

GABRIELLE ANTUNES DOS REIS

ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE
Staphylococcus lugdunensis E *Propionibacterium acnes*
NA FORMAÇÃO DE BIOFILME



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

DEZEMBRO / 2018

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a Orientação da Professora Rosana Barreto Rocha Ferreira.

FICHA CATALOGRÁFICA

R347a Reis, Gabrielle Antunes dos
Análise da interação entre amostras de *Staphylococcus lugdunensis* e *Propionibacterium acnes* na formação de biofilme / Gabrielle Antunes dos Reis. -- Rio de Janeiro: UFRJ, 2018.
xii; 46 f.

Orientadora: Rosana Barreto Rocha Ferreira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2018.
Bibliografia: f.38-46
1. *Staphylococcus lugdunensis*. 2.
Propionibacterium acnes. 3. Interação microbiana. 4.
Biofilme. 5. Sobrenadante. I. Barreto Rocha
Ferreira, Rosana, orient. II. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA

ALUNO: **Gabrielle Antunes dos Reis**

DRE: 115029913

BANCA EXAMINADORA: Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto (Presidente)
MSc. Suzanne de Oliveira Nunes
Dra. Renata Ferreira Boente
Profa. Eliane de Oliveira Ferreira (Suplente)

Título da Monografia: "Análise da interação entre amostras de *Staphylococcus lugdunensis* e *Propionibacterium acnes* na formação de biofilme"

Local: Sala de Reunião do Departamento de Microbiologia Médica / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 7 de dezembro de 2018 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 07 de dezembro de 2018.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora:

Tatiana de Castro Abreu Pinto

Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Suzanne de Oliveira Nunes

MSc. Suzanne de Oliveira Nunes

Renata Ferreira Boente

Dra. Renata Ferreira Boente

Eliane de Oliveira Ferreira

Profa. Eliane de Oliveira Ferreira

Aluno:

Gabrielle Antunes dos Reis

Gabrielle Antunes dos Reis

Orientador:

Rosana Barreto Rocha Ferreira

Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira

Coordenador
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho à minha mãe Lúcia, aos meus pais Luiz e Carlos e em memória da minha avó Neuza, por investirem em meu conhecimento e por estarem presentes em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças concedidas até aqui, por todas as vezes em que nEle encontrei forças para vencer as batalhas do dia a dia, ainda que de forma inconsciente. Sei que nunca me abandonou.

À minha família, em especial à minha mãe, que lutou a vida inteira para que eu me tornasse quem sou. Aos meus pais Luiz e Carlos e em memória da minha avó Neuza, por depositarem total confiança na minha capacidade e por todo amor que sempre me deram. Vocês são o meu tudo e se cheguei até aqui, devo tudo a vocês. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu namorado e melhor amigo Leonardo. Obrigada por estar ao meu lado durante todo esse período conturbado e pelos puxões de orelha. Obrigada também por me levar e buscar tantas vezes na faculdade e até por ter ido ao laboratório comigo em final de semana/feriado. Você contribui com meu amadurecimento diário e eu só tenho a agradecer por te ter comigo. Te amo muito!

À minha filha Amora, que foi resgatada da rua para ser mimada 24 h no nosso lar. Você chegou no momento em que eu mais precisei e já no primeiro dia me mostrou que veio para me fazer muito feliz. Mesmo que você não saiba, seu apoio é fundamental, até quando fica dormindo no sofá enquanto eu viro a noite estudando. Não me vejo mais sem você.

Aos meus amigos que, ainda que de longe, torcem pelo meu sucesso e emanam energias positivas para que tudo sempre dê certo. Em especial ao meu Corinthians, Danielle e Juliana, vocês são as melhores amigas que eu poderia ter. Larissa, Loreto, Juliana Santos, Livia e Dani, vocês são os amigos de escola que eu vou levar pra sempre. Carol, Danilo e Lucas, sei que onde estiverem (ainda que TÃO distantes) estão sempre comigo. Obrigada a todos pela torcida, apoio, conselhos e contribuições. Amo vocês.

Aos meus amigos de turma, em especial à Bruna, Bruno, Carol, Marcela, Sarah e Thiago. Obrigada por compartilharem tantos momentos de alegria e desespero comigo. Vocês foram essenciais para que eu não surtasse durante esses 4 anos. Levarei vocês sempre em meu coração.

Aos meus amigos do laboratório LCPM, em especial à Thaís e ao Thiago. Thaís, obrigada por toda sua disponibilidade, por todo o tempo que passou me ajudando e por ter se tornado uma amiga tão especial. Thiago (você de novo kkk), obrigada também por ser sempre tão solícito e por sempre me manter informada dos babados diários, você é um grande amigo para mim. Giulia e Ju Cu, vocês são a alegria dos meus dias, obrigada por me fazerem rir das nossas bobagens e também por me ajudarem sempre. Andressa e Jéssica, obrigada por me ajudarem sempre que podem.

À minha orientadora, amiga e mãe científica. Rosana, você me acolheu em um momento muito difícil e me fez enxergar que eu poderia ir bem mais além do que pensei. Obrigada por toda confiança depositada em mim e nos meus experimentos. E por muitas vezes ficar até mais ansiosa do que eu para saber os resultados rs. Você é uma grande inspiração e exemplo para mim e para todos que te cercam.

Agradeço ao Laboratório de Biologia de Anaeróbios e ao Laboratório de Infecção Hospitalar pelas cepas cedidas e aos seus membros, por sempre me ajudarem quando preciso. Sou muito grata por todo apoio oferecido.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e aos professores e funcionários que dele fazem parte, que tanto contribuíram e permanecem contribuindo para a minha formação. Agradeço também ao apoio financeiro concedido pela UFRJ, FAPERJ e CNPq.

“(...) Dessa passagem, a aprendizagem
é a única bagagem levada (...)”

Panorama – Forfun

RESUMO

GABRIELLE ANTUNES DOS REIS

ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE *Staphylococcus lugdunensis* E *Propionibacterium acnes* NA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Orientadora: Rosana Barreto Rocha Ferreira

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus lugdunensis e *Propionibacterium acnes* são membros da microbiota de pele humana, normalmente considerados como microrganismos comensais. Entretanto, estudos demonstram que ambas as espécies podem atuar como patógenos oportunistas, e serem isolados de infecções humanas. Recentemente, *S. lugdunensis* e *P. acnes* vêm sendo co-isolados de infecções relacionadas a dispositivos médicos, recebendo destaque em infecções articulares periprotéticas, devido principalmente à formação de biofilme. O biofilme é um dos principais fatores de virulência relacionados a esses microrganismos, o qual permite o estabelecimento e a persistência da infecção no hospedeiro. Dada a problemática relacionada à formação de biofilme por estas espécies e a frequência de co-isolamento em infecções, este estudo objetivou entender a interação entre esses dois microrganismos durante a formação de biofilme. Para isso, foi avaliada a capacidade de formação de biofilme misto e isolado das espécies e o impacto de moléculas presentes no sobrenadante de cada espécie sobre a produção de biofilme da outra. Além disso, buscou-se iniciar a caracterização das moléculas ativas presentes nestes sobrenadantes. Cepas clínicas de *S. lugdunensis* e *P. acnes* oriundas de infecções foram utilizadas. Primeiramente, foi realizado o teste de formação de biofilme em placa de microtitulação para avaliar a capacidade de formação de biofilme separadamente ou em conjunto para cada espécie. Em seguida, foi obtido o sobrenadante de *S. lugdunensis* livre de células em diferentes tempos de crescimento (8 h, 24 h, 48 h) e o sobrenadante de *P. acnes* após 72 h de crescimento. O extrato controle foi obtido utilizando apenas o meio de cultura. Os sobrenadantes das duas espécies foram submetidos ao calor (50 °C) e à fervura (100 °C). O sobrenadante de *S. lugdunensis* foi fracionado por peso molecular em filtros Amicon® de 10 kDa e 3 kDa. O sobrenadante de *P. acnes* foi submetido ao tratamento com proteinase K, tripsina e metaperiodato de sódio. Para avaliar o efeito das moléculas ativas presentes nos sobrenadantes de *S. lugdunensis* e *P. acnes* em cada condição, foi realizado o teste de formação de biofilme de *P. acnes* e *S. lugdunensis*, respectivamente. O sobrenadante de *P. acnes* também foi testado no crescimento de *S. lugdunensis*. Os resultados obtidos demonstram que quando associados, estes microrganismos aumentam a produção de biofilme quando comparado ao biofilme em isolado. *P. acnes* apresentou maior formação de biofilme na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* obtido após 48 h de crescimento. Este efeito se manteve quando o sobrenadante foi aquecido a 50 °C e perdido após a fervura. Além disso, as moléculas ativas presentes no sobrenadante parecem ter entre 3 kDa e 10 kDa. Por outro lado, *S. lugdunensis* apresentou redução na formação de biofilme na presença do sobrenadante de

P. acnes, sem alterar seu crescimento planctônico. Tal efeito só foi perdido quando o sobrenadante foi submetido ao tratamento com metaperiodato de sódio. Novos experimentos são necessários a fim de melhor caracterizar as moléculas bioativas. Estudos que analisem diferentes espécies em associação, principalmente durante a formação de biofilme, são de grande importância para elucidar a dinâmica das interações durante infecções mistas.

Palavras-chaves: biofilme, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus lugdunensis*, sobrenadante, interação microbiana.

ABSTRACT

GABRIELLE ANTUNES DOS REIS

INTERACTION ANALYSIS BETWEEN STRAINS OF *Staphylococcus lugdunensis* AND *Propionibacterium acnes* ON BIOFILM FORMATION

Advisor: Rosana Barreto Rocha Ferreira

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus lugdunensis and *Propionibacterium acnes* are members of the human skin microbiota, usually considered as commensal microorganisms. However, studies show that both species can act as opportunistic pathogens, being isolated from human infections. Recently, *P. acnes* and *S. lugdunensis* have been co-isolated from infections associated with medical devices, with emphasis on periprosthetic joint infections, mainly due to the biofilm formation. Biofilm is one of the main virulence factors of these microorganisms, which allows the establishment and persistence of infection in the host. Given the problems associated with biofilm formation by these species and the frequency of co-isolation in infections, this study aimed to understand the interaction between these two microorganisms during biofilm formation. For this, we evaluated the ability of these species to form biofilm mixed and separately and analyzed the impact of molecules present in the supernatant of each species over the other on the biofilm production. In addition, we sought to initiate the characterization of the active molecules present in these supernatants. Clinical strains of *S. lugdunensis* and *P. acnes* from infections were used. First, the biofilm formation test was performed in a microtiter plate to evaluate biofilm formation in isolated and mixed cultures for each species. Then, cell-free *S. lugdunensis* supernatant was obtained at different growth times (8 h, 24 h, 48 h) and *P. acnes* supernatant was obtained after 72 h of growth. The control extract was obtained by using only the culture medium. Supernatants from both species were submitted to heat (50 °C) and boiling (100 °C). *S. lugdunensis* supernatant was fractionated by molecular weight on 10 kDa and 3 kDa Amicon® filters. The supernatant from *P. acnes* was subjected to treatment with proteinase K, trypsin and sodium metaperiodate. To evaluate the effect of the active molecules present in the supernatants of *S. lugdunensis* and *P. acnes* in each condition, the biofilm formation assay was performed with *P. acnes* and *S. lugdunensis*, respectively. *P. acnes* supernatant was also tested on *S. lugdunensis* growth. The results showed that when associated, these microorganisms increase biofilm production in comparison with biofilm of each isolate alone. *P. acnes* showed a higher biofilm formation in the presence of the *S. lugdunensis* supernatant obtained after 48 h of growth. This effect was maintained when the supernatant was heated to 50 °C and lost after boiling. Also, the active molecules in the supernatant appear to be between 3 kDa and 10 kDa. On the other hand, *S. lugdunensis* showed reduction in biofilm formation in the presence of *P. acnes* supernatant, with no effect on its planktonic growth. This effect was lost only when the supernatant was subjected to treatment with sodium metaperiodate. New experiments are

needed in order to better characterize the bioactive molecules. Studies that analyze different species in association, especially during biofilm formation, are of great importance to elucidate the dynamics of interactions during mixed infections.

Keywords: biofilm, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus lugdunensis*, supernatant, microbial interaction.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Staphylococcus lugdunensis</i> - características gerais	1
1.1.1. <i>S. lugdunensis</i> como membro da microbiota de pele	2
1.1.2. O papel de <i>S. lugdunensis</i> em infecções	3
1.1.3. Fatores de virulência relacionados à formação de biofilme expressos por <i>S. lugdunensis</i>	4
1.1.4. Formação de biofilme por <i>S. lugdunensis</i>	5
1.2. <i>Propionibacterium acnes</i> – histórico e características do microrganismo	6
1.2.1. <i>P. acnes</i> como participante da microbiota humana	8
1.2.2. <i>P. acnes</i> e sua importância em infecções	8
1.2.3. Formação de biofilme por <i>P. acnes</i> e outros fatores de virulência	9
1.3. Biofilmes polimicrobianos	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Cepas bacterianas utilizadas no presente estudo	15
4.1.1. Confirmação da identificação prévia das cepas provenientes de amostras clínicas	16
4.2. Análise da capacidade de formação de biofilme monomicrobiano e misto por cepas de <i>S. lugdunensis</i> e <i>P. acnes</i>	17
4.3. Obtenção do sobrenadante de <i>S. lugdunensis</i> em diferentes tempos de crescimento	18
4.3.1. Avaliação do efeito do sobrenadante de <i>S. lugdunensis</i> obtido em diferentes tempos de crescimento sobre a produção de biofilme por <i>P. acnes</i>	19
4.4. Caracterização preliminar das moléculas ativas presentes no sobrenadante de <i>S. lugdunensis</i>	19
4.4.1. Análise da sensibilidade do sobrenadante de <i>S. lugdunensis</i> ao aquecimento e à fervura	20
4.4.2. Obtenção do sobrenadante de <i>S. lugdunensis</i> fracionado por peso molecular	20
4.5. Obtenção do sobrenadante de <i>P. acnes</i> em meio acrescido ou não de glicose	20
4.5.1. Avaliação do efeito do sobrenadante de <i>P. acnes</i> obtido em meio acrescido ou não de glicose sobre a produção de biofilme por <i>S. lugdunensis</i>	21
4.5.2. Análise do efeito do sobrenadante de <i>P. acnes</i> sobre o crescimento de <i>S. lugdunensis</i>	22
4.6. Caracterização preliminar das moléculas ativas presentes no sobrenadante de <i>P. acnes</i>	22
4.6.1. Análise da sensibilidade do sobrenadante de <i>P. acnes</i> ao aquecimento e à fervura	22
4.6.2. Análise de natureza química das moléculas ativas presentes no sobrenadante de <i>P. acnes</i>	23
4.7. Análise estatística	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Staphylococcus lugdunensis* - características gerais

Staphylococcus lugdunensis é uma espécie do gênero *Staphylococcus*. Bactérias deste gênero são cocos Gram-positivos dispostos em conjuntos que se assemelham a cacho de uvas (Madigan *et al.*, 2016) e suas colônias possuem coloração branca a creme, ligeiramente amarelada (Becker, Heilmann & Peters, 2014), podendo ser classificadas morfológicamente como lisas ou rugosas, dependendo da cepa em questão (Yazgi & Uyanik, 2010). As espécies do gênero *Staphylococcus* spp., com exceção das espécies *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* e *Staphylococcus saccharolyticus*, são produtoras da enzima catalase que catalisa a reação de conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Loew, 1990). Assim como outros *Staphylococcus*, *S. lugdunensis* é anaeróbio facultativo e geralmente exibe metabolismo respiratório, porém também é capaz de crescer de forma fermentativa (Madigan *et al.*, 2016). Em meios de cultura como ágar adicionado de sangue desfibrinado de carneiro, algumas cepas de *S. lugdunensis* apresentam beta-hemólise (Argemi *et al.*, 2017a).

S. lugdunensis foi descrito pela primeira vez em 1988, quando onze cepas desta espécie foram isoladas de diferentes tipos de infecções, dentre estas endocardite, bacteremia, infecções de pele e infecções relacionadas ao uso de próteses (Freney *et al.*, 1988). Estas cepas apresentavam sensibilidade à novobiocina, produziam um fator de ligação ao fibrinogênio denominado fator *clumping* e eram capazes de descarboxilar a ornitina. Estas características tornavam estas cepas pertencentes a uma nova espécie, uma vez que não foram observadas em conjunto para nenhuma outra espécie do gênero *Staphylococcus*.

S. lugdunensis é classificado como uma espécie do grupo de *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), assim chamado pela incapacidade de coagular o plasma sanguíneo (Bannerman & Peacock, 2007). A coagulase, também conhecida como coagulase livre, é uma proteína presente na superfície celular de algumas espécies de *Staphylococcus*, como *S. aureus*, que se liga ao fator globulina presente no plasma sanguíneo, formando o complexo estafilotrombina que promove a conversão do fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (McCulloch & Mamizuca, 2015).

