BRUNA MARQUES DE SOUZA

Caracterização da produção de biofilme e aspectos relacionados em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) da linhagem USA100/ST5 de hospitais do Rio de Janeiro

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 Kátia Regina Netto dos Santos e coorientação da doutoranda Lorrayne Cardoso Guimarães.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

S719c

Souza, Bruna Marques de
Caracterização da produção de biofilme e aspectos relacionados em amostras de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA) da linhagem USA100/ST5 de hospitais do Rio de Janeiro / Bruna Marques de Souza. -- Rio de Janeiro, 2018.
64 f.

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos.
Coorientadora: Lorrayne Cardoso Guimarães.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

1. Staphylococcus aureus. 2. Resistência à meticilina . 3. USA100 . 4. Biofilme. I. Santos, Kátia Regina Netto dos, orient. II. Guimarães, Lorrayne Cardoso, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

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

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

ALUNO: **Bruna Marques de Souza**
DRE: 115088496

BANCA EXAMINADORA: Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto (Presidente)
Profa. Raiane Cardoso Chamon
MSc. Suzanne de Oliveira Nunes
Profa. Renata Martins do Souto (Suplente)

Título da Monografia: **"Caracterização da produção de biofilme e aspectos relacionados em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) da linhagem USA100/ST5 de hospitais do Rio de Janeiro"**

Local: **Sala de seminários do Departamento de Microbiologia Médica** / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ
Data e hora de início: 4 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, 04 de dezembro de 2018.

NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Tatiana de Castro Abreu Pinto Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto
10,0	Raiane Cardoso Chamon Profa. Raiane Cardoso Chamon
10,0	Suzanne de Oliveira Nunes MSc. Suzanne de Oliveira Nunes
	Profa. Renata Martins do Souto

Aluno: Bruna Marques de Souza
Bruna Marques de Souza

Orientador:
Profa. Káia Regina Netto dos Santos

Coorientador: Lorrayne Cardoso Guimarães
MSc. Lorrayne Cardoso Guimarães

Coordenador de TCC
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer a Deus por guiar meus passos, pois sem Ele eu não teria chegado até aqui. Por permitir que eu vivesse o meu grande sonho de estudar na Universidade Federal do Rio de Janeiro, por me dar forças para seguir minha trajetória e enfrentar minhas dificuldades.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Rosemary e à minha avó Nathalina por todo o amor, apoio e paciência nos meus piores dias, sejam de crises de ansiedade, nervosismo e vontade de desistir e, ainda, naqueles dias onde eu não acreditava mais em mim mesma. Também agradeço pelos momentos indescritíveis de felicidade que tivemos com as minhas vitórias ao longo dessa trajetória. Eu amo muito vocês.

À professora Kátia, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter aceitado ser minha orientadora, pela confiança em mim e em meu trabalho, pelos ensinamentos científicos, apoio, paciência, carinho e amizade. Obrigada pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À Lorrayne por estar comigo desde a minha entrada no laboratório, você praticamente me "adotou"! Você estava sempre correndo atrás de mim, me chamando para acompanhar e fazer experimentos, me encorajando e me ajudando a crescer cientificamente, sem imaginar que um dia seria minha coorientadora. Obrigada pelos diversos momentos de alegria vivenciados no LIH, pelos conselhos e paciência comigo nos meus momentos de desespero, que não foram poucos. Sou muito grata por tudo, principalmente pela amizade que construímos e que levarei para sempre comigo.

À Carol Whitaker, minha amiga de todas as horas, literalmente. Afinal, nós fomos da mesma turma, mesmo laboratório, nossos projetos foram desenvolvidos em conjunto e com as mesmas amostras... Enfim, obrigada por tudo!

Às amigas que o LIH trouxe para a minha vida: Ariane, Tamara e Verônica. Tenho muita sorte por ter conhecido vocês! Obrigada por cada aprendizado, incentivo, momentos divertidos e a amizade de vocês.

Aos meus amigos de graduação: Bruno, Emanuele, Gabi Antunes, Marcela e Thiago. Obrigada pelo companheirismo, pelos momentos de alegria, risadas, conversas e união na hora do desespero com provas e seminários. Vocês tornaram essa jornada ainda mais especial!

A todos os que passaram e aos que ainda estão no LIH e marcaram a minha vida de alguma forma: Adriana, Andreia, Celina, Daiane, Débora, Juan, Juliana, Ludmila, Mariana, Mikio, Myllena, Priscylla, Quezia, Raiane, Rayssa, Thaís e Vanessa.

Às professoras Tatiana Pinto, Raiane Chamon, Renata Souto e à doutoranda Suzanne Nunes por terem aceitado o convite para fazer parte da banca.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPPG).

Às agências de fomento CNPq, FAPERJ e CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

BRUNA MARQUES DE SOUZA

Caracterização da produção de biofilme e aspectos relacionados em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) da linhagem USA100/ST5 de hospitais do Rio de Janeiro

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

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 aureus resistente à meticilina (MRSA) é um patógeno associado a infecções comunitárias e infecções relacionadas à assistência à saúde. Amostras MRSA da linhagem USA100/ST5/SCC*mec* II têm sido prevalentes em hospitais do Rio de Janeiro ao longo dos últimos anos, substituindo linhagens bem estabelecidas. Além disso, alguns estudos relatam que cepas dessa linhagem apresentam capacidade de produzir biofilme. Esse mecanismo de virulência contribui para o sucesso da infecção ao permitir a evasão do sistema imunológico, por atuar como uma barreira que dificulta a difusão de antimicrobianos e, ainda, por permitir a disseminação das células bacterianas para outros sítios no hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento de infecções crônicas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a produção de biofilme e aspectos relacionados em 63 amostras MRSA da linhagem USA100 (ST5-II) coletadas em hospitais do Rio de Janeiro entre 2004 e 2015. A identificação quanto à espécie bacteriana foi confirmada através de metodologias fenotípicas convencionais e MALDI-TOF-MS. Todas as amostras foram submetidas à quantificação da produção de biofilme em placa de microtitulação de poliestireno com TSB acrescido de 1% de glicose. A composição bioquímica do biofilme foi avaliada em uma amostra produtora de biofilme forte através do ensaio de dispersão com metaperiodato de sódio, proteinase K e DNase I. O impacto do fibrinogênio plasmático foi avaliado na produção de biofilme de seis amostras. Além disso, foi realizada a detecção dos genes *ica*A e *sas*G por PCR *uniplex* e a tipagem do operon *agr* por PCR *multiplex* para todas as amostras, com posterior avaliação da funcionalidade do operon através da detecção fenotípica de δ-hemolisina em ágar sangue de carneiro. As 63 amostras incluídas no estudo foram confirmadas como *S. aureus*, sendo 84% (n = 53) classificadas como produtoras de biofilme moderado ou forte. A amostra avaliada no ensaio de dispersão apresentou biofilme com conteúdo majoritariamente proteico (valor de *p* ajustado = 0,0002) contendo DNA extracelular (valor de *p* ajustado = 0,0011). Com relação à formação de biofilme na presença de fibrinogênio, metade das amostras testadas apresentou aumento significativo da produção de biofilme (valores de *p* ajustados <0,05). Os genes *ica*A e *sas*G e operon *agr* do tipo II foram encontrados em todas as amostras analisadas, porém o operon se mostrou inativo em 35% (n = 22) das mesmas. Em conclusão, os resultados demonstram a elevada capacidade de formação de biofilme por cepas da linhagem USA100, que têm emergido em hospitais do Rio de Janeiro nos últimos anos, destacando a importância deste fator de virulência que pode estar contribuindo para o estabelecimento de amostras MRSA USA100 na clínica.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; resistência à meticilina; USA100; biofilme.

ABSTRACT

BRUNA MARQUES DE SOUZA

Characterization of biofilm production and related aspects in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from USA100/ST5 lineage of Rio de Janeiro hospitals

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

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.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a pathogen related with community- and healthcare-associated infections. MRSA isolates from the USA100/ST5/SCC*mec* II lineage have been prevalent in the Rio de Janeiro hospitals over the last few years, replacing well established lineages. In addition, some studies report that strains of this lineage have the capacity to produce biofilm. This mechanism of virulence contributes to the success of the infection by allowing evasion of the immune system, acting as a barrier that hinders the diffusion of antimicrobial agents and also allowing the dissemination of bacterial cells to other sites in the host, contributing for the development of chronic infections. Thus, the objective of this work was to characterize the biofilm production and related aspects in 63 MRSA isolates of the USA100 (ST5-II) lineage collected in Rio de Janeiro hospitals between 2004 and 2015. Identification of the bacterial species was confirmed by phenotypical methodologies and MALDI-TOF-MS. All isolates were submitted to the quantification of the biofilm production in polystyrene microtiter plate with TSB plus 1% glucose. The biofilm composition of a strong biofilm producer isolate was evaluated through a dispersion assay with sodium metaperiodate, proteinase K and DNase I. The impact of plasmatic fibrinogen was evaluated in the biofilm production of six samples. Furthermore, the detection of the *ica*A and *sas*G genes was performed by uniplex PCR for all the samples as well as typing of the *agr* operon by multiplex PCR, with subsequent evaluation of the functionality of this operon through the phenotypic detection of δ-hemolysin in sheep blood agar. The 63 isolates included in the study were confirmed as *S. aureus*, with 84% (n = 53) classified as moderate or strong biofilm producers. The isolate evaluated in the dispersion assay showed biofilm with a predominantly protein content (adjusted p value = 0.0002) containing extracellular DNA (adjusted p-value = 0.0011). Regarding the biofilm formation in the presence of fibrinogen, half of the isolates tested showed a significant increase in biofilm production (adjusted p values <0.05). The *ica*A and *sas*G genes as well as operon *agr* of type II were found in all isolates analyzed, but the operon was inactive in 35% (n = 22) of them. In conclusion, these results demonstrate the high capacity of biofilm formation by strains of the USA100 lineage, which have emerged in the Rio de Janeiro hospitals in recent years, highlighting the importance of this virulence factor that may have contributed to the establishment of MRSA USA100 in the clinical settings.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; resistance to methicillin; USA100; biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas gerais da formação de biofilme..... 8
Figura 2: Fluxograma da metodologia adotada no estudo..... 15
Figura 3: Descrição das faixas de *score* emitidas na técnica de MALDI-TOF-MS.. 18
Figura 4: Distribuição das amostras, reagentes e branco no teste de determinação da composição bioquímica do biofilme..... 20
Figura 5: Esquema representando a placa de microtitulação de poliestireno para realização do teste de produção de biofilme na presença de fibrinogênio..... 22
Figura 6: Esquema representando a semeadura para a realização do teste de detecção fenotípica da produção de δ-hemolisina..... 27
Figura 7: Distribuição das 63 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina da linhagem USA100/ST5 de acordo com o perfil de formação de biofilme..... 29
Figura 8: Imagem da placa no ensaio de dispersão do biofilme da amostra 1301a.. 30
Figura 9: Dispersão do biofilme formado pela amostra 1301a..... 30
Figura 10: Perfil de formação de biofilme de seis amostras MRSA da linhagem USA100/ST5 na presença e ausência de fibrinogênio plasmático..... 31
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose para confirmar a amplificação do gene *ica*A (750 pb) em amostras MRSA USA100/ST5..... 31
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose para confirmar a amplificação do gene *sas*G (311 pb) em amostras MRSA USA100/ST5..... 32
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose para tipagem do sistema Agr em amostras MRSA USA100/ST5..... 32
Figura 14: Avaliação da funcionalidade do operon *agr* em amostras MRSA USA100/ST5 através do teste fenotípico de detecção de δ-hemolisina em placas de ágar sangue de carneiro..... 33
Figura 15: Funcionalidade do operon *agr* em 63 amostras MRSA da linhagem USA100/ST5..... 33
Figura 16: Distribuição dos fenótipos de formação de biofilme em 63 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina da linhagem USA100/ST5 de acordo com a funcionalidade do operon *agr*..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem das amostras clínicas MRSA USA100/ST5 utilizadas no estudo 13

Tabela 2: Amostras controle utilizadas no presente estudo..... 14

Tabela 3: Classificação da produção de biofilme em estafilococos (Stepanović *et al.*, 2007)..... 19

Tabela 4: Sequências dos iniciadores utilizados para detecção do gene *ica*A em *Staphylococcus aureus*, segundo Martín-Lópes *et al.* (2002)..... 24

Tabela 5: Sequências dos iniciadores utilizados para detecção do gene *sas*G em *Staphylococcus aureus*, segundo Roche *et al.* (2003)..... 25

Tabela 6: Sequências dos iniciadores utilizados para tipagem do sistema de *quorum-sensing* Agr em *Staphylococcus aureus*..... 26

Tabela 7: Tamanho dos fragmentos gerados de acordo com o tipo de Agr..... 26

Tabela 8: Distribuição das 63 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* de acordo com a faixa de *score* emitida na técnica de MALDI-TOF-MS..... 28

Tabela 9: Características gerais e resultados obtidos para 63 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina da linhagem USA100/ST5/SCC*mec* II utilizadas neste estudo..... 52

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Infecções relacionadas à assistência à saúde..... 1
1.2 *Staphylococcus aureus*..... 2
1.3 Resistência à meticilina em *S. aureus*..... 4
1.4 Epidemiologia das linhagens de MRSA..... 5
1.5 Biofilme de *S. aureus*..... 7
2. JUSTIFICATIVA..... 11
3. OBJETIVO..... 12
3.1 Estratégias..... 12
4. MATERIAIS E MÉTODOS 13
4.1 Características do estudo..... 13
4.2 Confirmação da espécie bacteriana..... 16
4.3 Quantificação da formação de biofilme em placa de microtitulação poliestireno..... 18
4.4 Ensaio para verificação da composição bioquímica do biofilme formado..... 19
4.5 Avaliação da formação de biofilme na presença de fibrinogênio plasmático..... 21
4.6 Extração de DNA por Chelex-100 e Proteinase K..... 22
4.7 Detecção de genes envolvidos na formação de biofilme por *Staphylococcus aureus*..... 23
4.8 Tipagem do sistema de *quorum-sensing* Agr e avaliação fenotípica de sua atividade..... 25
4.9 Análise estatística..... 27
5. RESULTADOS..... 28
5.1 Confirmação da espécie bacteriana..... 28
5.2 Produção de biofilme por amostras MRSA da linhagem USA100/ST5..... 28
5.3 Determinação da composição bioquímica do biofilme..... 29
5.4 Avaliação da produção de biofilme por amostras MRSA USA100 na presença de fibrinogênio plasmático..... 30
5.5 Detecção de genes envolvidos na formação de biofilme por *S. aureus*..... 31
5.6 Tipagem do sistema Agr e análise fenotípica de sua funcionalidade..... 32
6. DISCUSSÃO..... 35
7. CONCLUSÕES..... 40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 41
ANEXO..... 52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções relacionadas à assistência à saúde

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) podem ser definidas como infecções adquiridas em decorrência dos procedimentos e cuidados à saúde recebidos pelos pacientes nas unidades de saúde, com manifestação durante a estadia ou após o recebimento de alta. As IRAS impactam em taxas significativas de morbidade e mortalidade, sendo assim, um grave problema de saúde pública (Costa, Silva e Noriega, 2007; WHO, 2014).

