o perfil de produção de biofilme dos isolados;
- Comparar o genótipo e o fenótipo para formação de biofilme dos isolados.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos

O presente estudo tem um caráter observacional transversal de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes de todas as enfermarias do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW)/EBSERH/UFPB. As amostras foram obtidas inicialmente pelo setor de Bacteriologia da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do HULW (ULAC) e após uma análise dos dados foram encaminhadas para prosseguimento do projeto.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde/UFPB e foi aprovado recebendo o CAAE: 67625622.9.0000.5188 (Anexo A). Foi solicitado a dispensa do TCLE (Termo de Consentimento Livre Esclarecido) / TALE (Termo de Assentimento Livre Esclarecido) uma vez que não houve acesso a dados que identifiquem o paciente, bem como impossibilidade de contato para obtenção do mesmo.

### 4.2 Local da pesquisa

Todas as etapas e procedimentos foram realizados na Universidade Federal da Paraíba, no Laboratório de Genética de Microrganismos (LGM) e no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), localizados no Departamento de Biologia Molecular (DBM) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN).

### 4.3 Obtenção das amostras

Para compor o estudo, foram recebidas 15 amostras de isolados clínicos, previamente identificadas, seguindo os protocolos do HULW, como *S. aureus*. Além da identificação, também foi realizado, no HULW, o teste de susceptibilidade ao antimicrobiano (TSA).

As amostras foram separadas de acordo com mês/ano e procedência de coleta e imediatamente transportadas para o LGM/DBM/CCEN onde foram, com auxílio da alça microbiológica, cultivadas em 5 mL de caldo manitol para reconfirmar que se tratava de amostras de *S. aureus*. As amostras foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 h, decorrido esse tempo caso as amostras apresentassem uma turvação a indicação é de que houve crescimento, sendo

assim o isolado confirmado como *S. aureus*. Após essa etapa, os isolados reconfirmados foram identificados com códigos de A-O. Em seguida, as amostras seguiram para incubação em 5 mL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI) a  $35 \pm 2$  °C por 24 h, sendo este pré-cultivo utilizado para posteriores etapas da pesquisa.

Além disso, foram preparados estoques a partir do pré-cultivo mencionado anteriormente. Para tanto, com uma alça microbiológica foram feitas estrias no ágar BHI inclinado e estes foram mantidos sobre refrigeração de 4 °C, após incubação a  $35 \pm 2$  °C por 24 h.

#### 4.4 Determinação do genótipo dos isolados clínicos de *S.aureus*

Para a extração do DNA das amostras foi realizado um cultivo em 5 mL de caldo BHI a  $35 \pm 2$  °C por 24h, decorrido esse tempo, 2 mL do cultivo foi transferido para microtubos e estes levados à centrífuga a 14.000 g por 2 min, o sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido até obter todo o conteúdo celular, que foi armazenado a  $-20$  °C.

A etapa de extração foi baseada na metodologia de Singh e colaboradores (2018), com algumas modificações. Para essa extração foi usada a resina Chelex 100 (em Tris-HCl/EDTA - TE) a 5% visando melhorar a qualidade do DNA obtido. O precipitado celular foi ressuspendido em 200 µL de tampão, seguido de banho-maria a 100 °C por 20 min. Após esse tempo a amostra passou por vórtex e foi centrifugada por 10 min a 12.000 g, então o sobrenadante foi coletado.

Posteriormente seguiu-se com precipitação de proteínas utilizando acetato de amônia 2,5 M. Os tubos contendo as amostras e o acetato de amônia foram incubados por 5 min no gelo e depois centrifugados a 12.000 g por 10 min, o sobrenadante límpido foi coletado.

Para a precipitação de DNA adicionou-se acetato de sódio 0,3 M e 200 µL de etanol puro gelado ao sobrenadante. Essa solução foi levada ao freezer  $-20$  °C *overnight*. Após esse tempo seguiu-se com uma nova centrifugação a 12.000 g por 1 h a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 3

etapas, cada uma seguida de uma nova centrifugação a 12.000g por 10 min a 4 °C, e descarte do sobrenadante. Na primeira e a segunda utilizou-se etanol 75% e na terceira isopropanol absoluto gelado.

Após essa etapa, o precipitado foi levado ao fluxo laminar por aproximadamente 30 min para que todo o conteúdo líquido evaporasse. Por fim ressuspendeu-se o *pellet* em 30 µL tampão TE e levou-se para o banho-maria por 10 min a 55 °C. Decorrido esse tempo o DNA foi quantificado no NanoDrop™ em ng/µL.

Para a detecção do genótipo envolvido na formação do biofilme foram analisados seis genes (Quadro 2), descritos previamente na literatura. A detecção desses genes foi realizada por PCR convencional, utilizando 4 µL de DNA (aproximadamente 200 ng/µL), 1 µL do *primer* de interesse *forward* e 1 µL do *primer* de interesse *reverse* (0,4 µM), 2 µL de dNTPs (0,2 mM), 1 µL de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) a 2 mM, 2,5 µL de solução tampão, 0,25 µL de enzima Taq DNA polimerase (1,25 U) e 13,25 µL de água ultrapura autoclavada, totalizando o volume da reação 25 µL. As condições dos ciclos de amplificação foram: 94 °C para desnaturação inicial por 45 s, anelamento a 56 °C por 45 s e extensão da cadeia de DNA a 72 °C por 45 s, ao final uma extensão a 72 °C por 10 min.

A confirmação da PCR foi realizada através da presença e dos tamanhos (pb) dos amplicons detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com UniSafe Dye® e observados em transiluminador.