Como citado anteriormente, algumas cepas de *S. lugdunensis* são capazes de produzir uma adesina denominada fator *clumping* ou coagulase ligada à membrana, que também pode ser produzida por *S. aureus*. Por este motivo, *S. lugdunensis* pode ser identificado erroneamente como *S. aureus* em análises laboratoriais ao serem utilizados testes rápidos para

identificação da espécie, como o teste da coagulase em lâmina (teste de determinação do fator *clumping*) (Frank & Patel, 2008) ou testes de aglutinação em látex (Tan, Ng & He, 2008). A visualização da hemólise em ágar sangue, pode também gerar erros de identificação de *S. lugdunensis* como *S. aureus*. A implementação da técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) em laboratórios clínicos e de pesquisa permite a identificação mais precisa deste microrganismo (Patel, 2013).

1.1.1. *S. lugdunensis* como membro da microbiota de pele

S. lugdunensis, assim como outros membros do grupo SCN, é encontrado colonizando a superfície da pele e membranas mucosas humanas de forma comensal (Piette & Verschraegen, 2009). Logo após sua primeira descrição, este microrganismo foi isolado e identificado em culturas provenientes de diferentes regiões do corpo humano (Herchline & Ayers, 1991). Recentemente, estudos descreveram que *S. lugdunensis* participa da microbiota humana principalmente nas seguintes regiões: pélvica, perineal, virilha, axilas e nasal (Marquet *et al.*, 2003; Bieber & Kahlmeter, 2010; Ho *et al.*, 2015). Ao analisar em conjunto os resultados encontrados nesses estudos, é possível descrever que a colonização por *S. lugdunensis* foi detectada em 22 a 39,3% das amostras de colonização inguinal, seguido de cerca de 20% das amostras de colonização axilar e em 9,3 a 17,9% das amostras de colonização nasal (Marquet *et al.*, 2003; Bieber & Kahlmeter, 2010; Ho *et al.*, 2015). Estudos que visem o entendimento da relação deste microrganismo com hospedeiros humanos ainda são escassos e ainda não está bem elucidado na literatura se *S. lugdunensis* possui um local preferido para colonização e se este local é diferente em indivíduos da comunidade e pacientes hospitalizados (Babu & Oropello, 2011). Além disso, ainda não está claro se *S. lugdunensis* é capaz de colonizar estas áreas de forma permanente ou somente de forma intermitente (Becker, Heilmann & Peters, 2014).

Bieber & Kahlmeter (2010) analisaram 7 regiões distintas da pele e relataram que indivíduos colonizados por *S. lugdunensis* apresentaram colonização por esta espécie em mais de uma região analisada, enquanto que indivíduos colonizados por *S. aureus* apresentaram colonização de apenas um local, predominantemente as narinas. Mais recentemente, pesquisadores descreveram a produção de um composto bioativo, denominado lugdunina, por cepas de *S. lugdunensis* isoladas da microbiota nasal. Este composto apresenta ação antimicrobiana frente a diferentes bactérias patogênicas, principalmente *S. aureus*, inibindo

seu crescimento. Além disso, *lugdunina* apresenta grande potencial para prevenir tanto a colonização nasal como infecções invasivas por *S. aureus* (Zipperer *et al.*, 2016). Esta descoberta ressalta a importância de *S. lugdunensis* como membro da microbiota humana e o entendimento de que os microrganismos podem interagir competitivamente ou cooperativamente.

1.1.2. O papel de *S. lugdunensis* em infecções

Apesar do seu papel como membro da microbiota humana, *S. lugdunensis* é associado a uma ampla variedade de infecções, dentre estas estão infecções de pele e de tecidos moles, infecções cardiovasculares (endocardite infecciosa), infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos, infecções da corrente sanguínea, entre outras, principalmente em indivíduos hospitalizados (Babu & Oropello, 2011). Embora de acordo com a literatura a maior parte dos SCN possua um menor potencial de patogenicidade comparado a *S. aureus*, *S. lugdunensis* é considerado uma exceção por expressar fatores de virulência semelhantes àqueles encontrados em *S. aureus* (von Eiff, Peters & Heilmann, 2002; Piette & Verschraegen, 2009). A infecção por *S. lugdunensis* geralmente requer tratamento imediato e muitas vezes invasivo, incluindo intervenção cirúrgica, principalmente em casos de endocardite (Kyaw *et al.*, 2018) e de infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos (Sampathkumar, Osmon & Cockerill, 2000). A endocardite infecciosa decorrente de infecção por *S. lugdunensis* pode ser associada a dano tecidual significativo e conseqüentemente ao maior risco de mortalidade, elevando o significado clínico dessa bactéria. (Anguera *et al.*, 2005; Sabe *et al.*, 2014).

S. lugdunensis tem sido cada vez mais reconhecido como um dos principais agentes etiológicos de infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos. Dentre estas, as infecções articulares periprotéticas (IAPs) são as principais complicações relatadas após a artroplastia de prótese de joelho e de quadril, e pode ter início entre 6 semanas a 4 anos após o implante cirúrgico (Babu & Oropello, 2011). Estima-se que entre 1 e 3% dos pacientes submetidos a implante de prótese são afetados por IAPs (Zimmerli, Trampuz & Ochsner, 2004; Kurtz *et al.*, 2008). Um estudo realizado durante 9 anos (1998 a 2007) na Mayo Clinic em Rochester, relatou 28 casos de infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos por *S. lugdunensis* em 22 pacientes atendidos (6 pacientes apresentaram mais de um episódio de infecção). Do total, vinte e cinco casos (89%) estavam relacionados com a prótese de joelho, enquanto 3 casos (11%) estavam relacionados ao quadril (Shah *et al.*, 2010). Outro estudo

mais recente de Hascoët *et al.* (2016) comparou as características de IAPs por *S. lugdunensis*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. No total, foram analisados 88 casos de IAPs monomicrobianas, sendo 32% por *S. lugdunensis*, 34% por *S. aureus* e 34% por *S. epidermidis*. Os resultados demonstraram que a média de tempo entre a cirurgia e o início da IAP foi significativamente menor em *S. lugdunensis* (12 semanas) e *S. aureus* (44 semanas) do que em comparação com *S. epidermidis* (84 semanas). Além disso, *S. lugdunensis* esteve mais associado a IAP de joelho (57%) quando comparado a IAP de quadril (36%) e de outros locais (7%), assim como *S. aureus*. Em contrapartida, *S. epidermidis* esteve mais envolvido em IAP de quadril. Esses dados sugerem ainda mais a similaridade do curso clínico das infecções por *S. lugdunensis* e *S. aureus* e corroboram os resultados encontrados por Shah *et al.* (2010), de que em casos de IAPs, *S. lugdunensis* parece disseminar a infecção preferencialmente nos joelhos. Ainda que parte das IAPs causadas por *S. lugdunensis* sejam erradicadas com sucesso após o uso de antibióticos, se faz necessária uma atenção especial a este microrganismo. De fato, Argemi *et al.* (2017b) relataram um caso de infecção de prótese de joelho por *S. lugdunensis* que reincidiu após um ano da primeira infecção com a mesma cepa que tornou-se resistente a antibióticos, resultando em falha terapêutica. Esta cepa alterou seu estado metabólico normal para uma forma chamada de *small colony variant*. Essas colônias tornam as infecções persistentes e recidivas e são relatadas para outras infecções, inclusive infecções articulares protéticas causadas por *S. aureus* e *S. epidermidis*, após a exposição a antibióticos (Tande *et al.*, 2014).

1.1.3. Fatores de virulência relacionados à formação de biofilme expressos por *S. lugdunensis*

Os fatores de virulências expressos por *S. lugdunensis* podem explicar seu elevado potencial de agressão, levando a uma infecção grave. Dentre estes, está o sistema *agr* (gene acessório regulador) (Frank, del Pozo & Patel, 2008) que possui regiões homólogas com o sistema *agr* de *S. aureus* (Donvito *et al.*, 1997a). O sistema *agr* é um locus que atua na regulação do sistema de *quorum sensing*, no qual o microrganismo é capaz de adaptar sua maquinaria de regulação gênica de acordo com concentrações de moléculas que estão sendo secretadas no meio, que refletem a densidade populacional do ambiente em que se encontra (Reuter, Steinbach & Helms 2016). Dessa forma, o sistema *quorum sensing* atua como um regulador global de diversos fatores de virulência, particularmente sobre as exoproteínas

secretadas, incluindo enterotoxinas, hemolisinas e numerosas enzimas capazes de modificar as proteínas do hospedeiro (Novick, 2003).

O locus *slush*, também importante na virulência de *S. lugdunensis*, codifica três peptídeos hemolíticos fenotipicamente semelhantes à δ -toxina secretada por *S. aureus*, que conferem ao microrganismo capacidade de lisar células hospedeiras (Donvito *et al.*, 1997b). Outros fatores que medeiam a patogênese por *S. lugdunensis* são a presença de genes que codificam fatores de virulência como: ligantes de diferentes proteínas solúveis – colágeno, imunoglobulina G, fibronectina, plasminogênio e; coagulase ligada via fator *clumping*, uma proteína de ligação ao fibrinogênio (codificada pelo gene *Fbl*) (Mitchel, 2004; Nilsson *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2010). Assim como *S. aureus*, uma porcentagem variável de cepas de *S. lugdunensis* produzem diferentes enzimas, como esterases, proteases, lipases e também *slime* extracelular, que é uma camada espessa composta de polissacarídeos extracelulares (Piette & Verschraegen, 2009). A expressão do *slime* polissacarídico auxilia na aderência e colonização de *S. lugdunensis* em superfícies abióticas e bióticas, sendo associado aos processos de infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos, onde o microrganismo é capaz de formar biofilme (Rozalska & Ljungh, 1995; Bernardi, Pizzolitto & Pizzolitto, 2007).

1.1.4. Formação de biofilme por *S. lugdunensis*

Bactérias podem ser encontradas de forma livre como células planctônicas ou agregadas/agrupadas durante a formação de biofilme (Donlan, 2002). O biofilme é definido como uma comunidade microbiana sésil, no qual as células estão conectadas a outras células ou a uma superfície, incorporadas a uma matriz polimérica extracelular que lhes confere proteção (Costerton, Stewart & Greenberg, 1999). Assim, como para outros membros do gênero *Staphylococcus* a formação de biofilme é um importante fator de virulência de *S. lugdunensis*.

A formação do biofilme consiste em quatro etapas principais: adesão, maturação, acumulação e dispersão a partir do biofilme maduro (Fey & Olson, 2010). A composição da matriz polimérica varia entre cepas, podendo ser composta por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (eDNA) (Montanaro *et al.*, 2011; Cue *et al.*, 2012; Foster *et al.*, 2014). As comunidades sésseis podem originar células planctônicas que rapidamente se multiplicam e dispersam para outros locais. As células sésseis liberam antígenos e estimulam a produção de anticorpos, porém geralmente os anticorpos não são eficazes em combater os microrganismos presentes nos biofilmes. Este fator parecer ter relação com o caráter antigênico heterogêneo

do biofilme, onde um antígeno pode ser produzido em alguns locais do biofilme, mas pode estar ausente em outros. Além disso, a matriz polimérica extracelular onde o biofilme está envolto, confere proteção contra o sistema imune hospedeiro (Costerton, Stewart & Greenberg, 1999; Archer *et al.*, 2011). Portanto, ainda que o hospedeiro apresente excelentes respostas imunológicas celulares e humorais, as infecções por biofilme raramente são resolvidas por seus próprios mecanismos de defesa (Khoury *et al.*, 1992; Bryers, 2008). Logo, tanto a proteção oferecida pelas substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelas próprias bactérias quanto as alterações fisiológicas destas células, elevam a dificuldade para o sistema imunológico e para a antibioticoterapia em erradicar o biofilme microbiano. Por essa razão, as infecções em que há o estabelecimento de biofilme podem se tornar crônicas ou recorrentes, muitas vezes sendo solucionadas apenas com intervenção cirúrgica e vem recebendo cada vez mais destaque na literatura (Veerachamy *et al.*, 2014).

Diferente do que é observado para outros SCN, a matriz polimérica extracelular formada durante o biofilme de *S. lugdunensis* não é composta de Poli-N-acetilglucosamina, sendo majoritariamente proteica. Os biofilmes produzidos pelas cepas analisadas foram resistentes ao tratamento com dispersina B e metaperiodato de sódio, porém suscetíveis a proteases (Frank & Patel, 2007). Outro estudo destes mesmos autores mostrou que assim como em *S. aureus* e outros SNC, a capacidade de adesão e formação de biofilme por *S. lugdunensis* contribui para a patogênese e os diferentes tipos de infecções causadas por este microrganismo, principalmente IAPs e endocardites. Além disso, infecções por *S. lugdunensis* associadas à formação de biofilme em superfícies hospedeiras são frequentemente mediadas por proteínas de ligação expressas pelo microrganismo (Frank & Patel, 2008).

1.2. *Propionibacterium acnes* – histórico e características do microrganismo

Esta bactéria foi descrita pela primeira vez na literatura médica em 1896 como “bacilo da acne” (Unna, 1896). Porém, somente um ano após, o microrganismo foi isolado em cultura pura através de secreções de pústulas da acne (Sabouraud, 1897). Estudos posteriores indicaram a semelhança morfológica entre o “bacilo da acne” e membros do gênero *Corynebacterium* spp. (Gilchrist, 1903; Südmerson & Thompson, 1909). Enquanto Gilchrist (1900) nomeou o microrganismo em questão como *Bacillus acnes*, Bergey *et al.* (1923) o adicionaram ao gênero *Corynebacterium* spp. Entretanto, os pesquisadores Douglas & Gunter (1946) sugeriram uma nova mudança para o gênero *Propionibacterium* spp. devido à comparação com cepas de *Corynebacterium* spp. e observação de que o microrganismo em

questão assemelhava-se às bactérias produtoras de ácido propiônico (van Niel, 1928 *apud* Douglas & Gunter, 1946), principalmente devido à sua relação com o oxigênio e a natureza de seu processo catabólico. Atualmente, pesquisadores propuseram uma realocação de *P. acnes* para o gênero *Cutibacterium* baseada em evidências genômicas encontradas, dando origem à espécie *Cutibacterium acnes* (Scholz & Kilian, 2016). Porém, o microrganismo ainda é frequentemente encontrado como *P. acnes* na literatura e será abordado nesta denominação no presente estudo.

P. acnes possui alta heterogeneidade e é dividido em quatro grupos filogenéticos: IA, IB, II e III com base na filotipagem e sequenciamento completo do genoma (McDowell *et al.*, 2010). Classicamente, é relatado como bacilo Gram-positivo não formador de esporos e anaeróbio (Levy *et al.*, 2013), contendo células que medem entre 0,3 e 1,3 µm em diâmetro e entre 1 e 10 µm em comprimento. Porém, estas células são pleomórficas, encontradas em tamanhos e formatos variados, alterando-se entre cocos e bacilos bem definidos. Suas colônias em ágar adicionado de sangue desfibrinado de carneiro têm entre 1 e 2 mm de diâmetro, sendo geralmente vistas como circulares, lisas, convexas, brilhantes ou opacas e algumas cepas são capazes de produzir uma zona de hemólise estreita neste meio. E apesar de tipicamente crescer em anaerobiose, *P. acnes* parece não ser um microrganismo anaeróbio estrito, pois algumas cepas já foram descritas como aerotolerantes ou microaerófilas, refletindo sua capacidade de viver em diferentes ambientes (Winn *et al.*, 2005; Delgado, Suárez & Mayo, 2011). A capacidade de cepas deste microrganismo em tolerar, por horas, a presença de oxigênio, foi demonstrada *in vitro* em tecido humano com alto potencial de oxidação (Csukás, Banizs & Rozgonyi, 2004) e o isolamento em aerobiose também já havia sido demonstrado por Evans & Matter (1979). Entretanto, apesar das características de tolerância ao oxigênio, *P. acnes* não é detectado de forma confiável pela cultura aeróbia devido ao seu crescimento extremamente lento. Para aumentar a detecção deste microrganismo na clínica, tanto culturas aeróbicas e anaeróbicas devem ser prolongadas por até 14 dias (Wu *et al.*, 2011). O estudo de Csukás, Banizs & Rozgonyi (2004) sugeriu que *P. acnes* pode persistir em tecidos humanos e danificá-los através da produção de metabólitos como acetato, propionato, indol, porforina, H₂S e diferentes enzimas. Em adição, o estudo de Winn *et al.* (2005) que analisou subprodutos metabólicos ácidos através de cromatografia gasosa, revelou a produção de grandes quantidades de ácido propiônico, pequenas quantidades de ácido acético e quantidades ainda menores de ácido isovalérico por este microrganismo.