Segundo Madigan e colaboradores (2016), as instituições de saúde, em geral, podem ser consideradas ambientes complexos e com alto risco de disseminação de agentes infecciosos. Uma das principais questões associadas é o fato de indivíduos infectados e pessoas com o estado de saúde debilitada estar concentrados em um mesmo ambiente, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de infecções cruzadas. Além disso, outros fatores de risco relacionados às unidades de saúde, contribuindo para o desenvolvimento de IRAS incluem: a transmissão de patógenos por meio dos profissionais de saúde, seleção de microrganismos resistentes pelo uso contínuo de antimicrobianos, realização de procedimentos médicos invasivos, presença de pacientes imunossuprimidos, permanência prolongada no hospital, internação em unidades de tratamento intensivo (UTIs), entre outros fatores (Madigan *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium* e *Enterobacter* spp. estão entre os microrganismos mais comumente isolados de IRAS (Rice, 2008; Santajit e Indrawattana, 2016; Braga *et al.*, 2018). Apesar do potencial virulento destes agentes bacterianos, a maioria pode ser encontrada na microbiota de seres humanos, o que dificulta a eliminação dos mesmos nos ambientes de saúde (Madigan *et al.*, 2016).

S. aureus é um microrganismo frequentemente associado ao desenvolvimento de IRAS, sendo possível destacar as infecções de corrente sanguínea (ICS) como um dos quadros mais graves dentro deste contexto (Keynan e Rubinstein, 2013). O tratamento das infecções ocasionadas por esta bactéria é desafiador, uma vez que é notória a sua capacidade em adquirir resistência a inúmeros antimicrobianos (Lowy, 2003; Chambers e DeLeo, 2009). Outro aspecto de importância como agente etiológico de IRAS é sua capacidade de produção de biofilme (Otto, 2018). Infecções associadas a esse fator de virulência bacteriano são consideradas crônicas, de

difícil tratamento e estão frequentemente relacionadas a dispositivos médicos invasivos (cateteres, marca-passos e próteses). A formação de biofilme, neste caso, pode resultar em destruição tecidual, disseminação sistêmica do microrganismo no hospedeiro, susceptibilidade reduzida à antibioticoterapia e necessidade de remoção do dispositivo médico. Assim, infecções associadas ao biofilme de *S. aureus* são consideradas de importância médica, visto que elevam os custos no tratamento dos pacientes, assim como impactam negativamente no prognóstico dos mesmos (Costerton, Stewart e Greenberg, 1999; Hall-Stoodley, Costerton e Stoodley, 2004; Høiby *et al.*, 2010; Veerachamy *et al.*, 2014; Zapotoczna, O'Neill e O'Gara, 2016).

1.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é constituído de 50 espécies e 22 subespécies (Euzéby, 2018). As espécies bacterianas pertencentes a este gênero apresentam-se como cocos Gram-positivos organizados sob a forma de cachos, mas também podem ser visualizados de forma isolada, aos pares ou em pequenas cadeias quando obtidos de espécimes clínicos. São microrganismos imóveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, resistentes a 0,04 U de bacitracina e são capazes de crescer em meios contendo 7,5% de cloreto de sódio. Outra característica importante do gênero é a produção da enzima catalase, com exceção de *S. aureus* subespécie *anaerobius* e *S. saccharolyticus*. Esta enzima é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e pode ser utilizada para diferenciar os grupos de cocos Gram-positivos, uma vez que os microrganismos pertencentes aos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* não produzem catalase (Ryan, 2004; Bannerman e Peacock, 2007; Carroll, 2014).

As espécies do gênero *Staphylococcus* são divididas em dois grandes grupos: *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) e coagulase-positivos. Essa divisão é feita com base na produção da proteína coagulase que ativa a protrombina no sangue, a qual se transforma em trombina que converte fibrinogênio em fibrina (Kloos e Bannerman, 1999; Rupp e Fey, 2000). A formação de fibrina ou coágulos ao redor das bactérias dificulta o seu reconhecimento e fagocitose pelas células do sistema imune. *Staphylococcus aureus* representa a principal espécie do grupo dos *Staphylococcus* coagulase-positivos, e compõe a microbiota de seres humanos saudáveis, podendo ser encontrado em diversos sítios do corpo, como: narinas anteriores, axilas, trato gastrintestinal, virilha, entre outros. Entretanto, por ser uma bactéria que dispõe de uma

vasta gama de fatores de virulência, está associada a diversos tipos de infecção, tanto em ambientes hospitalares quanto comunitários (Gordon e Lowy, 2008; Carroll, 2014).

A transmissão de *S. aureus* pode ocorrer por meio do contato direto com indivíduos infectados ou colonizados, através de fômites e, ainda, pelas mãos dos profissionais de saúde. As pessoas colonizadas por esse microrganismo se apresentam como reservatório do patógeno e estão mais propensas a desenvolver infecções ocasionadas pelo mesmo (Lowy, 1998; Muñoz *et al.*, 2008; Chambers e DeLeo, 2009). Em geral, 20 a 30% da população se apresenta como portadora de *S. aureus* na mucosa nasal (Wertheim *et al*. 2005; Gorwitz *et al.*, 2008; Sakr *et al.*, 2018).

S. aureus pode causar uma variedade de quadros infecciosos em seres humanos, desde manifestações mais brandas até processos mais complexos. Pode ser causador de patologias como o impetigo bolhoso, furunculose, endocardite, osteomielite, infecções de corrente sanguínea, entre outras (Tong *et al.*, 2015). É possível citar ainda os processos patológicos que envolvem a secreção de toxinas, como a síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e intoxicação alimentar (Carroll, 2014). Porém, a infecção geralmente acontece quando há o rompimento da barreira cutaneomucosa, o que faz com que o patógeno tenha acesso aos tecidos mais profundos do hospedeiro e/ou à corrente sanguínea (Iwatsuki *et al.*, 2006).

S. aureus possui um vasto arsenal de fatores de virulência que contribui para o seu sucesso como patógeno, proporcionando a adesão e invasão de tecidos e, ainda, a evasão do sistema imunológico (Zecconi e Scali, 2013). O processo de adesão conta com uma série de proteínas de superfície, das quais se destacam as denominadas MSCRAMMs (componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas da matriz extracelular, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) que podem se ligar a moléculas como fibronectina, fibrinogênio e colágeno. O microrganismo também produz diversas enzimas (proteases, lipases, elastases) que permitem a invasão e destruição tecidual (Patti *et al.*, 1994; Gordon e Lowy, 2008; Foster *et al.*, 2014). Com relação à evasão do sistema imune, a cápsula polissacarídica atua como fator antifagocitário (Carroll, 2014) e a proteína A, espécie-específica, tem a capacidade de se ligar à porção FC de imunoglobulinas G (IgG), impedindo a ativação do sistema complemento (Uhlén *et al.*, 1984; Foster *et al.*, 2014). Outra estratégia apresentada por *S aureus* é a secreção de toxinas com ação local e/ou sistêmica, tais como hemolisinas (α, β, δ e γ), leucocidina de Panton-Valentine, enterotoxinas, toxinas esfoliativas e toxina da síndrome do

choque-tóxico (Dinges, Orwin e Schlievert, 2000; Argudín, Mendoza e Rodicio, 2010; Oliveira, Borges e Simões, 2018).

1.3 Resistência à meticilina em *S. aureus*

A partir da primeira metade do século 20, com o surgimento da resistência bacteriana à penicilina, tornou-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas (Rammelkamp e Maxon, 1942). Em 1960, a meticilina, uma penicilina semissintética resistente à ação de β-lactamases, foi desenvolvida e utilizada para tratar as infecções causadas por *S. aureus* e outros microrganismos resistentes à penicilina. Porém, em 1961 já existiam relatos de amostras de *S aureus* resistentes à meticilina (MRSA, *methicillin-resistant S. aureus*) na Inglaterra (Jevons, 1961; Enright *et al.*, 2002; Deurenberg e Stobberingh, 2009).

A resistência à meticilina em *S. aureus* é conferida, geralmente, pelo gene *mec*A que se encontra inserido em um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, *staphylococcal cassette chromosome mec*). O gene codifica uma proteína ligadora de penicilina (PBP, *penicillin-binding protein*) alterada, denominada PBP2a. Esta proteína alterada conserva a atividade de transpeptidase, mas possui baixa afinidade pelos β-lactâmicos, permitindo que a síntese do peptideoglicano continue acontecendo, o que evita a morte bacteriana. Este mecanismo de resistência tem um grande impacto na clínica, visto que a resistência não se dá somente às penicilinas semissintéticas, podendo incluir também a maioria dos antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos, como as cefalosporinas e carbapenemas (Katayama, Ito e Hiramatsu, 2000; Chambers e DeLeo, 2009; Deurenberg e Stobberingh, 2009). É importante ressaltar que alguns estudos descreveram genes homólogos ao *mec*A, os quais são conhecidos como *mec*C e *mec*B. O gene *mec*C pode ser encontrado no SCC*mec* do tipo XI, carreado por algumas amostras MRSA provenientes principalmente de bovinos (García-Álvarez *et al.*, 2011). O *mec*B foi inicialmente detectado em *Macrococcus caseolyticus* e, mais recentemente em *S. aureus*, sendo carreado por um plasmídeo (Tsubakishita *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2018).

A estrutura básica do SCC*mec* é constituída pelo complexo do gene *mec*, complexo *ccr* (*cassette chromosome recombinases*) e pelas regiões J (*junkyard* ou *joining*). As diferenças entre os tipos de SCC*mec* baseiam-se, justamente, nos genes de recombinases *ccr*, responsáveis pela

integração e excisão do cassete, e na classe do complexo do gene *mec*, que contém o gene *mec*A, seus reguladores e sequências de inserção. Desta forma, até o momento, são descritos treze tipos de SCC*mec* (I ao XIII) (Katayama, Ito e Hiramatsu, 2000; Hiramatsu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018; Baig *et al.*, 2018). O SCC*mec* também pode apresentar, de forma variável, genes adicionais que conferem resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos ou macrolídeos, e também a metais pesados. Em geral, esses genes se encontram inseridos na região J (Oliveira, Wu e De Lencastre, 2000; Ito *et al.*, 2001).

Tendo em vista a estrutura dos diferentes tipos de SCC*mec* descritos, foi visto que algumas variantes de amostras MRSA eram mais frequentemente isoladas em ambientes específicos. As linhagens MRSA primeiramente relacionadas com os ambientes hospitalares (HA-MRSA, *healthcare-associated* MRSA) geralmente apresentam tipos de SCC*mec* mais extensos, como I, II e III, sendo sua maior extensão associada à presença de genes de resistência a outros antimicrobianos (Ito *et al.*, 2001). Por outro lado, cepas MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA, *community-associated* MRSA) carreiam variantes menores, IV e V, normalmente, são suscetíveis a outros antimicrobianos que não pertencem à classe dos β-lactâmicos e, frequentemente, possuem os genes que codificam a leucocidina de Panton-Valentine (PVL, *Panton-Valentine leukocidin*) (Ma *et al.*, 2002; Okuma *et al.*, 2002; Vandenesch *et al.*, 2003).

1.4 Epidemiologia das linhagens de MRSA

O surgimento de métodos de tipagem molecular com alto poder discriminatório e reprodutibilidade possibilitou uma melhor análise e caracterização da epidemiologia das infecções ocasionadas por *S. aureus*. Dentro desse contexto, é possível destacar as técnicas de tipagem de sequências multilocus (MLST, *Multilocus Sequence Typing*) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (Enright *et al.*, 2000; McDougal *et al.*, 2003).

A técnica de tipagem de sequências multilocus tem como princípio o sequenciamento de genes constitutivos envolvidos com o metabolismo celular bacteriano. Quando o MLST é utilizado para a caracterização de *S. aureus*, são pesquisados sete genes: *arc*C, *aro*E, *glp*F, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqi*L. Desta forma, cada sequência corresponde a um alelo e o conjunto destes, origina o perfil alélico ou tipo de sequência (ST, *sequence type*). Com base no número de alelos

semelhantes, as cepas são agrupadas em um mesmo complexo clonal (CC, *clonal complex*), embora possuam STs distintos. Desta forma, as estirpes são reunidas de acordo com a proximidade evolutiva (Enright *et al.*, 2000).

A técnica de PFGE permite avaliar os perfis de fragmentação do cromossomo bacteriano, possibilitando inferir a clonalidade das amostras. A técnica se baseia na clivagem de sítios específicos do DNA cromossômico através do uso de enzimas de restrição e separação dos fragmentos por eletroforese em gel de campo pulsado (McDougal *et al.*, 2003). Em 1995, Tenover e colaboradores propuseram critérios para a interpretação do perfil de bandas obtido. Em 2009, Van Belkum e colaboradores estabeleceram que amostras de um mesmo genótipo teriam até quatro bandas de diferença e mínimo de 80% de similaridade. Atualmente, a construção de dendrogramas utilizando ferramentas de bioinformática, pode auxiliar na análise dos resultados (Goering, 2010).

A aplicação destes métodos de tipagem molecular torna-se útil dentro do cenário epidemiológico, principalmente em investigação de surtos. Já foi visto que amostras MRSA são facilmente transmitidas entre indivíduos, o que impacta em uma disseminação rápida dessas estirpes, tanto em ambientes hospitalares quanto comunitários. Além disso, algumas linhagens apresentam capacidade de cruzar barreiras geográficas (Papakyriacou *et al.*, 2000).

Tendo isto em vista, em 2003, McDougal e colaboradores buscaram padronizar a nomenclatura das linhagens/clones MRSA mais comumente encontradas nos Estados Unidos para facilitar o compartilhamento de dados e compreensão de surtos. Desta forma, oito linhagens, denominadas de USA100 a USA800, foram descritas com base na associação dos resultados obtidos pelas técnicas de PFGE, MLST e tipagem do gene *spa* (sequenciamento de uma região polimórfica do gene que codifica a proteína A estafilocócica). Alguns anos depois, novas linhagens foram identificadas e incluídas na classificação, como: USA900, USA1000 e USA1100 (Tenover *et al.*, 2008; Monecke *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2018).

A linhagem USA100 é descrita como pertencente ao ST5/CC5, carreia o SCC*mec* do tipo II e está associada ao clone multirresistente hospitalar conhecido como Nova Iorque/Japão (*New York*/*Japan*) (Le *et al.*, 2018). Inicialmente, amostras desta linhagem foram isoladas de hospitais nos Estados Unidos (Roberts *et al.*, 1998). Posteriormente, foi visto que amostras de hospitais no Japão apresentavam o mesmo perfil genético, indicando que se tratava do mesmo clone (Aires de Sousa *et al.*, 2000). Ao longo dos anos, estudos mostraram que amostras desta linhagem foram se

disseminando para outros lugares do mundo como México (Velazquez-Meza *et al.*, 2004), Espanha (Potel *et al.*, 2007) e Brasil (De Miranda *et al.*, 2007; Caboclo *et al.*, 2013).

