

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação da formação de biofilme e sua associação com características clínicas e sistemas de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus*

ANA PAULA BECKER

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação da formação de biofilme e sua associação com características clínicas e sistemas de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus*

Tese de doutorado apresentada por **Ana Paula Becker** para a obtenção de TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Co-orientador: Prof. Dr. Cicero A. G. Dias

Porto Alegre, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Diego Rodrigues Falci

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr Rodrigo Cayô da Silva

Universidade Federal de São Paulo

Becker, Ana Paula

Investigação da formação de biofilme e sua associação com características clínicas e sistemas de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* / Ana Paula Becker. -- 2017.

101 f.

Orientador: Alexandre José Macedo.

Coorientador: Cícero Dias.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. MRSA. 3. biofilme. 4. bomba de efluxo. I. Macedo, Alexandre José, orient. II. Dias, Cícero, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, prof Dr Alexandre José Macedo, primeiramente pela oportunidade de crescer durante o doutorado, mas principalmente por ser o pesquisador sensato, humano, correto, inteligente e curioso que sempre foi. Por me apoiar em todas as decisões, profissionais e pessoais, durante o doutorado mesmo que isso afetasse direta ou indiretamente o andamento do projeto. Eu não teria conseguido sem esse apoio.

Ao meu co-orientador, prof Dr Cícero Dias, por transmitir o conhecimento em microbiologia clínica desde muito tempo atrás. Pelas oportunidades de crescimento profissional e conhecimento “de bancada”. Pela calma, paciência e apoio de sempre.

Aos meus amigos. E são tantos a agradecer. Dizem que a pessoas entram na sua vida por uma razão, por uma estação, ou por uma vida inteira. Os amigos conquistados ou reconquistados no programa de pós graduação provavelmente ficarão pela minha vida inteira, mas se o destino quiser que não seja assim fico com a certeza de que cada um teve a sua razão: Dani Trentin, Fran Senger, Laura, Mari, Flávia. Os dias de pesquisa foram tão mais gratificantes com a presença de vocês.

E falando em amigos que aparecem por uma razão, não poso deixar de destacar uma pessoa em especial: Rafael Schneider. Dizem que amigos que surgem por uma razão poderão parecer uma dádiva de Deus, e são! Eles estão lá pela razão que você precisa que eles estejam lá. Eles desaparecem ou eles permanecem para a vida. Mas para sempre você tem certeza da importância dessa amizade. Obrigada Rafa!

Às amigas que da mesma forma a pós graduação uniu, porém tenho certeza que a vida teria unido de alguma forma: Odelta, o doutorado não teria sido conquistados sem tua presença. Tua amizade me deu segurança, tua alegria me contagiava nos momentos mais difíceis e tua disposição em ajudar o próximo me empurrou para frente diversas vezes. Obrigada. Muri: tua amizade e parceria no doutorado foram essenciais, em especial nos últimos anos onde passou de colega a amiga, a psicóloga, a *roomate*. Tudo foi mais fácil sabendo que sempre pude contar contigo. Essas pessoas me ensinaram

lições para a vida inteira: coisas que você deve construir para ter uma formação emocional sólida. Minha tarefa é colocar em uso tudo que aprendi com elas. Obrigada por serem parte da minha vida.

Não tenho como concluir os agradecimentos aos amigos sem citar meus colegas da UNIFRA. Não sei como me suportaram como colega professora e principalmente como coordenadora do curso durante a conclusão do doutorado. Obrigada aos colegas e curso: Bruno, Chris, Huander, Kátia, Larissa e Michele. Obrigada aos amigos interdisciplinares: Aline, Ana, Bel, Duda, Jerônimo, Light, Lê, Miti, Tiago e Topy. Todos os encontros extra classe, almoços e jantas proporcionaram ânimo para conclusão dessa etapa.

E falando em UNIFRA não posso deixar de salientar, meu amigo, colega, companheiro, Luis Ricardo Peroza. Já teria desistido diversas vezes se não fosse por você. É uma pessoa iluminada que contagia a todos a sua volta proporcionando alegria, paz, segurança. Obrigada pelo apoio profissional, pelos tantos almoços, jantas, viagens e conversas.

Obrigada aos amigos e amores que se perderam no caminho, faz parte da jornada de um doutorado.

E um mais que especial obrigada à minha família. Que orgulho que eu tenho: vocês são o meu exemplo, minha base, meu suporte. Obrigada por me apoiar incondicionalmente em tantos momentos, alegres e difíceis. Com vocês não existe sonho que não se possa realizar, aprendi a lutar pelo que eu quero até o final e se não deu certo tem somente um motivo bem simples: o fim da luta ainda não chegou. Amo vocês.

RESUMO

Staphylococcus aureus é uma bactéria que pode ser encontrada colonizando diversas partes do corpo humano, entretanto os diversos fatores de virulência que a bactéria possui, ancorados a sua superfície ou excretados para o meio extracelular, tornam essa bactéria um potencial patógeno, causando infecções de pele e tecidos moles, osteomielite, infecções respiratórias, infecções relacionadas a cateteres e outros dispositivos e bacteremia. Um dos fatores de virulência da bactéria, é a habilidade em formar biofilmes. Biofilmes são comunidades bacterianas tridimensionais complexas, que vivem organizadas e aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, embebidas em uma matriz exopolimérica. Cerca de 80% das bactérias vivem organizadas na forma de biofilme, pois nestas estruturas são menos sensíveis aos antibióticos e à resposta imune do hospedeiro. A habilidade de *S. aureus* em formar biofilme é importante pois o torna uma das principais bactérias que infecta dispositivos médicos e implantes, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes que apresentam esse tipo de infecção. Os medicamentos da classe dos β -lactâmicos eram a principal escolha para o tratamento de *S. aureus*, entretanto nos últimos anos essa bactéria adquiriu resistência a esses antimicrobianos, através da aquisição do gene *mecA*, tornando escassa as opções terapêuticas. Como se não bastasse, os biofilmes bacterianos são particularmente mais resistentes a tratamentos com antibióticos, não só devido ao aumento da transmissão de mecanismos de resistência dentro da comunidade, mas também por causa das limitações de difusão da droga colocados pela matriz extracelular, inativação de antibióticos pela alta concentração de íons de metal e baixo pH, entre outros fatores. Combinados, esses atributos tornam o biofilme bacteriano em torno de 1000 vezes mais tolerante e/ou resistente aos antimicrobianos comparado às células planctônicas. A investigação de estudos epidemiológicos para prevenção dessas infecções, bem como de novas estratégias para prevenção e tratamento de infecções por biofilmes, especialmente em isolados clínicos sabidamente multirresistentes, é urgentemente necessária. Dentre estas estratégias estão a pesquisa de diferentes mecanismos ou substâncias capazes de provocar a inibição da formação ou a erradicação do biofilme formado. Neste contexto,

os sistemas de bombas de efluxo e inibidores de bombas de efluxo representam uma fonte promissora de erradicação do biofilme formado. O principal objetivo deste estudo é investigar características clínico-epidemiológicas em isolados clínicos que estejam associadas a formação de biofilme, bem como investigar o papel de bombas de efluxo, inibidores dessas bombas e novos genes envolvidos na habilidade de isolados clínicos de *S. aureus* em formar biofilme. O capítulo 1 associa características clínicas e epidemiológicas com a habilidade de formação de biofilme. O capítulo 2 mostra o papel da adição de antimicrobianos na inibição e erradicação de biofilmes, a associação com inibidores de bomba de efluxo para melhor entender os sistemas de bomba de efluxo na capacidade desses isolados em formar biofilme e por último, novos genes que participam desse processo, em isolados clínicos de MRSA. Este estudo permite planejar ações preventivas para essas infecções relacionadas a biofilmes. Além disso, demonstra que os sistemas de bombas de efluxo parecem ser alvos promissores para erradicar infecções associadas a biofilmes bacterianos.

Palavras-Chave: biofilme; *Staphylococcus aureus*; MRSA; bomba de efluxo

ABSTRACT

Staphylococcus aureus can be found colonizing the human body, however its virulence factors anchored to its surface or secreted into the extracellular medium, makes this bacteria as a potential pathogenic, causing skin and soft tissue infections, osteomyelitis, respiratory infections, catheter-related and other devices infections and bacteremia. One of the virulence factors that bacteria produce is the ability to form biofilms. Biofilms are complex three-dimensional bacterial communities, living organized and attached on a biotic or abiotic surface, embedded in a matrix exopolimérica. About 80% of live bacteria are organized in the form of biofilms because in these structures are less sensitive to antibiotic and the host immune response. The ability of *S. aureus* to form biofilms is important because it makes it one of the main bacteria that infects medical devices and implants, increasing patient morbidity and mortality. The class of β -lactam drugs used to be main choice for the treatment of *S. aureus* infections, however in recent years the bacteria acquired resistance to these antibiotics by acquiring *mecA* gene, so therapeutic options becoming scarce. Besides that, bacterial biofilms are particularly resistant to antibiotic treatments, not only due to increased transmission resistance mechanisms within the community, but also because limitations in drug diffusion by extracellular matrix, inactivation of antibiotics due to high concentration of metal ions and low pH, and other factors. Combined, these attributes make the bacterial biofilm around 1000 times more tolerant and / or resistant to antimicrobial compared to planktonic cells. Investigation of epidemiological studies to prevent such infections, as well as new strategies for prevention and treatment of biofilm infections, especially in known multidrug-resistant clinical isolates, is urgently needed. Among these strategies we could list the different search engines or substances capable of causing or inhibiting the formation of biofilm eradication. In this context, system efflux pumps and efflux pump inhibitors represent a promising source of biofilm eradication. The aim of this study is to investigate the clinical and epidemiological characteristics in clinical isolates that are associated with biofilm formation and investigate the role of efflux pumps and inhibitors of these pumps in the ability of *S.*

aureus clinical isolates to form biofilms. The chapter 1 associates clinical and epidemiological characteristics with biofilm formation ability. Chapter 2 shows the role of the addition of antimicrobials in inhibition and eradication of biofilms, the association with efflux pump inhibitors to better understand the efflux pump systems in the ability of these isolates to form biofilm and, finally, new genes important in MRSA clinical isolates biofilm formation. This study allows planning preventive actions for these biofilm-related infections. In addition, it demonstrates that efflux pump systems appear to be promising targets for eradicating infections associated with bacterial biofilms.

Keywords: biofilm, *Staphylococcus aureus*, MRSA; efflux pump

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO.....	13
II - REVISÃO DO TEMA.....	21
II – 1. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
II – 2. Biofilmes.....	25
II – 3. Controle genético dos biofilmes bacterianos.....	30
II- 4. <i>Staphylococcus aureus</i> e resistência aos antimicrobianos.....	32
II – 5. Estratégias de combate aos biofilmes bacterianos.....	34
II – 6. Bombas de efluxo em <i>S. aureus</i>	35
II – 7. Bombas de efluxo e biofilmes bacterianos.....	40
II – 8. Inibidores de bombas de efluxo.....	41
III – OBJETIVOS.....	17
III - 1. OBJETIVO GERAL.....	18
III - 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
IV – CAPÍTULOS.....	45
IV - Capítulo 1 - Biofilm formation in clinical isolates of <i>S. aureus</i> is associated with presence of device and dissemination of bacterial infection to other sites.....	47
IV - Capítulo 2 - <i>sepA</i> gene is positively regulated in MRSA-biofilm exposed to fluoroquinolones and downregulated by efflux pump inhibitor.....	65
V - DISCUSSÃO GERAL.....	77
VI – CONCLUSÕES.....	83
VIII – REFERÊNCIAS.....	87

I - INTRODUÇÃO

A formação de biofilmes por bactérias representa um complexo problema de Saúde Pública. Recentemente, tem havido um grande interesse no papel dos biofilmes nas doenças infecciosas. O *National Institutes of Health* tem estimado que aproximadamente 80% das infecções humanas estão associadas a biofilmes patogênicos. Infecções mediadas por biofilme afetam a pele (feridas), sangue, superfícies mucosas (trato respiratório e genitourinário) e dispositivos médicos (tubos endotraqueais, cateteres intravasculares e urinários, implantes ortopédicos e *stents* arteriais) (DONLAN, 2001). No âmbito hospitalar, como reportado pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention), os biofilmes estão envolvidos em mais de 65% das infecções hospitalares. Em função da resistência inerente aos antibióticos, as infecções causadas por biofilmes podem ser fatais para pacientes imunocomprometidos (COSTERTON; VEEH, 2003).

Todos os dispositivos médicos implantados são suscetíveis a colonização por *Staphylococcus* e infecções estafilocócicas associadas a biofilme tem sido associadas com dispositivos implantados, desde cateteres até implantes de válvulas cardíacas, marca-passos, lentes de contato, cateters de derivação e próteses (DONLAN et al., 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; ZHANG; GOWARDMAN, 2015). O tecido lesionado também se torna um fator de risco para o desenvolvimento de infecções associadas a biofilmes. *S. epidermidis* e *S. aureus*, que são parte da microbiota normal da pele, são patógenos oportunistas que podem causar infecções profundas como feridas pós-operatórias (HAMMOND et al., 2011). A habilidade de *S. aureus* em formar biofilme em dispositivos médicos ou tecidos lesionados é um fator de virulência chave para esse patógeno, especialmente em hospitais e centros de assistência à saúde onde a necessidade de utilização de antimicrobianos é alta e a formação de biofilme representa um problema por permitir ao micro-organismo sobreviver mesmo na presença da droga (HOIBY et al., 2010).

Biofilmes maduros são tolerantes a agentes antimicrobianos, devido à taxa de crescimento alterada dos organismos presentes no biofilme (DONLAN et al., 2002) e surgimento de subpopulações resistentes (ITO et al., 2009). Além disso, os biofilmes também promovem a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos em

S. aureus e outros micro-organismos (SAVAGE; CHOPRA; O'NEILL, 2013). Assim, agentes que interferem na estrutura do biofilme e têm um grande potencial no tratamento de infecções causadas por biofilme.

A obtenção de amostra clínica a partir de pacientes com dispositivos médicos (tubo endotraqueal, cateteres) e o teste da habilidade de formação de biofilme nesses isolados pode ajudar a prevenir infecções persistentes e potencialmente fatais (TAJ et al., 2012).

Além disso, nas últimas décadas os esforços de pesquisa têm conduzido a avanços importantes no entendimento dos determinantes moleculares dos biofilmes microbianos. As enzimas que degradam moléculas da matriz exopolissacarídea têm sido discutidas como potenciais moléculas efetoras de estruturação do biofilme e a dispersão do biofilme (JOO; OTTO, 2013).