1.2.1. *P. acnes* como participante da microbiota humana

P. acnes é normalmente encontrado colonizando a pele humana de forma comensal, principalmente associado às glândulas sebáceas ricas em lipídeos e a folículos pilosos, estruturas relativamente anóxicas que permitem o estabelecimento de microrganismos anaeróbios facultativos (Chiller, Selkin & Murakawa, 2001). Sua capacidade de colonizar superfícies cutâneas está relacionada à produção de lipases que degradam os lipídeos presentes neste local, principalmente o sebo (Miskin *et al.*, 1997). Esta espécie foi relatada como a mais abundante (87%) em uma análise da composição microbiana de unidades polissebáceas da pele (Gibbon *et al.*, 2013). O mesmo foi descrito por pesquisadores que analisaram amostras provenientes de unidades polissebáceas, através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e observaram alta frequência de *P. acnes* (Miura *et al.*, 2010). Nesses locais, *P. acnes* e outros microrganismos comensais como espécies do gênero *Staphylococcus* e do gênero *Malassezia*, são capazes de formar comunidades microbianas. (Grice & Segre, 2011).

Um estudo avaliou a presença de *P. acnes* em diferentes áreas da pele, classificadas como oleosas, secas e úmidas e concluiu que este microrganismo é mais comumente encontrado em áreas oleosas como o couro cabeludo e a testa. Também foi frequente em algumas áreas onde as glândulas sudoríparas estão presentes, como virilha e axilas, bem como em áreas de mucosas, como narina e reto. Entretanto, a densidade microbiana nessas duas áreas foi menor do que a encontrada nas regiões das glândulas sebáceas, sugerindo que o sebo secretado por estas glândulas pode ser um substrato para obtenção de energia por *P. acnes* (McGinley, Webster & Leyden, 1977). Além de participar da microbiota cutânea, *P. acnes* pode ser encontrado, de forma menos frequente, colonizando a cavidade oral, o trato respiratório, o intestino, a conjuntiva e o canal auditivo externo (Funke *et al.*, 1997; Grice *et al.*, 2009).

1.2.2. *P. acnes* e sua importância em infecções

Embora normalmente *P. acnes* seja encontrado colonizando de forma comensal a pele e outros locais do corpo humano, é também capaz de se comportar como patógeno oportunista (Achermann *et al.*, 2014). A associação de *P. acnes* como agente de diferentes infecções da pele e de tecidos moles é descrita na literatura, como em casos de acne, em que o microrganismo parece ter um papel importante (Dessinioti & Katsambas, 2010) e da síndrome

SAPHO caracterizada pelo aparecimento de sinovite, acne, pustulose, hiperostose e osteíte inflamatória (Colina *et al.*, 2007). Mais recentemente, este microrganismo tem sido reconhecido como causa de diferentes tipos de infecções relacionadas à utilização de implantes, principalmente oculares, cardiovasculares e de articulações protéticas (Deramo & Ting, 2001; Delahaye *et al.*, 2005; Piper *et al.*, 2009). Nesse último caso, *P. acnes* é capaz de interagir com o sistema imunológico e pode gerar uma inflamação que conseqüentemente desencadeia uma osteíte crônica, que persiste mesmo após a remoção do implante ortopédico (Colina *et al.*, 2007). Embora cepas desta espécie sejam geralmente suscetíveis à maioria dos antibióticos, incluindo a penicilina, a dificuldade em erradicar a infecção sem a remoção do dispositivo e/ou tratamento prolongado é relatada com frequência (Bayston *et al.*, 2007).

Para o diagnóstico clínico, é preconizado que uma cultura positiva com *P. acnes* seja interpretada com cautela devido ao risco de contaminação da cultura com *P. acnes* comensal da pele. No caso de isolamento do microrganismo apenas em caldos ou apenas em uma dentre outras amostras de tecido, são necessários critérios adicionais de análise, tais como sintomas clínicos, histopatologia positiva ou testes moleculares (Corvec *et al.*, 2012). A implementação de estudos genômicos, transcriptômicos, filogenéticos e da técnica de MALDI-TOF MS para a correta identificação desse microrganismo têm permitido um melhor entendimento da importância clínica de *P. acnes*, que segue sendo um microrganismo negligenciado, apesar de causar infecções crônicas e recorrentes, principalmente relacionadas às próteses ortopédicas e cardíacas (Nagy *et al.*, 2013; Aubin *et al.*, 2014).

1.2.3. Formação de biofilme por *P. acnes* e outros fatores de virulência

Devido à associação de *P. acnes* aos dispositivos médicos implantados e às características clínicas das infecções, Ramage *et al.* (2003), sugeriram a formação de biofilme por este microrganismo em biomateriais. Posteriormente, diferentes estudos analisaram a formação de biofilme *in vitro* por este microrganismo em diferentes biomateriais, como placas de microtitulação, esferas de vidro, titânio, aço e silicone e comprovaram a eficiência desse microrganismo em formar biofilme nessas superfícies (Bayston *et al.*, 2007; Coenye, Peeters & Nelis, 2007; Tabin *et al.*, 2012). Desde sua descoberta, o biofilme passou a ser considerado um importante fator de virulência envolvido na patogênese de *P. acnes* e parece ser independente do tipo filogenético da cepa (Achermann *et al.*, 2014). Análises do biofilme produzido por *P. acnes* revelaram que a matriz polimérica extracelular é composta de proteínas, resíduos glicosilados e DNA extracelular (Jahns, Eilers & Alexeyev, 2016).

Embora a maioria dos mecanismos e etapas envolvidos na formação de biofilme por esse microrganismo ainda não sejam completamente elucidados, Holmberg *et al.* (2009) sabendo que o plasma humano é um agente facilitador para a maioria das espécies bacterianas produtoras de biofilme, determinaram o efeito desse componente na formação de biofilme por *P. acnes* e concluíram que ao contrário do que é visto para outras espécies, o plasma foi capaz de inibir a formação de biofilme pelas dez cepas de *P. acnes* testadas.

Outros fatores de virulência expressos por *P. acnes* são os genes que codificam proteínas capazes de se ligar tanto à matriz extracelular como às proteínas plasmáticas do hospedeiro, como fibronectina, laminina e fibrinogênio (Achermann *et al.*, 2014). Estas parecem conferir um papel importante no início da formação de biofilme e infecção associada aos dispositivos médicos, assim como relatado para biofilmes formados por *Staphylococcus* spp. (Herrmann *et al.*, 1988). Recebem destaque a proteína de ligação à fibronectina, que é uma importante adesina de superfície produzida por *P. acnes*; e o envelope celular a base de lipopolissacarídeos presentes na célula bacteriana. Ambos possuem papel importante na formação e fixação do biofilme (Yu *et al.*, 1997; Achermann *et al.*, 2014).

P. acnes é capaz de produzir hemólise, que confere a este capacidade de invadir, disseminar e de se evadir do sistema imune do hospedeiro. No caso de *P. acnes*, algumas cepas foram observadas apresentando atividade β -hemolítica, causando intensa lise de eritrócitos, que parece estar relacionada ao gene *tly* (McDowell *et al.*, 2010). Uma análise de genoma de *P. acnes* revelou a presença de 5 genes que apresentaram homologia ao fator CAMP produzido por *Streptococcus agalactiae*. Esse fator é capaz de se ligar às imunoglobulinas G e M, atuando como uma toxina formadora de poros. O CAMP também possui atividade co-hemolítica com a enzima esfingomielinase, que pode conferir citotoxicidade a queratinócitos e macrófagos, o que justifica a virulência através da degradação e invasão de células hospedeiras, que é encontrada em cepas consideradas mais virulentas (Valanne *et al.*, 2005; Nakatsuji *et al.*, 2011).

Rotineiramente, a presença de *P. acnes* em culturas provenientes de implantes removidos é associada à contaminação, ainda que este microrganismo esteja envolvido na infecção, provavelmente porque as células bacterianas não se desagregam do biofilme formado nos implantes (Zappe *et al.*, 2007). Este fato associado ao crescimento lento do microrganismo pode explicar a alta variabilidade referente à taxa de prevalência de *P. acnes* no hospedeiro, podendo variar de baixa ou nula a alta (0 a 40 %) (Galim *et al.*, 2006; Capoor *et al.*, 2016). Entretanto, a implementação da técnica de sonicação de próteses que libera um

fluido sonificado para que posteriormente seja cultivado, demonstra resultados de melhora na recuperação de microrganismos e consequentemente no diagnóstico da infecção (Trampuz *et al.*, 2006).

Outra questão importante na clínica e que tem sido relatada há muitos anos é a tolerância de células microbianas presentes no biofilme frente aos agentes antimicrobianos. Isso se deve a diversos fatores como a restrição na difusão das drogas no interior da matriz polimérica extracelular (Costerton, Stewart & Greenberg, 1999) e a complexidade estrutural e metabólica do biofilme que diminui a disposição de nutrientes para as células presentes em camadas mais profundas, que entram em estado de dormência semelhante à fase estacionária, limitando a ação de antimicrobianos que atuam sobre células metabolicamente ativas (Jahns, Eilers & Alexeyev, 2016).

1.3. Biofilmes polimicrobianos

Biofilmes polimicrobianos, também denominados biofilmes mistos ou multiespécies, são compostos por mais de uma espécie microbiana que atuam sinergicamente e a formação desse complexo pode estar associada ao processo de co-agregação bacteriana (Varposhti, Entezari & Feizabadi, 2014). A descrição da natureza e desenvolvimento de biofilmes microbianos cresceu significativamente desde o primeiro relato de formação dessas comunidades (Leeuwenhoek, 1684 *apud* Slavkin, 1997). No entanto, apesar deste avanço, geralmente os estudos *in vitro* analisam a formação de biofilmes monomicrobianos, que são relativamente raros *in vivo*, pois a maior parte dos biofilmes é composta por uma mistura entre diferentes cepas e espécies, aumentando as interações intraespécies e interespécies e a complexidade de macromoléculas presentes nesse ambiente (Sutherland, 2001; Elias & Banin, 2012). Quando as bactérias estão presentes em biofilmes mistos, a presença de uma espécie produzindo grandes quantidades de matriz polimérica extracelular pode aumentar a estabilidade de outras espécies, ainda que estas não sejam capazes de sintetizar esta matriz (James, Beaudette & Costerton, 1995).

O co-isolamento de *P. acnes* e SCN é descrito na literatura associado a biofilmes polimicrobianos em infecções mistas. Um estudo avaliando 38 casos de IAPs de joelho e quadril demonstrou que 63% estavam relacionadas à infecção monomicrobiana por *P. acnes* e 37% estavam relacionadas a infecções mistas. Dessas, 71,4% correspondiam a infecções por *P. acnes* e SCN (Figa *et al.*, 2017). Outro estudo avaliou infecções de disco intervertebral em

pacientes submetidos à microdissectomia e revelou que entre 119 cepas isoladas de *P. acnes*, 18% correspondiam ao co-isolamento com diferentes espécies de SCN. A formação de biofilme nos discos foi avaliada através da técnica de microscopia confocal que relevou a presença de cepas de *P. acnes* em biofilme (Capoor *et al.*, 2017). Além disso, já foi observado que sobrenadante da cultura de *P. acnes* é capaz de induzir a formação de biofilme por *S. aureus* em superfícies abióticas, através da coproporfirina III, uma porfirina extracelular produzida por *P. acnes*, o que sugere ainda mais a capacidade desse microrganismo de se associar com outros durante a formação de biofilme em infecções mistas (Wollenberg *et al.*, 2014).

Gahukamble *et al.* (2014), baseando-se em um estudo já feito com *S. aureus*, estabeleceram um modelo experimental *in vivo* de osteomielite relacionada a implantes para avaliar o comportamento de *P. acnes* e *S. lugdunensis* nesta infecção. Os resultados obtidos indicaram que *P. acnes* foi capaz de formar biofilme isolado em todos os animais examinados e que não foi capaz de aderir da mesma forma na superfície de diferentes materiais de implante *in vitro*. Enquanto *S. lugdunensis* reduziu a capacidade de formar biofilme isolado *in vivo* quando comparado ao biofilme formado na superfície de diferentes materiais de implantes *in vitro*. Além disso, a forma mais grave da doença foi observada em animais infectados com *P. acnes* quando comparado aos infectados somente com *S. lugdunensis* ambos isoladamente. Tais avaliações *in vitro* e *in vivo* indicam que *P. acnes* e *S. lugdunensis* diferem nos aspectos de formação de biofilme.

2. JUSTIFICATIVA

S. lugdunensis e *P. acnes* são membros da microbiota de pele humana, normalmente considerados como microrganismos comensais. Entretanto, diferentes estudos demonstram que ambas as espécies podem atuar como patógenos oportunistas, sendo frequentemente isoladas de infecções humanas.

Tais infecções estão sendo cada vez mais relacionadas à formação de biofilme, principalmente polimicrobiano, e ao uso de dispositivos médicos, como por exemplo, o implante de próteses. Ambos os fatores possuem grande impacto na saúde pública, uma vez que biofilmes conferem aos microrganismos maior capacidade de tolerar tanto a ação do sistema imunológico como a de antimicrobianos. Muitas vezes, as próteses dos pacientes precisam ser removidas através de novas cirurgias e/ou se faz necessário uso prolongado de antimicrobianos para eliminar a infecção.

De acordo com o descrito na literatura, *P. acnes* e *S. lugdunensis* estão associados durante a formação de biofilme polimicrobiano. Entretanto, estudos buscando entender a relação entre estas espécies e seus fatores de virulência são limitados. Por estas razões, avaliar diferentes condições *in vitro* para estas espécies, principalmente durante a formação de biofilme, são de grande importância para auxiliar na elucidação da dinâmica destas interações durante infecções mistas *in vivo*. O melhor entendimento de tais interações podem auxiliar na escolha do tratamento adequado e na descoberta de moléculas com impacto para a terapia destas infecções.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar a interação de *Staphylococcus lugdunensis* e *Propionibacterium (Cutibacterium) acnes* em biofilme através da análise do co-cultivo destas espécies e do efeito do sobrenadante obtido a partir da cultura de *S. lugdunensis* sobre a produção de biofilme por *P. acnes* e vice-versa.

Para isso, as seguintes etapas foram realizadas:

1. Avaliar a capacidade de formação de biofilme monomicrobiano e misto por cepas de *S. lugdunensis* e *P. acnes*;
2. Avaliar o efeito de moléculas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis* na produção de biofilme por *P. acnes*;
3. Iniciar a caracterização das moléculas bioativas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis*;
4. Avaliar o efeito de moléculas presentes no sobrenadante de *P. acnes* sobre a produção de biofilme e sobre o crescimento de *S. lugdunensis*;
5. Iniciar a caracterização das moléculas bioativas presentes no sobrenadante de *P. acnes*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cepas bacterianas utilizadas no presente estudo

As cepas clínicas das espécies *Staphylococcus lugdunensis* (546 e LCPb) e *Propionibacterium (Cutibacterium) acnes* (LCP e ISR) oriundas de infecções nosocomiais são da coleção dos laboratórios de Infecção Hospitalar e de Biologia de Anaeróbios e foram utilizadas na realização dos experimentos propostos (Tabela 1).

Tabela 1: Características das cepas bacterianas utilizadas durante a realização deste estudo

Amostra	Espécie	Sítio de isolamento	Data de isolamento	Referência
546	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Sangue	06/2007	Pereira, 2010
LCPb*	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Prótese	06/2016	Lima, 2018
LCP*	<i>Propionibacterium acnes</i>	Prótese	06/2016	Lima, 2018
ISR	<i>Propionibacterium acnes</i>	Prótese	08/2016	Lima, 2018

*Amostras isoladas do mesmo paciente.

Um fluxograma dos experimentos realizados com as cepas bacterianas neste estudo está descrito na Figura 1.