No Brasil, grande parte das cepas MRSA encontradas nos hospitais estava relacionada ao clone endêmico brasileiro (CEB/ST239 - SCC*mec* III) até o início dos anos 2000 (Vivoni *et al.*, 2006). Porém, nos últimos dez anos foi visto que esta linhagem vem sendo substituída por outras, como USA400 (ST1-IV), USA800 (ST5-IV) e USA100 (ST5-II) (Caboclo *et al.*, 2013; Caiaffa-Filho *et al.*, 2013; Cavalcante *et al*. 2014; De Oliveira *et al.*, 2015). Em 2017, Chamon e colaboradores relataram que o CEB foi completamente substituído pelas linhagens USA100 e USA400 em dois hospitais do Rio de Janeiro, em um estudo que avaliou uma coleção de amostras isoladas de ICS.

A disseminação de amostras MRSA da linhagem USA100 em hospitais nacionais é preocupante, visto que esta linhagem está associada à multirresistência antimicrobiana, incluindo a resistência à mupirocina (usada na descolonização nasal de pacientes internados) e vancomicina e não susceptibilidade à daptomicina (utilizadas na terapêutica de infecções por cepas MRSA) (da Costa *et al.*, 2016; Chamon *et al.*, 2017). Além disso, alguns estudos têm mostrado que amostras dessa linhagem são capazes de produzir biofilme (Vanhommerig *et al.*, 2014; King *et al.*, 2016).

1.5 Biofilme de *S. aureus*

Biofilmes podem ser definidos como agregados microbianos envoltos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares e que podem se aderir a superfícies bióticas ou abióticas (Donlan e Costerton, 2002; Flemming e Wingender, 2010). As células bacterianas presentes neste microambiente apresentam fenótipo alterado com relação à taxa de crescimento, expressão gênica e produção de proteínas. Além disso, é possível que haja a troca de material genético entre as bactérias através da transferência horizontal de genes, possibilitando a aquisição de genes de resistência (Donlan e Costerton, 2002).

O processo de formação do biofilme bacteriano pode ser dividido em três etapas gerais, como esquematizado na figura abaixo (Figura 1): adesão, maturação e dispersão (Otto, 2013).

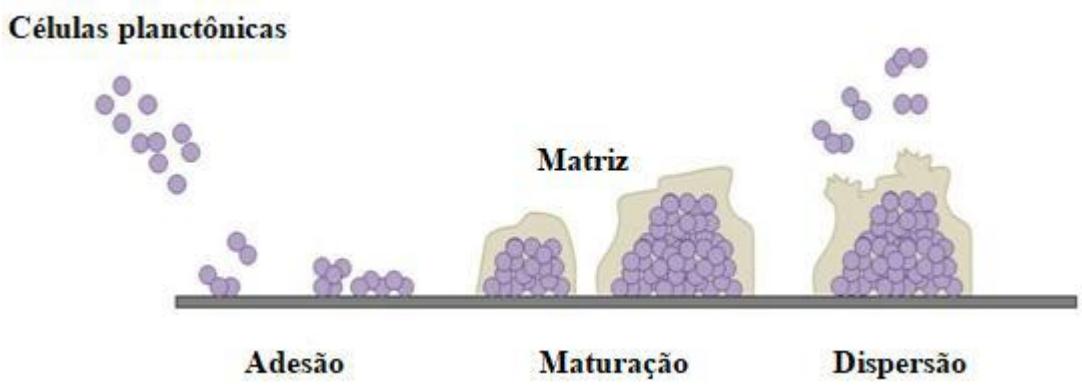

Figura 1. Etapas gerais da formação de biofilme. (Imagem cedida por Raiane Cardoso Chamon).

S. aureus é capaz de se aderir a superfícies bióticas ou abióticas. A adesão a uma superfície abiótica inerte se dá, principalmente, por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas. Porém, quando se trata da superfície de implantes ou dispositivos médicos, a adesão é mediada, majoritariamente, pelas adesinas da parede celular bacteriana. Isto se deve ao fato de que o dispositivo médico é imediatamente recoberto por proteínas plasmáticas e de matriz extracelular do hospedeiro após sua inserção (Otto, 2008; Franz *et al.*, 2011; Arciola, Campoccia e Montanaro, 2018).

Em seguida, as células bacterianas começam a se multiplicar e, neste momento, é possível que haja a formação e liberação de microcolônias. A maturação propriamente dita é marcada pela agregação bacteriana e formação da matriz extracelular polimérica (Moormeier *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstram que, em estafilococos, um dos principais elementos envolvidos com a formação da matriz exopolissacarídica do biofilme é a adesina intercelular polissacarídica (PIA, *polysaccharide intercellular adhesin*). A síntese e o processamento da PIA são dependentes da expressão do operon *ica*ADBC (Mack *et al.*, 1996; Cramton *et al.*, 1999; Otto, 2008; Otto, 2013). No entanto, outros mecanismos de acumulação de biofilme *ica*-independentes também são descritos (Fitzpatrick, Humphreys e O'Gara, 2005). Foi visto que as proteínas de parede celular de *S. aureus*, como a SasG (*S. aureus surface protein G*), podem participar da formação de biofilmes que seriam caracterizados como proteicos (Corrigan *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2014). Além disso, o biofilme de *S. aureus* também pode conter DNA extracelular, liberado pela ação de autolisinas, o que auxiliaria o processo de adesão inicial e acumulação do biofilme (Kaplan *et al.*, 2012; Otto, 2013; Foster *et al.*, 2014).

Estudos demonstram que a resistência à meticilina pode interferir também na composição bioquímica do biofilme de *S. aureus* (Fitzpatrick, Humphreys, e O'Gara, 2005; O'Neill *et al.*, 2007). Relatos sugerem que a alta expressão de PBP2a inibe, de alguma forma, a expressão dos produtos dos operons *ica* e *agr*. Contudo, foi visto que amostras MRSA continuavam produzindo biofilme, mesmo na ausência da expressão do operon *ica*. Assim, é relatado que a formação e acumulação do biofilme nessas amostras ocorram por intermédio das proteínas de superfície da parede celular, o que caracterizaria o biofilme como proteico (Fitzpatrick, Humphreys, e O'Gara, 2005; O'Neill *et al.*, 2007; Pozzi *et al.*, 2012; McCarthy *et al.*, 2015).

A última etapa de formação do biofilme, a dispersão, é caracterizada pelo rompimento da matriz extracelular, resultando na disseminação das células bacterianas para outros sítios no hospedeiro. O processo pode ocorrer pela remoção mecânica do biofilme, interrupção na produção da matriz extracelular ou pela atuação de moléculas que rompem a matriz (Otto, 2008; Arciola, Campoccia e Montanaro, 2018). Um dos principais mecanismos envolvidos com a fase de dispersão em *S. aureus* é o sistema de *quorum-sensing* Agr (*accessory gene regulator*) (Le e Otto, 2015). Esse sistema é responsável por controlar a expressão de alguns genes com base na densidade celular (Novick e Muir, 1999). Grande parte desses genes está relacionada à virulência e codificam proteases, toxinas e hemolisinas (Novick, 2003; Boles e Horswill, 2008).

O operon *agr* é constituído por quatro genes (*agrA*, *agrC*, *agrD* e *agrB*) que estão envolvidos em todo o processo de sinalização e indução do *quorum-sensing* (Le e Otto, 2015). Diferentes tipos de sistema Agr (I, II, III ou IV) podem ser encontrados em amostras de *S. aureus*, resultado de polimorfismos em AgrD e AgrC, sendo relatado que o tipo de operon *agr* pode estar relacionado com o complexo clonal apresentado pelas amostras (Ji, Beavis e Novick, 1997; Monecke *et al.*, 2011; Thoendel *et al.*, 2011). O operon *agr* é formado pelo locus do RNAII e do RNAIII, sendo P2 e P3 seus respectivos promotores. O RNAIII é a molécula efetora intracelular que reprime a expressão de uma série de proteínas da superfície bacteriana e, ao mesmo tempo, estimula a expressão de uma gama de toxinas e enzimas. Além disso, também atua como RNA mensageiro do gene *hld* que codifica para a δ-hemolisina (Novick e Geisinger, 2008; Thoendel *et al.*, 2011; Otto, 2013; Le e Otto, 2015).

Assim, quando o Agr está ativo, há uma repressão na expressão de adesinas bacterianas e, por outro lado, um estímulo com relação à produção de proteases, nucleases e modulinas solúveis em fenol (PSMs, *phenol soluble modulins*). As PSMs, principalmente, vão atuar de forma a

romper a matriz extracelular do biofilme através de sua ação surfactante (Vuong *et al.*, 2000; Otto, 2013; Lister e Horswill, 2014; Le e Otto, 2015). Desta forma, alguns estudos demonstram que cepas que apresentam um sistema Agr não funcional podem exibir um aumento da produção de biofilme, visto que elementos que atuam como dispersantes do biofilme serão produzidos em menor quantidade (Vuong *et al.*, 2000; Cafiso *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2013). Porém, há controvérsias entre a maior acumulação de biofilme e atuação do Agr, uma vez que esta relação nem sempre é observada em alguns estudos (Côrtes *et al.*, 2015; Pérez-Montarelo *et al.*, 2017; Guimarães, 2018).

JUSTIFICATIVA

S. aureus é um patógeno de importância médica, uma vez que está associado a diversos tipos de infecção, dispõe de um vasto arsenal de fatores de virulência e pode apresentar resistência crescente a diferentes classes de antimicrobianos. Com base em estudos epidemiológicos, foi visto que nos últimos anos a linhagem CEB (ST239-III) vem sendo substituída por outros clones, como USA100 (ST5-II), em hospitais do Rio de Janeiro. A linhagem USA100 está associada à multirresistência e, além disso, estudos mostraram que algumas cepas têm capacidade de produzir biofilme. É importante destacar que a produção desse fator de virulência contribui para o sucesso da infecção ao permitir o escape do sistema imunológico, por atuar como uma barreira que dificulta a penetração dos antimicrobianos e também por permitir a disseminação das células bacterianas para outros sítios no hospedeiro. Portanto, pode contribuir para o desenvolvimento de infecções crônicas e de difícil tratamento. Entretanto, são poucos os estudos que caracterizam o perfil de virulência de amostras brasileiras MRSA USA100, principalmente, quando se trata da formação de biofilme. Logo, a compreensão dos aspectos relacionados à virulência dessas amostras torna-se essencial dentro do contexto clínico para auxiliar no entendimento das características que levaram ao estabelecimento desse clone em hospitais do Rio de Janeiro.

3. OBJETIVO

Caracterizar a produção de biofilme e aspectos relacionados em 63 amostras MRSA da linhagem USA100 (ST5-II) isoladas de hospitais do Rio de Janeiro.

3.1 Estratégias

- Confirmar a identificação das amostras através de testes fenotípicos convencionais e MALDI-TOF-MS;

- Determinar o perfil de formação de biofilme em placas de microtitulação de poliestireno;

- Determinar a composição bioquímica do biofilme para uma amostra classificada como produtora de biofilme forte;

- Avaliar a produção de biofilme de seis amostras em placas recobertas com fibrinogênio;

- Detectar os genes *ica*A e *sas*G, envolvidos com o processo de formação de biofilme, através de PCR *uniplex*;

- Verificar o tipo de sistema Agr por PCR *multiplex*;

- Avaliar a atividade do operon *agr* através da detecção de δ-hemolisina em placas de ágar sangue de carneiro.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Características do estudo

O presente estudo foi caracterizado como descritivo e laboratorial. Foram selecionadas todas as amostras clínicas de *S. aureus* da linhagem USA100 (ST5-II) pertencentes à coleção de amostras do Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH), localizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), coletadas entre 2004 e 2015. Desta forma, 63 amostras dessa linhagem foram incluídas no estudo, isoladas de dois hospitais do Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) (31 amostras; 49%) e Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) (32; 51%). Dessas amostras, 52 (83%) foram provenientes de sangue e 11 (17%) foram oriundas de outros sítios de isolamento (Tabela 1). As amostras se encontram estocadas em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*, BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA) acrescido de 20% (v/v) de glicerol (Proquimios Comércio e Indústria Ltda; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a -20 ºC (Sambrock, Fritsch e Maniatis, 1989), assim como as amostras controles (Tabela 2). As amostras clínicas foram previamente caracterizadas quanto à espécie bacteriana, resistência à meticilina e clonalidade através de técnicas fenotípicas e moleculares convencionais. O fluxograma da metodologia utilizada no estudo está ilustrado na Figura 2.

Tabela 1. Origem das amostras clínicas MRSA USA100/ST5 utilizadas no estudo.

Sítio de isolamento	n (%)
Sangue	52 (83)
Ferida operatória	3 (4,8)
Colonização Nasal	3 (4,8)
Urina	1 (1,6)
Secreção traqueal	1 (1,6)
Escara	1 (1,6)
Secreção óssea	1 (1,6)
ND	1 (1,6)
Total	63 (100)

n - Número; ND - não determinado.

Tabela 2. Amostras controle utilizadas no presente estudo.

Espécie	Amostra	Características	Referência
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	Controle positivo de testes fenotípicos	NA
	ATCC 33591	Positiva para o gene *ica*A e produtora de biofilme	NA
	1125a*	Positiva para o gene *sas*G*;* gene sequenciado	Matos, 2013
	RN4220	Produtora de β-hemolisina	Novick, 1967
	1636a*	Produtora de biofilme proteico com presença de eDNA	NP
	63a*	Amostra com sistema Agr do tipo I	Chamon, 2017
	Mu50	Amostra com sistema Agr do tipo II	Hiramatsu *et al.*, 1997
	1342a*	Amostra com sistema Agr do tipo III	Chamon, 2017
	1453a*	Amostra com sistema Agr do tipo IV	Chamon, 2017
Escherichia coli	ATCC 25922	Controle para coloração de bactérias Gram-negativas	NA
	DH5α	Controle para MALDI-TOF-MS	NA
Enterococcus faecalis	ATCC 51299	Controle negativo para o teste da catalase	NA
Staphylococcus epidermidis	ATCC 14990	Controle negativo para o teste da coagulase	NA
	ATCC 35984	Produtora de biofilme de natureza polissacarídica	Christensen *et al.*, 1985
Staphylococcus lugdunensis	546s*	Produtora de biofilme proteico	Pereira *et al.*, 2012

ATCC – *American Type Culture Collection*; *Amostra clínica; eDNA - DNA extracelular; MALDI-TOF-MS - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo - espectrometria de massa; NA - Não se aplica; NP - Dado não publicado (realizado no laboratório de pesquisa).