Outro alvo de pesquisas são as bombas de efluxo bacterianas. Estas, são as proteínas de transporte ativo que funcionam para expulsar compostos tóxicos, incluindo drogas antimicrobianas, a partir da célula. Estas bombas servem para proteger as bactérias de danos por toxinas, e podem desempenhar um papel no desenvolvimento de resistência a agentes antimicrobianos. Por exemplo, demonstrou-se que a produção de bombas de efluxo é hiperexpressa em isolados resistentes de muitas bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (PIDDOCK, 2006). Os compostos que inibem a bombas de efluxo bacterianas são de interesse devido ao seu potencial para aumentar a eficácia quando associados a antimicrobianos (BROWN et al., 2015).

No entanto, estas abordagens promissoras precisam ser clinicamente validadas. Como a nossa compreensão do mecanismo molecular da formação de biofilme e regulação segue em expansão, prevemos que estas novas abordagens serão, eventualmente, desenvolvidas para utilização no tratamento de infecções relacionadas com o biofilme problemáticas nos ambientes clínicos.

III – OBJETIVOS

III - 1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de isolados clínicos bacterianos de *Staphylococcus aureus* quanto a características epidemiológicas e formação de biofilme, bem como estudar o papel de bombas de efluxo na formação de biofilme.

III - 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a associação entre características clínicas e capacidade de formar biofilme em isolados de *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a formação de biofilme de isolados clínicos frente a concentração subinibitória de antimicrobiano e inibidor de sistemas de bombas de efluxo;
- Quantificar a expressão de genes de bombas de efluxo no biofilme de isolados clínicos tratados com antimicrobiano e inibidor de bombas de efluxo.

II - REVISÃO DO TEMA _____

II – 1. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende bactérias gram-positivas, cocóides, catalase-positivas, imóveis, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. As espécies que compõem o gênero *Staphylococcus* podem ser divididas em coagulase-positivas e coagulase-negativas. As amostras identificadas como *Staphylococcus aureus* subsp *aureus*, subespécie frequentemente referida como *S. aureus*, estão entre as amostras de estafilococos mais frequentemente isoladas de seres humanos, sendo ainda a única subespécie desse gênero, dentre as patogênicas para humanos, que produz a enzima extracelular, a coagulase, capaz de converter fibrinogênio em fibrina, causando a coagulação do plasma, fator esse usado para identificação de *S. aureus* e diferenciação dos outros tipos de estafilococos (MURRAY et al., 2003).

Os *S. aureus* são normalmente encontrados colonizando pele e membranas mucosas de humanos. Elevadas concentrações desse micro-organismo podem estar colonizando as axilas, porção anterior das narinas e o períneo. Porém, essas bactérias também podem estar distribuídas em outros sítios, como orofaringe, boca, vagina, trato intestinal e glândulas mamárias. Os *S. aureus* são oportunistas e as bactérias que colonizam podem estar envolvidas em uma série de doenças no homem, desde uma simples infecção localizada na pele, até doenças graves e disseminadas como pneumonias, meningites, carbúnculo renal, bacteremias e endocardites (MURRAY et al., 2003), demonstrando assim uma ampla versatilidade.

A versatilidade de *S. aureus* em sobreviver a resposta imune do hospedeiro e causar uma diversidade de doenças tem sido atribuída a sua habilidade de expressar um variado repertório de fatores de virulência. A patogenicidade das infecções por *S. aureus* depende da produção de proteínas de superfície que medeiam a aderência aos tecidos do hospedeiro e da secreção de uma série de toxinas extracelulares e enzimas que destroem as células e tecidos do hospedeiro, evitando ou incapacitando a defesa imune e permitindo o crescimento e disseminação da bactéria nas células do hospedeiro (LOWY, 1998).

Toxinas são proteínas secretadas por *S. aureus* para a matriz extracelular usualmente envolvidas na penetração tecidual. Essas proteínas são citolíticas e ajudam

no crescimento bacteriano por adquirir nutrientes essenciais tais como ferro a partir da lise celular. Entre as toxinas mais comuns secretadas por *S. aureus* estão: hemolisinas (toxinas que lisam eritrócitos e sua ação é usualmente mediada por receptores) (POWERS; WARDENBURG, 2014), leucotoxinas (lisam leucócitos), toxina esfoliativa (são serina proteases e o agente causador da síndrome da pele escaldada em neonatos) (BUKOWSKI; WLADYKA; DUBIN, 2010), enterotoxina (causadoras de vômitos e diarreia e uma das causas mais comuns de doenças transmitidas por alimentos, pois são termoresistentes não degradadas pelo processo de cozimento) e toxina da síndrome do choque tóxico (sigla do inglês: TSST-1, que conduz a grave morbidade e mortalidade, por exemplo em casos infecções associadas a tampões) (BERKLEY et al., 1987). Além das toxinas, os fatores de virulência estafilocócicos também incluem, enzimas e proteínas de superfície. A secreção de enzimas, tais como coagulase, proteases e estafiloquinases ajudam na evasão bacteriana das defesas do hospedeiro, bem como na invasão e penetração no tecido (KONG; NEOH; NATHAN, 2016). A maioria dessas enzimas funciona através da degradação das moléculas ou interferindo com a cascata de sinalização e vias metabólicas do hospedeiro (OTTO, 2014). Além disso, as proteínas de superfície de *S. aureus* (fatores de agregação, fibronectina, proteína A, colagenase) também ajudam na adesão bacteriana, invasão tecidual e evasão as defesas (FOSTER et al., 2014).

Além dos fatores de virulência citados, *S. aureus* também secreta uma substância de natureza polissacarídica, amorfa que se localiza externamente à cápsula bacteriana e a ela encontra-se fracamente ligada. Tal polissacarídeo apresenta a propriedade de se aderir diretamente à superfícies lisas de plásticos, agregando, em uma segunda etapa, as bactérias sob essas superfícies, o que resulta na formação do biofilme (OTTO, 2008).

É sabido que quando comparadas com cepas de estafilococos coagulase-negativos (SCon), um menor número de cepas de *S. aureus* produz biofilme *in vitro*, porém estes micro-organismos são capazes de expressar melhor tal característica *in vivo* (MAIRA-LITRÁN et al., 2002).

II – 2. Biofilmes

Biofilmes microbianos se desenvolvem quando os micro-organismos se aderem a uma superfície e produzem polímeros extracelulares que facilitam a adesão e fornecem uma matriz estrutural. Essa superfície pode ser de materiais abióticos ou tecidos vivos. Micro-organismos associados a biofilmes comportam-se de forma diferente comparados à organismos planctônicos no que diz respeito ao crescimento e habilidade de resistir a remoção mecânica e tratamentos antimicrobianos e portanto, constituem um problema de saúde pública (DONLAN, 2001).

Bactérias produtoras de biofilme são capazes de se aderir a corpos estranhos implantados no organismo, formando uma comunidade organizada de células aderentes. Biofilmes em dispositivos médicos podem ser compostos de bactérias gram-positivas ou gram-negativas ou leveduras. Bactérias comumente isoladas desses dispositivos incluem os gram-positivos *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Streptococcus viridans*; e os gram-negativos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses organismos podem se originar a partir da pele de pacientes ou de trabalhadores da saúde ou ainda de outras fontes no ambiente. Biofilmes podem ser compostos de uma única espécie ou por múltiplas espécies, dependendo do dispositivo médico e da permanência no paciente (DONLAN, 2001; DONLAN et al., 2002).

Assim como outras comunidades, os biofilmes se desenvolvem gradativamente com o passar do tempo. São cinco estágios universais no ciclo de crescimento/maturação do biofilme (Figura 1) que são universais, independente dos fenótipos dos micro-organismos (APARNA; YADAV, 2008).

(1) O primeiro estágio é a agregação que pode levar apenas alguns segundos para ser ativado. É onde as células bacterianas se fixam a um substrato em contato com um fluido e é induzido por sinais do meio ambiente. Esses sinais variam de um organismo para outro, mas incluem concentração dos nutrientes, pH, concentração de oxigênio, temperatura, osmolaridade e concentração de ferro. A transição de bactéria planctônica para biofilme ocorre em resposta a mudanças ambientais, e envolve múltiplos fatores regulatórios, que traduzem sinais que modificam a expressão de genes, mediando assim

a reorganização da célula bacteriana nessa comunidade (MONDS; TOOLE, 2009; PARSEK; SINGH, 2003). Essa reorganização celular, altera a expressão de moléculas de superfície, utilização de nutrientes, e fatores de virulência, e equipa a bactéria com um arsenal de propriedades que permitem sua sobrevivência em condições desfavoráveis (LENZ et al., 2008; ZHANG; MAH, 2008). Superfícies rugosas são mais suscetíveis à formação de biofilme devido a redução da tensão superficial e aumento da área de superfície. Estudos indicam que bactérias tendem a formar mais facilmente biofilme em materiais hidrofóbicos como teflon e outros plásticos do que em vidro e metal. Durante esse estágio, as células bacterianas exibem uma taxa de crescimento logarítmica (ANTUNES et al., 2010; APARNA; YADAV, 2008; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

(2) O segundo estágio é caracterizado como uma ligação irreversível e começa minutos depois do estágio 1. Depois de aderir a superfície epitelial, a bactéria começa a se multiplicar enquanto emitem sinais químicos que promovem uma intercomunicação entre as células bacterianas. Uma vez que a intensidade dos sinais excede um certo nível, mecanismos genéticos ativam a produção de uma matriz que é composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS do inglês: *extracellular polymeric substances*). Os sinais químicos são também capazes de capturar nutrientes e bactérias planctônicas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Nesse estágio o EPS é 90% da biomassa do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010) e agregados celulares são formados até que a motilidade diminui (APARNA; YADAV, 2008).

(3) Quando os agregados celulares tornam-se camadas com uma espessura superior a 10µm, o biofilme está no estágio 3 onde a matriz juntamente com proteínas (BRANDA et al., 2006; DIGGLE et al., 2006), pili, flagelo, outras adesinas (CEGELSKI et al., 2010; PINKNER et al., 2006), e DNA extracelular (eDNA) (GUITON et al., 2009; VILAIN et al., 2009), agem como um alicerce que estabilizam a estrutura tridimensional do biofilme. Na matriz, nutrientes estão presos para o metabolismo das bactérias que ali estão, e a água é retida por interações com polissacarídeos hidrofílicos (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Enzimas secretadas pela bactéria modificam a composição da EPS em resposta a mudanças na disponibilidade de nutrientes (GJERMANSEN et al.,

2005; SAUER et al., 2004), adequando assim a arquitetura do biofilme ao ambiente específico (SAUER et al., 2004). Assim, os componentes estruturais da matriz dão origem a uma estrutura altamente hidratada, robusta, com elevada resistência, que mantém as bactérias em estreita proximidade, permitindo interação célula a célula e troca de DNA, protegem a biomassa de dessecação, e agentes físicos e químicos que possam causar danos (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A natureza resiliente do biofilme também é, em parte, atribuída à presença de gradientes ambientais dentro da biomassa, que dão origem a sub-populações de bactérias que mostram expressão diferenciada de genes em resposta a composição nutricional do local e disponibilidade de oxigênio (DOMKA et al., 2007).

(4) Quando o biofilme alcança seu último estágio de maturação sua espessura é usualmente superior a 100µm e nesse estágio a função da matriz no hospedeiro é proteger a bactéria da exposição às defesas da resposta imune inata (tais como opsonização e fagocitose), bem como contra antimicrobianos (JEFFERSON, 2004; LEID et al., 2002). Interações entre as bactérias no biofilme podem promover a disseminação de mecanismos de resistência e fatores de virulência (VUONG et al., 2004), apresentando assim, uma maior tolerância aos agentes antimicrobianos (FRANK et al., 2007), aumento da resistência a forças físicas (incluindo as forças de tensão produzidas pelo sangue ou lavagem cirúrgica) (JEFFERSON, 2004) e uma extraordinária resistência à fagocitose (SCHOMMER et al., 2011; WAGNER et al., 2009).

(5) Durante o estágio 5, é observada a dispersão celular. Algumas das bactérias voltam ao estado planctônico e deixam o biofilme para infectar outro sítio. Isso acontece vários dias depois do estágio 4 (ANTUNES et al., 2010; APARNA; YADAV, 2008).

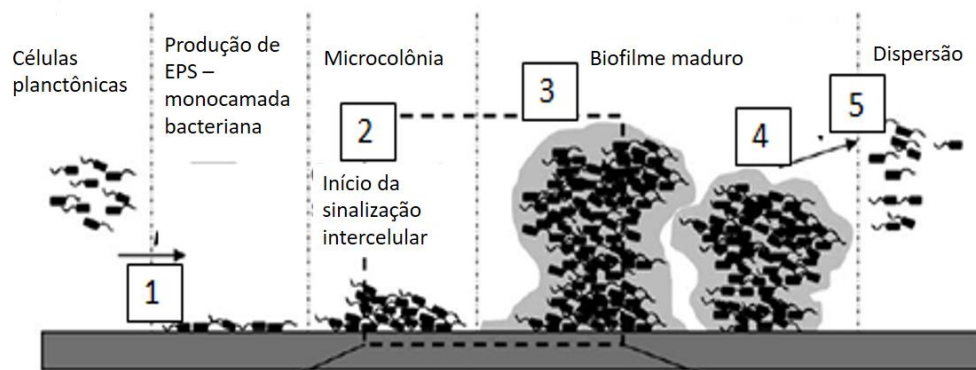


Figura 1. Esquema de formação do biofilme – adaptado de (MACEDO; ABRAHAM, 2009).

Dentre as bactérias que causam infecções associadas a dispositivos médicos, as do gênero *Staphylococcus* spp., são as mais comumente envolvidas nesses eventos (PARRA-RUIZ et al., 2012).

As infecções bacterianas agudas normalmente envolvem bactérias planctônicas e geralmente são tratáveis com antibióticos. No entanto, nos casos em que as bactérias têm sucesso na formação de biofilme no hospedeiro, a infecção frequentemente torna-se crônica (BJARNSHOLT et al., 2013). Na clínica médica, os biofilmes são cada vez mais reconhecidos como importante fator na doença humana, representando mais de 80% das infecções segundo o *US National Institute of Health* (DAVIES, 2003). Estas infecções podem ser teciduais ou associadas a dispositivos médicos, nas mais variadas regiões do corpo, conforme a figura 2.