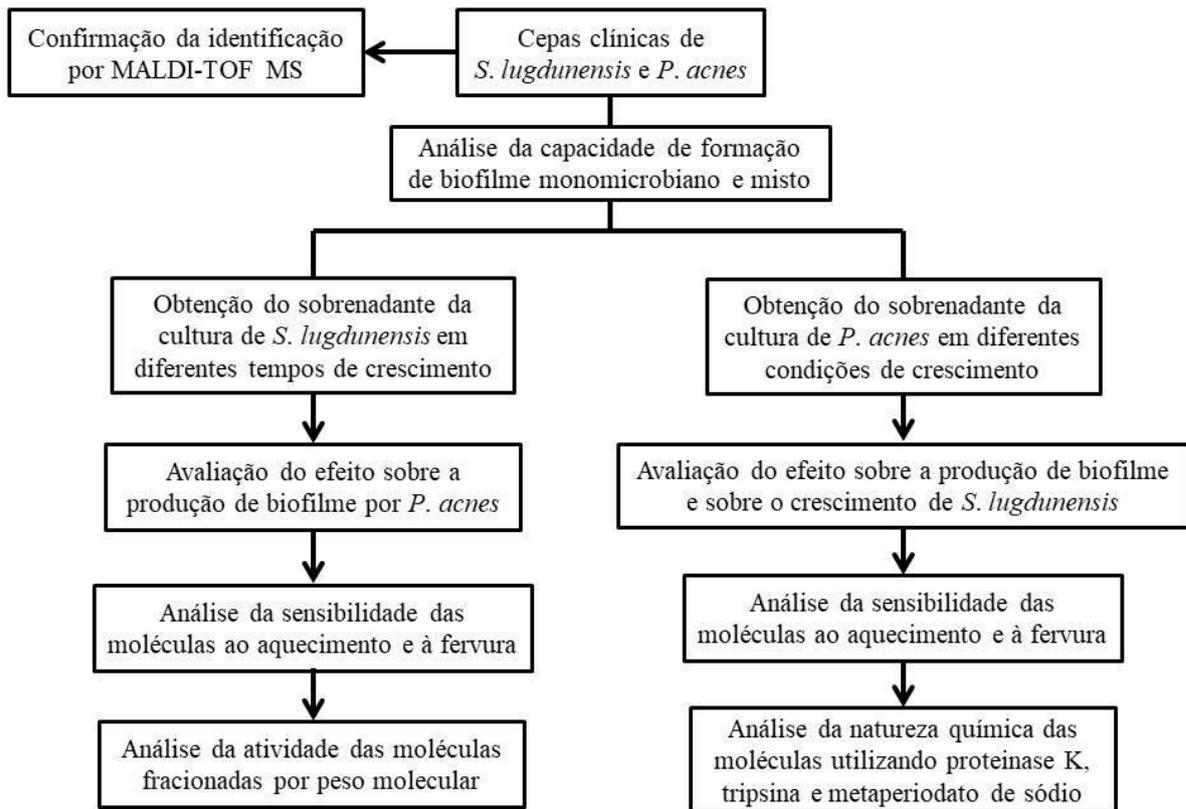


Figura 1: Fluxograma da metodologia utilizada no estudo.

4.1.1. Confirmação da identificação prévia das cepas provenientes de amostras clínicas

Primeiramente, a confirmação da identificação das cepas clínicas de *S. lugdunensis* (546 e LCPb) e de *P. acnes* (LCP e ISR), foi realizada através da técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS).

As cepas previamente identificadas como *S. lugdunensis* (546 e LCPb) foram semeadas em base de ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas em aerobiose a 37 °C por 24 h. As cepas previamente identificadas como *P. acnes* (LCP e ISR) foram também semeadas em base de ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas em atmosfera anaeróbica (80% de N₂; 10% de H₂; 10% de CO₂) a 37 °C por 72 h. Após incubação, uma colônia de cada cepa foi tocada e depositada na placa metálica e foi aplicado sobre as colônias 1 µL de ácido fórmico 70% para lisar as células bacterianas. Após secagem a temperatura ambiente, foi aplicado 1 µL da matriz composta de ácido orgânico α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Sigma; Saint Louis, MO, EUA) e após secagem a temperatura ambiente, a placa metálica contendo as cepas foi submetida à análise de proteínas totais no MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemanha). Cada

colônia foi analisada em duplicata. O equipamento foi calibrado de acordo com as recomendações do fabricante.

O resultado da identificação foi considerado segundo o *score* obtido da amostra através do *software* do aparelho. Portanto, *scores* obtidos entre 2,3 e 3,0 foram considerados como uma identificação altamente provável da espécie. Já *scores* obtidos entre 2,0 e 2,29 representaram uma identificação segura do gênero e uma identificação provável da espécie. Enquanto *scores* obtidos entre 1,7 e 1,9 representaram uma identificação provável do gênero. *Scores* com valores abaixo de 1,7 não foram considerados confiáveis para identificação, de acordo com o banco de dados disponível (Bruker Daltonik MALDI *Biotyper*; Bruker Daltonics, Leipzig, Alemanha).

4.2. Análise da capacidade de formação de biofilme monomicrobiano e misto por cepas de *S. lugdunensis* e *P. acnes*

Com a finalidade de analisar a capacidade de formação de biofilme em isolado e misto por estas cepas, foi utilizado o teste de formação de biofilme em placa de microtitulação de poliestireno, 96 poços com fundo chato, marca TPP 92096 (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça). As cepas de *P. acnes* (LCP e ISR) foram semeadas em base de ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro a 37° C por 72 h em anaerobiose e as cepas de *S. lugdunensis* (546 e LCPb) semeadas em TSA (*Tryptic Soy Agar*; Difco™, BD Diagnostics, Oxford, Inglaterra) a 37 °C por 24 h em aerobiose. Após o crescimento de cada cepa, os inóculos foram preparados em 3 mL de meio TSB (*Tryptic Soy Broth*; Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD, EUA) acrescido de 1% de glicose (Inlab, SP, Brasil) para obtenção de suspensões bacterianas correspondentes ao tubo 1,0 da escala de McFarland (3×10^8 UFC/mL). Em seguida, na placa de microtitulação, foram adicionados aos poços controle 20 µL da suspensão bacteriana de cada cepa em 180 µL de meio TSB acrescido de 1% de glicose para avaliação da formação de biofilme por cada espécie em isolado. Nos poços em que foi avaliada a capacidade de formação de biofilme misto por estas cepas, foram adicionados 10 µL da suspensão bacteriana de *S. lugdunensis* e 10 µL de *P. acnes* em 180 µL de meio TSB acrescido de 1% de glicose. Nos poços brancos foram adicionados somente 200 µL de meio TSB acrescido de 1% de glicose. Posteriormente, a placa de microtitulação foi incubada estaticamente em atmosfera anaeróbica (80% de N₂; 10% de H₂; 10% de CO₂) a 37 °C por 72 h. Não houve troca do meio de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicata experimental e duplicata biológica.

Após incubação, todos os poços foram submetidos à coloração de acordo com os padrões estabelecidos por Stepanović (2007) com modificações. Primeiramente, o meio foi descartado e foram realizadas duas etapas de lavagem com 200 µL de PBS pH 7,2 (Laborclin, Paraná, Brasil), a fim de retirar as células planctônicas não aderidas ao biofilme bacteriano. Logo após, foi realizada uma etapa de fixação em que a placa de microtitulação foi incubada a 60 °C por 60 min. Em seguida, foram adicionados 150 µL de safranina 0,1% (Fisher Scientific Company, Nova Hampshire, EUA) e a placa de microtitulação foi incubada a temperatura ambiente por 15 min. Após esse período, a safranina foi desprezada e foram realizadas duas etapas de lavagem com 200 µL de PBS pH 7,2. Em seguida, foi feita uma etapa de eluição em 150 µL de etanol 95% e após 30 min, foi realizada a leitura de densidade óptica a 492 nm de comprimento de onda ($D.O_{492nm}$) em espectrofotômetro (Thermo Plate TP Reader MN).

Para analisar os resultados, o valor de $D.O_{492nm}$ obtido para cada condição em triplicata foi descontado do valor da média da triplicata da $D.O_{492nm}$ obtida nos poços brancos. Os resultados obtidos foram analisados através do teste t de Student não pareado, utilizando o GraphPad Prism *software*, a fim de calcular o p-valor. Foi considerada significância estatística quando $p \leq 0,05$.

4.3. Obtenção do sobrenadante de *S. lugdunensis* em diferentes tempos de crescimento

A cepa de *S. lugdunensis* (546) foi primeiramente semeada em meio TSA a 37 °C por 24 h e foram feitos 3 inóculos bacterianos distintos a partir de 1 colônia em tubos estéreis contendo 50 mL de meio TSB acrescido de 1% de glicose, que em seguida, foram submetidos a diferentes períodos de incubação (8 h, 24 h e 48 h) estaticamente a 37 °C. Após incubação, foi realizada uma etapa de centrifugação a 2155 x g a 15 °C por 15 min e, posteriormente, cada sobrenadante obtido foi filtrado, utilizando membrana de 0,22 µm (Kasvi, Brasil) e seringa estéril, a fim de obter sobrenadantes livres de células bacterianas. Logo após, 1 mL do sobrenadante foi distribuído para tubos cônicos, a fim de realizar a etapa de secagem utilizando o Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf, Alemanha). Ao final, cada sobrenadante contido em tubo cônico foi suspenso em 50 µL de solução salina 0,85% estéril, a fim de obter sobrenadantes concentrados em 20x.

Para obtenção do extrato controle, o método descrito acima foi executado utilizando somente 50 mL de meio TSB acrescido de 1% de glicose, sem o inóculo bacteriano. Este extrato foi utilizado como controle, a fim de avaliar se os compostos presentes no meio não estavam alterando a produção de biofilme ou o crescimento bacteriano.

4.3.1. Avaliação do efeito do sobrenadante de *S. lugdunensis* obtido em diferentes tempos de crescimento sobre a produção de biofilme por *P. acnes*

A fim de avaliar o efeito de moléculas presentes no sobrenadante da cultura de *S. lugdunensis* (546) obtido em diferentes tempos de crescimento sobre a formação de biofilme pela cepa de *P. acnes* (LCP), foi realizado o teste de formação de biofilme em placa de microtitulação de poliestireno, 96 poços com fundo chato, marca TPP 92096. Para tal, foram utilizados o sobrenadante concentrado obtido em diferentes tempos de crescimento e o extrato controle conforme descrito no item 4.3.

O inóculo bacteriano utilizado durante os testes resultou do crescimento da cepa de *P. acnes* em base de ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro incubado em anaerobiose a 37 °C por 72 h que posteriormente foi inoculado em 3 mL de meio TSB acrescido de 1% de glicose para obtenção de uma suspensão bacteriana correspondente ao tubo 1,0 da escala de McFarland com aproximadamente 3×10^8 UFC/mL. Em seguida, foram adicionados aos poços controle 20 µL da suspensão bacteriana em 180 µL de meio TSB acrescido de 1% de glicose para avaliação da capacidade de formação de biofilme por *P. acnes*. Já nos poços testes, foram adicionados 15 µL da suspensão bacteriana em 120 µL de meio TSB acrescido de 1% de glicose e 15 µL de cada sobrenadante (8 h, 24 h ou 48 h) ou extrato controle. Nos poços considerados como controles negativos, foram adicionados 15 µL dos sobrenadantes (8 h, 24 h ou 48 h) ou extrato controle em 135 µL de meio TSB acrescido de 1% de glicose, sem a suspensão bacteriana. Posteriormente, a placa de microtitulação foi incubada estaticamente em câmara de anaerobiose a 37 °C por 72 h. Não houve troca dos meios de cultura durante o período de incubação. Todos os testes foram realizados em triplicata experimental e duplicata biológica.

Após incubação, todos os poços foram submetidos à coloração de acordo com o descrito por Stepanović (2007), com modificações, como detalhado no item 4.2.

Para analisar os resultados, o valor de D.O._{492nm} obtido para cada condição em triplicata foi descontado do valor da média da triplicata da D.O._{492nm} obtida nos controles negativos. Os resultados obtidos foram analisados através do teste t de Student não pareado, utilizando o GraphPad Prism *software*, a fim de calcular o p-valor. Foi considerada significância estatística quando $p \leq 0,05$.

4.4. Caracterização preliminar das moléculas ativas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis*

4.4.1. Análise da sensibilidade do sobrenadante de *S. lugdunensis* ao aquecimento e à fervura

Foi avaliada a sensibilidade das moléculas ativas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis* (546) quando expostas ao aquecimento e à fervura. Para tal, 10 mL de sobrenadante de *S. lugdunensis* e 10 mL de extrato controle (obtidos de acordo com o item 4.3) concentrados em 20x, foram submetidos separadamente ao aquecimento a 50 °C por 40 min e à fervura (100 °C) por 40 min. O mesmo protocolo descrito no item 4.4 foi realizado para avaliação da atividade do sobrenadante de *S. lugdunensis* e extrato controle aquecidos e fervidos na produção de biofilme por *P. acnes* (LCP).

4.4.2. Obtenção do sobrenadante de *S. lugdunensis* fracionado por peso molecular

As moléculas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis* (546) foram submetidas a fracionamento utilizando filtros Amicon® de 10 e 3 kDa. Para tal, o sobrenadante de *S. lugdunensis* foi obtido de acordo com o item 4.3 e após a etapa de filtração utilizando membrana de 0,22 µm e seringa estéril, foram adicionados 10 mL de sobrenadante em tubo de 50 mL acoplado com filtro Amicon® de 10 kDa. Em seguida, o tubo foi submetido a uma etapa de centrifugação por 20 minutos a 4000 x g em centrífuga de rotor móvel (Sorvall, Legend™ RT). Após esse período, a fração que ficou retida no filtro Amicon® (> 10 kDa) foi suspensa em 1 mL de água para injeção estéril. Já a fração filtrada (<10 kDa), foi transferida para um tubo de 50 mL acoplado com filtro Amicon® de 3 kDa. Posteriormente, o tubo foi submetido a uma etapa de centrifugação por 40 minutos a 4000 x g. A fração que ficou retida no filtro Amicon® (> 3 kDa) foi suspensa em 1 mL de água destilada estéril, enquanto a fração filtrada (< 3 kDa) permaneceu no tubo. Ao final, foram distribuídos 1 mL das frações obtidas para tubos cônicos, a fim de realizar a etapa de secagem utilizando o Speed Vac Concentrator Plus. Por fim, cada uma das frações (> 10 kDa, > 3 kDa e < 3 kDa) foi suspensa em 500 µL de solução salina 0,85% estéril, de modo que cada fração estivesse concentrada em 20x. O mesmo protocolo descrito no item 4.4 foi realizado para avaliação da atividade das frações do sobrenadante de *S. lugdunensis* na produção de biofilme pela cepa de *P. acnes* (LCP).

4.5. Obtenção do sobrenadante de *P. acnes* em meio acrescido ou não de glicose

A cepa de *P. acnes* (LCP), foi primeiramente semeada em base de ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro a 37° C por 72 h em anaerobiose e a partir do crescimento, foram feitos inóculos bacterianos distintos em tubos contendo 10 mL de meio TSB ou TSB acrescido de 1% de glicose, ambos pré reduzidos (0,01% de cisteína) e esterilizados anaerobicamente. Os meios foram incubados por 72 h a 37 °C. Após este período, os tubos foram vortexados por 1 min e foi realizada uma etapa de centrifugação a 1700 x g a 15 °C por 15 min, seguido de filtração em membrana de 0,22 µm. Logo após, o pH dos sobrenadantes foi ajustado, a fim de que fossem equivalentes ao pH do extrato controle e foi realizada uma nova filtração dos sobrenadantes e extrato controle. Ao final, foram realizadas as mesmas etapas descritas no item 4.3 para secagem e concentração dos sobrenadantes em 20x.

Para obtenção dos extratos controles, o método descrito acima foi executado utilizando somente 10 mL de meio TSB ou TSB acrescido de 1% de glicose, pré reduzidos e esterilizados anaerobicamente, sem o inóculo bacteriano. Estes extratos foram utilizados como controle a fim de avaliar se os compostos presentes no meio não estavam alterando a produção de biofilme ou o crescimento bacteriano.

4.5.1. Avaliação do efeito do sobrenadante de *P. acnes* obtido em meio acrescido ou não de glicose sobre a produção de biofilme por *S. lugdunensis*

A fim de avaliar o efeito de moléculas presentes no sobrenadante da cultura de *P. acnes* (LCP) obtido no meio TSB ou TSB acrescido de 1% de glicose sobre a formação de biofilme pela cepa de *S. lugdunensis* (546), foi realizado o teste de formação de biofilme em placa de microtitulação de poliestireno, 96 poços com fundo chato, marca TPP 92096. Para tal, foram utilizados os sobrenadantes concentrados obtidos nos diferentes meios e o extrato controle conforme descrito no item 4.6.

O inóculo bacteriano utilizado durante os testes foi resultado do crescimento da cepa de *S. lugdunensis* em meio TSA incubado em aerobiose a 37 °C por 24 h que posteriormente foi inoculado em 3 mL de meio TSB acrescido de 1% de glicose para obtenção de uma suspensão bacteriana correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, foram adicionados aos poços controle 20 µL da suspensão bacteriana em 180 µL de meio TSB acrescido de 1% de glicose para avaliação da capacidade de formação de biofilme por *S. lugdunensis*. Já nos poços testes, foram adicionados 15 µL da suspensão bacteriana em 120 µL de meio TSB acrescido de 1%

de glicose e 15 µL de cada sobrenadante (obtido em TSB ou TSB acrescido de 1% de glicose) ou extrato controle. Nos poços considerados como controles negativos, foram adicionados 15 µL dos sobrenadantes (obtido em TSB ou TSB acrescido de 1% de glicose) ou extrato controle em 135 µL de meio TSB acrescido de 1% de glicose, sem a suspensão bacteriana. Posteriormente, a placa de microtitulação foi incubada estaticamente a 37 °C por 24 h. Todos os testes foram realizados em triplicata experimental e duplicata biológica.