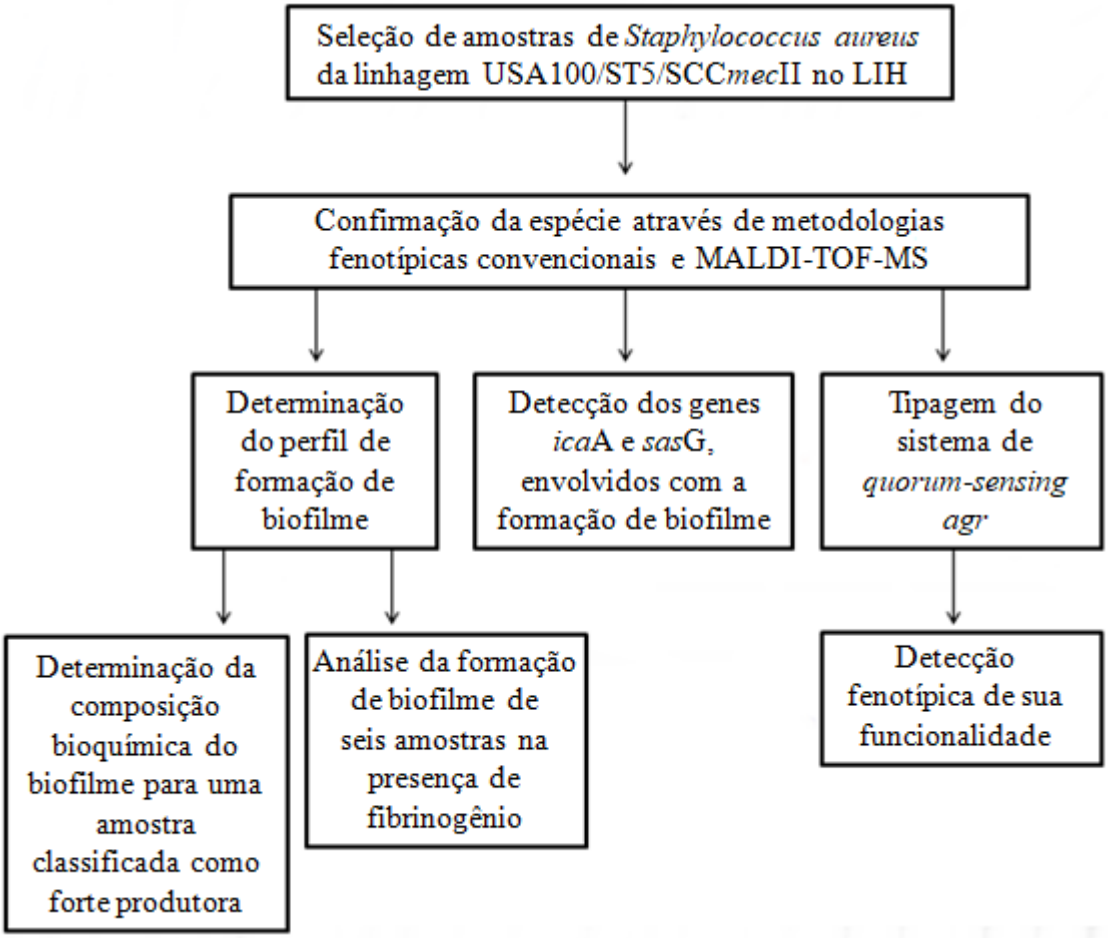

Figura 2. Fluxograma da metodologia adotada no estudo.

4.2 Confirmação da espécie bacteriana

4.2.1 Metodologias fenotípicas convencionais

Os testes fenotípicos utilizados para confirmar o gênero e a espécie bacteriana foram realizados com base nas metodologias descritas por MacFaddin (2000) e Bannerman e Peacock (2007). Todas as amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro (Plast Labor; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, posteriormente, incubadas a 37 ºC por 24 a 48 h para análise de pureza, aspecto das colônias e hemólise.

As amostras também foram submetidas à coloração de Gram para análise do aspecto morfotintorial e teste da catalase para verificar a produção desta enzima. Para isto, o crescimento bacteriano foi obtido através da semeadura em TSA (*Trypticase Soy Agar*, BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA) com incubação a 35 ºC por 24 h. A coloração de Gram foi realizada utilizando o kit de coloração de Gram da Laborclin (Pinhais, PN, Brasil) segundo as recomendações do fabricante. As amostras usadas como controles foram: *S. aureus* ATCC 25923 (controle para cocos Gram-positivos) e *E. coli* ATCC 25922 (controle para bacilos Gram-negativos).

Para a realização do teste da catalase, uma colônia bacteriana obtida através do crescimento em TSA (BD) foi transferida para uma lâmina de vidro com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril e, posteriormente, uma gota de peróxido de hidrogênio (Proquimios; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 3% foi adicionada sobre a mesma. A formação de bolhas de oxigênio sugere a produção da enzima catalase. As amostras *S. aureus* ATCC 25923 (catalase positiva) e *E. faecalis* ATCC 51299 (catalase negativa) foram utilizadas como controles do teste.

As amostras também foram submetidas à pesquisa do fator *clumping* e, para isto, foi utilizado o kit Staphclin (Laborclin; Pinhais, PN, Brasil) seguindo as orientações do fabricante. O resultado do teste foi considerado positivo diante do surgimento de aglutinação aparente. Amostras que apresentaram resultado negativo ou de difícil interpretação foram avaliadas através do teste de coagulase em tubo utilizando o kit Coagu-plasma (Laborclin; Pinhais, PN, Brasil). Segundo a descrição do fabricante, as amostras são consideradas positivas para o teste da coagulase se houver a formação de um coágulo após o período de incubação a 37 ºC por até 24 h.

Os controles utilizados em ambos os testes foram: *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo) e *S. epidermidis* ATCC 14990 (controle negativo).

4.2.2 Confirmação da espécie por MALDI-TOF-MS (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo - espectrometria de massa, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry*)

Em conjunto com os testes fenotípicos convencionais, a técnica de MALDI-TOF-MS foi utilizada para confirmação da espécie *S. aureus*. Primeiramente, as amostras foram semeadas em TSA (BD) e incubadas a 35 ºC por 24 h. A partir do crescimento bacteriano obtido, utilizando um palito de madeira, uma colônia bacteriana de cada amostra foi depositada em poços de uma placa metálica (s*ample target*) fornecida pelo fabricante do equipamento MALDI-TOF-MS Microflex LT (Bruker Daltonics). Cada amostra foi analisada em duplicata. Em seguida, em cada poço da placa metálica foi adicionado 1 µL de ácido fórmico a 70% (v/v) (Sigma-Aldrich Chemical Company; Saint Louis, MO, EUA). Após secagem da placa a temperatura ambiente, foi adicionado 1 µL da matriz composta por ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Sigma; Saint Louis, MO, EUA) preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma; Saint Louis, MO, EUA) por poço. A placa foi novamente mantida a temperatura ambiente para completa secagem da mistura e formação dos cristais e, em seguida, foi inserida no equipamento. A amostra *Escherichia coli* DH5α foi utilizada para calibrar o aparelho e os espectros gerados foram avaliados pelo software de bioinformática MALDI Biotyper versão 7.0 (Bruker Daltonics) em modo operacional padrão, que fez uma busca em seu banco de espectros de referência a fim de encontrar o espectro que mais se assemelha ao obtido com a amostra. Ao encontrar os dez microrganismos com os picos mais semelhantes ao da amostra analisada, uma lista foi originada com base no *score* gerado pelo software, o qual varia de 0 a 3,0. A faixa de *score* considerada como aceitável no presente estudo foi de 2,000 a 3,000. As possíveis pontuações e resultados estão descritos na Figura 3.

Faixa de *score*	Descrição	Símbolos	Cor
2,300 - 3,000	Identificação altamente provável de espécie	(+++)	Verde
2,000 - 2,299	Identificação do gênero, identificação provável de espécie	(++)	Verde
1,700 - 1,999	Identificação provável do gênero	(+)	Amarelo
0,000 - 1,699	Identificação não confiável	(-)	Vermelho

Figura 3. Descrição das faixas de *score* emitidas na técnica de MALDI-TOF-MS.

4.3 Quantificação da formação de biofilme em placa de microtitulação de poliestireno

Para avaliar a capacidade de formação de biofilme por todas as amostras, a metodologia empregada foi a descrita por Stepanović e colaboradores (2007) com algumas modificações. O crescimento bacteriano foi obtido através da semeadura em TSA (BD) com posterior incubação a 35 ºC por 24 h. Após o período de incubação, suspensões bacterianas foram preparadas em tubos contendo 3 mL de água destilada estéril e padronizadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL; absorbância entre 0,08 e 0,1 a 600 nm). Foram inoculados 20 µL da suspensão bacteriana em poços contendo 180 µL do meio TSB (BD) acrescido de 1% de glicose (p/v) (Isofar; Duque de Caxias, RJ, Brasil) de uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo chato modelo TPP 92096 (Techno Plastic Products; Trasadingen, Suíça). Foram utilizados três poços (triplicata experimental) para cada amostra. Nos seis poços referentes ao branco (controle negativo), foram inoculados 200 µL de TSB + 1% glicose. Por fim, a microplaca foi incubada a 37 ºC por 24 h. As amostras produtoras de biofilme utilizadas como controles são: *S. epidermidis* ATCC 35984 (amostra fortemente produtora de biofilme) e *S. aureus* ATCC 33591 (amostra produtora de biofilme moderado). Este experimento foi realizado em triplicata.

Após a incubação a 37 ºC por 24 h, o meio de cultura com crescimento foi desprezado através da inversão da placa e, em seguida, foram feitas duas lavagens com 200 µL de tampão PBS 1 X (*phosphate buffered saline*, Laborclin; Pinhais, PN, Brasil) pH 7,1 a 7,3, estéril. Em seguida, a placa de microtitulação foi incubada a 60 ºC por 1 h para fixação do biofilme formado. A coloração do biofilme foi realizada com adição de 150 µL de safranina (Fisher Scientific Company; Fair Lawn, NJ, EUA) a 0,1% (p/v) filtrada e posterior incubação da placa por 15 min a temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido através da inversão da placa e realização de duas etapas de lavagem com 200 µL de PBS 1 X (Laborclin) estéril. A placa foi

deixada invertida por 10 min a temperatura ambiente para secagem e, em seguida, 150 µL de etanol 95% (v/v) foram adicionados em cada poço com o intuito de fazer uma eluição do corante aderido ao biofilme. Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min, com tampa, a temperatura ambiente, sem homogeneização ou agitação. Ao final do período de incubação, foi feita uma leitura a 492 nm no espectrofotômetro (Thermo Plate TP Reader NM).

Após a etapa de leitura no espectrofotômetro, os valores gerados foram analisados conforme descrito por Stepanović e colaboradores (2007). Primeiramente, foi calculada a média dos valores de densidade óptica (DO) para os seis poços referentes ao branco. Com relação às amostras, foi feito o cálculo da média para os valores de DO dos poços amostrais e, com o resultado obtido, foi feita uma subtração pela média dos seis valores do branco para obter o que chamamos de densidade óptica final (DOf). Além disso, um valor de corte chamado de densidade óptica de corte (DOc) foi estabelecido, o qual correspondeu à média dos valores de DO do branco somada a três vezes o desvio padrão do mesmo. Assim, a classificação das amostras como não produtoras de biofilme, produtoras de biofilme fraco, moderado ou forte, foi feita com base nos valores da DOf em relação à DOc obtidos (Tabela 3). Após a realização da triplicata da placa, foi calculada a média final das DOs para cada amostra.

Tabela 3. Classificação da produção de biofilme em estafilococos (Stepanović *et al.*, 2007).

Critério	Classificação da amostra
DOf ≤ DOc	não produtora
DOc ≤ DOf ≤ 2 x DOc	produtora de biofilme fraco
2 x DOc ≤ DOf ≤ 4 x DOc	produtora de biofilme moderado
DOf ≥ 4 x DOc	produtora de biofilme forte

DOf – Densidade óptica final; DOc – Densidade óptica de corte.

4.4 Ensaio para verificação da composição bioquímica do biofilme formado

A determinação da composição bioquímica do biofilme como proteica, polissacarídica ou contendo DNA extracelular foi realizada de acordo com as metodologias descritas por Frank e Patel (2007) e Izano e colaboradores (2008), com algumas modificações.

Os procedimentos iniciais do experimento consistiram na obtenção do crescimento bacteriano e formação do biofilme em placa de microtitulação de poliestireno (TPP) conforme descrito no item 4.3.

Após o período de incubação, o meio foi desprezado através da inversão da placa. Posteriormente, duas lavagens com 200 µL de PBS 1 X (Laborclin) pH 7,1 a 7,3 estéril foram realizadas. Em seguida, foi feito um tratamento com 100 µL de diferentes reagentes distribuídos em triplicata (triplicata experimental) e a placa foi incubada a 37 ºC por 2 h. Os reagentes utilizados para verificar a dispersão do biofilme foram: proteinase K (Invitrogen; Carlsbad, EUA) a 100 µg/ml em Tris-HCl (Invitrogen; Carlsbad, EUA) a 10 mM pH 7,5 (clivagem de aminoácidos alifáticos e aromáticos); metaperiodato de sódio ($NaIO_4$) (Sigma Chemical Company; Saint Louis, MO, EUA) a 50 mM em água de injeção (oxidação de ligações polissacarídicas); DNase I (Invitrogen; Carlsbad, EUA) a 100 µg/mL em solução de NaCl 150 mM (Proquimios Comércio e Indústria Ltda; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e $CaCl_2$ 1 mM (Macalé; Juiz de Fora, MG, Brasil) (degradação de DNA); e tampão PBS 1 X (Laborclin) pH 7,1 a 7,3 estéril (controle negativo). A figura 4 ilustra a distribuição das amostras e dos reagentes nos poços.

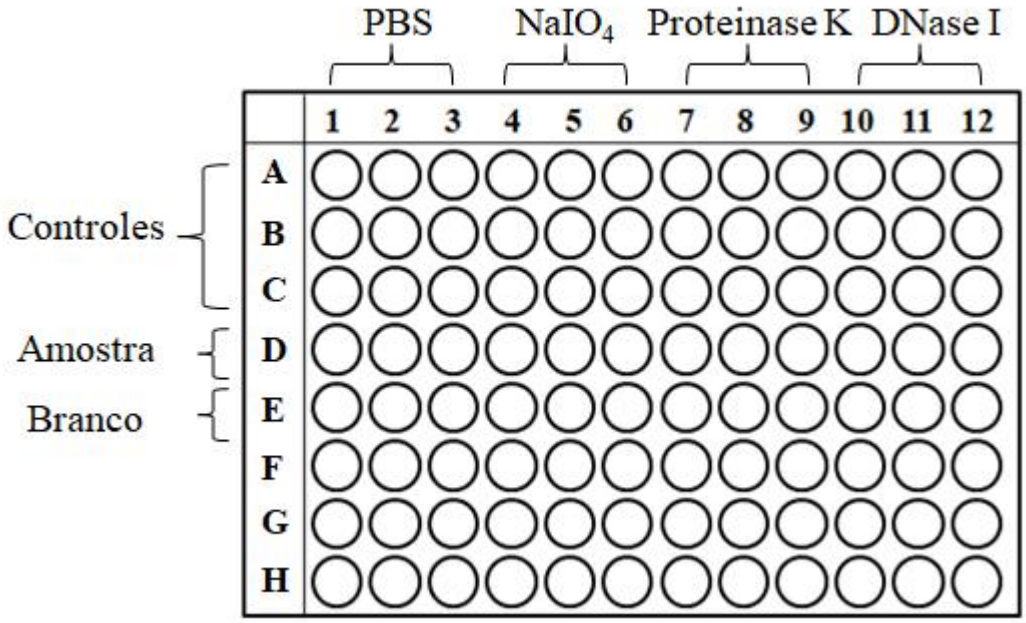

Figura 4. Distribuição das amostras, reagentes e branco no teste de determinação da composição bioquímica do biofilme.