**Quadro 2** – Oligonucleotídeos para detecção dos genes associados à formação de biofilme.

(continua)

<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Amplicon (pb)	Ref.
<i>icaA</i> (F)	ACACTTGCTGGCGCAGTCAA	188	KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, (2018)

**Quadro 2** – Oligonucleotídeos para detecção dos genes associados à formação de biofilme.

(conclusão)

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'→3')</b>	<b>Amplicon (pb)</b>	<b>Ref.</b>
<i>icaA</i> (R)	TCTGGAACCAACATCCAACA		
<i>icaD</i> (F)	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, (2018)
<i>icaD</i> (R)	AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA		
<i>fib</i> (F)	CTACAACACTACAATTGCCGTCACAG	405	KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, (2018)
<i>fib</i> (R)	GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC		
<i>bap</i> (F)	CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG CAC	971	DEMIR <i>et al.</i> (2020)
<i>bap</i> (R)	GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC		
<i>cna</i> (F)	AAA GCG TTG CCT AGT GGA GA	192	DEMIR <i>et al.</i> (2020)
<i>cna</i> (R)	AGT GCC TTC CCA AAC CTT TT		
<i>fnbA</i> (F)	GAT ACA AAC CCA GGT GGT GG	191	DEMIR <i>et al.</i> (2020)
<i>fnbA</i> (R)	TGT GCT TGA CCA TGC TCT TC		

Fonte: Própria autora, 2023

#### 4.5 Caracterização da produção de biofilme

A produção biofilme foi caracterizada em métodos qualitativos e quantitativos. Com caráter qualitativo a avaliação foi feita por meio de caldo com Vermelho Congo (CR) (LEE *et al.*, 2016). Nesse método os isolados foram padronizados em uma densidade óptica de 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0,1 ( $10^8$  UFC/mL) em 5 mL de caldo BHI e depois 2 mL foram adicionadas em tubos contendo caldo CR-TSB (*Tryptic Soy Broth*). Os inóculos foram então incubados a 35 °C  $\pm$  2 °C por 24h. Decorrido esse tempo, os tubos que apresentaram coloração vermelha- enegrecida foram considerados como cepas produtoras de biofilme, aqueles que

apresentaram coloração laranja foram considerados fracos produtores e aqueles com coloração amarela foram considerados não produtores.

Como cepas controle nesse experimento foram utilizadas a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como controle negativo, e *Escherichia coli* 05 e *Escherichia coli* 30 isoladas de amostras de leite de casos de mastite bovina em fazendas de laticínios localizadas em Viçosa e Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (SILVA *et al.*, 2014).

A determinação quantitativa foi realizada seguindo a metodologia de Stepanović e colaboradores com algumas adaptações (STEPANOVIĆ *et al.*, 2004). Inicialmente foi feito o pré-cultivo das amostras em tubos contendo 5 mL de caldo BHI, em seguida esses tubos foram incubados a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24h. Posteriormente o cultivo foi padronizado a uma  $\text{DO}_{600}$  de 0,1 ( $10^8$  UFC/mL) em caldo BHI, a partir dessa padronização foram feitas as culturas em meio TSB acrescido de 1% de glicose, 200  $\mu\text{L}$  da cultura foi transferida para um poço da microplaca (96 poços). Em seguida o tempo zero (T0) do cultivo celular foi avaliado a  $\text{DO}_{600}$  (Thermo Scientific Multiskan GO®). Em seguida, a microplaca foi incubada a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24h.

Após a incubação, o crescimento celular em 24h foi determinado pela  $\text{DO}_{600}$ . Em seguida, as células planctônicas foram retiradas e seguiu-se com a lavagem dos poços. Para esse processo, 220  $\mu\text{L}$  de salina (NaCl 0,9%) foram adicionados a cada poço, esse procedimento foi repetido três vezes para garantir a retirada de possíveis células planctônicas. Aguardou-se até a secagem da placa e 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de 0,2% de safranina foi adicionada em cada poço, incubando a mesma em temperatura ambiente por 40 minutos (OMMEN; ZOBOK; MEYER, 2017).

Decorrido esse tempo, o corante foi retirado e seguiu-se com um novo processo de lavagem, dessa vez realizado duas vezes, como descrito anteriormente. Após a lavagem e secagem da placa adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 95% para solubilizar a safranina aderida à matriz extracelular do biofilme. Após 15 minutos de incubação a biomassa de biofilme foi quantificada

por espectrofotometria a 530 nm. Como controle negativo foi avaliado o cultivo na ausência de células bacterianas, em meio TSB mais 1% de glicose não inoculado, foi utilizado também como controle a cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como controle negativo para não produção de biofilme. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

A partir dos valores de DOs obtidos o biofilme foi classificado em quatro categorias (Quadro 3). Primeiramente, com os valores obtidos dos controles negativos foi determinado o valor de corte, DOc, a partir da fórmula (3 x desvio padrão + média do controle negativo). Com esse valor de DOc estabeleceu-se as categorias a partir da DO obtida para o crescimento bacteriano: não aderente ( $DO \leq DOc$ ), fracamente aderente ( $DOc < DO \leq 2x DOc$ ), moderadamente aderente ( $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ ) e fortemente aderente ( $4x DOc < DO$ ) (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007).

**Quadro 3** - Classificação da aderência do biofilme

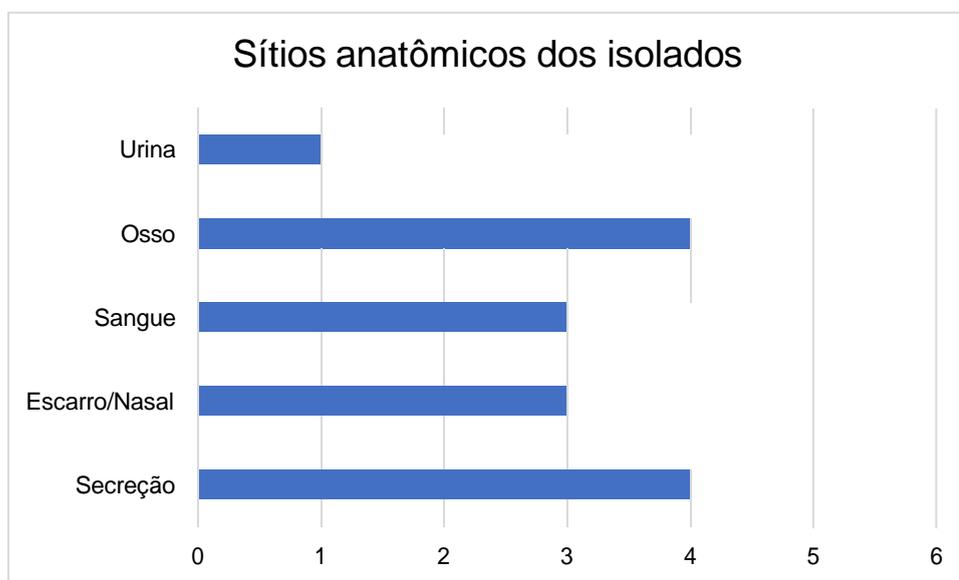
<b>Valor calculado para DOc</b>	<b>Média dos valores de DO</b>	<b>Aderência do biofilme</b>
<b><math>DO &gt; 4xDOc</math></b>	$DO > 1,152$	Fortemente
<b><math>2xDOc &lt; DO \leq 4xDOc</math></b>	$0,576 < DO \leq 1,152$	Moderadamente
<b><math>DOc &lt; DO \leq 2xDOc</math></b>	$0,288 < DO \leq 0,576$	Fracamente
<b><math>DO \leq DOc</math></b>	$DO \leq 0,288$	Não aderente