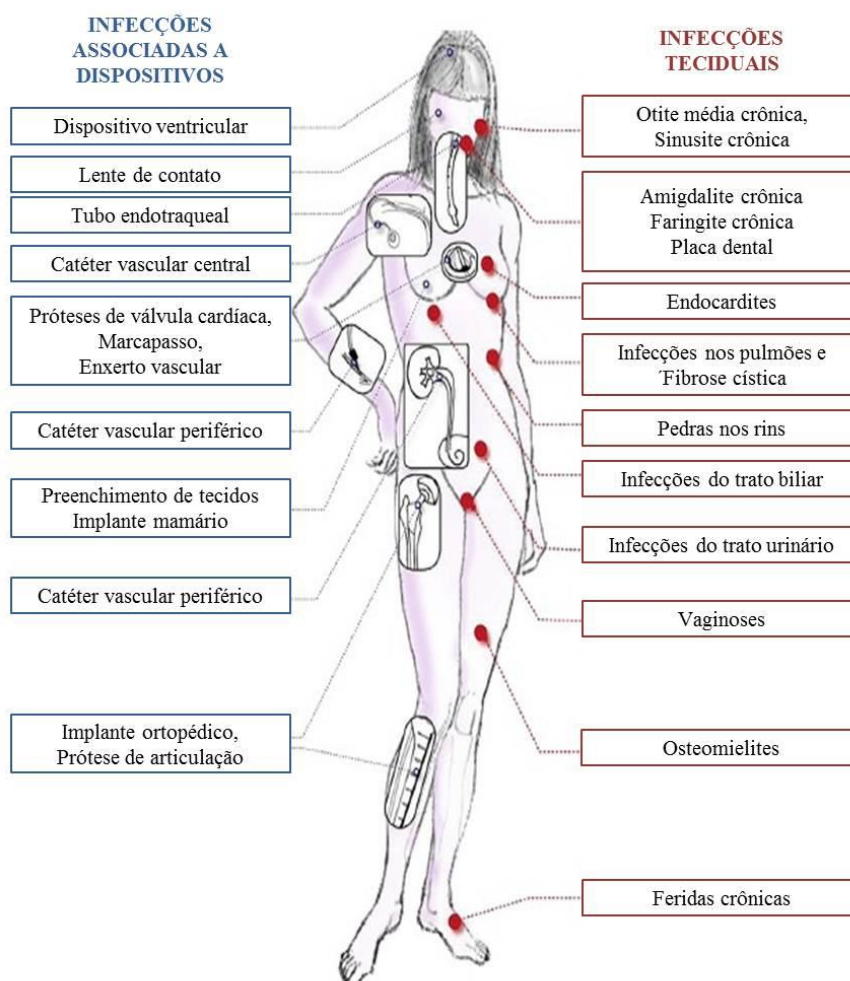


Figura 2: Típicas infecções humanas teciduais ou associadas a dispositivos causadas por biofilmes. Adaptado de HØIBY et al. (2014).

As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções associadas a biofilmes são limitadas, na maioria dos casos, à remoção do dispositivos (COSTERTON, 2005). Apesar dos avanços na compreensão das propriedades dos biofilmes e do desenvolvimento de novas tecnologias, ainda assim, tem aumentado a prevalência de mortalidade e morbidade das infecções associadas a biofilmes, bem como o custo estimado para o tratamento dessas infecções (LYNCH; ROBERTSON, 2008). Estimativas recentes apontam que o custo de uma infecção de prótese articular pode chegar a mais de 50 mil dólares por paciente e 250 milhões de dólares por ano nos

Estados Unidos (CATALDO et al., 2010). Isso destaca a necessidade urgente de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de novas infecções bacterianas relacionadas a biofilme.

II – 3. Controle genético dos biofilmes bacterianos

No segundo estágio da formação do biofilme, sinais químicos começam a promover uma intercomunicação entre as bactérias que estão no biofilme. Esse mecanismo é denominado *quorum sensing* e é considerado uma “linguagem” utilizada para comunicação intercelular, que é baseada na produção e reconhecimento de sinais químicos por pequenas moléculas chamadas auto-indutores. Quando existe uma concentração suficiente de bactérias e a concentração de moléculas autoindutoras alcançam determinado nível alto, a bactéria responde reprimindo ou ativando alvos genes (DE KIEVIT; IGLEWSKI, 2000). Os genes controladores do *quorum sensing* podem constituir aproximadamente 10% do genoma bacteriano (WAGNER et al., 2003) e desempenham um papel importante na maturação e dispersão dos biofilmes bacteriano. Apesar desses sistemas não estarem envolvidos na adesão e estágios iniciais de crescimento do biofilme, eles são necessários para o desenvolvimento e também é o principal regulador da dispersão do biofilme (SAKURAGI; KOLTER, 2007).

Muitas bactérias Gram-positivas utilizam o sistema de *quorum sensing* para controlar a expressão gênica e *S. aureus* tem servido como modelo para estudar essa sinalização bacteriana (NOVICK; GEISINGER, 2008), sendo um importante foco para o controle da formação de biofilmes. Um dos fatores que contribui para a virulência de *S. aureus* é o seu sistema de *quorum sensing* baseado em peptídeos, que de acordo com alguns autores, é codificado principalmente pelo locus gênico regulatório acessório (*agr*) (Figura 3) (ANTUNES et al., 2010; GREEN; ROLFE; SMITH, 2014). Nesse modelo de regulação do *quorum sensing* com o locus *agr* como principal regulador, a agregação ou não de mais bactérias ao biofilme, bem como a expressão de fatores de virulência, ocorre da seguinte maneira: (1) a transcrição do locus *AgrD* induz um sensor ligado a membrana (*AgrB*) a liberar peptídeos auto indutores (AIP); (2) esses peptídeos se ligam a outro sensor ligado à membrana (*AgrC*) induzindo a sua fosforilação; (3) essa

fosforilação ativa o locus *AgrA*; (4) que por sua vez ativa dois promotores: P2 e P3; (5) o promotor P3 estimula a transcrição de uma molécula efetora de RNAIII; (6) RNAIII regula expressão de fatores de virulência; (7) o promotor P2 por sua vez, será responsável pela continuidade do processo, transcrevendo outro locus *AgrD*.

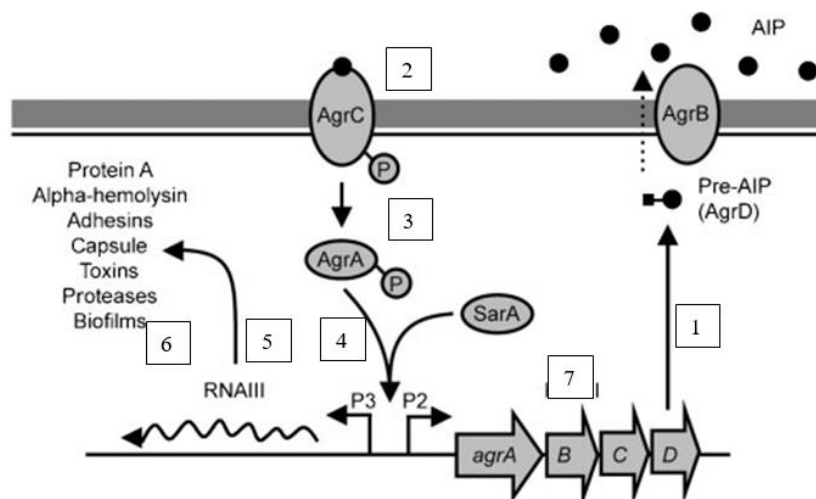


Figura 3. Modelo proposto por Antunes et. al. 2010 para regulação do *quorum sensing* em *S. aureus* onde o locus *agr* seria o principal regulador.

Além do *quorum sensing*, outro importante regulador do biofilme é o segundo mensageiro c-di-GMP, usado na transdução de sinais em uma ampla variedade de bactérias. A sinalização c-di-GMP é considerado o sistema de sinalização secundário mais complexo descoberto em bactérias. No entanto, sua complexidade varia significativamente e esse tipo de sinalização é ausente em algumas bactérias (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). Depois de se ligar a uma variedade de receptores celulares, c-di-GMP controla a transcrição, a atividade de enzimas e até o funcionamento de grandes estruturas celulares (HENGGE, 2009) e desempenha um importante papel na decisão bacteriana entre a forma de vida planctônica e de biofilme (JENAL; MALONE, 2006). Os fatores regulados por c-di-GMP e importantes para o desenvolvimento da estrutura tridimensional do biofilme são: síntese de exopolissacarídeos, adesão, secreção de DNA extracelular (eDNA), e controle da morte e motilidade celular. Tem sido provada a conexão regulatória entre *quorum sensing* e c-

di-GMP. Finalmente, pequenas moléculas e RNA não codificáveis, sRNAs, incluindo *riboswitches* (domínios complexos enovelados de RNA que servem como receptores para metabólitos específicos), tem mostrado participar na regulação genética pós transcricional em bactérias, envolvendo uma gama de processos metabólicos e adaptação ao stress (MANDIN; GUILLIER, 2013; MICHAUX et al., 2014). Além disso, reguladores de sRNA tem se tornado uma poderosa ferramenta para engenharia metabólica e biologia (KANG et al., 2014). No entanto, a quantidade de dados que apontem a função do sRNA na forma de vida de biofilme, ainda é limitada.

II- 4. *Staphylococcus aureus* e resistência aos antimicrobianos

Outra característica importante deste patógeno é a facilidade de aquisição de genes que conferem multirresistência aos antimicrobianos normalmente prescritos no tratamento de infecções associadas a esses micro-organismos (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000).

A combinação da progressiva perda da eficácia do antibiótico devido à emergência e disseminação da resistência, e o número baixo de estudos acerca de novos antimicrobianos contra patógenos multirresistentes, tem conduzido ao que chamamos de “crise de resistência aos antimicrobianos”. Dentre os patógenos mais desafiadores nesse âmbito, está o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (LEBLEBICIOGLU et al., 2016).

Desde a descoberta da penicilina em 1928, os antimicrobianos provaram um tremendo sucesso em controlar infecções bacterianas agudas (HOGAN; KOLTER, 2002). Os microbiologistas aprenderam a prever os efeitos dos antibióticos *in vivo* avaliando a concentração inibitória mínima (CIM) ou a concentração bactericida mínima (CBM) *in vitro*. CIM e CBM avaliam os efeitos dos antibióticos contra organismos planctônicos na fase de crescimento exponencial, portanto, predizem corretamente a eficácia do antibiótico contra a divisão rápida das bactérias em infecções aguda. No entanto, clínicos, que precisam lidar com infecções crônicas associadas a biofilmes, tais como infecções relacionadas a dispositivos médicos ou implantes,

frequentemente não conseguem curar seus pacientes utilizando os mesmos tratamentos (COSTERTON; VEEH, 2003). Há evidências crescentes de que as infecções relacionadas a biofilmes frequentemente resistem às mais altas taxas de concentração dos antibióticos (HOGAN; KOLTER, 2002). As infecções podem persistir por meses ou anos, resultando em sofrimento prolongado e danos aos tecidos adjacentes ao dispositivo, eventualmente com perda da função (COSTERTON; VEEH, 2003).

Os antibióticos em geral são compostos caracterizados pela alta atividade contra os micro-organismos patogênicos de baixa toxicidade para seres humanos e animais e resistentes a inativação por enzimas e fluidos do organismo. A partir de 1950, quando os antibióticos passaram a ser comumente utilizados, iniciou-se o fenômeno de resistência bacteriana (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016), desde então passou a ser um problema de importância considerável em saúde pública. Hoje em dia o desenvolvimento de certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade que temos no desenvolvimento de novas drogas. A utilização sucessiva à maioria das classes de agentes antimicrobianos, tais como penicilina, macrolídeos, aminoglicosídeos, clorofenicol, tetraciclina entre outros, passou a ser difícil para o controle de infecção estafilocócicas e o tratamento destas (GILL et al., 2005).

MRSA tem se tornado a maior causa de infecções associadas a hospital, desde a sua descoberta na Grã-bretanha em 1960, imediatamente após o antimicrobiano beta-lactâmico metilina ser introduzido para uso clínico contra *Staphylococcus spp* (JEVONS, 1961) e essas cepas bacterianas são resistentes a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (GELATTI et al., 2009; PAGANINI et al., 2009). Atualmente, mais de 60% dos isolados de *S. aureus* possuem resistência a metilina e alguns têm desenvolvido resistência aos outros diferentes agentes antimicrobianos (MORAN et al., 2012; PFALLER et al., 2001). Os isolados MRSA são um problema no mundo todo, principalmente em países em desenvolvimento, que tem dificuldades visto que opções alternativas de tratamento são escassas (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015).

Biofilmes bacterianos são particularmente resistentes a tratamentos com antibióticos, conforme já abordado, não só devido ao aumento da transmissão de

mecanismos de resistência dentro da comunidade, mas também por causa das limitações de difusão da droga colocados pela matriz extracelular, inativação de antibióticos pela alta concentração de íons de metal e baixo pH, e a presença de células *persisters*, metabolicamente inativas, que sobrevivem ao tratamento (COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2007; LEWIS, 2008). Combinados, esses atributos tornam o biofilme bacteriano em torno de 1000 vezes mais tolerante e/ou resistente aos antimicrobianos comparado às células planctônicas (HOIBY et al., 2010).

Associados, os dados expostos acima, acerca do aumento da disseminação de *S. aureus* com resistência a diversas drogas e a problemática do biofilme nesses isolados, em especial quando já está presente algum tipo de resistência, visto que dentro do biofilme essa resistência se dissemina, aumenta a necessidade de estudos sobre a habilidade de formar biofilme em isolados resistentes, bem como mecanismos e/ou estratégias de prevenção e combate para formação de biofilme em isolados clínicos.

II – 5. Estratégias de combate aos biofilmes bacterianos

Estudos tem mostrado que diferentes mecanismos anti-biofilme são capazes de modular a formação de biofilme:

(1) Estratégias para inibir a adesão microbiana: A adesão microbiana a uma superfície é um fenômeno natural e essencial para a formação do biofilme. Nos últimos anos, diversas abordagens foram desenvolvidas para reduzir a adesão microbiana, incluindo pesquisas bioquímicas, físico-químicas e biológicas (MIQUEL et al., 2016).

(2) Estratégias para inibir a maturação da estrutura do biofilme: Biofilmes jovens frequentemente são mais suscetíveis a agentes antimicrobianos comparados a biofilmes maduros (ITO et al., 2009). A grande quantidade de matriz no biofilme maduro pode agir como uma barreira à agentes antimicrobianos (ANDERL; FRANKLIN; STEWART, 2000). A alta densidade celular no biofilme maduro pode induzir a comunicação célula-célula (*quorum sensing*), que aumenta a expressão de genes que contribuem para a resistência bacteriana (DE KIEVIT; IGLEWSKI, 2000). Além disso, a competição por nutrientes pode criar subpopulações heterogêneas no biofilme maduro,

que também pode causar resistência antimicrobiana (WALTERS et al., 2003). Assim, estratégias para interferir no desenvolvimento e diferenciação (maturação) do biofilme estão sendo desenvolvidas por diversos grupos de pesquisa.