Após incubação a 37 ºC por 2 h, os reagentes foram desprezados através da inversão da placa e uma lavagem com 200 µL de PBS 1 X (Laborclin) foi realizada. A placa foi submetida a uma etapa de secagem a temperatura ambiente por 24 h. Após esse período, a coloração do biofilme foi realizada conforme descrito no item 4.3.

A densidade óptica final (DOf) das amostras perante cada reagente foi a média das DOs obtidas para os três poços da amostra, subtraída pela média das DOs dos poços referentes ao branco tratados com o respectivo reagente. A determinação da composição bioquímica do biofilme foi realizada com base na redução dos valores de densidade óptica (DOf) das amostras frente ao tratamento com determinado reagente quando comparado com os valores obtidos no tratamento com PBS (controle negativo da dispersão) e demais reagentes. Posteriormente, os valores foram lançados no programa GraphPad Prism 6.01 para verificar se a redução observada era significativa.

Este ensaio foi realizado em triplicata e as amostras utilizadas como controles foram: *S. epidermidis* ATCC 35984 (amostra produtora de biofilme polissacarídico), *S. lugdunensis* 546s (amostra produtora de biofilme proteico) e *S. aureus* 1636a (amostra produtora de biofilme proteico com presença de DNA extracelular).

4.5 Avaliação da formação de biofilme na presença de fibrinogênio plasmático

Esta metodologia foi realizada segundo a descrição de Ferreira e colaboradores (2012). A primeira etapa deste experimento consistiu na sensibilização da microplaca (96 poços) (TPP 92096) com fibrinogênio plasmático humano. Assim, 150 µL de fibrinogênio (Sigma Chemical Company; Saint Louis, MO, EUA) a 50 µg/mL em tampão PBS 1 X (Laborclin) pH 7,1 a 7,3 estéril foram adicionados aos poços em triplicata, sendo que três poços foram reservados para o branco. Para comparar com o perfil de formação de biofilme na ausência da proteína, também foram reservados, tanto para as amostras quanto para o branco, poços em triplicata nesta mesma placa em que o fibrinogênio não foi adicionado (Figura 5).

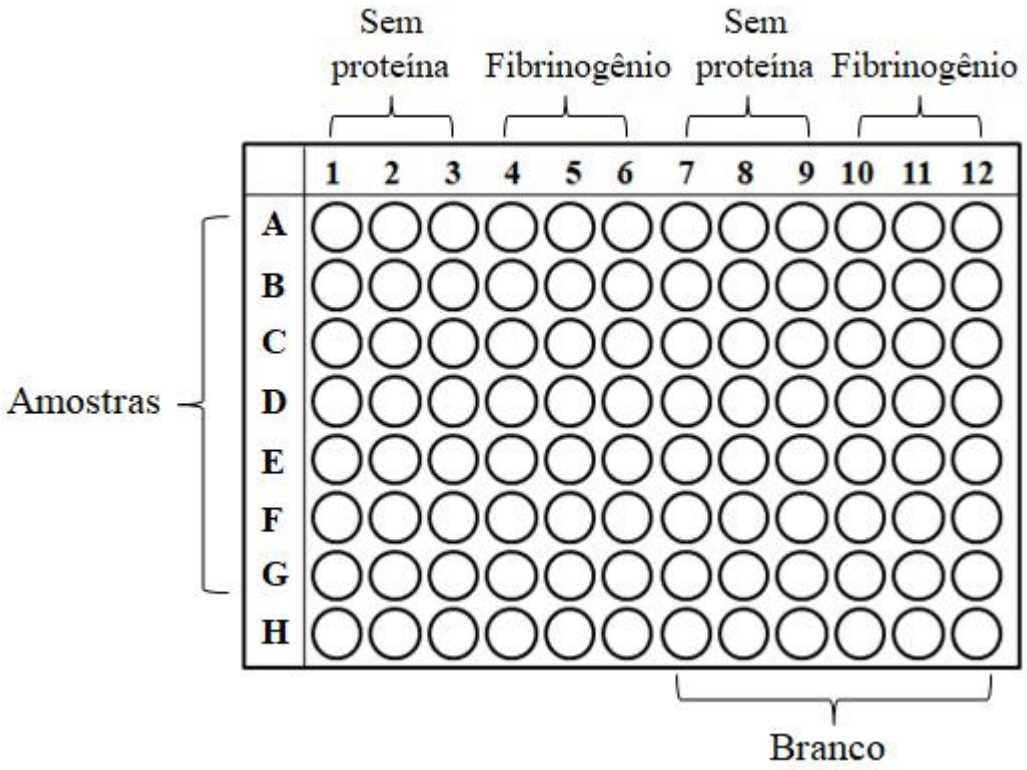

Figura 5. Esquema representando a placa de microtitulação de poliestireno para realização do teste de produção de biofilme na presença de fibrinogênio.

A placa foi incubada a 37 ºC por 1 h e, posteriormente, foi mantida a 4 ºC por 18 a 24 h. Todo o conteúdo dos poços foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta multicanal e foram realizadas duas lavagens com 180 µL de PBS 1 X (Laborclin) estéril. Em seguida, o biofilme foi formado e corado seguindo o protocolo relatado no item 4.3.

A partir dos valores de absorbância obtidos, foi calculada a média para os poços referentes ao branco e às amostras. Em seguida, a densidade óptica final (DOf) das amostras foi obtida pela subtração da média das DOs das amostras pela média do branco correspondente. Esta técnica foi realizada em triplicata e foi avaliada a média dos valores obtidos em cada experimento. Então, foi feita uma comparação dos valores de DOf obtidos na presença e ausência de fibrinogênio através de testes estatísticos usando o programa GraphPad Prism 6.01.

4.6 Extração de DNA por Chelex-100 e Proteinase K

A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Walsh, Metzger e Higuchi, 1991 para todas as amostras. A técnica baseia-se nas propriedades de Chelex-

100, resina que atua como quelante de íons metálicos, impedindo a degradação do DNA em fervura (Singer-Sam *et al.*, 1989). A solução de Chelex 5% (p/v) (Bio-Rad Laboratories Inc.; EUA) foi preparada utilizando água de injeção e, em seguida, armazenada em um tubo de centrifugação novo estéril. As amostras bacterianas foram semeadas em TSA (BD) e incubadas a 35 ºC por 24 h. Com o auxílio de uma alça bacteriológica esterilizada, o crescimento bacteriano (3 a 5 colônias) foi transferido para microtubos novos contendo 200 µL da solução de Chelex 5% e 2 µL de Proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen; Carlsbad, EUA). Os microtubos foram incubados em banho-maria a 56 ºC por 1 h. Após este período, cada microtubo foi agitado durante 10 s no vórtex e, em seguida, foram submetidos à fervura por 10 min. Posteriormente, as amostras foram novamente agitadas por 10 s e centrifugadas a 10000 *xg* por 3 min em microcentrífuga (Eppendorf; Hamburgo, Alemanha). Por fim, o DNA presente no sobrenadante foi coletado, transferido para novos microtubos identificados, quantificado utilizando espectrofotômetro NanoVue Plus (Biochrom; Holliston, MA, EUA) e armazenado a -20 ºC.

4.7 Detecção de genes envolvidos na formação de biofilme por *Staphylococcus aureus*

4.7.1 Detecção do gene *ica*A

Para realizar a amplificação do gene *ica*A, foi feita uma PCR *uniplex* para todas as 63 amostras com base na descrição de Martín-Lópes e colaboradores (2002).

Primeiramente, foi preparado o mix com os componentes básicos da reação em cadeia da polimerase em microtubos de 200 µL. Para isso, foram adicionados: 2,5 µL de tampão da enzima 1 X (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 3 mM de $MgCl_2$; 100 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Biotools; Madrid, Espanha); 0,6 µM de cada um dos iniciadores (Tabela 4); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools; Madrid, Espanha); 3 µL de DNA (aproximadamente 150 ng) e água de injeção para completar o volume de 25 µL por amostra.

Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados para detecção do gene *ica*A em *Staphylococcus aureus*, segundo Martín-Lópes *et al.* (2002).

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
icaAF	AAACTTGGTGCGGTTACAGG	750
icaAR	TCTGGGCTTGACGTTG	

Posteriormente, os microtubos foram colocados em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha). A reação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 95 ºC por 4 min; seguida de 35 ciclos a 95 ºC por 30 s, 50 ºC por 90 s e 72 ºC por 45 s; e uma etapa final de extensão a 72 ºC por 1 min. A amostra utilizada como controle positivo nesta reação foi *S. aureus* ATCC 33591.

A eletroforese para visualização do fragmento amplificado foi realizada em gel de agarose a 1,5% (p/v), em TBE 0,5 X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2) (Sigma; Saint Louis, MO, EUA) a 80 V por 1 h. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o de 100 pb (Kasvi; Curitiba, PN, Brasil). A revelação das bandas de DNA foi realizada mediante a adição do corante UniSafe Dye ® (0,5 x) (Uniscience Corporation; Miami, Flórida, EUA) no momento do preparo do gel. Este, por sua vez, foi submetido à luz ultravioleta em transiluminador (Kasvi; Curitiba, PN, Brasil).

4.7.2 Detecção do gene *sas*G

A detecção do gene *sas*G foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Roche e colaboradores (2003), através de uma PCR *uniplex* para todas as 63 amostras.

O preparo do mix para esta reação foi feito da mesma forma como descrito no item 4.7.1, sendo que, neste caso, os iniciadores utilizados foram sasGF e sasGR (Tabela 5).

Tabela 5. Sequências dos iniciadores utilizados para detecção do gene *sasG* em *Staphylococcus aureus*, segundo Roche *et al.* (2003).

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
sasGF	CGCTGATCAGAGATAAGAAAGGACCGG	311
sasGR	CGCTGATCATTAATTCTTTCTTCTACGAG	

O ciclo de amplificação foi realizado com o auxílio do termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), consistindo em: uma etapa de desnaturação inicial a 94 ºC por 3 min; seguida de 30 ciclos a 94 ºC por 1 min, 50 ºC por 1 min e 72 ºC por 1 min; e uma etapa final de extensão a 72 ºC por 1 min. A amostra utilizada como controle positivo nesta reação foi *S. aureus* 1125a (Matos, 2013).

Em seguida, foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) conforme descrito no item 4.7.1.

4.8 Tipagem do sistema de *quorum-sensing* Agr e avaliação fenotípica de sua atividade

4.8.1 Tipagem do Agr

Para a tipagem do sistema Agr, foi realizada uma PCR *multiplex* baseada na metodologia proposta por Gilot e colaboradores (2002). Além dos componentes básicos da PCR, foram utilizados cinco iniciadores denominados: pan-agr, agr1, agr2, agr3 e agr4. O pan-agr hibridiza na fita senso, em uma região conservada entre os diferentes tipos de Agr. Por outro lado, os outros quatro iniciadores hibridizam em regiões variáveis da fita anti-senso que são específicas para cada tipo de Agr (I, II, III e IV), gerando fragmentos de tamanhos diferentes (Gilot *et al.*, 2002).

Para o preparo do mix da reação, foram adicionados em um microtubo: 2,5 µL de tampão da enzima 1 X (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 5 mM de $MgCl_2$; 200 µM de cada dNTP (Biotools); 0,3 µM de cada um dos iniciadores (Tabela 6); 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools); 2 µL (aproximadamente 100 ng) de DNA e água de injeção para completar o volume final de 25 µL por amostra.

Tabela 6. Sequências dos iniciadores utilizados para tipagem do sistema de *quorum-sensing* Agr em *Staphylococcus aureus*.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Referência
pan-agr	ATGCACATGGTGCACATGC	Gilot *et al.*, 2002
agr1	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	
agr2	TATTACTAATTGAAAAGTGGCCAAGC	
agr3	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	
agr4	CGATAATGCCGTAATACCCG	

A amplificação dos fragmentos foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) e a reação consistiu em: uma etapa de desnaturação inicial a 94 ºC por 5 min; seguida de 26 ciclos a 94 ºC por 30 s, 55 ºC por 30 s e 72 ºC por 1 min; e uma etapa final de extensão a 72 ºC por 10 min.

Para a visualização do produto da PCR, foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), conforme descrito no item 4.7.1. A tabela 7 apresenta o tamanho dos fragmentos com base em cada tipo de Agr. As amostras que foram utilizadas como controle para cada tipo de sistema Agr, são: 63a (tipo I) (Chamon, 2017), Mu50 (tipo II) (Hiramatsu *et al.*, 1997), 1342a (tipo III) (Chamon, 2017) e 1453a (tipo IV) (Chamon, 2017).

Tabela 7. Tamanho dos fragmentos gerados de acordo com o tipo de Agr.

Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
491 pb	575 pb	323 pb	659 pb

4.8.2 Avaliação da funcionalidade do operon *agr* através da detecção fenotípica da produção de δ-hemolisina

O gene denominado *hld* codifica a δ-hemolisina (Hld) e encontra-se inserido no operon *agr* (Janzon e Arvidson, 1990). Assim, quando o operon está funcional, a δ-hemolisina é

produzida. Portanto, este teste permite inferir sobre a funcionalidade do Agr baseado na detecção fenotípica da produção de δ-hemolisina (Adhikari *et al.*, 2007).

Para a realização do teste, a metodologia empregada foi descrita por Adhikari e colaboradores (2007). Para isso, o crescimento bacteriano foi obtido através da semeadura em TSA (BD) com posterior incubação a 35 ºC por 24 h. Em seguida, utilizando placas de ágar sangue de carneiro (Laborclin; Pinhais, PN, Brasil), as amostras a serem testadas foram inoculadas de maneira perpendicular a uma amostra padrão denominada RN4220 que é produtora de β-hemolisina (Figura 6). As placas de ágar sangue (Laborclin) foram então incubadas a 37 ºC por 24 h.

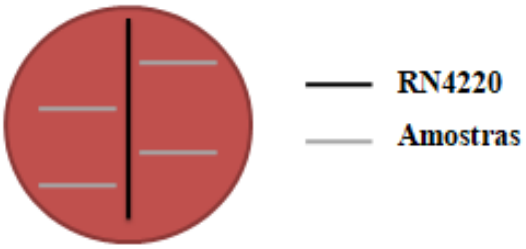

Figura 6. Esquema representando a semeadura para a realização do teste de detecção fenotípica da produção de δ-hemolisina.

Desta forma, quando havia a produção de δ-hemolisina pela amostra teste, esta atuava de forma sinérgica com a β-hemolisina da amostra RN4220, resultando no aparecimento de uma zona de hemólise total em forma de seta, indicando que o sistema estava ativo (Adhikari *et al.*, 2007).

4.9 Análise estatística

O programa GraphPad Prism 6.01 foi utilizado nas análises estatísticas dos resultados. A dispersão do biofilme foi analisada usando o teste *two-way* Anova, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Para comparação dos resultados obtidos da formação do biofilme na presença e ausência do fibrinogênio também foi utilizado o teste *two-way* Anova, seguido do teste de comparações múltiplas de Sidak. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Confirmação da espécie bacteriana

As 63 amostras clínicas de *S. aureus* da linhagem USA100/ST5-II selecionadas para a realização deste estudo e previamente caracterizadas quanto à espécie, resistência à meticilina e clonalidade, foram novamente avaliadas por testes fenotípicos convencionais e pela metodologia de MALDI-TOF-MS para confirmação da espécie bacteriana.