Fonte: Própria autora, 2023

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre outubro de 2022 a janeiro de 2023, 15 isolados clínicos de *S. aureus* foram identificadas pelo setor de Bacteriologia da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do HULW e armazenadas para a análise no presente estudo. Destas, 10 (67%) foram isoladas de pacientes do sexo masculino e 5 (33%) do sexo feminino. Os sítios anatômicos dos isolados variaram (Gráfico 1), sendo a maior parte das amostras provenientes de secreções diversas (n= 7).

**Gráfico 1** – Origem dos tipos de isolados clínicos de *S. aureus*



Fonte: Própria autora, 2023

Ainda sobre as amostras, a partir dos dados de antibiograma realizado pelo ULAC, 7 destas (47%) apresentaram no seu perfil de sensibilidade resistência à oxacilina, sendo então classificadas como MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*). Resultado similar ao encontrado por Saud *et al.* (2023) em um estudo que avaliou trabalhadores da área da saúde e estudantes de medicina. Esse dado representa uma preocupação para as equipes de saúde, visto que cepas MRSA são comumente associadas a um aumento da mortalidade, apresentando um potencial crítico dentro do contexto clínico.

As cepas MRSA podem ser classificadas de acordo com sua origem, comunitária ou hospitalar e o seu agravante para a sociedade é que esse tipo de resistência pode levar a um aumento da morbidade e mortalidade do paciente,

além de encarecer os custos hospitalares devido ao prolongamento do tratamento (LADE; JOO; KIM, 2022). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, em 2016, cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina já representavam 57,4% dos microrganismos encontrados nas UTIs adultos (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Para os casos de infecção causada por MRSA, os antimicrobianos de escolha são vancomicina, teicoplanina, linezolida, daptomicina (DOS SANTOS *et al.*, 2021). Além desses, a rifampicina pode ser utilizada também, mas com cautela e juntamente com a vancomicina, visando reduzir a resistência à rifampicina (CHEN *et al.*, 2022). No isolados obtidos para o presente estudo não foi identificado nenhuma amostra com resistência à vancomicina ou aos demais antibióticos escolhidos para o tratamento de MRSA o que representa um ponto positivo no tratamento destes pacientes.

Ainda em relação aos testes de susceptibilidade ao antibiótico (TSA) os resultados destes TSAs podem ser visualizados no Quadro 4.

**Quadro 4** – Antibióticos utilizados no TSA para isolados clínicos de *S. aureus*

(continua)

Antimicrobianos*	Perfil de Susceptibilidade		
	Resistente (R)	Sensível (S)	Intermediário (I)
Amicacina	0	2	0
Ampicilina/Sulbactam	6	0	0
Ceftarolina	0	5	0
Ciprofloxacino	4	0	0
<b>Clindamicina</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>0</b>
Cloranfenicol	0	1	0
Daptomicina	0	6	0
Eritromicina	5	1	0
Gentamicina	1	8	0
Levofloxacino	2	0	5
<b>Linezolida</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>0</b>
<b>Oxacilina</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>0</b>
<b>Penicilicina</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
Rifampicina	0	12	0
Sulfametoxazol+Trimetropim	2	8	0

**Quadro 4** – Antibióticos utilizados no TSA para isolados clínicos de *S. aureus*  
(conclusão)

Antimicrobianos*	Perfil de Susceptibilidade		
	Resistente (R)	Sensível (S)	Intermediário (I)
Teicoplanina	0	7	0
Tetraciclina	0	1	1
<b>Vancomicina</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>0</b>

Legenda: \* Nem todos os antimicrobianos foram testados para todas as cepas.

Fonte: Própria autora, 2023

A partir do Quadro 4 observa-se que os antimicrobianos mais testados foram Cloranfenicol, Linezolida, Oxacilina, Penicilina e Vancomicina. Desses, o que apresenta o maior índice de resistência observado é penicilina. O que pode ser explicado pelo fato desse ser o primeiro antibiótico introduzido no tratamento de infecções e que teve suas primeiras cepas de *S. aureus* produtoras de penicilinas identificadas em 1944 (LADE; JOO; KIM, 2022).

No nosso estudo foi encontrado uma resistência de 80% das cepas à penicilina, ao que foi semelhante encontrado na revisão de Bôtelho *et al.* (2022). Nessa revisão os valores de resistência encontrados variaram de 80% até 100%. Observa-se, portanto, que a escolha pela penicilina como antibiótico de escolha para tratamento de infecções de *S. aureus* vem sendo cada vez mais ineficaz por conta dessa alta resistência.

Os resultados obtidos para os ensaios de caracterização de produção e detecção de genes envolvidos na formação de biofilme para as 15 amostras de *S. aureus* estão sumarizados no Quadro 5.