Após incubação, todos os poços foram submetidos à coloração de acordo com o descrito por Stepanović (2007), com modificações, como detalhado no item 4.2.

Para analisar os resultados, o valor de D.O._{492nm} obtido para cada condição em triplicata foi descontado do valor da média da triplicata da D.O._{492nm} obtida nos controles negativos. Os resultados obtidos foram analisados através do teste t de Student não pareado, utilizando o GraphPad Prism *software*, a fim de calcular o p-valor. Foi considerada significância estatística quando $p \leq 0,05$.

4.5.2. Análise do efeito do sobrenadante de *P. acnes* sobre o crescimento de *S. lugdunensis*

Para analisar o efeito de moléculas presentes no sobrenadante de *P. acnes* (LCP) sobre o crescimento de *S. lugdunensis*, foi realizada a curva de crescimento das cepas 546 e LCPb na presença do sobrenadante de *P. acnes* (LCP) e do extrato controle obtidos em meio TSB sem adição de glicose conforme o item 4.7. Primeiramente, as cepas 546 e LCPb foram crescidas em meio TSA a 37 °C por 24 h e após esse período, uma colônia de cada cepa foi inoculada em 5 mL de TSB acrescido de 1% de glicose e incubadas a 37 °C *overnight*. As culturas crescidas foram ajustadas para uma D.O._{610nm} inicial de 0,05 e inoculadas em tubos de 50 mL na presença do sobrenadante (LCP) ou extrato controle (ambos na concentração 1:10) e do meio TSB acrescido de 1% de glicose. Os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação e a leitura da D.O._{610nm} foi realizada a cada 1 h, utilizando espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000). O teste foi realizado em duplicata biológica.

4.6. Caracterização preliminar das moléculas ativas presentes no sobrenadante de *P. acnes*

4.6.1. Análise da sensibilidade do sobrenadante de *P. acnes* ao aquecimento e à fervura

Foi avaliada a sensibilidade das moléculas ativas presentes no sobrenadante de *P. acnes* (LCP) obtido em meio TSB sem adição de glicose quando expostas ao aquecimento e à fervura. Para tal, 10 mL de sobrenadante de *P. acnes* e 10 mL de extrato controle (obtidos de acordo com o item 4.6) concentrados em 20x, foram submetidos ao aquecimento a 50 °C por 40 min e à fervura (100 °C) por 40 min. O mesmo protocolo descrito no item 4.7 foi realizado para avaliação da atividade do sobrenadante de *P. acnes* e extrato controle aquecidos e fervidos na produção de biofilme por *S. lugdunensis* (546).

4.6.2. Análise da natureza química das moléculas ativas presentes no sobrenadante de *P. acnes*

O sobrenadante de *P. acnes* (LCP) e extrato controle obtidos em meio TSB sem adição de glicose (de acordo com o item 4.6) foram tratados utilizando proteinase K, tripsina ou metaperiodato de sódio, a fim de caracterizar preliminarmente a natureza química das moléculas ativas presentes no sobrenadante. Para o tratamento utilizando proteinase K e tripsina, foi adicionado 3,5 µL de proteinase K (200 µg/mL) ou tripsina (20 µg/mL) em 350 µL de sobrenadante de *P. acnes* e em 350 µL do extrato controle. Já o tratamento com metaperiodato de sódio (NaIO₄; 40 mM) foi feito adicionando 35 µL do composto em 350 µL de sobrenadante de *P. acnes* e em 350 µL do extrato controle. Em seguida, o sobrenadante e extrato controle para cada condição de tratamento foram incubados a 37 °C por 1 h. Para inativar a proteinase K, a tripsina e o metaperiodato de sódio, a fim de garantir que estes não interferissem nos resultados obtidos, cada sobrenadante e extrato controle foram fervidos por 40 min após o tratamento. O tratamento foi também realizado nos extratos controle a fim de excluir qualquer atividade direta dos compostos no biofilme de *S. lugdunensis*. O mesmo protocolo descrito no item 4.7 foi realizado para avaliação da atividade do sobrenadante de *P. acnes* e extrato controle tratados na produção de biofilme por *S. lugdunensis* (546).

4.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste t de Student, não pareado, usando o programa GraphPad Prism 6.0, para calcular o valor p, sendo considerada significância estatística quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Confirmação da identificação das cepas de *S. lugdunensis* e *P. acnes* oriundas de amostras clínicas

As cepas utilizadas durante este estudo (Tabela 1) tiveram suas identificações de gênero e espécie confirmadas através da técnica de MALDI-TOF MS. O resultado foi considerado confiável para estas identificações quando as cepas apresentaram *scores* a partir de 2,0 no *software* do aparelho.

5.2. Avaliação da capacidade de formação de biofilme monomicrobiano e misto por cepas de *S. lugdunensis* e *P. acnes*

A capacidade de cepas de *S. lugdunensis* (546 e LCPb) e *P. acnes* (LCP e ISR) de formar biofilme em isolado e em conjunto foi avaliada em placa de microtitulação de poliestireno. Para tal, as cepas de cada espécie foram crescidas somente na presença do meio TSB acrescido de 1% de glicose ou na presença das cepas da outra espécie e a produção de biofilme foi comparada após 72 h de incubação da placa em anaerobiose. Através dos valores de D.O._{492nm} obtidos da leitura do biofilme, foi observado que as cepas de *P. acnes* LCP e ISR não foram capazes de formar biofilme em isolado nestas condições, enquanto que as cepas de *S. lugdunensis* 546 e LCPb formaram biofilme em isolado. Porém, quando ambas as cepas de *S. lugdunensis* foram cultivadas com as cepas de *P. acnes*, a produção de biofilme aumentou em comparação com as cepas em isolado. Os valores de D.O._{492nm} podem ser observados na Figura 2. Todos os resultados obtidos da formação de biofilme misto entre *S. lugdunensis* e *P. acnes* foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,001$) quando em comparação com os resultados obtidos da formação de biofilme monomicrobiano por cada cepa.

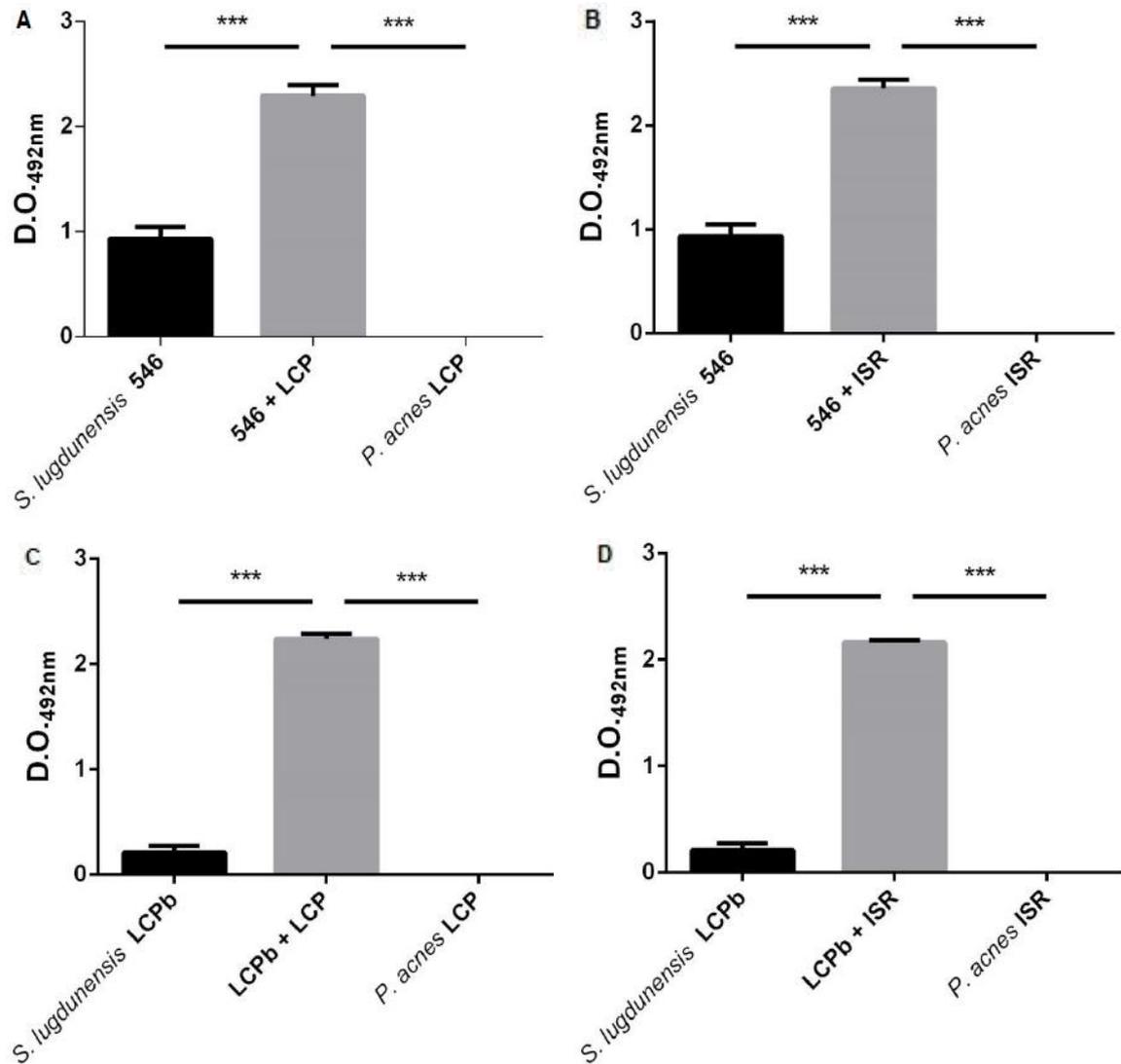


Figura 2: Formação de biofilme monomicrobiano e misto por cepas de *S. lugdunensis* e *P. acnes*. **A:** Cepas *S. lugdunensis* 546 e *P. acnes* LCP. **B:** Cepas *S. lugdunensis* 546 e *P. acnes* ISR. **C:** Cepas *S. lugdunensis* LCPb e *P. acnes* LCP. **D:** Cepas *S. lugdunensis* LCPb e *P. acnes* ISR. ***: $p \leq 0,001$.

5.3. Análise do efeito de moléculas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis* obtido em diferentes tempos de crescimento na produção de biofilme por *P. acnes*

Tendo em vista o efeito positivo na formação de biofilme das cepas de *S. lugdunensis* e *P. acnes* em combinado, nos propomos a investigar o papel de moléculas secretadas por cada espécie no biofilme da outra espécie. Para estes estudos escolhemos prosseguir com uma cepa de *S. lugdunensis* (546) e uma cepa de *P. acnes* (LCP).

Assim, o sobrenadante obtido da cultura de *S. lugdunensis* em diferentes tempos de crescimento (8 h, 24 h, 48 h) teve seu efeito testado na formação de biofilme por *P. acnes* em placa de microtitulação de poliestireno. Para isso, a cepa *P. acnes* foi crescida na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* em cada condição e na presença do extrato controle, que foi

utilizado para avaliar se os compostos presentes no meio não estavam alterando a produção de biofilme ou o crescimento bacteriano. A produção de biofilme foi comparada em cada condição após 72 h de incubação da placa em anaerobiose. *P. acnes* apresentou aumento na capacidade de produzir biofilme na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* obtido após 24 h e 48 h de crescimento, quando comparado ao biofilme formado na presença do extrato controle. O biofilme formado na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* obtido após 8 h de crescimento não apresentou diferença significativa quando comparado ao biofilme formado na presença do extrato controle. O efeito de aumento no biofilme foi ainda maior na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* obtido após 48 h de crescimento. Os valores de D.O._{492nm} obtidos da leitura do biofilme de *P. acnes* na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* (8 h, 24 h, 48 h) e extrato controle podem ser observados na Figura 3.

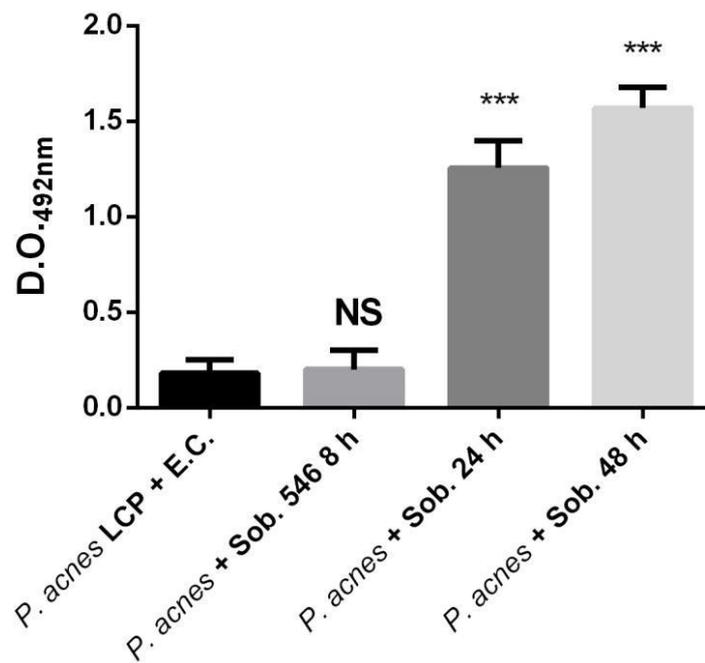


Figura 3: Produção de biofilme pela cepa de *P. acnes* (LCP) na presença do extrato controle (E.C.) e do sobrenadante (Sob.) de *S. lugdunensis* (546) obtido após 8 h, 24 h e 48 h de crescimento. ***: $p \leq 0,001$. NS: não significativo.

5.4. Análise da sensibilidade de moléculas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis* ao aquecimento e à fervura

O sobrenadante obtido da cultura de *S. lugdunensis* (546) e extrato controle foram analisados quanto à sensibilidade ao aquecimento (50 °C por 40 min) e à fervura (100 °C por 40 min). A atividade do sobrenadante de *S. lugdunensis* e extrato controle aquecidos e

fervidos foi avaliada na produção de biofilme por *P. acnes* (LCP) em placa de microtitulação de poliestireno, posteriormente incubada por 72 h em anaerobiose. Na Figura 4, podemos observar o aumento na produção de biofilme por *P. acnes* na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* quando comparado ao extrato controle. Tal efeito foi mantido quando o sobrenadante de *S. lugdunensis* foi submetido ao aquecimento e perdido após ter sido submetido à fervura. Assim, os resultados obtidos indicaram que as moléculas bioativas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis* são resistentes ao aquecimento até 50 °C, mas que a atividade é perdida após fervura. O extrato controle não teve sua atividade alterada frente ao aquecimento e à fervura (dados não mostrados).

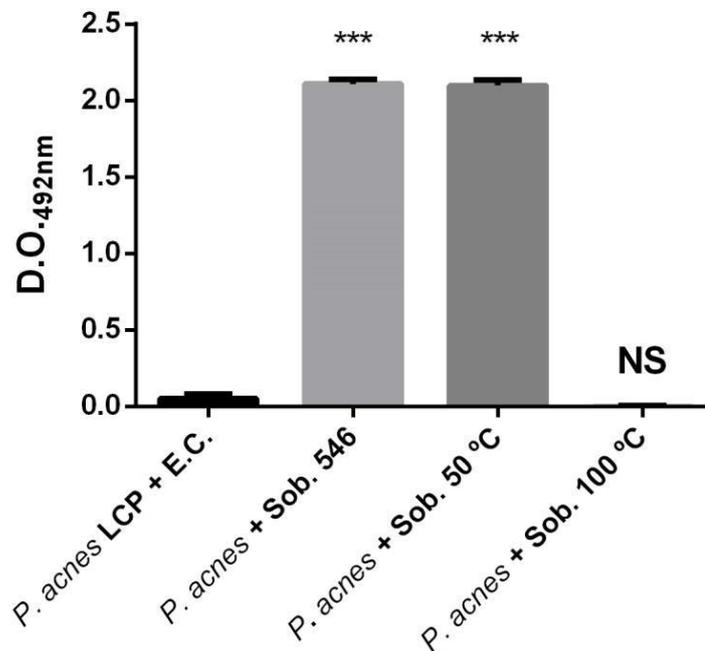


Figura 4: Produção de biofilme pela cepa de *P. acnes* (LCP) na presença do extrato controle (E.C.) e do sobrenadante (Sob.) de *S. lugdunensis* (546) bruto, aquecido (50 °C) e fervido (100 °C). ***: $p \leq 0,001$. NS: não significativo.