Em relação aos testes fenotípicos convencionais, todas as amostras se apresentaram como cocos Gram-positivos arranjados em cachos, produziram a enzima catalase e exibiram resultado positivo nos testes do fator *clumping* ou da coagulase.

Em seguida, as amostras foram submetidas à técnica de MALDI-TOF-MS, cuja pontuação mínima considerada como aceitável no presente estudo foi de 2,000. Neste sentido, foi observado que 47 (75%) amostras apresentaram identificação altamente provável de espécie (faixa de *score* entre 2,300 e 3,000), enquanto 16 (25%) foram confirmadas quanto ao gênero e apresentaram uma provável identificação em nível de espécie (faixa de *score* entre 2,000 e 2,299) (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição das 63 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* de acordo com a faixa de *score* emitida na técnica de MALDI-TOF-MS.

Faixa de *score*	Descrição	n (%)
2,300 – 3,000	Identificação altamente provável de espécie	47 (75)
2,000 – 2,299	Identificação do gênero, identificação provável de espécie	16 (25)
1,700 – 1,999	Identificação provável do gênero	0 (0)
0,000 – 1,699	Identificação não confiável	0 (0)

n - Número.

5.2 Produção de biofilme por amostras MRSA da linhagem USA100/ST5

Todas as amostras foram avaliadas quanto à capacidade de formação de biofilme através do teste de quantificação em placa de microtitulação de poliestireno com TSB + 1% glicose

corada com safranina a 0,1% (p/v). A maioria das amostras (40; 63%) foi classificada como produtora de biofilme moderado, enquanto os fenótipos forte, fraco e não produtor de biofilme foram observados em 13 (21%), 5 (8%) e 5 (8%) amostras, respectivamente (Figura 7).

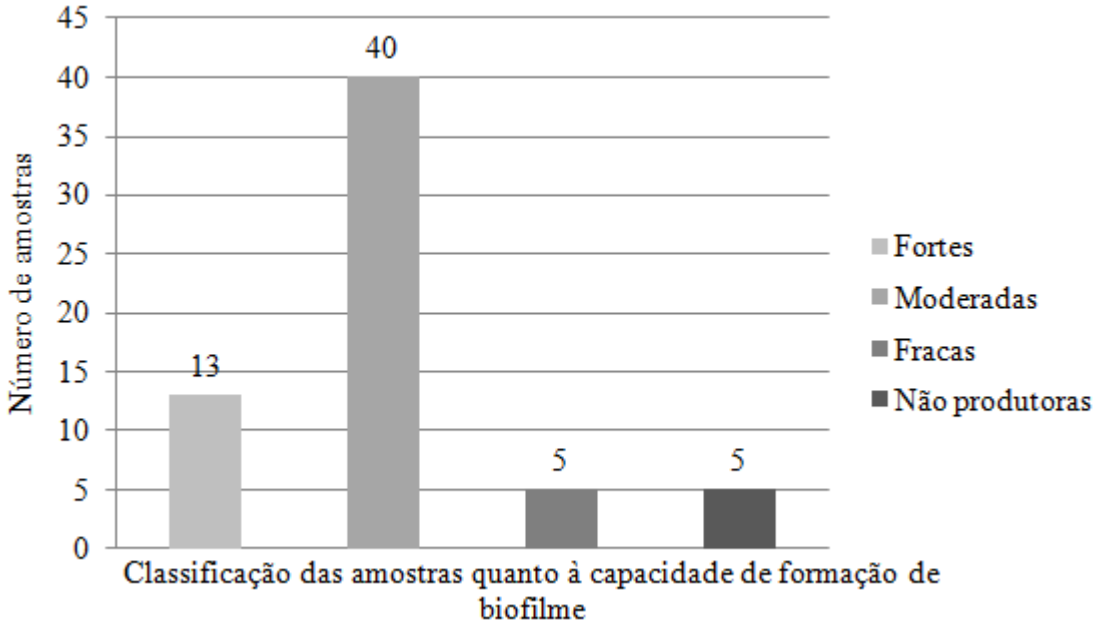

Figura 7. Distribuição das 63 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina da linhagem USA100/ST5 de acordo com o perfil de formação de biofilme.

5.3 Determinação da composição bioquímica do biofilme

Uma amostra MRSA USA100/ST5 classificada como produtora de biofilme forte (média DO final = 1,358) foi selecionada aleatoriamente para realização do ensaio de dispersão com metaperiodato de sódio, proteinase K e DNase I a fim de determinar se o biofilme era de natureza polissacarídica, proteica e se possuía DNA extracelular, respectivamente. A amostra avaliada, isolada de ICS em 2009, apresentou redução significativa do biofilme na presença de proteinase K (valor de *p* ajustado = 0,0002) e DNase I (valor de *p* ajustado = 0,0011), sendo esta redução mais expressiva na incubação com a protease (Figuras 8 e 9). Desta forma, pode-se supor que, neste caso, a matriz extracelular é composta majoritariamente de conteúdo proteico e também continha DNA extracelular.

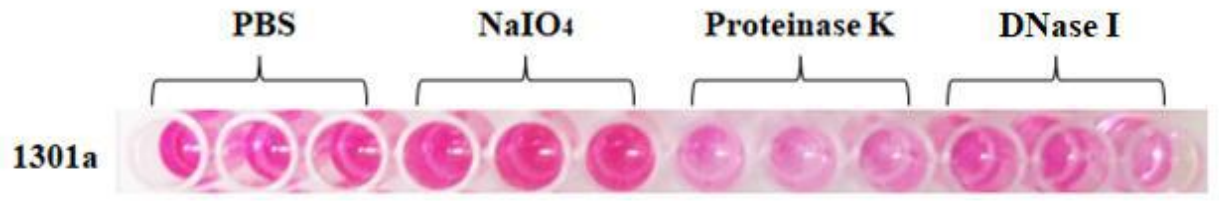

Figura 8. Imagem da placa no ensaio de dispersão do biofilme da amostra 1301a. $NaIO_4$ - Metaperiodato de sódio; PBS - Tampão fosfato salino.

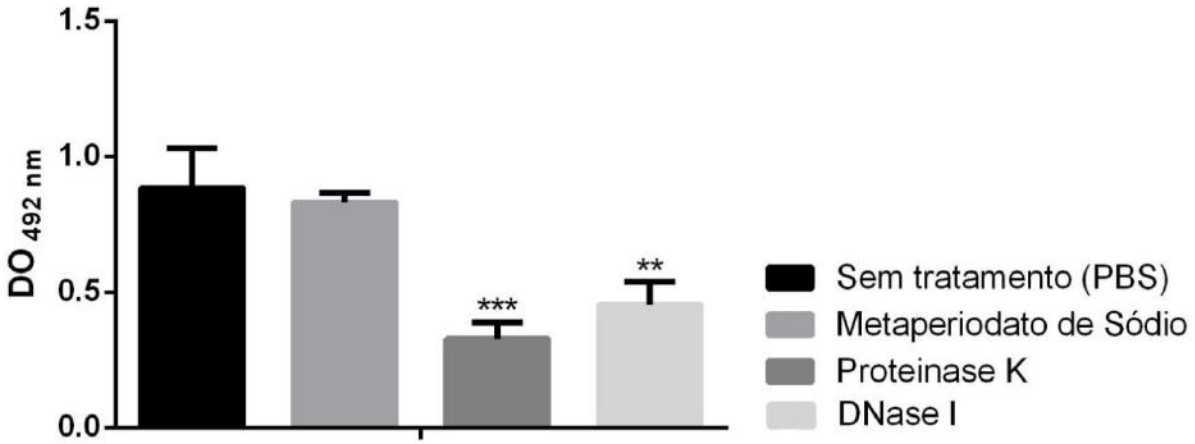

Figura 9. Dispersão do biofilme formado pela amostra 1301a. $DO_{492\ nm}$- Densidade óptica a 492 nm; PBS - Tampão fosfato salino. Os símbolos ** e *** indicam valores de $p < 0,01$ e 0,001, respectivamente.

5.4 Avaliação da produção de biofilme por amostras MRSA USA100 na presença de fibrinogênio plasmático

Para avaliar se o fibrinogênio plasmático teria algum impacto no perfil de formação de biofilme de amostras MRSA USA100/ST5, foram selecionadas aleatoriamente seis amostras, das quais três foram classificadas como produtoras de biofilme moderado (1255a, 1579a e 1592a) e outras três como produtoras de biofilme fraco (1655a, 1661a e 1770a).

A análise mostrou que cinco das seis amostras avaliadas apresentaram uma maior produção de biofilme na presença de fibrinogênio (Figura 10). Este aumento foi considerado estatisticamente significativo para três amostras (50%), sendo duas produtoras de biofilme moderado (1255a e 1592a) e uma produtora de biofilme fraco (1655a). Os respectivos valores de *p* ajustados foram: 0,0292; 0,0053 e 0,0008.

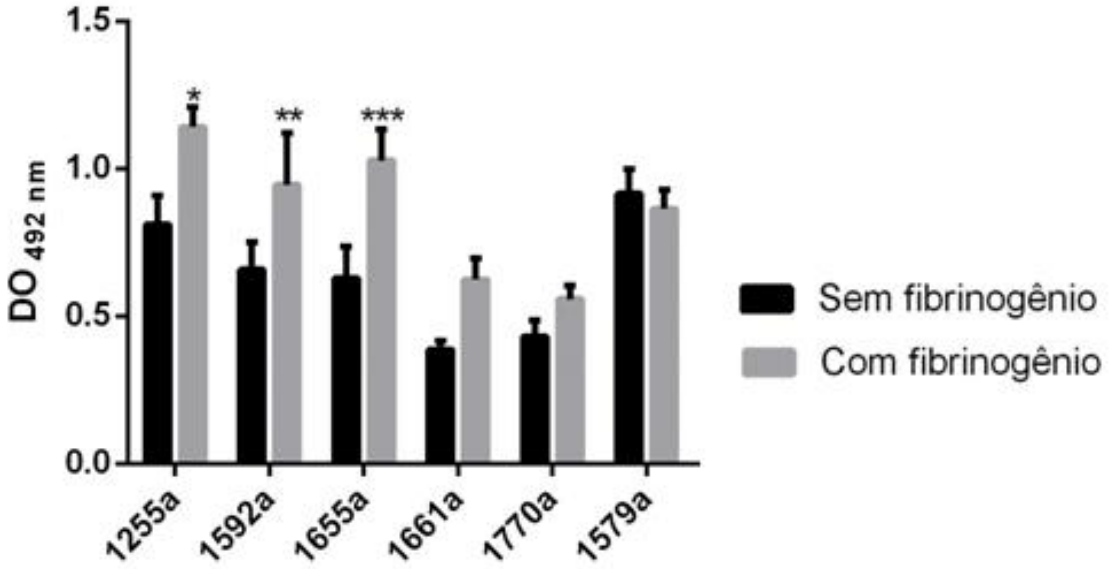

Figura 10. Perfil de formação de biofilme de seis amostras MRSA da linhagem USA100/ST5 na presença e ausência de fibrinogênio plasmático. $DO_{492\ nm}$ - Densidade óptica a 492 nm. Os símbolos *, ** e *** indicam valores de $p < 0,05$, 0,01 e 0,001, respectivamente.

5.5 Detecção de genes envolvidos na formação de biofilme por *S. aureus*

As 63 amostras MRSA USA100/ST5 foram submetidas à PCR *uniplex* para detecção dos genes *ica*A, associado com a produção de biofilme polissacarídico, e *sas*G, envolvido com a formação de biofilme proteico. Foi observado que todas as amostras apresentaram bandas de 750 pb (Figura 11) e 311pb (Figura 12) correspondentes aos genes *ica*A e *sas*G, respectivamente.

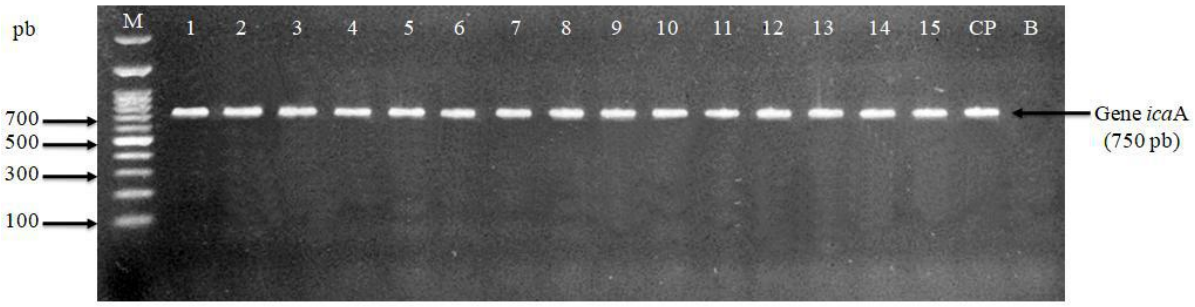

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose para confirmar a amplificação do gene *ica*A (750 pb) em amostras MRSA USA100/ST5. M: Marcador de tamanho molecular (100 pb); Colunas 1 a 15: amostras testadas e positivas para o gene; CP: Controle positivo (amostra ATCC 33591); B: Branco.

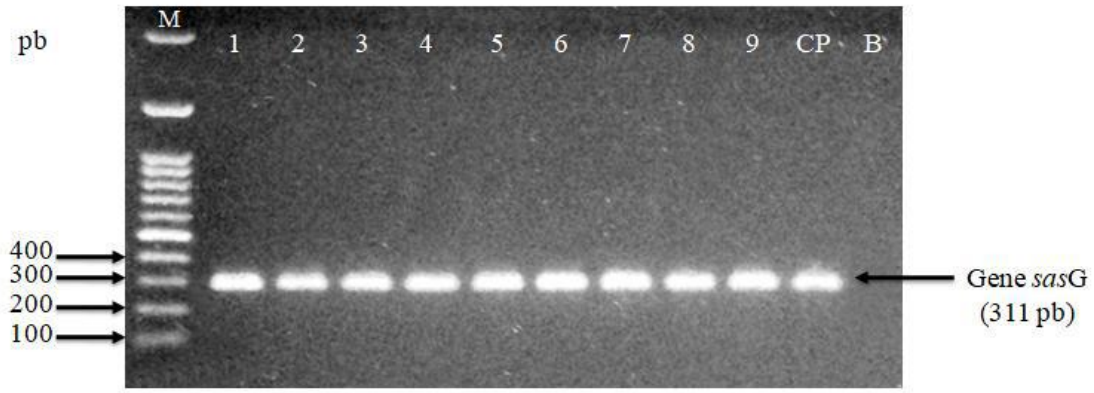

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose para confirmar a amplificação do gene *sas*G (311 pb) em amostras MRSA USA100/ST5. M: Marcador de tamanho molecular (100 pb); Colunas 1 a 9: amostras testadas e positivas para o gene; CP: Controle positivo (amostra 1125a); B: Branco.