**Quadro 5** – Perfil do potencial de formação de biofilme dos isolados clínicos de *S. aureus*

Amostra	Origem	CR-TSB	Biofilme (aderência)	Genes					
				<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>cna</i>	<i>fib</i>	<i>fnbA</i>	<i>bap</i>
C*	Escarro	VP	Fortemente	-	+	+	-	+	-
G	Nasal	V	Fortemente	+	+	+	+	-	-
H*	Nasal	VP	Moderadamente	+	+	+	+	+	-
K	Ossos	P	Fracamente	+	+	-	+	+	-
E*	Ossos	VP	Moderadamente	+	+	+	-	+	-
F*	Ossos	VP	Moderadamente	+	+	+	+	+	-
L	Ossos	VP	Moderadamente	+	+	+	-	+	-
I	Sangue	V	Fortemente	+	+	-	+	+	+
J	Sangue	P	Fortemente	-	-	+	+	+	-
N*	Sangue	VP	Fracamente	+	+	-	+	+	+
B*	Secreção	V	Fortemente	+	+	+	-	+	-
A	Secreção	V	Moderadamente	+	+	+	-	-	-
D	Secreção	V	Moderadamente	+	+	+	+	-	-
M*	Secreção	P	Moderadamente	+	+	+	+	-	-
O	Urina	VP	Fracamente	-	+	+	-	+	-
LM		A	Não-aderente						
Ec05		L	Fracamente						

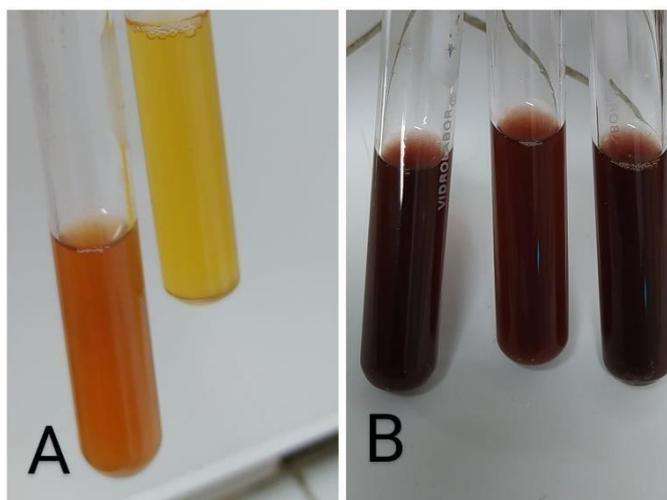
Legenda: LM (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644), Ec05 (*Escherichia coli* 05), CR-TSB (Vermelho Congo em TSB), V (Vermelho), VP (Vermelho-Preto), P (Preto), A (Amarelo), L (Laranja), + (detecção do gene), - (gene não detectado) e \* (amostras MRSA).

Fonte: Própria autora, 2023

Para a caracterização do potencial de formação de biofilme por esses isolados de *S. aureus* o primeiro teste conduzido foi o de caracterização no caldo com Vermelho Congo. O Vermelho Congo é um corante diazo secundário, cuja coloração varia de azul, em pH abaixo de 3,0, e vermelho em pH acima de 5,2 (DONADU *et al.*, 2022). No contexto do biofilme ele é muito utilizado em metodologias que visam identificar essa produção, isso porque ele detecta a produção de da matriz extracelular polimérica, também conhecida como *slime*, que é um importante fator para detecção do biofilme (RABHA *et al.*, 2021).

Nesse caso, amostras produtoras dessa matriz adquirem uma coloração vermelha-enebrecida no meio em que foi adicionado e caso sejam não produtoras adquirem coloração amarelada. Caso elas produzam um biofilme fraco a coloração adquirida é alaranjada (Figura 2).

**Figura 2** – Resultados da caracterização com Vermelho Congo



Legenda: A: Tubo laranja (*Escherichia coli* 05), tubo amarelo (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644). B: Da esquerda para direita tubos com amostra K, L e M.

Fonte: Própria autora, 2023

De acordo com os resultados, observa-se que todas as amostras de isolado clínico de *S. aureus* obtiveram uma coloração vermelha ou vermelha-preta, o que as caracteriza como formadoras de biofilme. A cepa de *Listeria monocytogenes* produziu uma coloração amarelada e foi utilizada como um controle negativo para a produção de biofilme.

Apesar de ser uma metodologia relativamente fácil de ser executada, os seus resultados podem ser variáveis e sofrer alterações a depender do meio base utilizado na preparação da solução. Até o momento, o meio base que apresentou bons resultados foi o TSB (o mesmo utilizado no presente estudo), uma vez que se observou que 100% das cepas que apresentam o gene *icaA* apresentam mudança de cor nesse método (LEE *et al.*, 2016).

No presente estudo, apenas três amostras (C, J e O) não apresentaram essa correlação entre o seu genótipo e o resultado observado no meio CR-TSB (Quadro 5). Portanto, a utilização do método em caldo com Vermelho Congo ainda carece de estudos para averiguar sua aplicabilidade e reprodutibilidade no contexto de identificação da produção de biofilme (LEE *et al.*, 2016).

Os resultados em relação à classificação do biofilme quanto à sua aderência, através do método quantitativo, foram: 47% (7/15) apresentaram biofilme moderadamente aderente, 33% (5/15) apresentaram biofilme fortemente aderente e 20% (3/15) apresentaram biofilme fracamente aderente (Quadro 5). Portanto, todas as amostras apresentam capacidade de formar biofilme. Observou-se também que as amostras provenientes de secreções e escarro/nasal tiveram seu biofilme classificado como moderadamente e fortemente aderente, enquanto amostras de sangue, urina e osso, apresentam maior variação, entre fracamente a fortemente aderente (Quadro 5).

Comparando os resultados do método de avaliação com Vermelho Congo e da safranina não foi possível estabelecer uma relação diretamente, visto que, há amostras, como a amostra K onde observamos a coloração preta no método CR-TSB enquanto a quantificação da massa de biofilme pela safranina revelou um biofilme fracamente aderente. Alguns estudos sugerem que a metodologia com Vermelho Congo apesar de ser barata e de fácil execução apresenta uma

sensibilidade e acurácia baixas, o que torna seu resultado pouco confiável para determinação de biofilme (SHARLEE e SUMANGALA, 2020; JOGI *et al.*, 2022).

A associação da classificação da aderência do biofilme à origem anatômica do isolado, uma vez que observamos que os isolados de secreção apresentam biofilme fortemente aderente, também foi observada em um outro trabalho em que se avaliou amostras de *swabs* nasais, feridas e sangue. Os autores apontaram que amostras de passagem nasal e feridas produziram biofilme mais fortes do que aqueles coletados de sangue (LESHEM *et al.*, 2022).