(3) Estratégias para erradicar o biofilme: A terapia antimicrobiana para erradicar infecções relacionadas a biofilmes é frequentemente ineficaz. Os mecanismos de resistência das células em biofilme aos agentes antimicrobianos variam entre os diferentes estágios do biofilme (DAVIES, 2003).

(4) Estratégias para induzir a dispersão do biofilme: É sabido que diferenças no ambiente tais como concentração de substrato de oxigênio e carbono podem desencadear a dispersão do biofilme (NEWELL et al., 2011). A dispersão do biofilme coincide com a alteração nos componentes da matriz exopolimérica, entender a modulação desses componentes e a tradução de sinais para dispersão poderia ajudar no desenvolvimento de estratégias para controle do biofilme.

II – 6. Bombas de efluxo em *S. aureus*

Uma das estratégias para erradicar o biofilme já formado, pode ser as bombas de efluxo bacterianas.

As bactérias podem usar diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, o que inclui degradação ou modificação dos antimicrobianos; alteração do alvo de ligação do antimicrobiano; proteção do alvo e redução intracelular da concentração do antimicrobiano, tanto pela redução da permeabilidade da parede bacteriana quanto pelo efluxo do antimicrobiano para fora da célula bacteriana. A resistência mediada por efluxo perdeu espaço nas pesquisas, em contraste com os outros mecanismos conhecidos. Entretanto, tem ganhado mais interesse, uma vez que reconhecemos que muitas bombas de efluxo bacteriano são capazes de expulsar várias classes não relacionadas de compostos antimicrobianos da célula, promovendo o aparecimento de fenótipos de resistência a múltiplos fármacos (PIDDOCK, 2006).

A regra fisiológica das bombas de efluxo na bactéria tem sido relatada como a eliminação endógena de metabólicos tóxicos da célula, a secreção de fatores de

virulência, e como resposta ao stress celular, especula-se que algumas drogas sejam substratos acidentais desses transportadores (PIDDOCK, 2006; POOLE, 2005).

Sistemas de efluxo bacterianos podem ser tanto específicos, expulsando somente um antimicrobiano ou uma classe de antimicrobianos, quanto bomba de efluxo multirresistentes. Essas bombas são classificadas em cinco famílias de acordo com seu requerimento energético e estrutura (Figura 4): ABC (do inglês: *ATP-binding cassettes*), MATE (do inglês: *Multidrug and Toxic compound efflux*), RND (do inglês: *resistance-nodulation cell division*), SMR: (do inglês: *small multidrug resistance family*), MEPEF (do inglês: *multiantimicrobial extrusion protein Family*), e MET (do inglês: *multidrug endosomal transporters*). As primeiras 5 famílias são encontradas em micro-organismos enquanto que a família MET é restrita a eucariotos (KOURTESI et al., 2013).

Essas bombas podem ter um importante papel no desenvolvimento da resistência a antimicrobianos. Por exemplo, tem sido mostrado que a produção de bombas de efluxo estão superexpressas (*up-regulated*) em isolados multiresistentes de diversas bactérias, incluindo MRSA (PIDDOCK, 2006).

Até o momento, mais de dez bombas de efluxo que conferem multirresistência foram descritas para *S. aureus*, codificadas tanto no cromossomo, quanto em plasmídeos (COSTA et al., 2013).

A bomba de efluxo NorA que confere multiresistência é um dos sistemas mais estudados em *S. aureus*. O gene que codifica essa bomba, é cromossômico e pertence a família MFS, sendo similar a bomba Bmr de *Bacillus subtilis* e a Tet(A) de *Escherichia coli*, que confere resistência às tetraciclinas (YOSHIDA et al., 1990). Diversos estudos mostram que NorA expulsa diversas substâncias químicas tais como fluoroquinolonas hidrofílicas (norfloxacino e ciprofloxacino), corantes como brometo de etídio e detergentes (FALCÃO-SILVA et al., 2009; NG; TRUCKSIS; HOOPER, 1994; YOSHIDA et al., 1990).

Desde os primeiros estudos em NorA, ficou evidente a ocorrência de outros sistemas de efluxo no cromossomo de *S. aureus* (KAATZ et al., 2000; KAATZ; MOUDGAL; SEO, 2002). A bomba de efluxo NorB é estruturalmente similar a bomba

de efluxo Blt e Bmr de *B. subtilis*, bem como similar com NorA e QacA de *S. aureus* e pertence a família MFS. NorB confere resistência a alguns substratos de NorA, tais como fluoroquinolonas hidrofílicas, biocidas e brometo de etídio, bem como a outras substâncias que não são substrato de NorA, tais como fluoroquinolonas hidrofóbicas (moxifloxacina) e tetraciclinas (COSTA et al., 2013).

A bomba de efluxo NorC é codificada pelo gene cromossômico *norC* que pertence a família MFS e é 61% idêntico a NorB. NorC está associado com baixos níveis de resistência a fluoroquinolonas hidrofílicas e hidrofóbicas (ciprofloxacina, moxifloxacina) e a detergentes (TRUONG-BOLDUC et al., 2006).

A bomba de efluxo MepA foi identificada em estudos com cepas mutantes de *S. aureus* sem *norA* (MCALEESE et al., 2005). MepA é codificado pelo gene cromossômico *mepA* e foi o primeiro mecanismo de transporte multidrogas da família MATE descrito em *S. aureus*. Apresenta similaridade a outros transportadores da família MATE como CdeA de *Clostridium difficile* e NorM de *Vibrio parahaemolyticus*. MepA foi associado com o fenótipo multiresistente conferindo baixos níveis de resistência a compostos quaternários de amônio tal como cloreto de benzalclônio, bem como a tigeciclina e antimicrobianos da classe das glicilciclinas. As fluoroquinolonas ciprofloxacina e norfloxacina foram demonstrados ser substratos fracos para MepA (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; MCALEESE et al., 2005).

O gene cromossômico de *S. aureus* *mdeA* que codifica a bomba de efluxo MdeA pertence a família MFS de transportadores e é similar a bomba de efluxo LmrB de *B. subtilis*, EmrB de *E. coli* e QacA de *S. aureus* (HUANG et al., 2004). A superexpressão de *mdeA* está associado ao aumento da resistência a biocidas como cloreto de benzalclônio, a corantes como brometo de etídio, e antimicrobianos como mupirocina, novobiocina e ácido fusídico. Fluoroquinolonas, norfloxacina e ciprofloxacina são substratos fracos para essa bomba de efluxo (YAMADA et al., 2006).

A proteína SepA, codificada pelo gene cromossômico *sepA*, foi identificada como uma bomba de efluxo que confere baixos níveis de resistência a compostos antissépticos, cloreto de benzalclônio, clorexidina (NARUI et al., 2002). Inicialmente esse transportador foi classificado na família SMR. No entanto, alguns genes

conservados essenciais nessa família, não estão presentes em SepA, sugerindo que SepA pertença a alguma família não identificada de transportadores (COSTA et al., 2013; NARUI et al., 2002).

SdrM é uma bomba de efluxo codificada pelo gene cromossômico *sdrM* e similar às proteínas da família MDR de bombas de efluxo, NorB e QacA. Essa bomba de efluxo está associada com baixos níveis de resistência a acriflavina, brometo de etídio e à fluoroquinolona norfloxacino (YAMADA et al., 2006).

Além dos genes descritos acima, codificados cromossomicamente, ainda existem genes de bombas de efluxo, que são codificados em plasmídeos. No início dos anos 80, um gene codificando resistência a diversos antisépticos e desinfetantes foi identificado no plasmídeo pSK1, carregado por isolados clínicos de *S. aureus* (TENNENT et al., 1985). Esse gene mais tarde foi designado *qacA*, codificando a bomba de efluxo QacA membro da família MFS (ROUCH et al., 1990). Outro determinante a resistência a antisépticos é o gene *qacB* encontrado no plasmídeo pSK23 codificando a bomba QacB e isolado a partir de isolados clínicos em 1950 (COSTA et al., 2013; PAULSEN; BROWN; SKURRAY, 1998).

A Figura 4 demonstra o resumo as 5 grandes famílias e o principal transportador dessas famílias.

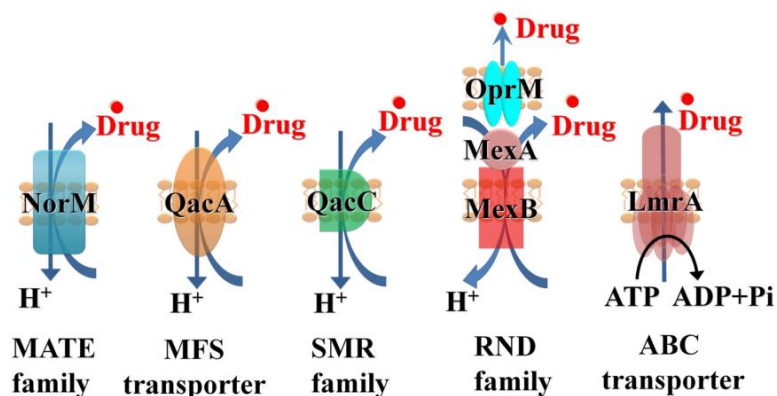


Figura 4 – Esquema dos membros chaves das 5 superfamílias de sistema de efluxo microbiano: NorM, expulsão de múltiplos antimicrobianos família MATE, QacA principal transportador família MFS, QacC transportador da família SMR, MexAB, transportador da família RND, LmrA, da família ABC de transportadores.

A superexpressão de bombas de efluxo multidrogas, podem promover resistência a diversas classes de antimicrobiano devido a sua falta de especificidade a substratos, mas também podem diminuir a suscetibilidade a biocidas, resultando num fenótipo de resistência multidroga. Além do risco de falha terapêutica, o desenvolvimento desse fenótipo de resistência pode dar origem a outros problemas como a possibilidade de resistência cruzada entre bombas e efluxo mediando resistência a antimicrobianos e biocidas, particularmente preocupante para isolados resistentes a fármacos tais como MRSA (COSTA et al., 2013).

A maioria dos estudos sobre bomba de efluxo mediando resistência em isolados clínicos de *S. aureus* usam como medida a diminuição da concentração inibitória mínima (CIM) na presença de compostos descritos como ativos em inibir efluxo, chamados inibidores de bomba de efluxo (AMARAL; VIVEIROS; KRISTIANSEN, 2006; DEMARCO et al., 2007) ou em ensaios que avaliam diretamente a atividade do efluxo, usando PCR em tempo real (VIVEIROS et al., 2010).

Ensaio de expressão de genes de bomba de efluxo revelam, que entre os isolados com aumento da atividade de efluxo, praticamente a metade (48%) tem

superexpressão de bombas de efluxo multidrogas. Dessas, 57% mostram superexpressão de uma única bomba de efluxo, mais comumente *norA* ou *mepA*, enquanto que o restante dos isolados (43%) mostram superexpressão de duas ou mais bombas de efluxo, predominantemente *norB/C* (DEMARCO et al., 2007).

II – 7. Bombas de efluxo e biofilmes bacterianos

Conforme já citado, o mecanismo de *quorum sensing* é a comunicação intercellular presente a partir do segundo estágio de formação do biofilme. Autores descreveram a relação entre o *quorum sensing* e os sistemas de bombas de efluxo. Essa sinalização é controlada pela expressão de genes específicos em resposta a sinais químicos extracelulares produzidos pelas próprias bactérias (PEARSON; VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1999). É sabido que o *quorum sensing* desempenha um papel no desenvolvimento do biofilme (PEARSON; VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1999). Os sistemas de bombas de efluxo tem sido relacionados com a regulação do *quorum sensing*, e é sabido que o *quorum sensing* controle a expressão de diversos fatores de virulência bem como a diferenciação do biofilme (KIEVIT et al., 2001). Chan e colaboradores (CHAN; CHUA, 2005) demonstraram que o processo controlado pelo *quorum sensing* como a formação de biofilme é dependente da bomba de efluxo BpeAB-OprB em *Burkholderia pseudomallei*. Em *Pseudomonas aeruginosa*, foi observado que a mutação num transportador da família RND regulou negativamente o biofilme (DIGGLE et al., 2002). Por conseguinte, um aumento na atividade da bomba de efluxo pode ter diversos efeitos na formação de biofilme através de um aumento da expulsão ou intrusão de moléculas do *quorum sensing* (HOCQUET et al., 2007).

De Kievit e Iglewski (2000) examinaram a expressão de duas bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, MexAB-OprM and MexCD-OprJ, através do curso de desenvolvimento do biofilme e verificaram a contribuição dessas bombas que codificam para multiresistência para a resistência a esses agentes na forma de vida de biofilme.

Ainda sobre *P. aeruginosa*, Zhang e colaboradores identificaram uma nova bomba de efluxo que é importante para resistência específica à certas classes de

antibióticos. A deleção completa de genes que codificam para essa bomba em um isolado ATCC resulta num aumento da sensibilidade a tobramicina, gentamicina e ciprofloxacina, especificamente em biofilme. Essa bomba de efluxo é mais expressa em células em biofilme comparadas às planctônicas (ZHANG; MAH, 2008).

Um estudo demonstrou aumento na formação de biofilme com aumento da atividade da bomba de efluxo SepA em *S. epidermidis*, e demonstrou ainda que essa bactéria requer a secreção de SepA para formação de biofilme, visto que em mutantes com deleção desse gene, a formação de biofilme foi reduzida (PAHARIK et al., 2016).

O tratamento com doses subinibitórias com agentes antimicrobianos tem demonstrado induzir a expressão de bombas de efluxo (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002) e conforme já mencionado, bombas de efluxo estão intimamente relacionadas a formação de biofilme (BAUGH et al., 2014; COSTA et al., 2013; DE KIEVIT; IGLEWSKI, 2000; LIAO; SCHURR; SAUERA, 2013; MAY; ITO; OKABE, 2009).

Visto que sistemas de bomba de efluxo parecem exercer um papel crucial no desenvolvimento da formação de biofilmes bacterianos, é importante esclarecer o papel desses sistemas em isolados clínicos de bactérias representativas como graves patógenos hospitalares, como é o caso de *S. aureus*.

II – 8. Inibidores de bombas de efluxo

A descoberta de compostos que inibem as bombas de efluxo bacterianas é promissora, visto que seu potencial aumenta a atividade do antimicrobiano (BROWN et al., 2015).

Um inibidor se baseia na habilidade dos sistemas de bombas de efluxo de mover compostos passiva ou ativamente contra um gradiente de concentração, através da membrana celular e precisa ser uma molécula capaz de agir como substrato da bomba investigada. Na presença de um inibidor de bomba de efluxo ativo, compostos tóxicos não se acumulam na célula. Reserpina, por exemplo, como um inibidor de bombas de efluxo que conferem multirresistência a antimicrobianos, parecem aumentar a

concentração de fluoroquinolonas dentro da bactéria em alguns isolados, pois se liga a bomba de efluxo responsável por remover esse produto tóxico, não permitindo a saída do antimicrobiano (KOURTESI et al., 2013).