5.6 Tipagem do sistema Agr e análise fenotípica de sua funcionalidade

O tipo de sistema Agr presente nas amostras estudadas foi verificado por PCR *multiplex*. Os resultados demonstraram que todas as 63 amostras apresentaram o Agr do tipo II, caracterizado pela presença de uma banda de 575 pb, conforme demonstrado na Figura 13.

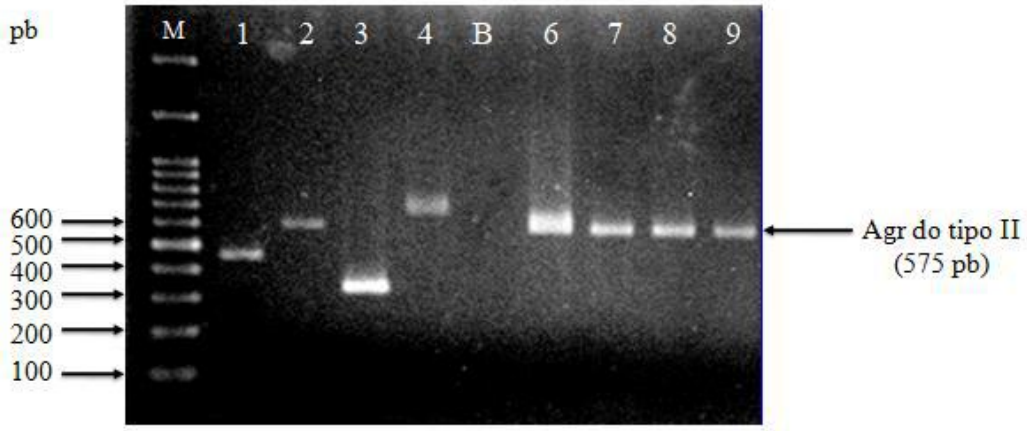

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose para tipagem do sistema Agr em amostras MRSA USA100/ST5. M: Marcador de tamanho molecular (100 pb); Colunas 1 a 4: amostras controles (1- 63a/AgrI, 2- Mu50/AgrII, 3- 1342a/AgrIII e 4- 1453a/AgrIV); B: Branco; Colunas 6 a 9: amostras testadas que apresentaram o Agr do tipo II.

Além disso, a funcionalidade do operon *agr* foi avaliada em todas as amostras através de um teste fenotípico que consiste na detecção de δ-hemolisina em ágar sangue de carneiro (Figura 14). Desta forma, foi observado que o operon *agr* estava ativo em 41 (65%) amostras (Figura 15).

Entretanto, a zona de hemólise em forma de seta, que indica resultado positivo neste teste, se apresentou de forma discreta ou pouco aparente na maioria das amostras analisadas.

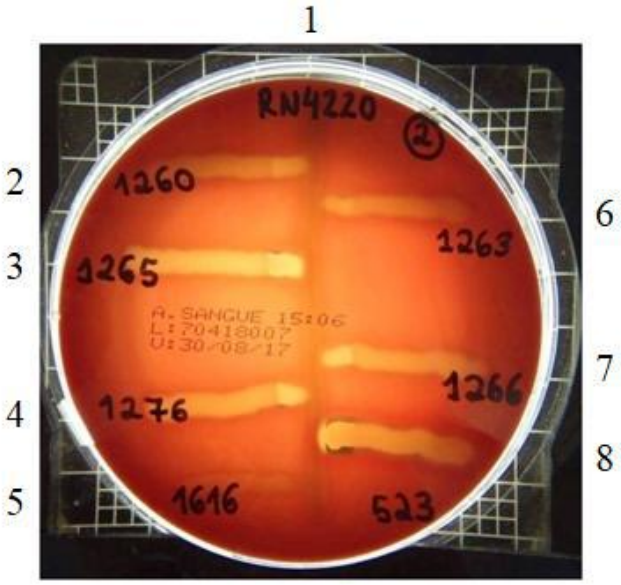

Figura 14. Avaliação da funcionalidade do operon *agr* em amostras MRSA USA100/ST5 através do teste fenotípico de detecção de δ-hemolisina em placas de ágar sangue de carneiro. 1 - RN4220 (Amostra padrão produtora de β-hemolisina); 2, 5 e 6 - Amostras negativas; 3, 4 e 7 - Amostras positivas com zona de hemólise discreta; 8 - Amostra positiva.

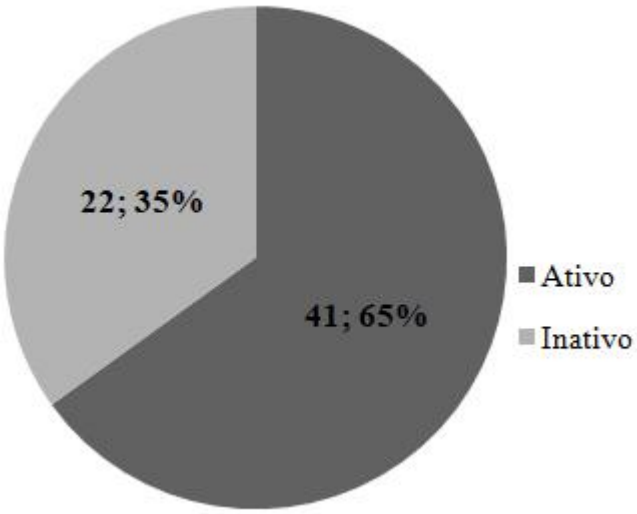

Figura 15. Funcionalidade do operon *agr* em 63 amostras MRSA da linhagem USA100/ST5.

Neste trabalho, não foi observada relação entre a inatividade do sistema Agr e maior produção de biofilme, visto que houve uma distribuição heterogênea dos perfis de formação de biofilme no grupo de amostras com o operon *agr* inativo como mostrado na Figura 16.

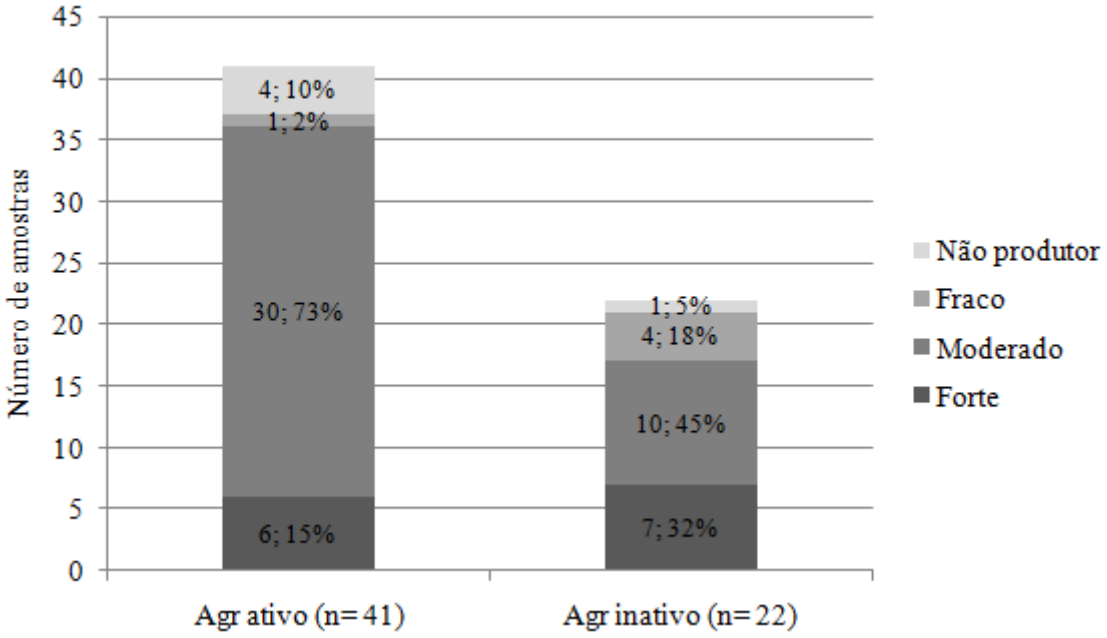

Figura 16. Distribuição dos fenótipos de formação de biofilme em 63 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina da linhagem USA100/ST5 de acordo com a funcionalidade do operon *agr*.

6. DISCUSSÃO

A formação de biofilme é um importante mecanismo de virulência apresentado por *S. aureus*, pois proporciona a evasão do sistema imunológico, impacta em uma menor susceptibilidade aos antimicrobianos e, normalmente, é associada com infecções relacionadas a dispositivos médicos (Davies, 2003; Singh *et al.*, 2010; Thurlow *et al.*, 2011; Veerachamy *et al.*, 2014; Otto, 2018). Sabendo da relevância deste fator de virulência, este estudo visou caracterizar a produção de biofilme e aspectos relacionados em 63 amostras MRSA da linhagem USA100/ST5 isoladas entre 2004 e 2015 de hospitais do Rio de Janeiro, visto que amostras desta linhagem vêm ganhando espaço na clínica e têm se estabelecido em hospitais desta região (Caboclo *et al.*, 2013; da Costa *et al.*, 2016; Chamon *et al.*, 2017; Damasco, 2017).

Alguns estudos descrevem que amostras da linhagem USA100 são capazes de produzir biofilmes, geralmente, classificados como fortes ou moderados (Vanhommerig *et al.*, 2014; Côrtes *et al.*, 2015; King *et al.*, 2016), embora também existam relatos de baixa produção de biofilme por amostras desta linhagem (Baldan *et al.*, 2012; Guimarães, 2018). Neste trabalho, a maioria das amostras avaliadas (40; 63%) foi classificada como produtora de biofilme moderado, seguido de 13 (21%) amostras classificadas como produtoras de biofilme forte, perfazendo um total de 84% de amostras potenciais produtoras de biofilme. Dados como esses destacam a importância de se investigar esse fator de virulência nessas amostras, o que pode estar contribuindo para o estabelecimento dessas cepas em ambientes de saúde da cidade do Rio de Janeiro.

Dados da literatura indicam que amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina poderiam regular negativamente a expressão dos operons *ica* e *agr*, o que influenciaria na composição do biofilme. Desta forma, cepas MRSA produziriam biofilmes de natureza proteica, enquanto as estirpes MSSA apresentariam biofilmes de composição polissacarídica (Fitzpatrick, Humphreys e O'Gara, 2005;O'Neill *et al.*, 2007; Pozzi *et al.*, 2012; McCarthy *et al.*, 2015; Dakheel *et al.*, 2016). A amostra 1301a (MRSA USA100) avaliada neste estudo, apresentou redução significativa do biofilme na presença de proteinase K e DNase I, caracterizando-o como tendo composição proteica e contendo DNA extracelular. É válido comentar que a presença de DNA extracelular na matriz de biofilmes bacterianos, como de *S. aureus*, vem sendo cada vez mais relatada (Izano *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2012; Jakubovics *et al.*, 2013; Okshevsky e Meyer, 2015;

Sugimoto *et al.*, 2018). Dengler e colaboradores (2015) descrevem que este componente desempenha um papel importante na estrutura do biofilme, atuando como uma rede eletrostática que auxilia o processo de interligação das células bacterianas embebidas na matriz extracelular proteica. Segundo alguns autores, o DNA na matriz do biofilme poderia ser utilizado como um possível alvo no combate a este fator de virulência (Kaplan *et al.*, 2012b; Okshevsky, Regina e Meyer, 2015). Uma limitação do estudo, no entanto, foi a avaliação de apenas uma amostra. Consequentemente, não se pode afirmar que a presença de DNA extracelular no biofilme seja uma característica comum às amostras da linhagem USA100. Deve-se destacar também que a amostra investigada possui o gene *ica*A, mas não apresentou um biofilme de composição polissacarídica. Neste sentido, O'Neill e colaboradores (2007) observaram que amostras MRSA possuíam e expressavam o operon *ica*, porém não havia detecção do produto do operon. Assim, sugere-se que a PBP2a poderia inibir, de alguma maneira, a produção da PIA. Portanto, conhecer a composição bioquímica do biofilme de amostras estafilocócicas é relevante, visto que impulsiona a busca por moléculas que promovam a destruição do biofilme bacteriano através de sua atividade direcionada contra os componentes da matriz extracelular.

A presença de dois genes associados com a produção de biofilme em *S. aureus* foi averiguada em todas as 63 amostras. O gene *ica*A faz parte do operon *ica*ADBC e está envolvido com a formação de biofilmes polissacarídicos, como já mencionado anteriormente (Arciola *et al.*, 2015; Otto, 2018). Por outro lado, o gene *sas*G codifica a proteína de superfície G que tem ação zinco-dependente e está relacionada com a produção de biofilmes proteicos (Geoghegan *et al.*, 2010; Speziale *et al.*, 2014; Paharik e Horswill, 2016; Otto, 2018). No presente estudo todas as amostras apresentaram ambos os genes. De forma similar, a maioria dos estudos que pesquisaram o gene *ica*A relataram que o mesmo foi detectado em todas as amostras de *S. aureus* avaliadas (Atshan *et al.*, 2012; Rasmussen *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013; de Matos *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016; Torlak *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018; Puah *et al.*, 2018). No entanto, a presença do gene *sas*G em *S. aureus* é mais variável (Rasmussen *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013; de Matos *et al.*, 2014; Puah *et al.*, 2018), o que pode estar relacionado com determinados complexos clonais (Monecke *et al.*, 2009). A presença destes dois genes envolvidos com mecanismos distintos de formação de biofilme na linhagem estudada demonstra a versatilidade dos fatores de virulência em *S. aureus*.

A formação de biofilme por *S. aureus* é frequentemente associada a infecções relacionadas a dispositivos médicos. Este microrganismo dispõe de uma ampla gama de adesinas que reconhecem as proteínas de matriz extracelular do hospedeiro, permitindo a adesão ao dispositivo implantado, visto que é recoberto por essas proteínas assim que inserido no paciente (Arciola, Campoccia e Montanaro, 2018). Visando mimetizar o que acontece *in vivo*, a formação de biofilme na presença de fibrinogênio foi outro aspecto investigado no presente trabalho. A maioria das amostras clínicas aqui estudadas foi isolada de ICS e este teste visa avaliar se uma proteína plasmática, como o fibrinogênio, provocaria um aumento da produção de biofilme por amostras MRSA USA100. Apesar da importância e do possível impacto dessa proteína no decorrer da infecção *in vivo*, a formação de biofilme na presença de fibrinogênio plasmático ainda é pouco avaliada em *S. aureus*. Em 2008, Bonifait, Grignon e Grenier relataram que o fibrinogênio induziu a formação de biofilme por *Streptococcus suis*. Em 2013, Bedran e colaboradores já haviam descrito que a mesma proteína foi capaz de induzir a formação de biofilme por *Streptococcus mutans* de maneira dose-dependente. Guimarães (2018) verificou um aumento da acumulação de biofilme por amostras de *S. aureus* de diferentes linhagens em placas recobertas com proteínas de matriz extracelular, incluindo o fibrinogênio. Além disso, diversos autores também demonstraram um aumento da produção de biofilme por amostras de *S. aureus* em placas recobertas com fibronectina (Zautner *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013; Côrtes *et al.*, 2015; Guimarães, 2018). Nós verificamos que 3 (50%) das 6 amostras MRSA USA100 avaliadas apresentaram um aumento significativo na acumulação de biofilme em placas recobertas com fibrinogênio, destacando que fatores do próprio hospedeiro podem ser utilizados em benefício do patógeno e, desta forma, podem contribuir para o sucesso da infecção.