Segundo Piechota e colaboradores (2018), um dos motivos que podem levar a esse aumento da força de aderência do biofilme pode ser as características próprias do trato respiratório. Nesse caso, o ambiente pode exercer uma seleção que leve à predominância de cepas produtoras de biofilme mais forte, ou seja, mais aderentes. Além disso, outros fatores, como, a disponibilidade de nutrientes e a expressão gênica devem ser levados em consideração quanto à essa característica do biofilme.

Apesar de não ter sido um dos genes estudados no presente estudo, alguns artigos apontam que cepas MRSA podem estar associadas a um aumento da força do biofilme, devido a presença do gene *mecA*. Todavia, o mecanismo por trás dessa associação entre o gene *mecA* e o biofilme ainda não foi elucidado (POZZI *et al.*, 2012; LESHEM *et al.*, 2022). Em nosso estudo, verificamos que seis das sete amostras consideradas MRSA apresentaram biofilmes moderadamente/fortemente aderente, dado que corrobora com esse estudo.

Outra correlação entre a resistência à metilina e o biofilme é que cepas MRSA podem ser protegidas contra a ação de antimicrobianos caso elas produzam o biofilme durante o processo infeccioso (GOES *et al.*, 2021). Isso deve-se a estrutura do biofilme que atua retardando a difusão de antibióticos, o que leva a proteção das células planctônicas, garantindo a sua multiplicação e estabelecimento da infecção (GIMZA; CASSAT, 2021). Além disso, algumas teorias sugerem que, se o antibiótico penetra lentamente no biofilme ele pode ser inativado pela produção de enzimas (ANZABI *et al.*, 2021).

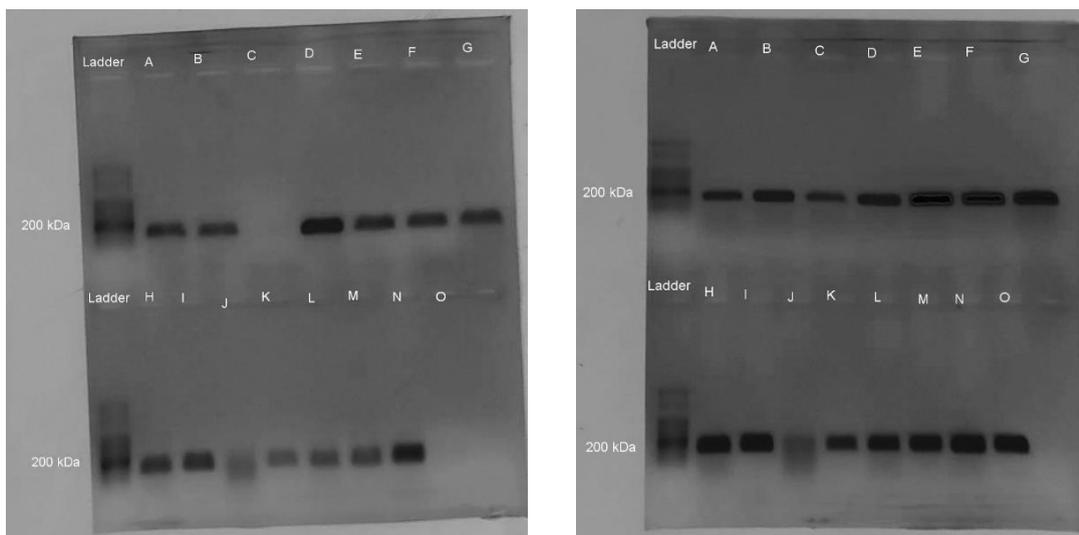
Em relação ao perfil genético observa-se que todas as amostras apresentam em seu genoma genes relacionados à formação de biofilme, dado que corrobora com o perfil fenotípico. O gene mais prevalente, dentre os isolados estudados, é o *icaD* (93% - 14/15), em segundo lugar o *icaA* (80% - 13/15) e *cna* (80% - 13/15). Considerando os sítios anatômicos dos isolados, nota-se que em secreções os genes *icaA*, *icaD* e *cna* estão presentes em todas as amostras, por outro lado, em ossos, *icaA*, *icaD* e *fnbA* estão presentes em todas as amostras. Nas amostras de escarro/nasal, os genes prevalentes foram *cna* e *icaD*, nos isolados de sangue têm-se *fib* e *fnbA*, por fim, na única amostra de urina observamos a presença dos genes *icaD*, *cna* e *fnbA*.

Os genes *icaA* e *icaD* compõem o operon *icaADBC* e estão associados a expressão de um polissacarídeo, PIA (*polysaccharide intercelular adhesin*) ou PNAG (*poly- $\beta$ -1-6-N-acetylglucosamine*). Esse polissacarídeo, por sua vez, é a molécula dominante no polissacarídeo extracelular produzido pelas bactérias do gênero *Staphylococcus* e tem sua atuação voltada para a produção do biofilme e evasão da resposta imune (NGUYEN; NGUYEN; OTTO, 2020).

O gene *icaA* é responsável pela produção da enzima *N-acetylglucosaminyl transferase*, enquanto o *icaD* contribui para a atividade enzimática do produto do gene *icaA*, assim, a expressão de apenas o *icaD* induz a uma baixa atividade enzimática. Nesse sentido, a coexpressão do *icaA* e *icaD* aumenta a atividade enzimática e está relacionada com a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (ARCIOLA; BALDASSARRI; MONTANARO, 2001).

No presente estudo foi observado a coexistência desses genes em 80% das amostras (12/15) (Figura 3) indicando que, apesar de outros genes estarem relacionados à produção de biofilme, a presença desses genes, e, conseqüentemente do polissacarídeo, é um importante mecanismo para a produção de biofilme para muitas cepas (ANZABI *et al.*, 2021). Além disso, foi analisado em nosso estudo que a coexpressão desses dois genes levou a expressão fenotípica de biofilmes moderadamente/fortemente aderente em 83% das amostras.

**Figura 3** – Amplificação dos genes *icaA* e *icaD* em isolados clínicos de *S. aureus*



Eletróforese em gel de 1,5% agarose. Da esquerda para direita Amplicon de 188 pb (*icaA*) e 198 pb (*icaD*).