O potencial para desenvolvimento de inibidores de bomba de efluxo de ação ampla é exemplificado pela reserpina (AESCHLIMANN et al., 1999; WANG et al., 2001), bem como por: biricodar (VX-710), timcodar (VX-853) e verapamil (AMARAL; MARTINS; VIVEIROS, 2007).

Um grande número de inibidores de bombas de efluxo, incluindo hioridazina, NMP, e PA β N mostrou reduzir a formação de biofilme e em combinação poderia abolir completamente a formação de biofilme em alguns casos (KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008).

Em *S. aureus* o sistema Nor de efluxo tem sido o mais estudado alvo de inibidores. A tabela 1 mostra os principais inibidores de bomba de efluxo para *S. aureus* com efeito sinérgico com antimicrobianos.

Tabela 1. Inibidores de bomba de efluxo para *S. aureus* com efeito sinérgico com antimicrobianos (Adaptado de Kourtesi et al. 2013)

Inibidor	Antimicrobiano com efeito sinérgico	Isolado de
4,5 ácido cafeiloquínico	Fluoroquinolonas	<i>Artemisia absinthum</i>
N-trans-feruloil 4'-O-metildopamina	Norfloxacina	Mirabilis jalapa
4 - {[[(E) -5- (3,3-dimetil-2-oxiranil) -3-metil-2-pentil] oxi} -7H-furo [3,2-g] cromen-7-ona	Norfloxacina	Óleo de <i>grape fruit</i>
Ácido galbânco	Ciprofloxacina	<i>Ferula szowitsiana</i>
Baicaleína 5, 6, 7-triidroxiflavona	Tetraciclina	<i>Thymus vulgaris L</i>
Tilirosida	Ciprofloxacina	<i>Herissantia tiubae</i>
5'-metoxiidnocarpina-D	Norfloxacina	<i>Berberis aetnensis</i>
Genisteína	Norfloxacina	<i>Lupinus argenteus</i>
Epigalocatequina galato	Tetraciclina	Chá verde
Ácido carnósico	Eritromicina	<i>Rosmarinus officinalis</i>

Diterpenos isopimarana	Tetraciclina	<i>Lycopus europaeus</i>
Ferruginol	Norfloxacin, Oxacilina	<i>C. lawsoniana</i>
Murucoidinas XII-XVI	Norfloxacin	<i>Ipomoea murucoides</i>
Orizabina XIX -IX-XV	Norfloxacin	Mexican Morning Glory Spp
Glicosídeos de resina	Fluoroquinolonas	<i>I. murucoides</i>
Tilioside	Corfloxacin, Ciprofloxacin, Ofloxacin	<i>Herissantia tiubae</i>
Piperina	Ciprofloxacin	<i>Piper nigrum</i>
Reserpina	Tetraciclina, Norfloxacin	<i>Rauwolfia vomitoria</i>
Ergotamina	Norfloxacin	<i>Claviceps purpurea</i>
Feoforbida	Ciprofloxacin	<i>Berberis aetnensis</i>
Julifloridina	Norfloxacin	<i>Prosopis juliflora</i>
Indóis, idarubicina	Ciprofloxacin	<i>Wrightia tinctoria R. Br.</i>
Éster dietílico do ácido 2,6-dimetil-4-fenil-piridina-3,5-dicarboxílico	Fluoroquinolonas	<i>Jatropha elliptica</i>

A grande maioria dos estudos envolvendo inibidores de bombas de efluxo utilizam cepas ATCC's. Torna-se importante testar o comportamento de isolados clínicos frente a esses inibidores.

Este trabalho visa avaliar os isolados clínicos de *S. aureus* quanto a formação de biofilme e sua relação com características clínico-epidemiológicas. Além disso, investigar em isolados clínicos MRSA escolhidos randomicamente: a formação de biofilme com concentrações subinibitórias de fluoroquinolona; investigar a concentração bactericida mínima de fluoroquinolona e composto quaternário de amônio necessária para erradicar o biofilme maduro; avaliar a expressão do gene *sepA* no biofilme tratado com fluoroquinolona e o efeito de inibidor de bomba de efluxo em todas essas condições.

IV - Capítulo 1 - Biofilm formation in clinical isolates of *S. aureus* is associated with presence of device and dissemination of infection

Manscrito aceito para publicação no periódico **Journal of Clinical and Diagnostic Research**

Biofilm formation in clinical isolates of *S. aureus* is associated with presence of device and dissemination of infection

Abstract

Introduction: Biofilms are complex microbial communities attached to abiotic or biotic surfaces. These communities produce their own extracellular matrix, where they interact with one another and with the environment. **Objective:** To observe the biofilm formation isolates of *Staphylococcus aureus* from South Brazil. **Materials and methods:** A total of 126 consecutive *S. aureus* isolates were collected, causing a variety of infections at a tertiary hospital from 2011 to 2014. We investigated biofilm-forming ability using a microtiter plate assay (crystal violet method) and compared the clinical characteristics and outcomes of infected patients with biofilm-forming ability. The following clinical characteristics were evaluated: presence of polymicrobial infection; presence of another microorganism (in another clinical material at the same time); recurrence of infection; presence of device and site of infection. **Results:** Biofilm forming bacteria were categorized as high producers (n = 46, 36.5%), moderate producers (n = 59, 46.8%) and weak producers or non-producers (n = 21, 16.7%). The presence of another microorganism isolated in the same day in another clinical specimen was significantly associated with biofilm-formation ($p < 0.006$) as well the presence of invasive devices ($p < 0.02$). **Conclusion:** This study allows planning medical conducts, eg the choice of appropriate antimicrobials, in patients with devices such as catheters and patients with infections at different sites in order to adequately adjust treatment of infections by biofilm-forming bacteria.

Introduction

The ability to form a biofilm is a characteristic associated with the persistence of a bacterium in an infection and it is believed that several chronic bacterial infections are related to the biofilm formation [1]. *Staphylococcus aureus* is a major cause of healthcare associated infections as well as community acquired infections and represents a significant cost in the health system. *Staphylococcus aureus* attachment to medical implants and host tissue and the establishment of a mature biofilm play an important role in the persistence of chronic infections [2].

Biofilms are defined as communities of bacteria submerged in an extracellular matrix produced by them that adheres to a biotic or abiotic surface. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are well known as major causes of chronic infection associated with biofilm formation [3].

The biofilm formation, especially on the surfaces of medical implants such as catheters, increases tolerance to antibiotic drugs and may lead to therapeutic failure [4,5].

One of the most important problems in implant infection is the general lack of epidemiological data due to the absence of studies that assess the capacity of a clinical isolate to produce biofilm and its epidemiological data. The objective of this study was to observe the biofilm-forming ability of *S. aureus* isolated from different clinical specimen by crystal violet staining and to analyze the relationship between biofilm and clinical features.

Material and Methods

This is a prospective study conducted with the permission of the hospital and since it did not use any data from the patient, did not require the approval of an ethics committee.

Isolates and growth media. The strains used for biofilm formation in microtiter plates were *S. aureus* from a variety of infections collected from May 2011 to April 2015. A total of 126 isolates were collected and only the first strain of each patient was used in the study. Clinical isolates were collected at *Mãe de Deus* hospital (about 400-bed hospital) and stored in skim milk with glycerol. Clinically information of each patient was collected from hospital records and the second isolate from each patient was not processed (it was treated as recurrence of infection). Susceptibility to antimicrobial agents was determined by minimal inhibitory concentrations (MICs) on the MicroScan WalkAway system (Siemens Healthcare, USA) according to protocols of the Clinical and Laboratory Standards Institute 2011 [6].

Biofilm formation. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* were cultured on blood agar and from their cultures a sterile NaCl suspension of about $3,0 \times 10^8$ CFU per well (reached by spectrophotometer reading at an optical density of 600 nanometers) were allowed to form biofilms overnight at 37 °C in 96-well flatbottom microplates. Biofilm formation was monitored by crystal violet staining and classified according to Stepanovic 2007 [7] as strong, moderate, weak and no biofilm formers. To classify, the optical density (OD) of each well stained with crystal violet is measured at 570 nm and the cut-off value (OD_c) should be established. It is defined as three standard deviations

(SD) above the mean OD of the negative control: $OD_c = \text{average OD of negative control} + (3 \times \text{SD of negative control})$. The isolates with OD below OD_c were classified as no biofilm producer; the isolates with OD reading average between OD_c and $2 \times OD_c$ were classified as weak biofilm formers; the isolates with mean OD reading between $2 \times OD_c$ and $4 \times OD_c$ were classified as moderate biofilm formers and the isolates with OD reading average above $4 \times OD_c$ were classified as strong biofilm formers.

Statistical analyses: Data analysis was performed using Graphpad Prism Software version 6.0. Statistical significance was assessed via Chi-square and Fisher's exact test for categorical variables and the Student t test or the Mann Whitney U test for continuous variables. Statistical significance was considered for p value of < 0.05 .

Results

One hundred twenty six clinical isolates of *Staphylococcus aureus* were collected. All clinical isolates classified as strong or moderate were considered biofilm formers, and all clinical isolates classified as weak were considered non-biofilm formers according to Stepanovic 2007. Biofilm forming bacteria were categorized as high producers ($n = 46, 36.5\%$), moderate producers ($n = 59, 46.8\%$) and weak producers or non-producers ($n = 21, 16.7\%$). After that, the clinical characteristics were compared to biofilm formers and non-formers and it is possible to verify that the presence of another microorganism, other than *S. aureus* isolated on the same day in another clinical specimen was significantly associated with biofilm-formation and this can be visualized in **Table 1** in the line "other microorganism" ($p < 0.006$). Another feature to be highlighted in Table 1 is the line "presence of invasive devices" ($p < 0.02$), even though

these devices were not the site of infection. An inverse association between biofilm and skin and soft tissue origin was observed ($p < 0.0003$). No association was found with the presence of polymicrobial infection (isolation of microorganism other than *S. aureus* at the same site of infection) recurrence of infection (same infection during hospitalization period). Also, when we evaluated the site of infection, no association was found between any site, except for skin and soft tissue infection, where there is a negative association with biofilm formers ($p 0.0003$).

TABLE 1. Summary of clinical characteristics

Characteristics	Biofilm	Biofilm	P
	formers	non-formers	
	105(83.3%)	21(16.7%)	
Age, years			
Mean ± SD	57±24	49±28	
Median	53	65	
Male	62	13	
Female	43	8	
MRSA isolates	32 (25,4%)	9 (7,14%)	0.3
Polymicrobial infection	9	2	1.0
Other microorganism ¹	27	0	0.006**
SCoN (blood)	4		
<i>E. faecalis</i> (urine)	4		
<i>P. mirabilis</i> (urine)	4		
<i>S. aureus</i> (catheter)	3		
<i>S. aureus</i> (blood)	2		
<i>C. albicans</i> (blood)	2		
<i>P. mirabilis</i> (blood)	1		
<i>S. aureus</i> (SSTI)	1		
<i>S. aureus</i> (tracheal aspirate)	1		
<i>P. mirabilis</i> (catheter)	1		
<i>E. coli</i> (urine)	1		
<i>Acinetobacter</i> spp. (blood)	1		
<i>Acinetobacter</i> spp. (urine)	1		
<i>E. faecalis</i> (catheter)	1		
Recurrence of infection	11	1	0.68
Presence of an invasive device	30	1	0.02*
Catheter	26	1	
Breast implant	3		
Endotracheal tube	1		
Site of infection			
Blood	55	10	0.81
Breast implant	3	0	1.0
Catheter tip	11	1	0.68
CSF	1	0	1.0
Nasopharyngeal	0	2	0.02*
Ocular	1	2	0.07
Sputum	2	0	1.0
Skin and Soft Tissue	6	8	0.0003***
Tracheal aspirate	13	3	0.73
Urine	6	0	0.58
Wound (cirurgic)	2	0	1.0

When we observe the antimicrobial profile of bacteria comparing biofilm formers and biofilm non-formers (**Table 2**), there is a tendency to higher resistance in biofilm-forming strains, 4.76% of isolates were resistant to all (except vancomycin) antibiotics tested. Besides this, we found a higher number of biofilm non-formers (47.62%) with susceptibility to all agents tested, compared to biofilm formers (38.10%).

Table 2. Comparison of antimicrobial susceptibilities between biofilm-forming and non-forming isolates

	Antibiotic resistance profiles	No of isolates	%	
Biofilm formers (105)	No one	40	38.10	
	OX	3	2.86	
	OX-CIP	2	1.90	
	CIP	2	1.90	
	ERI	9	8.57	
	SUT	5	4.76	
	SUT-ERI	2	1.90	
	ERI-CLI	17	16.19	
	CLI-ERI-SUT	2	1.90	
	OX-CIP-ERI	4	3.81	
	OX-CIP-CLI-ERI	14	13.33	
	All (OX-CIP-CLI-ERI-SUT) except VA	5	4.76	
	Biofilm non-formers (21)	No one	10	47.62
		OX	3	14.29
OX-CIP		1	4.76	
CIP		-	-	
ERI		-	-	
SUT		2	9.52	
SUT-ERI		-	-	
ERI-CLI		1	4.76	
CLI-ERI-SUT		-	-	
OX-CIP-ERI		1	4.76	
OX-CIP-CLI-ERI		3	14.29	
All (OX-CIP-CLI-ERI-SUT) except VA		-	-	

CIP Z ciprofloxacin; CLI Z clindamycin; OX Z oxacillin; P Z penicillin; SXT Z trimethoprim-sulfamethoxazole; TET Z tetracycline.

Discussion

Our results showed that biofilm-formation was significantly associated with the presence of another microorganism ($p < 0.006$) in other sites of infection and the presence of invasive devices ($p < 0.02$). Even though our study has not found statistically

significant differences regarding proportions of patients with polymicrobial infection or recurrence of infection being higher in biofilm-forming isolates than non-forming isolates, other authors were able to find this correlation [8].

Regarding our expectation to observe the association between biofilm and the presence of devices, it is possible to affirm that these devices perform essential life-saving functions on the one hand, while conversely they are also the leading cause of bloodstream infections[9]. It is widely known that biofilm might play a role in the pathogenesis of device-associated *S. aureus* infections. Particularly, the presence of biofilms on intravascular catheters and their role in catheter-related blood infection is widely accepted [10]. Biofilm-formation was significantly associated with the presence of invasive devices (such as catheter, breast implant and endotracheal tube) ($p < 0.02$) in our study, suggesting that biofilm infection may be the hidden focus of blood infections.