5.5. Avaliação da atividade de moléculas presentes no sobrenadante de *S. lugdunensis* fracionadas por peso molecular na formação do biofilme de *P. acnes*

O sobrenadante obtido da cultura de *S. lugdunensis* foi filtrado utilizando filtros de separação por peso molecular de 10 e 3 kDa. As frações obtidas (<3, >3 e >10 kDa) e o extrato controle foram testados quanto à atividade na produção de biofilme por *P. acnes* em placa de microtitulação de poliestireno, posteriormente incubada por 72 h em anaerobiose. Na Figura 5, observamos o aumento da produção de biofilme por *P. acnes* na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* quando comparado ao extrato controle. Entretanto, tal efeito

não foi observado na presença das frações do sobrenadante *S. lugdunensis* com moléculas menores que 3 kDa e maiores que 10 kDa. Já a fração com moléculas maiores que 3 kDa, apresentou atividade semelhante ao sobrenadante de *S. lugdunensis* bruto. Portanto, os resultados obtidos sugerem que a(s) molécula(s) bioativa(s) presente(s) no sobrenadante de 546, tenha(m) entre 3 e 10 kDa.

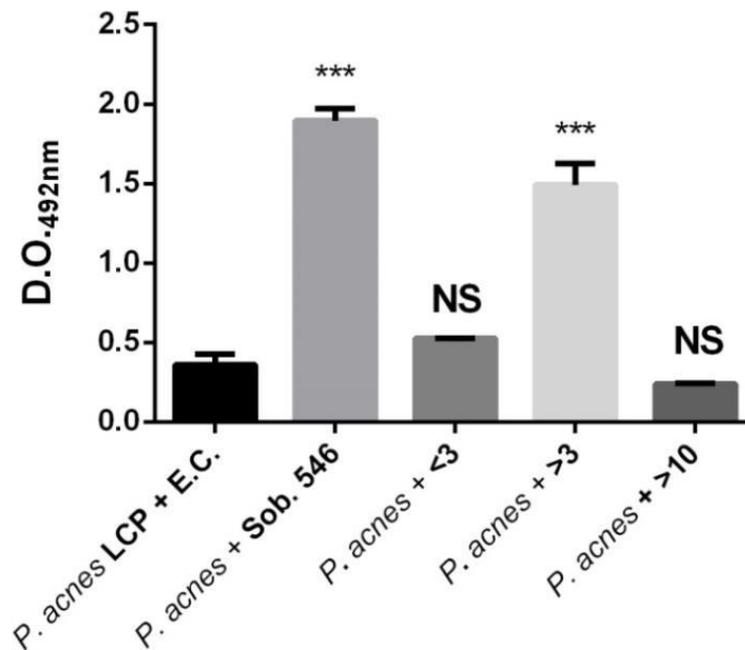


Figura 5: Produção de biofilme pela cepa de *P. acnes* (LCP) na presença das frações do sobrenadante (Sob.) de *S. lugdunensis* (546) (<3 kDa; >3 kDa; >10 kDa), do sobrenadante de *S. lugdunensis* bruto e extrato controle (E.C.). ***: $p \leq 0,001$. NS: não significativo.

5.6. Análise do efeito de moléculas presentes no sobrenadante de *P. acnes* obtido em meio acrescido ou não de glicose sobre a produção de biofilme por *S. lugdunensis*

Para avaliar o impacto das moléculas secretadas por *P. acnes* no biofilme de *S. lugdunensis*, o sobrenadante obtido da cultura de *P. acnes* em meio TSB ou TSB acrescido de 1% de glicose teve seu efeito testado na formação de biofilme por *S. lugdunensis* em placa de microtitulação de poliestireno. Primeiramente, *S. lugdunensis* foi crescido na presença do sobrenadante de *P. acnes* obtido em TSB ou TSB acrescido de 1% de glicose e na presença do extrato controle obtido em TSB ou TSB acrescido de 1% de glicose. Após a incubação da placa por 24 h em aerobiose, a produção de biofilme foi analisada para cada condição testada. Ao contrário do visto com *P. acnes*, cepa de *S. lugdunensis* apresentou diminuição na sua capacidade de produzir biofilme na presença do sobrenadante de *P. acnes* obtido em meio acrescido e não acrescido de glicose, quando comparado ao biofilme formado na presença do

extrato controle nas mesmas condições. O biofilme formado na presença do sobrenadante de *P. acnes* obtido em meio acrescido de glicose não apresentou diferença significativa quando comparado ao biofilme formado na presença do sobrenadante de *P. acnes* obtido em meio não acrescido de glicose. Portanto, os resultados obtidos e mostrados na Figura 6 indicam que, primeiramente, as moléculas presentes no sobrenadante da cultura de *P. acnes* tem efeito inibitório no biofilme de *S. lugdunensis* e que a presença destas moléculas não é dependente do crescimento de *P. acnes* em meio acrescido de glicose.

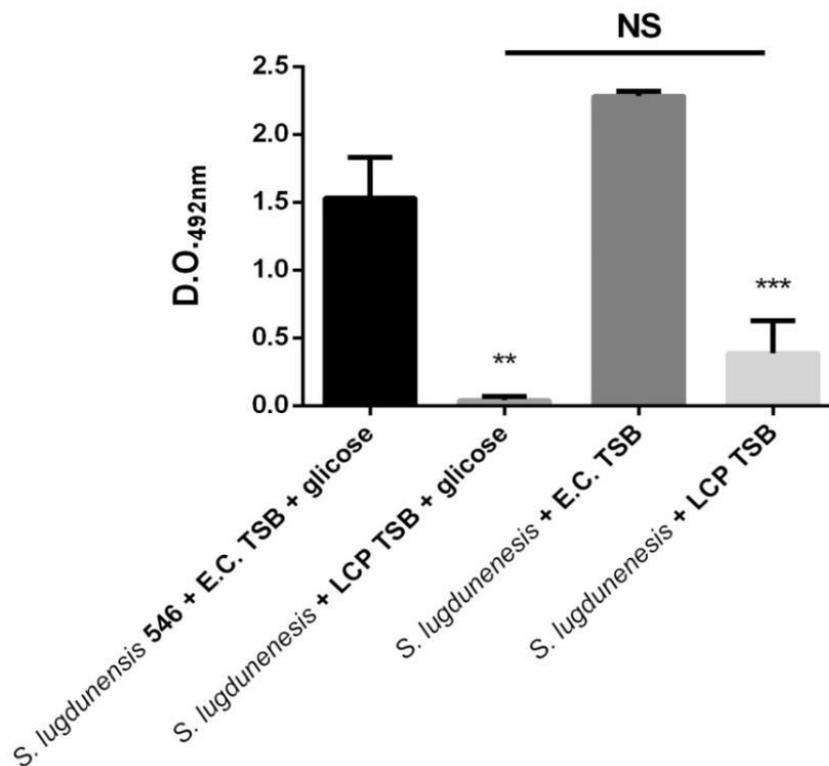


Figura 6: Produção de biofilme pela cepa de *S. lugdunensis* (546) na presença do sobrenadante de LCP obtido em TSB acrescido de glicose (TSB + glicose) ou não (TSB) e do extrato controle obtido nas mesmas condições (E.C. TSB + glicose e E.C. TSB). ***: $p \leq 0,001$. **: $p \leq 0,01$. NS: não significativo.

5.7. Avaliação do efeito de moléculas presentes no sobrenadante de *P. acnes* sobre o crescimento de *S. lugdunensis*

Tendo em vista que o sobrenadante de *P. acnes* obtido após crescimento em meio sem adição de glicose teve efeito inibitório na produção de biofilme de *S. lugdunensis*, investigamos se este sobrenadante teria efeito no crescimento planctônico desta espécie. Para isso, culturas de *S. lugdunensis* (546 e LCPb) foram inoculadas em meios de cultura na presença do sobrenadante de *P. acnes* ou extrato controle sob agitação. A leitura da D.O._{610nm} foi realizada a cada 1 hora, utilizando espectrofotômetro. Os resultados obtidos nas curvas de

crescimento das cepas de *S. lugdunensis* demonstram que o sobrenadante de *P. acnes* não afetou o crescimento das cepas em comparação com o extrato controle (Figura 7).

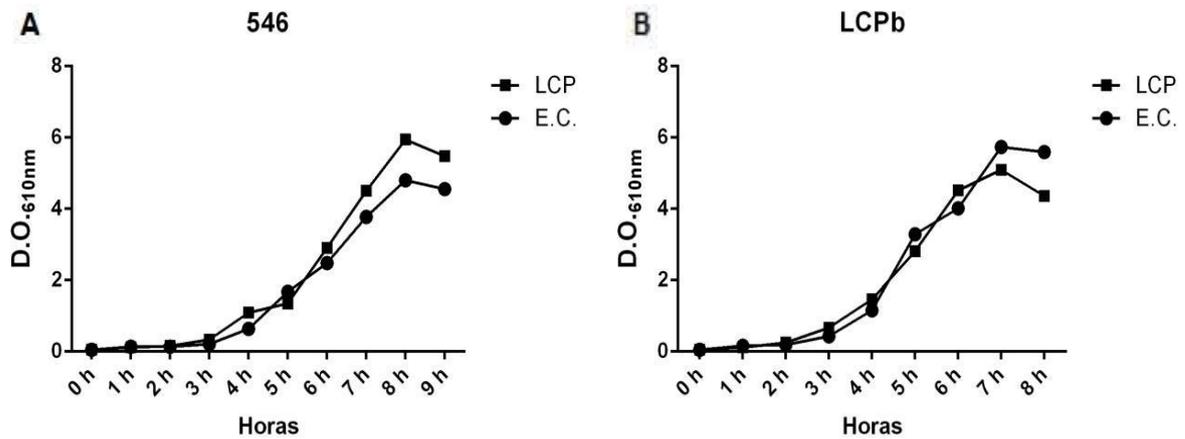


Figura 7: Curvas de crescimento das cepas de *S. lugdunensis* na presença do sobrenadante de *P. acnes* (LCP) e extrato controle (E.C.). **A:** Cepa 546. **B:** Cepa LCPb.

5.8. Análise da sensibilidade das moléculas presentes no sobrenadante de *P. acnes* ao aquecimento e à fervura

O sobrenadante obtido da cultura de *P. acnes* em meio TSB sem adição de glicose e extrato controle foram analisados quanto à sensibilidade ao aquecimento (50 °C por 40 min) e à fervura (100 °C por 40 min). Na Figura 8, podemos observar o efeito de diminuição da produção de biofilme por *S. lugdunensis* na presença do sobrenadante de *P. acnes* em comparação com o extrato controle. Tal efeito foi mantido quando o sobrenadante de *P. acnes* foi submetido ao aquecimento e à fervura. Assim, os resultados obtidos indicam que as moléculas bioativas presentes no sobrenadante de *P. acnes* são resistentes ao aquecimento e à fervura. O efeito de redução de biofilme foi ainda maior na presença do sobrenadante de LCP fervido, apresentando diferença significativa ($p \leq 0,001$) quando comparado ao extrato bruto. O extrato controle não teve sua atividade alterada frente ao aquecimento e à fervura (dados não mostrados).

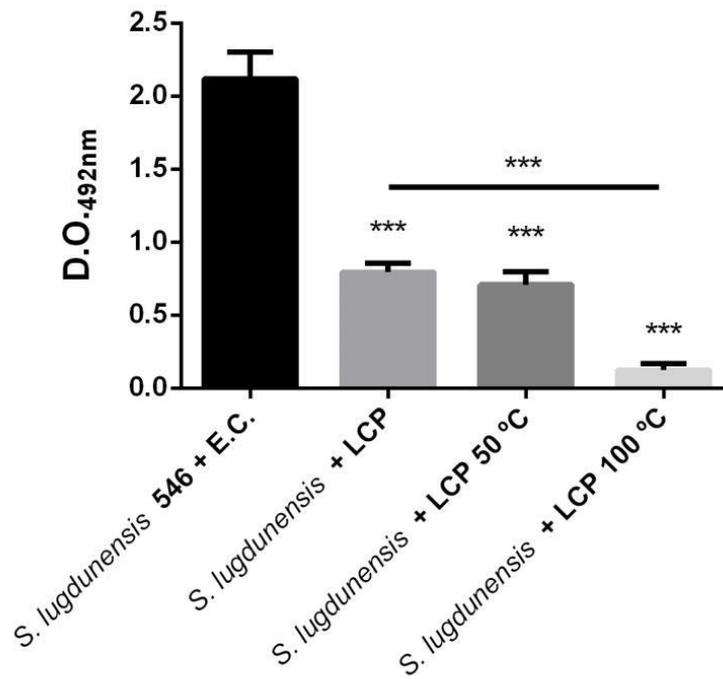


Figura 8: Produção de biofilme por *S. lugdunensis* (546) na presença do extrato controle (E.C.) e do sobrenadante de LCP bruto, aquecido (50 °C) e fervido (100 °C). ***: $p \leq 0,001$.

5.9. Análise da natureza química de moléculas presentes no sobrenadante de *P. acnes*

A fim de melhor caracterizar as moléculas bioativas, o sobrenadante obtido da cultura de *P. acnes* em meio TSB sem adição de glicose foi analisado quanto à natureza química da(s) molécula(s) bioativa(s). Para tal, o sobrenadante de *P. acnes* e extrato controle foram tratados com proteinase K (200 µg/mL), tripsina (20 µg/mL) e metaperiodato de sódio (40 mM) com posterior inativação dos compostos por fervura. Logo após, a atividade do sobrenadante de *P. acnes* e extrato controle submetidos aos tratamentos foi avaliada na produção de biofilme por *S. lugdunensis*. Na Figura 9, novamente podemos observar a diminuição da produção de biofilme por *S. lugdunensis* na presença do sobrenadante de *P. acnes* bruto em comparação com o extrato controle. Tal efeito se manteve quando o sobrenadante de *P. acnes* foi tratado com proteinase K e tripsina. Entretanto, o efeito foi perdido após o tratamento do sobrenadante com metaperiodato de sódio, não havendo diferença significativa entre essa condição e o extrato controle. O resultado obtido sugere que a natureza química da(s) molécula(s) bioativa(s) presente(s) no sobrenadante de LCP não é proteica. O extrato controle não teve sua atividade alterada frente aos tratamentos utilizados (dados não mostrados).

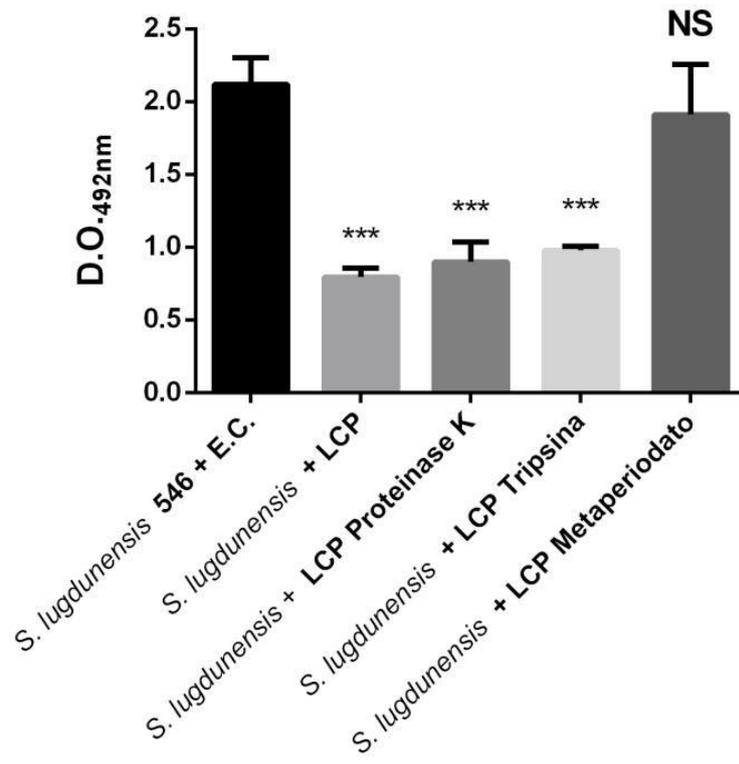


Figura 9: Produção de biofilme por *S. lugdunensis* (546) na presença do extrato controle (E.C.) e do sobrenadante de *P. acnes* (LCP) bruto, tratado com proteinase K, tripsina e metaperiodato de sódio. ***: $p \leq 0,001$. NS: não significativo.