Fonte: Própria autora, 2023

Ainda sobre o gene *icaD*, observamos que todos os isolados considerados MRSA's tiveram esse gene detectado (Quadro 5). Essa correlação foi relatada em um estudo que avaliou isolados clínicos de *S. aureus* em Teerã/Irã, os autores observaram que todos os isolados MRSA's possuíam os genes *icaD* e *icaC* (este não foi avaliado no presente estudo). Assim, foi sugerido uma alta prevalência desses genes em cepas MRSA's, todavia, a presença dos mesmos, ou de todos os genes do operon nem sempre estava associada com a formação do biofilme *in vitro*, o que pode indicar que a regulação do biofilme passa por diversos fatores (MIRZAEI; NAJAR PEERAYEH; GHASEMIAN, 2014).

Um outro gene avaliado no presente estudo foi o *fnbA* (*Fibronectin binding protein*), esse gene codifica uma proteína que se liga à fibronectina. Observamos que todos os isolados com origem óssea e sanguíneas apresentaram no seu genótipo esse gene. Pode-se inferir que essa relação está associada ao fato de que esse gene é importante para a invasão da bactéria no tecido ósseo. Além disso, em nosso estudo, fenotipicamente, 75% dessas amostras expressaram um biofilme moderadamente/fortemente aderente. Essa característica, contribui para a proteção da bactéria no sítio de infecção e falha na terapia antimicrobiana, podendo levar também a casos de deformação óssea (KALINKA *et al.*, 2014).

Em um estudo feito por Demir e colaboradores (2018) foi encontrado 87,5% de detecção do gene *cna* em amostras de feridas. No presente estudo, não foram utilizadas amostras de feridas, porém a porcentagem de detecção encontrada para esse gene (80%) foi bastante similar, sendo predominante em amostras de escarro/nasal, secreção e ósseas. O gene *cna* está associado a expressão de uma proteína ligante de colágeno e, portanto, é esperado que seja presente em amostras de variados sítios pelo fato do colágeno ser a proteína mais abundante no corpo humano (SHARMORADI *et al.*, 2019). Fenotipicamente, o perfil de biofilme apresentado em amostras com o gene *cna* foi próximo ao do gene *fnbA*, com 73,3% das cepas revelando um biofilme moderadamente/fortemente aderente.

Uma fonte relevante de infecções causadas por *S. aureus* são as bacteremias. Segundo alguns estudos foi sugerido que essa espécie utiliza da fibrina e do fibrinogênio recrutados por sua enzima coagulase para formar o arcabouço do biofilme na corrente sanguínea do hospedeiro. Nesse sentido o gene *fib* é um importante fator de virulência para esse tipo de infecção, já que será o responsável por codificar a expressão de uma proteína que se liga ao fibrinogênio (HAMADA *et al.*, 2021).

Em nosso estudo, esse gene foi encontrado em 60% das amostras, estando presente em todas as amostras de sangue. Esse resultado é corroborado pelo estudo de Pérez-Montarelo e colaboradores (2018), que encontrou valores entre 58%-77%. O biofilme produzido pelas amostras isoladas de sangue do referido trabalho foi classificado em 67% fortemente aderente e 33% fracamente aderente.

Por fim, o gene *bap* (*Biofilm-associated protein*) codifica uma proteína de superfície que é responsável por promover a fixação primária em superfícies inertes. Essa atuação, entretanto, é intermediada sem a presença do operon *icaADBC* (SALINA *et al.*, 2020). A porcentagem de expressão desse gene em nosso trabalho foi de 13%, mesma porcentagem encontrada por Demir e colaboradores (2020) em espécimes de feridas isoladas em Mardin, Turquia. Essa baixa detecção do gene *bap* pode ser explicada pelo fato dele não ser costumeiramente encontrado a partir de isolados humanos.

## 6 CONCLUSÃO

Diante do exposto conclui-se que o biofilme possui um importante fator na virulência das infecções por *S. aureus* e tem sua formação atrelada a vários mecanismos. O ensaio com Vermelho Congo indicou que todas as amostras de isolados clínicos de *S. aureus* são potenciais produtoras de biofilme. No entanto embora seja bastante utilizado, não se mostrou uma metodologia eficaz na correlação dos seus resultados com os resultados de classificação de aderência do biofilme, reduzindo sua aplicabilidade.

Observamos que a maior parte dos isolados apresentou um biofilme moderadamente e fortemente aderente, fator que facilita o estabelecimento da infecção e caracteriza um complicador do tratamento, além disso, essa característica de formação de biofilme pode estar atrelada à resistência à meticilina (MRSA).

No perfil genético, observou-se que para cada isolado clínico pelo menos três genes envolvidos na formação de biofilme foram detectados, os genes mais comuns correspondem aos do operon *icaABDC*, que atuam na síntese de um importante exopolímero, o gene *cna*, uma importante adesina. O que demonstra que para a regulação e formação do biofilme diferentes proteínas estão associadas.

Por fim, conclui-se que apesar do presente estudo contar com um número amostral pequeno as correlações encontradas entre o genótipo e o fenótipo de formação do biofilme são interessantes, especialmente para o contexto clínico. Dessa forma, mais estudos precisam ser conduzidos, avaliando a participação de outros genes como *eno*, *ebpS* e *mecA* atuam contribuindo para a formação do biofilme e quais as possíveis correlações genéticas e fenotípicas podem ser estabelecidas, ajudando a elucidar a formação do biofilme nos isolados clínicos de *S. aureus*.