Furthermore, following the establishment of a biofilm, individual cells can detach/disperse from the original biofilm and seed new sites of infection [11]. This phenomenon represents a reservoir of dissemination of bacterial infection to other sites in the human body, as already shown by other authors [12]. Our study showed that biofilm-forming bacteria was significantly associated with the presence of another microorganism in another site of infection ($p < 0.006$). This finding corroborates with an earlier study that reported that dispersal of bacteria may explain the high rate of infection in distant sites symptomatically observed with *S. aureus* [13]. When bacteria living in the form of biofilms disperse and return to a planktonic state, dissemination to other secondary sites is possible and worsens infection, [2] and our work shows that association.

Staphylococcus aureus have become some of the most important pathogens in nosocomial infections associated with the use of catheters and other medical implants. However, because these species are part of the normal bacterial flora of human skin and mucosal surfaces, it is difficult to discern when a microbial isolate may be the cause of infection or is the result of sample contamination. It is well known that in the clinical laboratory cut-offs are used for differentiating infection from contamination with normal bacterial flora [14–16]. It is also widely accepted that the detachment rate of all species within the biofilms is not necessarily the same. Since we are working with clinical isolates, our hypothesis is that these strains may be part of normal patient microbiota and this may have contributed to the absence of correlation between polymicrobial infection in biofilm-forming isolates and non-forming isolates [17].

The presence of Skin and Soft Tissue Infection (SSTI) was significantly associated with biofilm non-formers ($p < 0.0003$) and, as far as we know, this is the first report of this association. Likewise, Qi and co-workers (2016) [18] showed that production of PSMs (phenol-soluble modulins) was higher in *S. aureus* skin and soft tissue infections (SSTI) than other sites of infection and Otto and co-workers (2013) [19] demonstrate that low PSM production causes strongly increased biofilm formation, not to mention PSMs disperse biofilm. Usually SSTI are attributed to community-associated *S. aureus* (CA-MRSA) isolates and in the last decade the number of reports of CA-MRSA isolates increased [20,21] even in nosocomial isolates [22]. The different virulence phenotypes of these two MRSA is suggested to be due to phenol-soluble modulin a (PSMa), which is encoded in the core genome. Moreover, the expression of PSMa is elevated in most prevalent CA-MRSA strains [23].

The global emergence of organisms with multiple drug resistances (MDRs) is an important factor in acute and chronic infections that leads to increased mortality rates and increased healthcare costs [24]. In addition to antibiotic resistance, the other factor that causes treatment failure and chronic and recurrent staphylococcal infections in patients is biofilm formation in these strains [25,26]. In our work, as expected, we found a higher number of biofilm non-formers (47.62%) with antimicrobial sensitivity profile, compared to biofilm formers (38.10%).

Limitations

It is difficult to demonstrate the independent effects of biofilm, since biofilm is the product of various factors, including not only bacterial factors but also host factors and this is the reason why studies with clinical isolates of the relationship of specific epidemiological characteristics and biofilm formation require further investigation. Besides this, the isolates were collected from a single hospital. Future studies with an approach in more than one health center are needed. In spite of such limitations, this work managed to associate the presence of device and dissemination of bacteria in other sites to the ability to form biofilm. The information on the capacity of a clinical isolate to produce biofilm would help to understand its virulence and provide better planning of future preventive actions.

Conclusions

This study allows planning medical conducts, eg the choice of appropriate antimicrobials, in patients with devices such as catheters and patients with infections at

different sites in order to adequately adjust treatment of infections by biofilm-forming bacteria.

References

- [1] Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol* 2007;56:1581–8. doi:10.1099/jmm.0.47331-0.
- [2] Lister JL, Horswill AR. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:178. doi:10.3389/fcimb.2014.00178.
- [3] Costerton W, Veeh R. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin ...* 2003;112:12. doi:10.1172/JCI200320365.Introduction.
- [4] O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 2007;45:1379–88. doi:10.1128/JCM.02280-06.
- [5] Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002;70:6339–45. doi:10.1128/IAI.70.11.6339.
- [6] Cockerill F, Wikler MA, Bush K, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hardy DJ, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-first informational supplement. vol. 31. 2011.
- [7] Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, ??irkovi?? I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by

- staphylococci. *Apmis* 2007;115:891–9. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- [8] Cha JO, Yoo JI, Yoo JS, Chung HS, Park SH, Kim HS, et al. Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Heal Res Perspect* 2013;4:225–32. doi:10.1016/j.phrp.2013.09.001.
- [9] Edgeworth JD, Treacher DF, Eykyn SJ. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27:1421–8. doi:10.1097/00003246-199908000-00002.
- [10] Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001;7:277–81. doi:10.3201/eid0702.700277.
- [11] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (80-) 1999;284:1318–22. doi:10.1126/science.284.5418.1318.
- [12] Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:207–28. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_10.
- [13] Fux C a, Wilson S, Stoodley P. Detachment Characteristics and Oxacillin Resistance of. *Society* 2004;186:4486–91. doi:10.1128/JB.186.14.4486.
- [14] Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977;296:1305–9. doi:10.1056/NEJM197706092962301.

- [15] el-Ebiary M, Torres a, González J, de la Bellacasa JP, García C, Jiménez de Anta MT, et al. Quantitative cultures of endotracheal aspirates for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1552–7. doi:10.1164/ajrccm/148.6_Pt_1.1552.
- [16] Blot F, Schmidt E, Nitenberg G, Tancredi C, Leclercq B, Laplanche A, et al. Earlier positivity of central-venous- versus peripheral-blood cultures is highly predictive of catheter-related sepsis. *J Clin Microbiol* 1998;36:105–9.
- [17] Donlan RM, Costerton JW, Donlan RM, Costerton JW. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol* 2002;15:167–93. doi:10.1128/CMR.15.2.167.
- [18] Qi R, Joo HS, Sharma-Kuinkel B, Berlon NR, Park L, Fu C lung, et al. Increased in vitro phenol-soluble modulins production is associated with soft tissue infection source in clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Infect* 2016;72:302–8. doi:10.1016/j.jinf.2015.11.002.
- [19] Joo H-S, Otto M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol* 2013;19:1503–13. doi:10.1016/j.chembiol.2012.10.022.Molecular.
- [20] Ribeiro A, Dias C, Silva-carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Neves R, et al. First Report of Infection with *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol* 2005;43:1985–8. doi:10.1128/JCM.43.4.1985.
- [21] Gelatti LC, Bonamigo RR, Inoue FM, do Carmo MS, Becker AP, da Silva Castrucci FM, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus carrying SCC mec type IV in southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46:34–8.
- [22] Becker AP, Cantareli VV, Rossato FCP, Inoue FM, Dias C, d’Azevedo PA. Non-Multidrug-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Infection in Health-care Facilities in Southern Brazil. *J Med Microbiol Diagnosis* 2014;3:1–5. doi:10.4172/2161-0703.1000150.
- [23] Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 2007;13:1510–4. doi:10.1038/nm1656.
- [24] McGrath EJ, Chopra T, Abdel-Haq N, Preney K, Koo W, Asmar BI, et al. An Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection in a Neonatal Intensive Care Unit: Investigation and Control. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32:34–41. doi:10.1086/657669.
- [25] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95–101. doi:10.1002/2014GB005021.
- [26] Prober H, Gibson G. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Curr Issues Intest Microbiol* 2002;3:23–7.

Key words: *Staphylococcus aureus*; biofilm production; medical device; hospital infection; bacterial dissemination.

IV - Capítulo 2 - *sepA* gene is positively regulated in MRSA-biofilm exposed to fluoroquinolones and downregulated by efflux pump inhibitor

Submetido para publicação no periódico Journal of Hospital Infection

***sepA* gene is positively regulated in MRSA-biofilm exposed to fluoroquinolones and downregulated by efflux pump inhibitor**

Ana Paula Becker^{1*}, Rafael Schneider², Cicero AG Dias², Alexandre José Macedo¹

Affiliation

¹ Faculdade de Farmácia and Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Address: Avenida Ipiranga, 2752 sala 705. City: Porto Alegre State: Rio Grande do Sul. CEP: 90610-000. Country: Brasil.

² Basic Health Sciences Department – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Address: Rua Sarmento Leite, 245 sala 205. City: Porto Alegre. State: Rio Grande do Sul. CEP 90050-170. Country: Brasil.

* Corresponding author email: anapbecker1@gmail.com Fax number: +55 51 3308 5437

Running Title: ***sepA* gene in MRSA-biofilm of clinical isolates**

Declarations of interest: none

Summary

Background: Efflux pumps appear to be essential in bacterial biofilms and have been reported as one of the mechanisms responsible for the antimicrobial resistance in biofilm structures. **Aims:** were to investigate in MRSA clinical isolates: (1) biofilm formation with fluoroquinolones sub-inhibitory concentration with and without EPI; (2) minimal bactericidal concentration of fluoroquinolone necessary to eradicate biofilm with and without EPI; and (3) expression of *sepA* gene in biofilm treated with fluoroquinolone and the effect of EPI under the same condition. **Methods:** We tested the response of MRSA clinical isolates to sub inhibitory concentrations of ciprofloxacin associated with reserpine (an efflux pump inhibitor) using staining with violet crystal followed by spectrophotometer reading. In addition, quantitative RT-PCR was performed for the efflux pumps genes. **Findings:** Biofilm formation decreased in presence of ciprofloxacin and reserpine. On the other hands expression of *sepA* gene (coding for an efflux pump) increased with ciprofloxacin and returns to control levels when biofilm was exposed to ciprofloxacin and reserpine at the same time. **Conclusion:** Theses results confirms its involvement with biofilm formation and suggest *sepA* as important target for further studies to treat mature biofilm.

Key words: *S. aureus*; biofilm; *sepA*; efflux pump

Introduction

Multidrug efflux systems have previously been suggested to be important in the intrinsic antibiotic resistance of biofilms and have shown to be involved in the ability of various bacteria species to form biofilm [1]. Due to the fact that multidrug resistant pumps play an important role in the resistance of planktonic bacteria to antimicrobial agents it seems logical that attachment to surfaces and adopting the biofilm mode of growth might be signaling cells to increase the expression of efflux pumps [2]. Several proteins in the efflux pump systems were, named NorA, NorB, NorC, MdeA, SepA [3–6] and their role in bacterial biofilm requires further investigation. In particular, SepA

is well known as a multidrug efflux pump [6] and the study of its role in bacterial biofilm is very recent as well its functions in the biofilm life cycle are not well characterized [7].

An example of antimicrobial in which efflux pumps' overexpression may also play an important role in resistant is fluoroquinolones [8]. Fluoroquinolones have been increasingly used as a treatment for infections caused by methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) in several countries [9].

Efflux pump inhibitors (EPIs) have previously been shown to decrease biofilm formation in *S. aureus* [1,4,10,11] and efflux pump inhibition activity of EPIs have previously been shown to block some types of antibiotic resistance in bacteria [1,11]. As the presence of the *sepA* gene was already related to biofilm in *S. epidermidis* [7], these facts motivated us to investigate the expression of *sepA* in clinical isolates of MRSA in biofilm eradication as a multidrug efflux pump using a fluoroquinolone with EPI. The aims of this study were to investigate in MRSA clinical isolates: (1) biofilm formation with fluoroquinolones sub-inhibitory concentration with and without EPI; (2) minimal bactericidal concentration of fluoroquinolone necessary to eradicate biofilm with and without EPI; and (3) expression of *sepA* gene in biofilm treated with fluoroquinolone and the effect of EPI under the same condition.

Methods

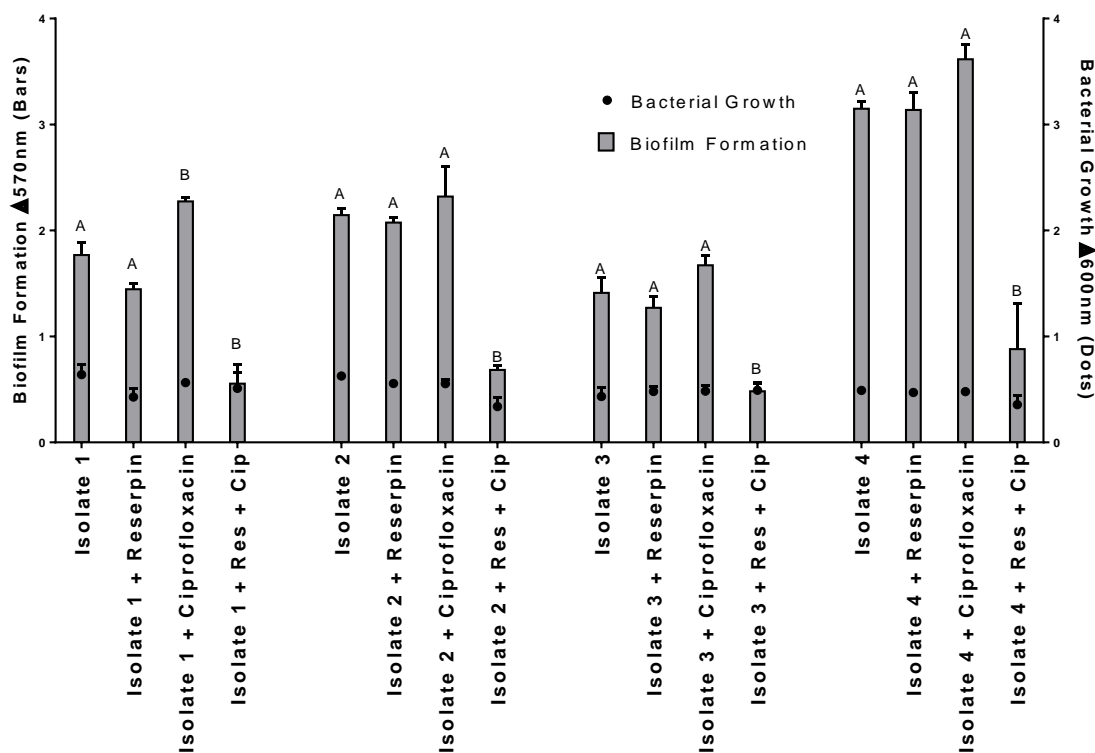
We first obtain the minimal inhibitory concentration (MIC) by broth microdilution method according CLSI 2016 to four clinical isolates of MRSA tested. With MIC data, we proceed with biofilm formation assays, using half of the MIC for each isolate. Each clinical isolate ($3,0 \times 10^8$ CFU per well) were incubated to form biofilm overnight at 37 °C in 96-well microplates with and without ciprofloxacin in sub-inhibitory concentration and with and without reserpine (EPI) (20 µg/ml). After 24h we performed crystal violet staining according previous study [12]. MTT assay (colorimetric assay for assessing cell metabolic activity) was performed in order to investigate if the reserpine could be killing bacteria (data not shown). The minimal bactericidal concentration of fluoroquinolone with or without EPI against biofilm was performed according to Frank, et. al., 2007 [13]. For RNA extraction, TRIzol method was used, following the

manufacturer's protocol and quantified by nanodrop. After extraction, 200 ng were used for treatment with DNase and cDNA synthesis. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed in triplicate using a SYBR Green qRT-PCR Kit (Applied Biosystem®) for the efflux pumps genes and data were analyzed by $2^{-\Delta Ct}$ method.