6. DISCUSSÃO

A pele humana consiste em um dos maiores e mais versáteis órgãos do corpo humano, tendo como uma de suas principais funções servir de barreira física entre o corpo e o ambiente externo (Egert & Simmering, 2016). Sendo assim, a pele é considerada a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos, ao mesmo tempo em que é colonizada por uma microbiota altamente diversa e ativa (Oh *et al.*, 2016). *P. acnes* e *S. lugdunensis* são espécies frequentemente associadas a esta microbiota (Cosseau *et al.*, 2016) e que eventualmente, podem se comportar como patógenos oportunistas, caso a barreira física da pele seja rompida (Aubin *et al.*, 2014; Becker, Heilmann & Peters, 2014). Ambos vêm sendo isolados como agentes etiológicos de infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos, principalmente em implantes ortopédicos onde são capazes de formar biofilme (Hascoët *et al.*, 2018; Nora *et al.*, 2018). Dada a frequência de co-isolamento destas espécies e a relevância da formação de biofilme para o estabelecimento de infecções, analisamos a capacidade de cepas de *P. acnes* e *S. lugdunensis* em formar biofilme polimicrobiano *in vitro* em anaerobiose, visto que *P. acnes* é um microrganismo anaeróbio. Os resultados encontrados demonstram uma maior formação de biofilme quando as cepas estão em associação em comparação ao biofilme formado em isolado por cada espécie. Tais resultados corroboram com os descritos na literatura que indicam a capacidade de *P. acnes* e espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa causarem infecções mistas *in vivo* (Capoor *et al.*, 2017; Figa *et al.*, 2017) que podem estar associadas à formação de biofilme polimicrobiano (Figa *et al.*, 2017). Possivelmente, estas duas espécies, ajudariam uma a outra a persistirem em estado de biofilme, facilitando o seu estabelecimento e manutenção em uma infecção relacionada a próteses periprotéticas, por exemplo.

Em 2016, Tyner & Patel relataram que em anaerobiose, *P. acnes* é capaz de atuar favorecendo a manutenção de biofilme de *S. aureus* em co-cultura. Neste trabalho, *S. aureus* não foi capaz de formar biofilme estável em isolado nas condições testadas, pois durante o período de incubação, o biofilme foi sendo degradado. Quando *P. acnes* e *S. aureus* foram co-cultivados, o oposto foi observado com *S. aureus* se mantendo por um longo período na presença de *P. acnes*. Já em aerobiose, *S. aureus* formou um biofilme monomicrobiano estável. Tais resultados indicam que microrganismos aeróbios podem se comportar de maneira diferente quando cultivados anaerobicamente e evidenciam a importância de entender as interações entre os diferentes microrganismos durante a formação de biofilme polimicrobiano.

Visto que um estudo anterior do nosso grupo já havia demonstrado que moléculas presentes no sobrenadante da cultura de *S. lugdunensis* conferem aumento na formação de biofilme por *P. acnes* em anaerobiose (Reviello, 2018), buscamos avaliar o tempo de crescimento ideal para que essas moléculas sejam secretadas por *S. lugdunensis* e iniciar a caracterização das moléculas bioativas. Nossos resultados indicaram que o efeito de aumento da produção de biofilme por *P. acnes* é maior na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* obtido após 48 h de crescimento. Além disso, observamos que as moléculas bioativas mantêm sua atividade após serem submetidas ao aquecimento até 50 °C, porém a atividade é perdida após fervura e que tais moléculas parecem ter entre 3 e 10 kDa. Portanto, concluímos que *S. lugdunensis* produz moléculas que auxiliam na formação de biofilme de *P. acnes* em anaerobiose e que esta produção é aumentada conforme o crescimento bacteriano. Maiores estudos serão necessários para avaliar se a lise bacteriana favorece a produção destas moléculas e possível identificação da molécula bioativa. Procuraremos também entender os mecanismos pelo qual esta molécula atua em *P. acnes*, para de fato entender como a interação destas duas espécies pode ser vantajosa para elas no desenvolvimento de uma infecção periprostética.

Porém, neste trabalho procuramos também entender se o contrário seria verdadeiro, ou seja, se *P. acnes* estaria produzindo moléculas que facilitariam a formação de biofilme de *S. lugdunensis*. Surpreendentemente, ao avaliar as moléculas secretadas por *P. acnes* após 72h de crescimento em anaerobiose sob a formação de biofilme por *S. lugdunensis*, observamos que as moléculas secretadas por *P. acnes* eram capazes de diminuir a formação de biofilme por *S. lugdunensis*, porém sem inibir seu crescimento planctônico. Shu *et al.* (2015) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que o ácido propiônico, produto da fermentação de *P. acnes* e obtido no sobrenadante de sua cultura, é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e que tal efeito é resultado do metabolismo do glicerol no meio de cultura em que *P. acnes* é crescido. Além disso, os autores relataram que a acidificação do meio durante a fermentação, com mudança brusca no pH, reduziu conseqüentemente o pH intracelular de *S. aureus* e causou o efeito letal nas células.

Como já mencionado, no presente estudo não foi observado efeito no crescimento de *S. lugdunensis*, mas para verificar se não estaríamos lidando com efeitos do ácido propiônico, o efeito do sobrenadante de *P. acnes* crescido em meio sem adição de glicose e com o pH ajustado ao mesmo pH do extrato controle foi testado. Tal efeito permaneceu mostrando que

as moléculas bioativas encontradas na cultura da cepa de *P. acnes* de nosso estudo, provavelmente não são as mesmas relatadas por Shu *et al.* (2015).

Assim, seguimos com a caracterização das moléculas com atividade antibiofilme no sobrenadante de *P. acnes*. Nos experimentos feitos para avaliar a sensibilidade das moléculas bioativas frente ao aquecimento (50 °C) e à fervura (100 °C) e aos tratamentos com proteinase K, tripsina e metaperiodato de sódio, foi observado que as moléculas eram resistentes a todas as condições, exceto ao tratamento com metaperiodato de sódio. O metaperiodato de sódio é capaz de oxidar ligações polissacarídicas (dióis vicinais), indicando portanto uma natureza provavelmente polissacarídica das moléculas ativas neste sobrenadante. Interessantemente, observamos que o efeito de diminuição da produção de biofilme por *S. lugdunensis* é maior na presença do sobrenadante de *P. acnes* fervido. Tal resultado levanta a hipótese de que outras moléculas presentes no sobrenadante possam atuar inibindo a atividade das moléculas bioativas de interesse no estudo. Dessa forma, as possíveis moléculas inibidoras da atividade antibiofilme estariam sendo degradadas durante a fervura e as moléculas bioativas estariam atuando em suas melhores condições.

Estudos recentes como o de Mahdhi *et al.* (2018) vêm demonstrando a atividade antibiofilme de polissacarídeos extracelulares. Nesse estudo, foi observado que *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus* spp. são capazes de secretar exopolissacarídeos que possuem atividade antibiofilme frente *Escherichia coli*. Jun *et al.* (2018) encontraram atividade antibiofilme em polissacarídeos de algas marinhas frente a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, bactérias associadas ao biofilme dentário. Em ambos os estudos foi encontrada atividade inibitória no crescimento das espécies testadas, tal efeito não foi observado em nossos estudos. Em 2011, Jiang *et al.* demonstraram a presença de exopolissacarídeos secretados por uma espécie marinha de *Vibrio* spp. com atividade antibiofilme frente cepas de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Tal efeito não resulta da redução no crescimento dessas espécies. Já Pihl *et al.* (2013), observaram a presença de compostos polissacarídicos presentes no sobrenadante da cultura de *P. aeruginosa* capazes de atuar na formação do biofilme produzido por *S. epidermidis*, sem afetar seu crescimento planctônico.

É importante destacar que os efeitos observados em nosso estudo de aumento na formação de biofilme durante o co-cultivo das espécies, bem como o aumento da capacidade de formação de biofilme por *P. acnes* na presença do sobrenadante de *S. lugdunensis* e o efeito oposto observado com o sobrenadante da cultura de *P. acnes* no biofilme de *S. lugdunensis*, são fenótipos dependentes das condições de cultivo a que os microrganismos

foram submetidos *in vitro*. Tais condições podem ser capazes de estimular a expressão de determinados genes, enquanto inibe a expressão de outros, por meio da regulação gênica de fatores de virulência, conferindo vantagens adaptativas ao microrganismo. No biofilme polimicrobiano, por exemplo, os microrganismos obtêm diversas vantagens, como a cooperação metabólica e influência de subprodutos, obtenção de resistência passiva, participação em sistemas de *quorum sensing*, dentre outros (Carlsson, 1997; Fischbach & Sonnenburg, 2011; Weimer, Juneau & Murrah, 2011).

As moléculas presentes no sobrenadante da cultura de *P. acnes* serão foco de futuros estudos, que darão continuidade na caracterização das moléculas com atividade antibiofilme que foram encontradas. É de nosso interesse obter outras cepas de *P. acnes* para avaliar se tais moléculas são produzidas independente ou não da cepa em questão. Além de testar o efeito das moléculas bioativas em outras cepas de *S. lugdunensis*, bem como em cepas de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa. O fato dessas moléculas não interferirem em cepas planctônicas de *S. lugdunensis* e atuarem somente na produção de biofilme, que é um fator de virulência de extrema importância para as infecções causadas por essa espécie, traz a possibilidade de utilização dessas moléculas como estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções por *S. lugdunensis*.

Dados os tópicos abordados no estudo sobre a problemática relacionada à formação de biofilme polimicrobiano em infecções, novos estudos que investiguem os mecanismos moleculares envolvidos durante estas interações e ainda, que busquem soluções para o tratamento e erradicação do biofilme, são de extrema importância para a pesquisa e também para a clínica médica.

7. CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou que cepas de *P. acnes* e *S. lugdunensis* aumentam significativamente sua capacidade de produção de biofilme quando estão em biofilme misto em comparação ao biofilme formado em isolado por cada espécie. Tal fenótipo foi observado em anaerobiose e com duas cepas diferentes de cada espécie.
- As moléculas presentes no sobrenadante da cultura de *S. lugdunensis* conferem aumento significativo na produção de biofilme de *P. acnes* em anaerobiose. Essas moléculas possuem melhor atividade quando obtidas após 48 h de crescimento. Além disso, têm entre 3 e 10 kDa e são resistentes a 50 °C, porém sensíveis à fervura.
- As moléculas presentes no sobrenadante da cultura de *P. acnes* conferem diminuição na produção de biofilme de *S. lugdunensis* em aerobiose, sem afetar o crescimento planctônico da cepa. Estes dados indicam que *P. acnes* produz moléculas com atividade antibiofilme sem ação antibacteriana, atuando somente na produção de biofilme desta espécie.
- O efeito das moléculas bioativas presentes no sobrenadante de *P. acnes* não é dependente do seu crescimento na presença de glicose. Tais moléculas são resistentes à fervura, à proteinase K e à tripsina e sensíveis ao metaperiodato de sódio, indicando uma natureza polissacarídica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achermann, Y., Goldstein, E.J.C, Coenye, T. & Shirtliff, M.E. (2014). *Propionibacterium acnes*: from Commensal to Opportunistic Biofilm-Associated Implant Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 27(3): 419–440.
- Anguera, I., Río, A.D., Miró, J.M., Matínez-Lacasa, X., Marco, F., Gumá, J.R., Quaglio, G., Claramonte, X., Moreno, A., Mestres, C.A., Mauri, E., Azqueta, M., Benito, N., María, C.G., Almela, M. Jiménez-Expósito, M.J., Sued, O., Lazzari, E.D. & Gatell, J.M. (2005). *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart.* 91(2): e10.
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E. & Shirtliff, M.E (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence.* 2(5): 445-459.
- Argemi, X., Dahyot, S., Lebeurre, J., Hansmann, Y., Oustau, C.R. & Prévost, G. (2017 a). *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection. *Médecine et maladies infectieuses.* 47: 498–501.
- Argemi, X., Hansmann, Y., Riegel, P. & Prévost, G. (2017 b). Is *Staphylococcus lugdunensis* Significant in Clinical Samples?. *Journal of Clinical Microbiology.* 55(11): 3167-3174.
- Aubin, G.G, Portillo, M.E., Trampuz, A. & Corvec, S. (2014). *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Médecine et maladies infectieuses.* 44(6): 241–250.
- Babu, E. & Oropello, J. (2011). *Staphylococcus lugdunensis*: the coagulase-negative *Staphylococcus* you don't want to ignore. *Expert Reviews. Anti Infect. Ther.* 9(10): 901–907.
- Bannerman, T.L. & Peacock, S.J. (2007). *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed., vol. 1. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L. & Pfaller M.A. eds. (ASM Press, Washington, DC.) pp. 390-411.
- Bayston, R., Ashraf, W., Davies, R.B., Tucker, E., Clement, R., Clayton, J., Freeman, B.J. & Nuradeen, B. (2007). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* on biomaterials in vitro and in vivo: impact on diagnosis and treatment. *J Biomed Mater Res A.* 81(3): 705-709.
- Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 27(4): 870-926.
- Bernardi, A.C.A., Pizzolitto, E.L. & Pizzolitto, A.C. (2007). Detecção da produção de *slime* por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.* 28(1): 57-66.
- Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W. & Huntoon, F.M. (1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 1: 442.
- Bieber, L. & Kahlmeter, G. (2010). *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. *Clinical Microbiology and Infection.* 16(4): 385-388.
- Bryers, J.D. (2008). Medical Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering.* 100(1): 1-18.

- Capoor, M.N., Ruzicka, F., Machackova, T., Jancalek, R., Smrcka, M., Schmitz, J.E., Hermanova, M., Sana, J., Michu, E., Baird, J.C., Ahmed, F.S., Maca, K., Lipina, R., Alamin, T.F., Coscia, M.F., Stonemetz, J.L., Witham, T., Ehrlich, G.D., Gokaslan, Z.L., Mavrommatis, K., Birkenmaier, C., Fischetti, V.A. & Slaby, O. (2016). Prevalence of *Propionibacterium acnes* in Intervertebral Discs of Patients Undergoing Lumbar Microdiscectomy: A Prospective Cross-Sectional Study. PLoS One. 11(8): e0161676.
- Capoor, M.N., Ruzicka, F., Schmitz, J.E., James, G.A., Machackova, T., Jancalek, R., Smrcka, M., Lipina, R., Ahmed, F.S., Alamin, T.F., Anand, N., Baird, J.C., Bhatia, N., Deviren, S.D., Eastlack, R.K., Fisher, S., Garfin, S.R., Gogia, J.S., Gokaslan, Z.L., Kuo, C.C., Lee, Y.P., Mavrommatis, K., Michu, E., Noskova, H., Raz, A., Sana, J., Shamie, A.N., Stewart, P.S., Stonemetz, J.L., Wang, J.C., Witham, T.F., Coscia, M.F., Birkenmaier, C., Fischetti, V.A. & Slaby, O. (2017). *Propionibacterium acnes* biofilm is present in intervertebral discs of patients undergoing microdiscectomy. PLoS ONE. 12(4): e0174518.
- Carlsson J. (1997) Bacterial metabolism in dental biofilms. Adv Dent Res. 11: 75–80.
- Chiller, K., Selkin, B.A. & Murakawa, G.J. (2001). Skin microflora and bacterial infections of the skin. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 6(3): 170-174.
- Coenye, T., Peeters, E. & Nelis, HJ. (2007). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. Res. Microbiol. 158(4): 386-392.
- Colina, M., Monaco, A, L., Khodeir, M. & Trotta, F. (2007). *Propionibacterium acnes* and SAPHO syndrome: a case report and literature review. Clin Exp Rheumatol. 25(3): 457–460.
- Corvec, S., Portillo, M.E., Pasticci, B.M., Borens, O. & Trampuz, A. (2012). Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. The International Journal of Artificial Organs. 35(10): 923–934.
- Cosseau, C.S., Bertrand, R., Duplan, H., Lucas, O., Ingrassia, I., Pigasse, C., Roques, C. & Bilak, E.J. (2016). *Proteobacteria* from the human skin microbiota: Species-level diversity and hypotheses. One Health. 2: 33-34.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science. 284: 1318-1322.
- Csukás, Z., Banizs, B. & Rozgonyi, F. (2004). Studies on the cytotoxic effects of *Propionibacterium acnes* strains isolated from cornea. Microbial Pathogenesis. 36: 171–174.
- Cue, D., Lei, M.G. & Lee, C.Y. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. Front Cell Infect Microbiol. 2: 38.
- Delahaye, F., Fol, S., Célard, M., Vandenesch, F., Beaune, J., Bozio, A. & de Gevigney, G. (2005). *Propionibacterium acnes* infective endocarditis. Study of 11 cases and review of literature. Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux. 98(12): 1212–1218.
- Delgado, S., Suárez, A. & Mayo, B. (2011). Identification, typing and characterisation of *Propionibacterium* strains from healthy mucosa of the human stomach. International Journal of Food Microbiology.
- Deramo, V.A. & Ting, T.G. (2001). Treatment of *Propionibacterium acnes* endophthalmitis. Current Opinion in Ophthalmology. 12(3): 225–229.
- Dessinioti, C. & Katsambas, A.D. (2010) The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. Clin. Dermatol. 28: 2–7.

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9): 881-890.

Donvito, B., Etienne, J., Denoroy, L., Greenland, T., Benito, Y & Vandenesch, F. (1997 a). Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infection and Immunity*. 65(1): 95–100.