## REFERÊNCIAS

- ALABDULLATIF, Meshari; ALZAHRANI, Ahmed. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* during storage of platelet concentrates. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 61, n.6 p. 103456, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2022.103456>.
- ÁLVAREZ, Andrea *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: Latest trends and treatments based on bacteriophages. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 12, p. e01006-19, 2019.
- ANZABI, Younes. *et al.* Comparison of the Frequency of Biofilm-Forming Genes (icaABCD) in Methicillin-Resistant *S. aureus* Strains Isolated from Human and Livestock. **Archives of Razi Institute**, v. 76, n. 6, p. 1655, 2021.
- ARCHER, Nathan K. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445–459, 2011. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>.
- ARCIOLA, Carla Renata; BALDASSARRI, Lucilla; MONTANARO, Lucio. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2151-2156, 2001
- ASTLEY, Roger *et al.* An eye on *Staphylococcus aureus* toxins: roles in ocular damage and inflammation. **Toxins**, v. 11, n. 6, p. 356, 2019.
- BANIYA, Sushmita. **Biofilm: Formation, Advantages and Disadvantages**. 2022. Disponível em: <https://microbeonline.com/biofilm/>. Acesso em 15 mai. 2023
- BÔTELHO, Evillyn Xavier *et al.* Prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em hospitais do Brasil: uma revisão integrativa de literatura, **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e2711628744-e2711628744, 2022
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998. Dispõe sobre diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1998. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616\\_12\\_05\\_1998.html](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html). Acesso em: 01 nov. 2022.
- CHEN, Jiun-Liang *et al.* Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Periprosthetic Joint Infections. **Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 719, 2022
- CHEUNG, Gordon Y C; BAE, Justin S; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021. DOI 10.1080/21505594.2021.1878688. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>.
- DEMIR, Cemil *et al.* Presence of biofilm and adhesin genes in *Staphylococcus aureus* strains taken from chronic wound infections and their genotypic and phenotypic antimicrobial sensitivity patterns. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101584, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101584>.
- DONADU, Matthew Gavino *et al.* No correlation between biofilm-forming capacity and antibiotic resistance in environmental *Staphylococcus* spp.: in vitro results. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 471, 2022.
- DOS SANTOS, Suelen Cristina Gomes *et al.* Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* no Brasil: elevada frequência de clones epidêmicos| pandêmicos, CA-MRSA e perspectivas futuras. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 35734-35751, 2021
- GAYNES, Robert. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 5, p. 849, 2017.

GIMZA, Brittney D.; CASSAT, James E. Mechanisms of antibiotic failure during *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 638085, 2021.

GOES, Isabella Carolina Rodrigues dos Santos *et al.* Prevalence of nasal carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in primary health care units in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, 2021

GRAF, Alexander C. *et al.* Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, n. 6, p. 1036–1053, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001120>.

HAMADA, Masakaze *et al.* Increased incidence and plasma-biofilm formation ability of SCC mec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from patients with bacteremia. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 602833, 2021.

IKUTA, Kevin S. *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221-2248, 2022.

JOGI, Ajay Rai *et al.* Phenotypic detection and comparison of biofilm production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **The Pharma Innovation Journal**, p. 1352-1357, 2022.

KALINKA, Julia *et al.* *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1038-1049, 2014.

KONEMAN, Elmer W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. [S. l.: s. n.], 2008. vol. 6 ed.

KOT, Barbara; SYTYKIEWICZ, Hubert; SPRAWKA, Iwona. Expression of the Biofilm-Associated Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Biofilm and Planktonic Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3487, 2018. DOI 10.3390/ijms19113487.

KOT, Barbara *et al.* Effect of manuka honey on biofilm-associated genes expression during methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Scientific reports**, v. 10, n.1, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70666-y>.

LADE, Harshad; JOO, Hwang-Soo; KIM, Jae-Seok. Molecular Basis of Non- $\beta$ -Lactam Antibiotics Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1378, 2022.

LAKHUNDI, Sahreena; ZHANG, Kunyan. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>.

LEE, Jung Su *et al.* Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. **LWT**, v. 73, p. 707–714, 1 nov. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.023>.

LESHEM, Tamar *et al.* Incidence of biofilm formation among MRSA and MSSA clinical isolates from hospitalized patients in Israel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 2, p. 922-929, 2022

LIMA, Máira F. P. *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares - Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.

MIRZAEI, Mohsen; NAJAR PEERAYEH, Shahin; GHASEMIAN, Abdol-Majid. Detection of icaABCD genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Iranian Journal of Pathology**, v. 9, n. 4, p. 257-262, 2014.

MOHAMMED, Yasser Hussein Eissa *et al.* Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. **Microbial pathogenesis**, v. 123, p. 339-347, 2018.

MURRAY, Patrick R; ROSENTHAL, Ken S; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. [S. l.: s. n.], 2014. vol. 7 ed.

NGUYEN, Hoai TT; NGUYEN, Thuan H.; OTTO, Michael. The staphylococcal exopolysaccharide PIA—Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3324-3334, 2020.

NOURBAKHS, Fahimeh; NAMVAR, Amirmorteza Ebrahimzadeh. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 11, 2016.

OMMEN, Pernille; ZOBK, Natalia; MEYER, Rikke Louise. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, p. 87-89, 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. OMS lança primeiro relatório mundial sobre prevenção e controle de infecções. **Organização Pan-Americana de Saúde**, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/6-5-2022-oms-lanca-primeiro-relatorio-mundial-sobre-prevencao-e-controle-infeccoes>. Acesso em: 6 Jul 2022.

PÉREZ-MONTARELO, Dafne *et al.* Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia: association of molecular factors with the source of infection. **Frontiers in Microbiology**, p. 2210, 2018.

PIECHOTA, Małgorzata *et al.* Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains from hospitalized patients in Poland. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

POZZI, Clarissa *et al.* Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002626, 2012.

RAAFAT, Dina *et al.* Fighting *Staphylococcus aureus* biofilms with monoclonal antibodies. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 303-322, 2019

RABHA, E. L. *et al.* Adaptation of Congo Red Agar Method and Microtiter Plate Assay to Study Biofilm Formation in *Streptomyces*. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 18, n. 1, p. 113-123, 2021.

RAVEENDRA, Nandini *et al.* Bacterial Biofilms on Tracheostomy Tubes. **Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery**, p. 1–5, 2021. DOI 10.1007/s12070-021-02598-6.

REYNOLDS, Dan; KOLLEF, Marin. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2117–2131, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>.

RODRIGUES, Damara Freitas. **Modulação de Resistência a Drogas por Furocumarinas e Furocromonas em *Staphylococcus aureus***. Orientador: José Pinto de Siqueira Júnior. 2022. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2022. Disponível em: [https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/26746/1/DamaraFreitasRodrigues\\_Dissert.pdf](https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/26746/1/DamaraFreitasRodrigues_Dissert.pdf). Acesso em: 15 mai. 2023

SALINA, Anelise *et al.* Detection of *icaA*, *icaD*, and *bap* genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* and non-aureus staphylococci isolated from subclinical and clinical

bovine mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, p. 1034–1038, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11284>.