Results

The presence of EPI with ciprofloxacin decreases significantly ($p < 0.01$) the biofilm formation in all clinical isolates tested (Figure 1). As the crystal violet staining measures the global biomass present in the biofilm, MTT assay was performed to investigate if the reserpine could be killing bacteria and it is possible to verify that bacterial death is not the reason for the decrease of biofilm formation (data not shown).

Figure 1. MRSA clinical isolates exposed to sub-inhibitory concentration of ciprofloxacin (CIP) and efflux pump inhibitor (reserpine (RES) 20 $\mu\text{g/ml}$) and stained with crystal violet. Data is shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. Means with the same letter are not significantly different to control (bacteria without CIP and without RES), as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey muticomparison test.



In Table I it was possible to verify a decrease in the concentration of antimicrobial necessary to kill the MRSA (MBC: minimal bactericidal concentration) as well as to eradicate its biofilm formation (MBEC: minimal biofilm eradication concentration) because of EPI addition.

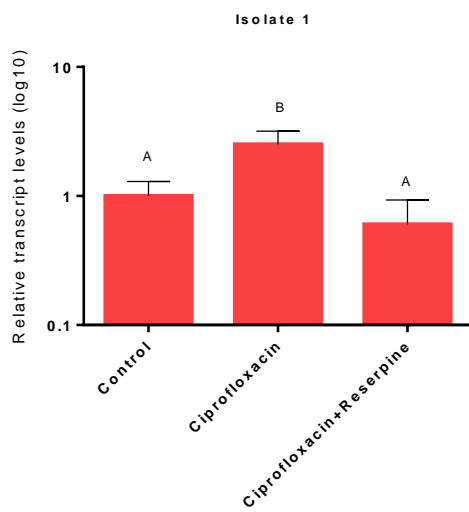
Table I. In vitro susceptibility testing and biofilm susceptibility assay of ciprofloxacin *plus* efflux pump inhibitor against MRSA clinical isolates

MRSA strains	Ciprofloxacin			
	Without EPI		With EPI	
	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MBEC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MBEC ($\mu\text{g/mL}$)
9	128	>512	64	32
10	128	>512	32	4
11	128	>512	32	8
64	128	>512	128	32

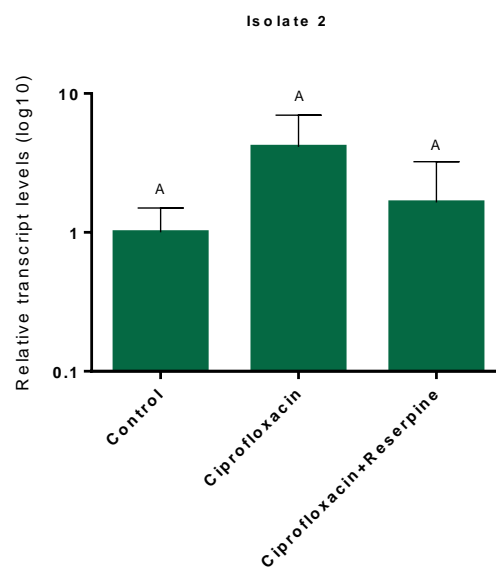
Sub-inhibitory concentrations of ciprofloxacin added to mature biofilm increased *sepA* relative transcripts levels on clinical isolates of MRSA. When mature biofilm was exposed to sub-inhibitory concentrations of ciprofloxacin as well as to an EPI, the expression of the gene returned to control levels (Figure 2).

Figure 2 (A,B,C,D). Quantitative real time RT-PCR of *sepA* gene transcripts in biofilm cells of MRSA clinical isolates exposed to sub-inhibitory concentrations of Ciprofloxacin and Ciprofloxacin + Reserpine. The measured quantity of the mRNA in each sample was normalized using *Ct* values obtained from the 16S gene ($2^{-\Delta Ct}$). Data is shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. Means with the same letter are not significantly different, as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multicomparison test.

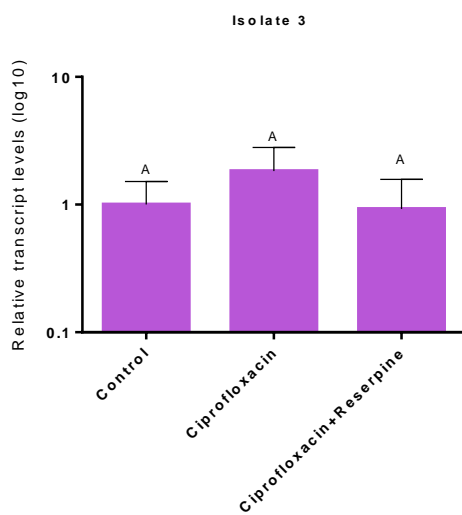
A



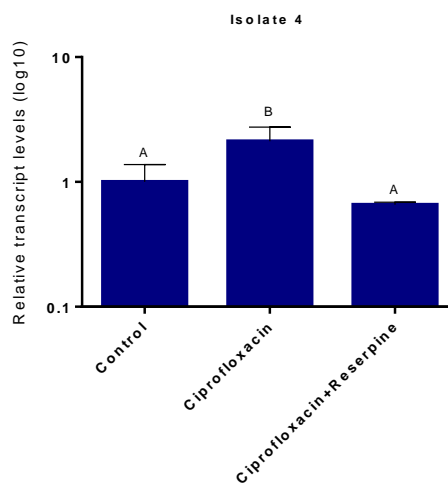
B



C



D



Discussion

A study demonstrated that the bioactive extracts of berry pomace with methicillin significantly reduced MRSA biofilm formation on plastic surface by down-regulating the expression of efflux pump including *sepA* genes [14]. In our study we could show that *sepA* is involved at least partially with MRSA-biofilm, since the decrease in its expression (when reserpine is added to ciprofloxacin - Figure 2) is correlated with the decrease of biofilm biomass (Figure 1). This is the first report of this association in *S. aureus* clinical isolates.

Our study shows that biofilm formation increases when the isolates are exposed to sub-inhibitory concentrations of ciprofloxacin and decreases when exposed to sub-inhibitory concentrations of ciprofloxacin as well as to an efflux pump inhibitor. These results associated with the decrease of gene expression with ciprofloxacin and EPI suggest *sepA* is one of the multidrug efflux genes which is probably related with biofilm formation in these isolates and supported by the previous confirmation of several studies about the necessity of the efflux pumps to maintain the bacterial biofilm [1,10,11,15–18]. Such data suggest that inhibition of the efflux pump could be a way to make the antimicrobial more effective on the mature biofilm. Together these findings shed light on an additional gene, *sepA*, which plays an important role in *S. aureus* biofilm development mechanisms that warrant further investigation.

Declarations of interest: none

- [1] Baugh S, Phillips CR, Ekanayaka AS, Piddock LJ V, Webber MA. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:673–81. doi:10.1093/jac/dkt420.
- [2] De Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000;68:4839–49. doi:10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000.
- [3] Yamada Y, Shiota S, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. Functional gene cloning and characterization of MdeA, a multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* 2006;29:801–4. doi:10.1248/bpb.29.801.
- [4] Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J* 2013;7:59–71. doi:10.2174/1874285801307010059.
- [5] Truong-bolduc QC, Strahilevitz J, David C, Hooper DC. NorC , a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus* NorC , a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus* 2006;50:1104–7. doi:10.1128/AAC.50.3.1104.
- [6] Narui K, Noguchi N, Wakasugi K, Sasatsu M. Cloning and characterization of a novel chromosomal drug efflux gene in *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1533–6. doi:10.1248/bpb.25.1533.
- [7] Paharik AE, Kotasinska M, Both A, Tra-my H, Büttne H, Roy P, et al. The metalloprotease SepA governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 2016:Epub ahead of print. doi:10.1111/mmi.13594.
- [8] Piddock LJ V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Infect Dis* 2006;19:382–402. doi:10.1128/CMR.19.2.382.
- [9] Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI, Farrington M, Fry C, Humphreys H, et al.

- Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J Hosp Infect* 2006;63 Suppl 1:S1-44. doi:10.1016/j.jhin.2006.01.001.
- [10] Trotonda MP, Tamber S, Memmi G, Cheung AL. MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2008;76:5645–54. doi:10.1128/IAI.00735-08.
- [11] Kourtesi C, Ball AR, Huang Y-Y, Jachak SM, Vera DM a, Khondkar P, et al. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. *Open Microbiol J* 2013;7:34–52. doi:10.2174/1874285801307010034.
- [12] Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, ??irkovi?? I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 2007;115:891–9. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- [13] Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:888–95. doi:10.1128/AAC.01052-06.
- [14] Salaheen S, Peng M, Joo J, Teramoto H, Butaye PR. Eradication and Sensitization of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* to Methicillin with Bioactive Extracts of Berry Pomace 2017;8:1–10. doi:10.3389/fmicb.2017.00253.
- [15] Gilbert P, Allison DG, McBain AJ. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J Appl Microbiol* 2002;92:98S–110S. doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x.
- [16] Zhang L, Mah TF. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol* 2008;190:4447–52. doi:10.1128/JB.01655-07.
- [17] Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded

in a biofilm. *Virulence* 2013;4:223–9. doi:10.4161/viru.23724.

- [18] Kvist M, Hancock V, Klemm P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:7376–82. doi:10.1128/AEM.01310-08.

A habilidade de formar biofilme é um fator de virulência bacteriano com expressiva importância no ambiente hospitalar (COSTERTON, 2005; DONLAN et al., 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). Uma das bactérias responsáveis por graves infecções associadas, tanto a ambientes hospitalares quanto a comunidade é o *Staphylococcus aureus* (GOULD, 2005; LOWY, 1998). Existe uma preocupação especial, pois ao longo dos anos o *S. aureus* adquiriu resistência aos antimicrobianos, restando poucas opções terapêuticas (EVEILLARD et al., 2004; MORAN et al., 2012). Ainda, agravando a problemática, *S. aureus* tem habilidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, tornando o quadro infeccioso mais difícil de erradicar mesmo sob concentrações do antimicrobianos, sensíveis *in vitro* (JOO; OTTO, 2013; OTTO, 2008; SAVAGE; CHOPRA; O'NEILL, 2013).

Particularmente, a presença de biofilmes em cateteres intravasculares e o seu papel na infecção relacionada com o cateter arterial é bem aceito (DONLAN, 2001). Nossos resultados apontam que a formação de biofilme foi significativamente associada com a presença de dispositivos invasivos sugerindo que a infecção no cateter pode ser o foco de outras infecções. Esta particularidade do biofilme, de aumentar infecções secundárias em outros sítios pode ser explicada pela habilidade de dispersão de células do biofilme. Num biofilme maduro polimicrobiano, algumas bactérias podem se desprender e colonizar outros locais, na forma planctônica, iniciando uma nova infecção (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Este fenômeno pode representar um reservatório de disseminação da infecção bacteriana a outros locais no corpo humano, como já demonstrado por outros autores (OTTO, 2008) e explica o achado nesse estudo, que associa a habilidade de formar biofilme com a infecção por outros micro-organismos em outros sítios, no mesmo paciente. Podemos utilizar como exemplo hipotético para explicar esse tipo de associação já provada por outros autores, um paciente com pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) que depois de alguns dias constatada a pneumonia desenvolve sepse por outro micro-organismo diferente do causador da PAV. É possível que a causa da PAV seja um biofilme polimicrobiano aderido ao tubo endotraqueal e que a bacteremia posterior a PAV seja resultado da dispersão de bactérias planctônicas (último estágio da formação do biofilme).

Apesar do biofilme ser um foco para novas infecções, em diferentes sítios, quando avaliamos infecção polimicrobiana *versus* habilidade de formar biofilme não existe associação no nosso estudo. Através desses achados, podemos supor que as células individuais que se dispersam do biofilme podem originar novas infecções, mas que, clinicamente pode existir uma dificuldade de diagnóstico de um biofilme multiespécie.

É sabido por décadas que bactérias associadas a biofilme toleram agentes antimicrobianos, detergentes e biocidas muito melhor do que as células planctônicas e existem relatos de que sistemas de bomba de efluxo podem estar associados, pelo menos parcialmente, a essa tolerância (KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008). Nosso achado mostra que concentrações subinibitórias de fluoroquinolonas podem estimular a formação de biofilme. Ressaltamos que esses resultados, quanto ao papel das bombas de efluxo em *S. aureus* é o primeiro com isolados clínicos.

Inibidores de bomba de efluxo são substâncias que inibem o fluxo de substâncias para fora das células, mediados por essas bombas. Estas bombas de efluxo são considerados alvos de medicamentos importantes para o desenvolvimento de estratégias de combinação utilizando inibidores e antibióticos (LOMOVSKAYA; WATKINS, 2001; MOHAMED; HUANG, 2007). Alguns estudos observaram que a adição destes compostos reduziu de forma significativa a formação de biofilme em várias bactérias (KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008). Em nosso estudo, a adição de inibidor de bomba de efluxo associada com o antimicrobiano da classe das quinolonas mostraram redução significativa na formação de biofilme. Corroborando com os estudos que demonstram a necessidade das bombas de efluxo para manutenção do biofilme, observamos uma tendência a diminuição quando adicionado um inibidor de bomba de efluxo da expressão de um gene (*sepA*) que codifica para uma bomba de efluxo multidroga. A importância desse gene para o biofilme somente foi relatada até então para *S. epidermidis*. Este é o primeiro relato para *S. aureus*.

Este fenômeno pode ser explicado como um problema de gerenciamento de resíduos por parte da bactéria, uma vez que o sistema de bomba de efluxo desempenha

um papel importante na remoção de substâncias tóxicas do biofilme maduro (KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008).

Apesar da necessidade de estudos futuros, a associação da habilidade de isolados clínicos de *S. aureus* formar biofilme com a presença de um dispositivo (como cateter) e com a possibilidade de desenvolver outra infecção em outro sítio, permite planejar ações preventivas para essas infecções.