Donvito, B., Etienne, J., Greenland, T., Mouren, C., Delorme, V. & Vandenesch, F. (1997 b). Distribution of the synergistic haemolysin genes hld and slush with respect to agr in human staphylococci. *FEMS Microbiology Letters*. 151:139–144.

Douglas, H.C., Gunter, S.E. (1946). The taxonomic position of *Corynebacterium acnes*. *J Bacteriol*. 52: 15–23.

Egert, M., & Simmering, R. (2016). The Microbiota of the Human Skin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 61–81.

Elias, S. & Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 36(5): 990–1004.

Evans, C.A. & Matter, K. (1979). The aerobic growth of *Propionibacterium acnes* in primary cultures from skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 76: 103-106.

Fey, P. D. & Olson, M. E. (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol*. 5(6): 917-933.

Figa, R., Muñetón, D., Gómez, L., Matamala, A., Lung, M., Cuchi, E. & Corona, P.S. (2017). Periprosthetic joint infection by *Propionibacterium acnes*: Clinical differences between monomicrobial versus polymicrobial infection. *Anaerobe*, 44:143-149.

Fischbach, M.A. & Sonnenburg, J.L. (2011). Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host Microbe*. 10: 336–347.

Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K. & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 12(1): 49-62.

Freney J., Brun Y., Bes M., Meugnier H., Grimont F., Grimont, P., Nervi, C. & Fleurette J. (1988). *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38, 168–172.

Frank, K.L., del Pozo, J.L. & Patel, R. (2008). From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis: How Daring To Be Different Works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 21: 111-133.

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

Frank, K.L. & Patel, R. (2008). *Staphylococcus lugdunensis* — Not the Average Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species. *Clinical Microbiology Newsletter*. 30(8): 55-62.

Funke, G., Graevenitz, A.V., Clarridge, J.E. & Bernard, K.A. (1997). Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 10(1): 125-159.

- Gahukamble, A.D., McDowell, A., Post, V., Varela, J.S., Rochford, E.T.J., Richards, R.G., Patrick, S. & Moriarty, T.F. (2014). *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus lugdunensis* Cause Pyogenic Osteomyelitis in an Intramedullary Nail Model in Rabbits. *J Clin Microbiol.* 52: 1595–1606.
- Galim, P.B., Rand, N., Giladi, M., Schwartz, D., Ashkenazi, E., Millgram, M., Dekel, S. & Floman, Y. (2006). Association between sciatica and microbial infection: true infection or culture contamination? *Spine.* 31(21): 2507–2509.
- Gibbon, S.F., Tomida, S., Chiu, B.H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfe, M.C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R.L., Miller, J.F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G.M. & Li, H. (2013). *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J Invest Dermatol.* 133(9): 2152-2160.
- Gilchrist, T.C. (1900). A bacteriological and microscopical study of over 300 vesicular and pustular lesions of the skin, with a research upon the etiology of acne vulgaris. *Johns Hopkins Hosp. Rept.* 9: 409-430.
- Gilchrist, T.C. (1903). The etiology of acne vulgaris. *Journal of Cutaneous Diseases.* 21: 107-120.
- Grice, E.A. & Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. *Nat Ver Microbiol.* 9(4): 244-254.
- Grice, E.A. Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., Green, E.D., Turner, M.L. & Segre, J.A. (2009). Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science.* 324(5931): 1190-1192.
- Hascoët, J.L., Bicart-See, A., Félicé, M.P., Giordano, G. & Bonnet, E. (2016). *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Infectious Diseases.* 51: 56-61.
- Hascoët, L.J., Félicé, M.P., Bicart, A.S., Bouige, A., Giordano, G., Bonnet, E. (2018). Species and antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections. *Epidemiology and Infection.* 1–6.
- Herchline, T.E. & Ayers, L.W. (1991). Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. *Journal of Clinical Microbiology.* 29(3): 419–421.
- Herrmann, M., Vaudaux, P.E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P.D., Perdreau, F.S., Peters, G. & Waldvogel, F.A. (1988). Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.* 158: 693–701.
- Ho, P.K., Leung, S.M.H., Chow, K.H., Tse, C.W.S., Cheng, V.C.C., Tse, H., Mak, S.K. & Lo, W.K. (2015). Carriage niches and molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and methicillin-resistant *S. lugdunensis* among patients undergoing long-term renal replacement therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 81: 141-144.
- Holmberg, A., Lood, R., Mörgelin, M., Söderquist, B., Holst, E., Collin, M., Christensson, B. & Rasmussen, M. (2009). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 787–795.
- Jahns, A.C., Eilers, H. & Alexeyev, O.A. (2016). Transcriptomic analysis of *Propionibacterium acnes* biofilms in vitro. *Anaerobe.* 42:111-118.
- James, G.A., Beaudette, L. & Costerton, J.W. (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology.* 15: 257-262.

- Jun, J.Y., Jung, M.J., Jeong, I.H., Yamazaki, K., Kawai, Y. & Kim, B.M. (2018). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae against Dental Plaque Bacteria. *Mar Drugs*. 16: 301.
- Khoury, A.E., Lam, K., Ellis, B. & Costerton, J.W. (1992). Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO Journal*. 38(3): M174–M178.
- Kurtz, S.M., Lau, E., Schmier, J. Ong, K.L., Zhao, K. & Parvizi, J. (2008). Infection Burden for Hip and Knee Arthroplasty in the United States. *The Journal of Arthroplasty*. 23: 984-991.
- Kyaw, H., Raju, F., Shaikh, A.Z., Lin, A.N., Lin, A.T., Abboud, J. & Reddy, S. (2018). *Staphylococcus lugdunensis* Endocarditis and Cerebrovascular Accident: A Systemic Review of Risk Factors and Clinical outcome. *Cureus*. 10(4): e2469.
- Levy, O., Iyer, S., Atoun, E., Peter, N., Hous, N., Cash, D., Musa, F. & Narvani, A.A. (2013). *Propionibacterium acnes*: An underestimated etiology in the pathogenesis of osteoarthritis? *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. 22: 505-511.
- Lima, C.O.G.X. (2018). *Cutibacterium acnes*: Um patógeno negligenciado em implantes ortopédicos. Dissertação de Mestrado em Ciências (Microbiologia). Programa de pós-graduação em Ciências (Microbiologia), UFRJ, Rio de Janeiro. 1-60.
- Loew, O. (1990). Catalase: a new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*. 87(2256): 284.
- Mahdhia, A., Lebanb, N., Chakrouna, I., Bayara, S., Mahdouania, K., Majdoubc, H., Kouidhid, B. (2018). Use of extracellular polysaccharides, secreted by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* spp., as reducing indole production agents to control biofilm formation and efflux pumps inhibitor in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*. 125: 448-453.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley D.H. & Stahl, D.A. (2016). Diversidade das Bactérias. In: *Microbiologia de Brock*, 14 ed. (Artmed, Porto Alegre, Brasil), pp 493.
- Marquet, N.V.D.M., Achard, A., Mereghetti, L., Danton, A., Minier, M. & Quentin, R. (2003). *Staphylococcus lugdunensis* Infections: High Frequency of Inguinal Area Carriage. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(4): 1404–1409.
- McDowell, A., Valanne, S., Ramage, G., Tunney, M., Glenn, J., McLorinan, G. C., Bhatia, A., Moissonneuve, J.F., Lods, M., Persing, D.H. & Patrick, S. (2010). *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(1): 326-334.
- McGinley, K.J., Webster, G.F. & Leyden, J.J. (1977). Regional Variations of Cutaneous Propionibacteria. *Appl Environ Microbiol*. 35(1): 62–66.
- Mitchell, J. (2004). Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology*. 150(11): 3831–41.
- Miskin, J.E., Farrell, A.M, Cunliffe, W.J. & Holland, K.T. (1997). *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. *Microbiology*. 143(5): 1745-1755.

- Miura, Y., Ishige, I., Soejima, N., Suzuki, Y., Uchida, K., Kawana, S. & Eishi, Y. (2010). Quantitative PCR of *Propionibacterium acnes* DNA in samples aspirated from sebaceous follicles on the normal skin of subjects with or without acne. *J Med Dent Sci.* 57(1): 67-74.
- Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaiolis, S., Campoccia, D., Speziale, P. & Arciola, C.R. (2011). Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs.* 34(9): 824-831.
- McCulloch, J.A. & Mamizuca, E.M. (2015). *Microbiologia*, 6 ed. São Paulo: Editora Atheneu. Brasil.
- Nagy, E., Urbán, E., Becker, S., Kostrzewa, M., Vörös, A., Hunyadkúrti, J. & Nagy, I. (2013). MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe.* 20: 20-26.
- Nakatsuji, T., Tang, D.C., Zhang, L., Gallo, R.L. & Huang, C.M. (2011). *Propionibacterium acnes* CAMP factor and host acid sphingomyelinase contribute to bacterial virulence: potential targets for inflammatory acne treatment. *PLoS One.* 6(4): e14797.
- Nilsson, M., Bjerketorp, J., Wiebensjö, A., Ljungh, A., Frykberg, L. & Guss, B. (2004). A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiology Letters.* 234(1): 155–61.
- Nora Renz, Stasa Mudrovcic, Carsten Perka, Andrej Trampuz. (2018). Orthopedic implant-associated infections caused by *Cutibacterium* spp. – A remaining diagnostic challenge. *PLoS One.* 13: e0202639.
- Novick, R.P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology.* 48(6):1429–1449.
- Oh, J., Byrd, A.L., Park, M., Kong, H.H. & Segre, J.A. (2016). Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell.* 165: 854–866.
- Patel, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis.* 57(4): 564-572.
- Pereira, E.M., Oliveira, F.L.F., Schuenck, R.P., Zoletti, G.O. & dos Santos, K.R.N. (2010). Detection of *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbi* gene. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 58(2): 295-298.
- Piette, A. & Verschaegen, G. (2009). Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology.* 134: 45–54.
- Pihl, M., Arvidsson, A., Skepö, M., Nilsson, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Svensäter, G. & Davies, J.R. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on peritoneal dialysis catheters and the effects of extracellular products from *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens and Disease.* 67: 192–198.
- Piper, K.E., Jacobson, M.J., Cofield, R.H., Sperling, J.W., Sanchez, S.J., Osmon, D.R., McDowell, A., Patrick, S., Steckelberg, J.M., Mandrekar, J.N., Fernandez, S.M. & Patel, R. (2009). Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. *Journal of Clinical Microbiology.* 47(6): 1878–1884.
- Ramage, G., Tunney, M.M., Patrick, S., Gorman, S.P. & Nixon, J.R. (2003). Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials.* 24: 3221–3227.

- Reuter, K., Steinbach, A. & Helms, V. (2016). Interfering with Bacterial Quorum Sensing. *Perspectives Medicinal Chemistry*. 8:1-15.
- Reviello, J.S. (2018). Análise da formação do biofilme entre as espécies *Staphylococcus lugdunensis* e *Propionibacterium acnes*. Dissertação de Mestrado em Ciências (Microbiologia). Programa de pós-graduação em Ciências (Microbiologia), UFRJ, Rio de Janeiro. 1-65.
- Rozalska, B. & Ljungh, A. (1995). Biomaterial-associated staphylococcal peritoneal infections in a neutropaenic mouse model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 11(4): 307-19.
- Sabe, M.A., Shrestha, N.K., Gordon, S. & Menon, V. (2014). *Staphylococcus lugdunensis*: A rare but destructive cause of coagulase-negative *Staphylococcus* infective endocarditis. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*. 3(3): 275–280.
- Sabouraud, R (1897). La séborrhée grasse et la pelade. *Annales de l'Institut Pasteur*. 11: 134–159.
- Sampathkumar, P., Osmon, D.R. & Cockerill, F.R. (2000). Prosthetic joint infection due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Mayo Clin Proc*. 75: 511–512.
- Scholz, C.F.P. & Kilian, M. (2016). The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 4422-4432.
- Shah, N.B., Osmon, D.R., Fadel, H., Patel, R., Kohner, P.C., Steckelberg, J.M., Mabry, T. & Berbari, E.F. (2010). Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(5): 1600–1603.
- Shu, M., Wang, Y., Yu, J., Kuo, S., Coda, A., Jiang, Y., Gallo, R.L. & Huang, C.M. (2013). Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a Commensal Bacterium in the Human Skin Microbiome, as Skin Probiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 8: e55380.
- Slavkin, H.C. (1997). Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. *J Am Dent Assoc*. 128(4): 492-495.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Cirković, I. & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115(8): 891–899.
- Südmerson, H.J. & Thompson, E.T. (1909). The cultivation and biological characters of *Bacillus acnes*. *Journal Path. Bact*. 14: 224-229.
- Sutherland I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147(1): 3–9.
- Tafin, F.U., Corvec, S., Betrisey, B., Zimmerli, W. & Trampuz A. (2012). Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(4): 1885-1891.
- Tan T.Y., Ng S.Y. & He J. (2008). Microbiological characteristics, presumptive identification, and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 46:2393–2395.

- Tande, A.J., Osmon, D.R., Greenwood-Quaintance, K.E., Mabry, T.M., Hanssen, A.D. & Patel, R. (2014). Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant *Staphylococci*. *mBio*. 5: 1910–1914.
- Trampuz, A., Piper, K.E., Hanssen, A.D., Osmon, D.R. Cockerill, F.R., Steckelberg, J.M. & Patel, R. (2006). Sonication of Explanted Prosthetic Components in Bags for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection Is Associated with Risk of Contamination. *J Clin Microbiol*. 44(2): 628–631.
- Tyner, H. & Patel, R. (2016). *Propionibacterium acnes* biofilm – A sanctuary for *Staphylococcus aureus*?. *Anaerobe*. 40: 63-67.
- Unna, P.G. (1896). Histopathology of the diseases of the skin. *Bristol Medico-Chirurgical Journal*. 14(54): 357–360.
- Valanne, S., McDowell, A., Ramage, G., Tunney, M.M., Einarsson, G.G., O'Hagan, S., Wisdom, G.B., Fairley, D., Bhatia, A., Maisonneuve, J.F., Lodes, M., Persing, D.H. & Patrick, S. (2005). CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. *Microbiology*. 151: 1369–1379.
- Varposhti, M., Enterazi, F. & Feizabadi, M.M. (2014). Synergistic interactions in mixed-species biofilms of pathogenic bacteria from the respiratory tract. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 47(5): 649-652.
- Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G. & Yarlagadda, P.K. (2014). Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H*. 228(10): 1083-1099.
- von Eiff, C., Peters, G. & Heilmann, C. (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases*. 2(11): 677-685.
- Wang, I. W., Anderson, J.M. & Marchant, R.E. (1933). *Staphylococcus epidermidis* adhesion to hydrophobic biomedical polymer is mediated by platelets. *J Infect Dis*. 167(2): 329-336.
- Weimer, K.E., Juneau, R.A & Murrah, K.A. (2011). Divergent mechanisms for passive pneumococcal resistance to beta-lactam antibiotics in the presence of *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis*. 203: 549– 555.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. & Woods, G. (2005). Identification of Anaerobic Bacteria. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6 th. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 927.
- Wollenberg, M.S., Claesen, J., Escapa, I.F., Aldridge, K.L., Fischbach, M.A. & Lemon, K.P. (2014). *Propionibacterium*-Produced Coproporphyrin III Induces *Staphylococcus aureus* Aggregation and Biofilm Formation. *mBio*. 5(4): e01286-14.
- Wu, S.M.B., Burns, E.M., Pottinger, P.S., Magaret, A.S., Rakeman, J.L., Matsen, F.A. & Cookson, B.T. (2011). Optimization of periprosthetic culture for diagnosis of *Propionibacterium acnes* prosthetic joint infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(7): 2490–2495.
- Yazgi, H. & Uyanki M.H. (2010). Atypical Colony Morphology of *Staphylococcus lugdunensis* Isolated from a Wound Specimen. *Eurasian J Med*. 42(1): 36-37.
- Zimmerli, W., Trampuz, A. & Ochsner, P.E. (2004). Prosthetic-joint infections. *The New England Journal of Medicine*. 351: 1645-1654.

Zipperer, A., Konnerth, M.C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., Burian, M., Schilling, N.A., Slavetinsky, C., Marschal, M., Willmann, M., Kalbacher, H., Schitteck, B., Brötz-Oesterhelt, H., Grond, S., Peschel, A. & Krismer, B. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*. 535(7613): 511-516.

Zappe, B., Graf, S., Ochsner, P.E., Zimmerli, W. & Sendi, P. (2007). *Propionibacterium* spp. in prosthetic joint infections: a diagnostic challenge. *Arch Orthop Trauma Surg.* (10): 1039-1046.

Yu, J.L., Mansson, R., Flock, J.I. & Ljungh, A. (1997). Fibronectin binding by *Propionibacterium acnes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19: 247–253.