SAUD, Bhuvan *et al.* Methicillin-Resistant and Biofilm-Producing *Staphylococcus aureus* in Nasal Carriage among Health Care Workers and Medical Students. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2023, 2023.

SHAHMORADI, Mostafa *et al.* Determining the biofilm forming gene profile of *Staphylococcus aureus* clinical isolates via multiplex colony PCR method. **Reports of biochemistry & molecular biology**, v. 7, n. 2, p. 181, 2019.

SHARLEE, Ravi; SUMANGALA, B. Detection of biofilm production among *Staphylococcus aureus* by Congo Red method and tube method. **Indian Journal of Microbiology and Research**, v. 6, n. 3, p. 222-225, 2020

SILVA, Vitor O. *et al.* Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 19, p. 6136-6145, 2014

SINGH, Utkarsha A.; KUMARI, Mukta; IYENGAR, Soumya. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. **Biological procedures online**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 2018.

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in applied microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–432, 2004. DOI 10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x.

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

SWOLANA, Denis *et al.* Sensitivity of staphylococcal biofilm to selected compounds of plant origin. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 607, 1 maio 2021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050607>.

TORRES, Giovanni *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections in Colombian dairy farms. **Heliyon**, v. 5, n. 10, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02535>.

TRABULSI, Luiz. R.; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 4.ed. [S.l]: Atheneu, 2004

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Record response to WHO's call for antimicrobial resistance surveillance reports in 2020. **World Health Organization**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/09-06-2021-record-response-to-who-s-call-for-antimicrobial-resistance-surveillance-reports-in-2020>. Acessado em: 30 nov. 2022.

YANG, Xiaowei *et al.* Drug resistance of pathogens causing nosocomial infection in orthopedics from 2012 to 2017: a 6-year retrospective study. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2021

ZHENG, Jinxin *et al.* Diclazuril Inhibits Biofilm Formation and Hemolysis of *Staphylococcus aureus*. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1690–1701, 11 jun. 2021. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.1c00030>.

ZHOU, Kaixiang *et al.* A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 7333, 2018.

# ANEXO A

CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA -  
CCS/UFPB



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Bioprospecção de moléculas com atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*

**Pesquisador:** ANGELA CAMILAORBEM MENEGATTI

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 67413822.1.0000.5188

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.016.954

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de analisar o projeto de pesquisa "Bioprospecção de moléculas com atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*" da Profa. Dra. Angela Camila Orbem Menegatti, do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Estudar a potencial atividade antimicrobiana e antibiofilme de biomoléculas frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB.

Objetivos específicos:

Coletar isolados clínicos de *S. aureus* do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB.

Identificar em isolados clínicos de *S. aureus* genes envolvidos na formação de biofilme.

Determinar o fenótipo de produção de biofilme em isolados clínicos de *S. aureus*.

Avaliar a ação de biomoléculas sob o crescimento da *S. aureus*.

Verificar a capacidade das moléculas em interferir com o biofilme em formação e consolidado.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Todos os procedimentos realizados são caracterizados como de risco mínimo, tais como:

**Endereço:** Prédio do CCS UFPB - 1º Andar  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900  
**UF:** PB **Município:** JOAO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comiteedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA -  
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 6.016.954

exposição de dados. A fim de minimizar e controlar estes riscos, o anonimato será garantido, sendo o acesso aos bancos de dados realizado exclusivamente por pesquisadores.

**Benefícios:** Os benefícios esperados, indiretamente, são contribuir com o conhecimento do perfil de formação de biofilme das cepas de *S. aureus* isoladas nos pacientes assistidos pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB, bem como promover pesquisas com o intuito de buscar novas moléculas com potencial farmacológico frente a esta bactéria.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Será um estudo observacional transversal de amostras de *S. aureus* isoladas em exames bacteriológicos e suscetibilidade a antimicrobianos obtidas pelo setor de Bacteriologia da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC), vinculada ao Hospital Universitário Lauro Wanderley/EBSERH/UFPB. As amostras clínicas procedentes de todas as enfermarias serão obtidas dos materiais coletados para os exames de rotina, analisadas de acordo com a sua procedência, mês e dados bacteriológicos, no mínimo, 20 amostras. A determinação qualitativa da produção de biofilme pelos isolados clínicos será realizada de acordo com o método do vermelho congo (CR) (LEE et al., 2016) e A determinação quantitativa da produção de biofilme será avaliada segundo a metodologia descrita por Stepanovic e colaboradores (2004) com algumas modificações (STEPANOVI et al., 2004).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto em tela se encontra bem instruído, de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que rege as pesquisas envolvendo seres humanos.

**Recomendações:**

Recomenda-se manter a metodologia proposta.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio

<b>Endereço:</b> Prédio do CCS UFPB - 1º Andar	<b>CEP:</b> 58.051-900
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária	
<b>UF:</b> PB	<b>Município:</b> JOAO PESSOA
<b>Telefone:</b> (83)3216-7791	<b>Fax:</b> (83)3216-7791 <b>E-mail:</b> comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA -  
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 6.016.954

Comitê.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2060886.pdf	23/03/2023 20:30:21		Aceito
Declaração de concordância	CARTA_3_2022_CCEN_DBM.pdf	23/03/2023 20:24:39	ANGELA CAMILA ORBEM	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_DE_EXECUCAO.pdf	23/03/2023 20:18:07	ANGELA CAMILA ORBEM	Aceito
Orçamento	Planilha_orcamentaria.pdf	23/03/2023 20:17:51	ANGELA CAMILA ORBEM	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia_HULW.pdf	23/03/2023 20:11:53	ANGELA CAMILA ORBEM MENEGETTI	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_ccen.pdf	15/02/2023 15:17:48	ANGELA CAMILA ORBEM	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termos_membros.pdf	14/12/2022 14:44:14	ANGELA CAMILA ORBEM	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_S_aureus.pdf	12/12/2022 17:16:50	ANGELA CAMILA ORBEM MENEGETTI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JOAO PESSOA, 24 de Abril de 2023

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Eliane Marques Duarte de Sousa**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Prédio do CCS UFPB - 1º Andar  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900  
**UF:** PB **Município:** JOAO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br