Além disso, os sistemas de bombas de efluxo parecem ser alvos promissores para erradicar infecções associadas a biofilmes bacterianos. Este estudo constata que a inibição de bombas de efluxo em isolados clínicos MRSA associado com um antimicrobiano diminui drasticamente a formação de biofilme provavelmente por competição de ligação ao receptor da bomba, uma vez que o inibidor está ligado à bomba, o antimicrobiano que estava sendo expulso por ação da bomba, consegue atingir a bactéria mesmo em concentrações subinibitórias como as testadas no estudo. Os dados ainda sugerem que um dos genes envolvidos nessa regulação em isolados clínicos MRSA seja *sepA*, visto que sua transcrição aumenta quando somente o antimicrobiano é adicionado ao biofilme formado e, por sua vez, sua transcrição retorna aos níveis do controle quando além do antimicrobiano é adicionado o inibidor da bomba de efluxo.

Este é o primeiro relato acerca do envolvimento da bomba de efluxo SepA codificada pelo gene cromossômico *sepA* em isolados de *S. aureus*, e certamente instiga a estudos futuros.

VI – CONCLUSÕES

Estudos com isolados clínicos com características epidemiológicas específicas em busca de alguma associação com a formação de biofilme ajuda a compreender a sua virulência e proporcionar um melhor planejamento da prevenção. Quanto maior o número de evidências dessas associações, melhor o prognóstico futuro.

Podemos concluir, a partir do artigo 1, que é necessário um maior cuidado com um paciente com infecção relacionada a cateter, visto que neste trabalho e em diversos outros podemos verificar uma associação entre presença de dispositivo e formação de biofilme. Além disso, a possibilidade desse paciente desenvolver uma infecção secundária em outro sítio, de acordo com nossos dados, é maior.

O artigo 2, por outro lado, mostra que concentrações subinibitórias de antimicrobiano estimulam a formação de biofilme e a expressão de um gene de bomba de efluxo em isolados clínicos de MRSA, que a inibição química de bombas de efluxo resulta em repressão da formação de biofilme e que a partir da inibição química das bombas de efluxo com reserpina, há uma diminuição na expressão do gene *sepA* de bomba de efluxo.

Os mecanismos que levam ao aumento dessa expressão da bomba de efluxo nos isolados clínicos, pode, ser: (1) mutação no gene repressor, (2) mutação no gene regulador, (3) mutação na região promotora do gene transportador, (4) inserção e elementos no gene transportador (PIDDOCK, 2006).

Portanto, a inibição do efluxo pode ser considerada uma estratégia promissora antibiofilme associada ao tratamento com antimicrobianos e a bomba *SepA* um alvo em isolados MRSA.

AESCHLIMANN, J. R. et al. Effects of NorA inhibitors on in vitro antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 335–340, 1999.

AMARAL, L.; MARTINS, M.; VIVEIROS, M. Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 1237–1246, 2007.

AMARAL, L.; VIVEIROS, M.; KRISTIANSEN, J. E. “Non-Antibiotics”: alternative therapy for the management of MDRTB and MRSA in economically disadvantaged countries. **Current drug targets**, v. 7, n. 7, p. 887–891, 2006.

ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1818–1824, 2000.

ANTUNES, L. C. M. et al. Quorum sensing in bacterial virulence. **Microbiology**, v. 156, n. 8, p. 2271–2282, 2010.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.

BAUGH, S. et al. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 673–681, 2014.

BERKLEY, S. F. et al. The relationship of tampon characteristics to menstrual toxic shock syndrome. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 258, n. 7, p. 917–20, 1987.

BJARNSHOLT, T. et al. The in vivo biofilm. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 9, p. 466–474, 2013.

BRANDA, S. S. et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm

matrix. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1229–1238, 2006.

BROWN, A. R. et al. A mass spectrometry-based assay for improved quantitative measurements of efflux pump inhibition. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–12, 2015.

BUKOWSKI, M.; WLADYKA, B.; DUBIN, G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1148–1165, 2010.

CATALDO, M. A. et al. Prosthetic joint infection: recent developments in diagnosis and management. **The Journal of infection**, v. 61, n. 6, p. 443–8, 2010.

CEGELSKI, L. et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. **National Institutes of Health**, v. 5, n. 12, p. 913–919, 2010.

CHAN, Y. Y.; CHUA, K. L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB Efflux Pump: Expression and Impact on Quorum Sensing and Virulence The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB Efflux Pump: Expression and Impact on Quorum Sensing and Virulence. **Society**, v. 187, n. 14, p. 4707–4719, 2005.

CHESSA, D.; GANAU, G.; MAZZARELLO, V. An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. **Journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 6, p. 547–50, 2015.

COSTA, S. S. et al. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. **The open microbiology journal**, v. 7, n. SPEC.ISSUE.1, p. 59–71, 2013.

COSTERTON, J. W. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 437, p. 7–11, 2005.

COSTERTON, J. W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Bacterial communications in implant infections: A target for an intelligence war. **International Journal of Artificial Organs**, v. 30, n. 9, p. 757–763, 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

COSTERTON, W.; VEEH, R. The application of biofilm science to the study

and control of chronic bacterial infections. **Journal of clinical ...**, v. 112, n. 10, p. 12, 2003.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–22, 2003.

DE KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4839–4849, 2000.

DEMARCO, C. E. et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3235–3239, 2007.

DIGGLE, S. P. et al. Advancing the Quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the Regulation of N -Acylhomoserine Lactone Production and Virulence Gene Expression. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 10, p. 2576–2586, 2002.

DIGGLE, S. P. et al. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 1095–1104, 2006.

DOMKA, J. et al. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 2, p. 332–346, 2007.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277–281, 2001.

DONLAN, R. M. et al. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

EVEILLARD, M. et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees: prevalence, duration, and transmission to households. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 25, n. 0899–823X (Print), p. 114–120, 2004.

FALCÃO-SILVA, V. S. et al. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phyther. Res.**, v. 23, n. 10, p. 1367–1370, 2009.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews.**

Microbiology, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 12, n. 1740–1534 (Electronic), p. 49–62, 2014.

FRANK, K. L. et al. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 888–895, 2007.

GELATTI, L. C. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501–506, 2009.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. s1, p. 98S–110S, 2002.

GILL, S. R. et al. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 7, p. 2426–2438, 2005.

GJERMANSEN, M. et al. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. **Environ Microbiol**, v. 7, n. 6, p. 894–906, 2005.

GOULD, I. M. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, n. 4, p. 277–282, 2005.

GREEN, J.; ROLFE, M. D.; SMITH, L. J. Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. **Virulence**, v. 5, n. 8, p. 794–809, 2014.

GUITON, P. S. et al. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3626–3638, 2009.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial

biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95–101, 2004.

HAMMOND, A. A. et al. An in vitro biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 312–321, mar. 2011.

HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 263–273, 2009.

HOCQUET, D. et al. Pseudomonas aeruginosa may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3531–3536, 2007.

HOGAN, D.; KOLTER, R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 472–477, 2002.

HOIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HØIBY, N. et al. ESCMID * guideline for the diagnosis and treatment of bio film infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 1–25, 2014.

HUANG, J. et al. Novel Chromosomally Encoded Multidrug Efflux Transporter MdeA in Staphylococcus aureus Novel Chromosomally Encoded Multidrug Efflux Transporter MdeA in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 909–917, 2004.

ITO, A. et al. Increased antibiotic resistance of Escherichia coli in mature biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4093–4100, 2009.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 163–173, 2004.

JENAL, U.; MALONE, J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. **Annual review of genetics**, v. 40, p. 385–407, 2006.

JEVONS, M. Celbenin resistant staphylococci. **Br Med J**, v. 1, p. 124–125, 1961.

JOO, H.-S.; OTTO, M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chem Biol.**, v. 19, n. 12, p. 1503–1513, 2013.

KAATZ, G. W. et al. Evidence for the Existence of a Multidrug Efflux Transporter Distinct from NorA in Staphylococcus aureus Evidence for the Existence of a Multidrug Efflux Transporter Distinct from NorA in Staphylococcus aureus. v. 44, n. 5, p. 1–4, 2000.

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug Resistance in Staphylococcus aureus Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transport Protein Multidrug Resistance in Staphylococcus aureus Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) T. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 5, p. 1857–1864, 2005.

KAATZ, G. W.; MOUDGAL, V. V.; SEO, S. M. Identification and characterization of a novel efflux-related multidrug resistance phenotype in Staphylococcus aureus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 833–838, 2002.

KANG, Z. et al. Small RNA regulators in bacteria: Powerful tools for metabolic engineering and synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3413–3424, 2014.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549–1555, 2000.

KIEVIT, T. DE et al. Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1761–1770, 2001.

KONG, C.; NEOH, H. M.; NATHAN, S. Targeting Staphylococcus aureus toxins: A potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 1–21, 2016.

KOURTESI, C. et al. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug

discovery and the challenge of clinical implementation. **The open microbiology journal**, v. 7, p. 34–52, 2013.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7376–7382, 2008.

LEBLEBICIOGLU, H. et al. Management of infections in critically ill returning travelers in the intensive care unit (I): Considerations on infection control and transmission of resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 113–117, 2016.

LEID, J. G. et al. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6339–6345, 2002.

LENZ, A. P. et al. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4463–4471, 2008.

LEWIS, K. Multidrug resistance of biofilms and persister cells. p. 2008, 2008.

LIAO, J.; SCHURR, M. J.; SAUERA, K. The merR-like regulator brlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 15, p. 3352–3363, 2013.

LOMOVSKAYA, O.; WATKINS, W. J. Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 14, p. 1699–711, 2001.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annu.Rev.Med.**, v. 59, n. 0066–4219 (Print), p. 415–428, 2008.

MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W.-R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))**, v. 5, n. 6, p. 517–528, 2009.

MAIRA-LITRÁN, T. et al. Immunochemical Properties of the Staphylococcal

Poly- N -Acetylglucosamine Surface Polysaccharide Immunochemical Properties of the Staphylococcal Poly- N -Acetylglucosamine Surface Polysaccharide. **Infection and immunity**, v. 70, n. 8, p. 4433–4440, 2002.

MANDIN, P.; GUILLIER, M. Expanding control in bacteria: Interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 125–132, 2013.

MAY, T.; ITO, A.; OKABE, S. Induction of multidrug resistance mechanism in Escherichia coli biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4628–4639, 2009.

MCALEESE, F. et al. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived Staphylococcus aureus mutants to tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1865–1871, 2005.

MICHAUX, C. et al. Physiological roles of small RNA molecules. **Microbiology (Reading, England)**, n. 2014, p. 1–33, 2014.

MIQUEL, S. et al. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. April, p. 1–14, 2016.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581–1588, 2007.

MONDS, R.; TOOLE, G. He Developmental Model of Microbial Biofilms Ten Years of a Paradigm Up for Review.Pdf. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 2009, 2009.

MORAN, G. J. et al. Prevalence of methicillin-resistant staphylococcus aureus as an etiology of community-acquired pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 8, p. 1126–1133, 2012.

MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 8th. ed. Washington; D.C.; USA: American Society for Microbiology, 2003. v. 1

NARUI, K. et al. Cloning and characterization of a novel chromosomal drug

efflux gene in *Staphylococcus aureus*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1533–6, 2002.

NEWELL, P. D. et al. A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. **PLoS Biology**, v. 9, n. 2, 2011.

NG, E. Y. W.; TRUCKSIS, M.; HOOPER, D. C. Quinolone resistance mediated by *norA*: Physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1345–1355, 1994.

NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. **Annu.Rev.Genet.**, v. 42, n. 0066–4197 (Print), p. 541–564, 2008.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207–228, 2008.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32–37, 2014.

PAGANINI, H. et al. Infecciones por *staphylococcus aureus* resistente e meticilina adquiridas en la comunidad en niños antes sanos y en niños relacionados al hospital en la Argentina. **Revista chilena de Infectología**, v. 26, n. 5, p. 406–412, 2009.

PAHARIK, A. E. et al. The metalloprotease SepA governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, p. Epub ahead of print, 2016.

PARRA-RUIZ, J. et al. Activity of linezolid and high-dose daptomycin, alone or in combination, in an in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2682–2685, 2012.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annu.Rev.Microbiol.**, v. 57, n. 0066–4227 (Print), p. 677–701, 2003.

PAULSEN, I. T.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Characterization of the earliest known *Staphylococcus aureus* plasmid encoding a multidrug efflux system. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 13, p. 3477–3479, 1998.

PEARSON, J. P.; VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1203–1210, 1999.

PFALLER, M. A et al. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S156-67, 2001.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 19, n. 2, p. 382–402, 2006.

PINKNER, J. S. et al. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 17897–902, 2006.

POOLE, K. **Efflux-mediated antimicrobial resistance**. [s.l: s.n.]. v. 56

POWERS, M. E.; WARDENBURG, J. B. Igniting the Fire: *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in the Pathogenesis of Sepsis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 10–13, 2014.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541–561, 2012.

ROUCH, D. et al. Efflux- mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: commonancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins . **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2051, 1990.

SAKURAGI, Y.; KOLTER, R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 14, p. 5383–5386, 2007.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

SAUER, K. et al. Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7312–7326, 2004.

SAVAGE, V. J.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A. J. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1968–1970, 2013.

SCHOMMER, N. N. et al. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2267–2276, 2011.

TAJ, Y. et al. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 6, p. 403–409, 2012.

TENNENT, J. M. et al. Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* plasmid-mediated quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 1, p. 79–83, 1985.

TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. NorC , a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus* NorC , a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. v. 50, n. 3, p. 1104–1107, 2006.

VILAIN, S. et al. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2861–2868, 2009.

VIVEIROS, M. et al. Antibiotic Resistance. **Methods Molecular Biology**, v. 642, p. 159–72, 2010.

VUONG, C. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54881–54886, 2004.

WAGNER, C. et al. Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms: phagocytosis by polymorphonuclear neutrophils (pmn) and formation of neutrophil extracellular traps (NETs). **Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume**, v. 91–B, n. SUPP II, p. 301, 2009.

WAGNER, V. E. et al. Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons : Effects of Growth Phase and Environment. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2080–2095, 2003.

WALTERS, M. C. et al. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 317–323, 2003.

WANG, E. J. et al. Active transport of fluorescent P-glycoprotein substrates: evaluation as markers and interaction with inhibitors. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 2, p. 580–585, 2001.

YAMADA, Y. et al. Functional gene cloning and characterization of MdeA, a multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 4, p. 801–4, 2006.

YOSHIDA, H. et al. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6942–6949, 1990.

ZHANG, L.; GOWARDMAN, J. Microbial biofilms associated with intravascular catheter-related bloodstream infections in adult intensive care patients. **European Journal of ...**, v. 35, n. 2, p. 10096, 2015.

ZHANG, L.; MAH, T. F. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 13, p. 4447–4452,

2008.