Outro aspecto relacionado com a formação de biofilme em *S. aureus* é o sistema de *quorum-sensing* Agr, o qual está intimamente associado com a dispersão do biofilme formado por inibir a expressão de adesinas e estimular a expressão de substâncias capazes de degradar a matriz extracelular. Até o momento, foram descritos quatro tipos de sistema Agr (I, II, III e IV) decorrentes dos polimorfismos em dois genes que constituem o operon (Boles e Horswill, 2008; Thoendel *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2014; Le e Otto, 2015). Estudos vêm associando amostras de *S. aureus* pertencentes ao CC5, como as da linhagem USA100 (ST5/SCC*mec* II), ao sistema Agr do tipo II (Holtfreter *et al.*, 2007; Thoendel *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2018). De fato, todas as amostras MRSA USA100 avaliadas no estudo apresentaram o Agr do tipo II como

relatado e 84% (53) destas mostraram capacidade de formação de biofilme. Neste sentido, vem sendo relatado que cepas que possuem o operon *agr* dos tipos II ou III são as principais produtoras de biofilme quando comparado com os tipos I e IV (Cafiso *et al.*, 2007; Ikonomidis *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2011; Khoramrooz *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2018). Entretanto, outros autores descrevem que a produção de biofilme pode estar relacionada com a clonalidade das amostras (Croes *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2013; Guimarães, 2018). Desta forma, não é possível afirmar que a elevada capacidade de formação de biofilme por amostras MRSA USA100 é decorrente da presença do sistema Agr do tipo II.

Além disso, alguns autores observaram uma relação entre inatividade do sistema Agr e maior produção de biofilme (Vuong *et al.*, 2000; Vuong *et al.*, 2004; Cafiso *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2013). O'Neill e colaboradores (2007) verificaram esta relação em 5 amostras de *S. aureus*, contudo as outras 13 amostras estudadas não mostraram diferença. No presente trabalho, o sistema Agr de 35% das amostras foi considerado inativo, porém não foi verificada relação entre o perfil de formação de biofilme das amostras e a funcionalidade deste operon. Assim como este estudo, outros autores não verificaram uma associação entre estes aspectos (Côrtes *et al.*, 2015; Pérez-Montarelo *et al.*,2017; Guimarães, 2018). Entretanto, é importante ressaltar que as amostras USA100 que apresentaram o operon ativo, segundo o teste fenotípico de detecção da produção de δ-hemolisina, apresentaram uma zona de hemólise em forma de seta menos evidente do que geralmente é observado (Adhikari, Arvidson e Novick, 2007; Schweizer *et al.*, 2011). Esse fato poderia estar relacionado com o locus do *psm-mec*, que pode ser encontrado em amostras carreadoras do SCC*mec* II e pertencentes ao ST5. Um dos produtos do *psm-mec* é um pequeno RNA regulatório que parece reprimir o AgrA (promove a transcrição dos dois locus do Agr), consequentemente, impacta na atuação do *quorum-sensing* bacteriano (Kaito *et al.*, 2013). Além disso, é descrito que o funcionamento do sistema Agr é variável entre as cepas de *S. aureus*. Neste sentido, é relatado que algumas cepas produzem RNAIII em baixos níveis e outras, como as representantes da linhagem USA300, apresentam níveis mais elevados de RNAIII (Li *et al.*, 2009; Paharik e Horswill, 2016). Uma limitação do presente trabalho é a de que nenhum teste quantitativo foi realizado em conjunto com o teste fenotípico a fim de verificar se a expressão do operon estava de fato reduzida. Desta forma, apesar de não ter havido relação entre produção de biofilme e inatividade do sistema Agr neste trabalho, torna-se importante averiguar a expressão

do operon quantitativamente, buscando avaliar se de fato haveria um possível impacto na virulência de amostras USA100.

Assim, o presente estudo reforça a importância de se avaliar a formação de biofilme e a versatilidade deste fator de virulência em amostras MRSA USA100/ST5, tendo em vista a mudança na epidemiologia das infecções ocasionadas por *S. aureus* em hospitais do Rio de Janeiro. Além disso, a compreensão desses aspectos permite explorar novas alternativas terapêuticas que futuramente possam ser aplicadas para o tratamento de infecções persistentes associadas ao biofilme.

7. CONCLUSÕES

- As amostras MRSA USA100/ST5 avaliadas produziram preferencialmente biofilmes fortes ou moderados (53; 84%), ressaltando a importância clínica destas amostras.

- Amostras desta linhagem parecem produzir biofilme proteico com presença de DNA extracelular.

- Independente da composição bioquímica do biofilme, todas as amostras apresentaram os genes *ica*A e *sas*G, associados com a produção de biofilme polissacarídico e proteico, respectivamente.

- A presença de fibrinogênio plasmático, como ocorre *in vivo*, pode induzir um aumento significativo da produção de biofilme por amostras MRSA USA100/ST5.

- Todas as amostras apresentaram o operon *agr* do tipo II, uma vez que este tipo tem sido associado com esta linhagem.

- O sistema Agr se mostrou inativo em 35% das amostras, e não foi observada relação entre este resultado e maior produção de biofilme nas amostras MRSA USA100/ST5 avaliadas no estudo.

8. RFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikari, R.P., Arvidson, S., e Novick, R.P. (2007). A nonsense mutation in *agr*A accounts for the defect in *agr* expression and the avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 traP::kan. Infect. Immun. 75, 4534-4540.

Aires de Sousa, M., de Lencastre, H., Santos Sanches, I., Kikuchi, K., Totsuka, K., e Tomasz, A. (2000). Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. Microb. Drug Resist. 6, 253-258.

Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., e Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. Front Cell Infect Microbiol. 5, 7.

Arciola, C.R., Campoccia, D., e Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. Nat. Rev. Microbiol. 16, 397-409.

Argudín, M.A., Mendoza, M.C., e Rodicio, M.R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins 2, 1751-1773.

Atshan, S.S., Nor Shamsudin, M., Sekawi, Z., Lung, L.T., Hamat, R.A., Karunanidhi, A., Mateg Ali, A., Ghaznavi-Rad, E., Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Chong Seng, J.S., Nathan, J.J., e Pei, C.P. (2012). Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*.
J Biomed Biotechnol. 2012:976972.

Baig, S., Johannesen, T.B., Overballe-Petersen, S., Larsen, J., Larsen, A. R., e Stegger, M. (2018). Novel SCC*mec* type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 61, 74-76.

Baldan, R., Testa, F., Lorè, N.I., Bragonzi, A., Cichero, P., Ossi, C., Biancardi, A., Nizzero, P., Moro, M., e Cirillo, D.M. (2012). Factors contributing to epidemic MRSA clones replacement in a hospital setting. PLoS One 8, e43153.

Bannerman, T.L.A., e Peacock, S.J. (2007). *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In. Manual of Clinical Mirobiology. 9. ed. (Washington: ASM Press.), pp. 390-411.

Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E.A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U., Peters, G. (2018). Plasmid-encoded transferable *mec*B-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 24, 242-248.

Bedran, T.B., Azelmat, J., Spolidorio, D.P., e Grenier, D.(2013). Fibrinogen-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to endothelial cells. Biomed Res Int. 2013, 431465.

Boles, B.R., e Horswill, A.R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathog. 4, e1000052.

Bonifait, L., Grignon, L., e Grenier, D. (2008). Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. Appl Environ Microbiol. 74, 4969-4972.

Braga, I.A., Campos, P.A., Gontijo-Filho, P.P., e Ribas, R.M. (2018). Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. J Hosp Infect. 99, 318-324.

Caboclo, R.M., Cavalcante, F.S., Iorio, N.L., Schuenck, R.P., Olendzki, A.N., Felix, M.J., Chamon, R.C., e Santos, K.R.N. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCC*mec* type IV and USA100/ST5 SCC*mec* type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. Am. J. Infect. Control. 41, 21-26.

Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Demelio, V., Spina, D., Nicoletti, G., e Stefani S. (2007). agr-genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51, 220-227.

Caiaffa-Filho, H.H., Trindade, P.A., da Cunha, P.G., Alencar, C.S., Prado, G.V., Rossi, F., e Levin, A.S. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC*mec* type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. Diagn. Microbiol. Infect Dis. 76, 518-520.

Carroll, K.C. (2014). Estafilococos. In: Microbiologia Médica. 26. ed. (New York: McGraw-Hill), pp. 199-207.

Chambers, H.F., e DeLeo, F.R. (2009). Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat. Rev. Microbiol. 7, 629-641.

Chamon, R.C. (2017). Avaliação da expressão fenotípica e genotípica de fatores de virulência e o papel da modulação antimicrobiana no biofilme de amostras de *Staphylococcus aureus* carreadores dos genes *pvl*. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, f: 186.

Chamon, R.C., Ribeiro, S.D., da Costa, T.M., Nouér, S.A., e Santos, K.R.N. (2017). Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Braz. J. Infect. Dis. 21, 185-189.

Chen, Y., Crosby, H.A., Oosthuysen, W.F., Diekema, D.J., Kelley, S.T., e Horswill, A.R. (2018). Draft Genome Sequence of USA100 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain 209. Genome Announc. 6, e01399-17.

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

Corrigan, R.M., Rigby, D., Handley, P., Foster, T.J. (2007). The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. Microbiology 153, 2435-2446.

Côrtes, M.F., Beltrame, C.O., Ramundo, M.S., Ferreira, F.A., e Figueiredo, A.M. (2015). The influence of different factors including *fnb*A and *mec*A expression on biofilm formed by MRSA clinical isolates with different genetic backgrounds. Int J Med Microbiol. 305, 140-147.

Costa, A.C., Silva, M.G., e Noriega, E. (2007). Manual de operacionalização do programa nacional de prevenção e controlo da infecção associada aos cuidados de saúde. Ministério da Saúde, Portugal.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., e Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284, 1318-1322.

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

Croes, S., Deurenberg, R.H., Boumans, M.L., Beisser, P.S., Neef, C., e Stobberingh, E.E. (2009). *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. BMC Microbiol. 9, 229.

Da Costa, T.M., Morgado, P.G., Cavalcante, F.S., Damasco, A.P., Nouér, S.A., e Santos, K.R.N. (2016). Clinical and microbiological characteristics of heteroresistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from bloodstream infections in a Brazilian teaching hospital. PLoS One 11, e0160506.

Dakheel, K.H., Abdul Rahim, R., Neela, V.K., Al-Obaidi, J.R., Hun, T.G., e Yusoff, K. (2016). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms and their influence on bacterial adhesion and cohesion. Biomed. Res Int., 2016: 4708425.

Damasco, A.P. (2017). *Staphylococcus aureus* isolados de infecção da corrente sanguínea em um hospital universitário do Rio de Janeiro entre 2011 e 2015: análise fenotípica e genotípica da resistência aos antimicrobianos e clonalidade. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências - Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, f: 101.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov. 2, 114-122.

De Matos, P.D., Sedaca, S., Ferreira, D.C., Iorio, N.L., Toledo, V.C., Freitas, A.I., Coelho, F.L., Sousa, C., Dos Santos, K.R., e Pereira, M.O. (2014). Antimicrobial synergism against different lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC*mec* IV. J. Appl. Microbiol. 116, 1418-1426.

Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A.S., e Losick, R. (2015). An electrostatic net model for the role of extracellular DNA in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 197, 3779-3787.

De Miranda, O.P., Silva-Carvalho, M.C., Ribeiro, A., Portela, F., Cordeiro, R.P., Caetano, N., Vidal, C.F., e Figueiredo, A.M. (2007). Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC*mec*IV that are related genetically to the USA800 clone. Clin. Microbiol. Infect. 13, 1165-1172.

De Oliveira, C.F., Morey, A.T., Santos, J.P., Gomes, L.V., Cardoso, J.D., Pinge-Filho, P., Perugini, M.R., Yamauchi, L.M., e Yamada-Ogatta, S.F. (2015). Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. J. Infect. Dev. Ctries. 9, 743-751.

Deurenberg, R.H., e Stobberingh, E.E. (2009). The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr. Mol. Med. 9, 100-115.

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

Donlan, R.M., e Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15, 167 e93.

Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J., e Spratt, B.G. (2000). Multilocus Sequence Typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38, 1008-1015.

Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., e Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). PNAS 99, 7687-7692.

Euzéby, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <www.bacterio.net>. Acesso em 16 de março de 2018.

Ferreira, F.A., Souza, R.R., Bonelli, R.R., Américo, M.A., Fracalanzza, S.E.L., e Figueiredo, A.M.S. (2012). Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent *Staphylococcus aureus* biofilm. J. Microbiol. Methods 88, 393-398.

Ferreira, F.A., Souza, R.R., de Sousa Moraes, B., de Amorim Ferreira, A.M., Américo, M.A., Fracalanzza, S.E., Dos Santos Silva Couceiro, J.N., e Sá Figueiredo, A.M. (2013). Impact of *agr* dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) variant of the lineage ST1-SCC*mec* IV. BMC Microbiol. 13, 1-12.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H., e O'Gara, J.P. (2005). Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 43, 1973-1976.

Flemming, H.C., e Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623-633.

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

Frank, K. L., e Patel, R. (2007). Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. Infect. Immun. 75, 4728–4742.

Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D., e Simon, J.C. (2011). Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. Biomaterials 32, 6692-6709.

García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, W., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L.R., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., e Holmes, M.A. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mec*A homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect. Dis. 11, 595-603.

Geoghegan, J.A., Corrigan, R.M., Gruszka, D.T., Speziale, P., O'Gara, J.P., Potts, J.R., e Foster, T.J. (2010). Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 192, 5663-5673.

Gilot, P., Lina, G., Cochard, T., e Poutrel, B. (2002). Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. J. Clin. Microbiol. 40, 4060-4067.

Goering, R.V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infect Genet. Evol. 10, 866-875.

Gordon, R.J., e Lowy, F.D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. CDI 46, 350-359.

Gorwitz, R.J., Kruszon-Moran, D., McAllister, S.K., McQuillan, G., McDougal, L.K., Fosheim, G.E., Jensen B.J., Killgore, G., Tenover, F.C., e Kuehnert, M.J. (2008). Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. J Infect Dis. 197, 1226-1234.

Guimarães, L.C. (2018). Adesão e formação de biofilme por linhagens brasileiras de *Staphylococcus aureus* isoladas de hospitais do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências - Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, f: 107.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., e Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2, 95-108.

Hiramatsu, K., Hanakia, H., Inob, T., Yabutab, K., Oguric, T., e Tenover, F.C. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother 40, 135-136.

Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., Takeuchi, F., Morimoto, Y., Katayama, Y., Matsuo, M., Kuwahara-Arai, K., Hishinuma, T., e Baba, T. (2013). Genomic basis for methicillin resistance in S*taphylococcus aureus*. Infect. Chemother. 45, 117-136.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., e Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int. J. Antimicrob. Agents 35, 322-332.

Holtfreter, S., Grumann, D., Schmudde, M., Nguyen, H.T., Eichler, P., Strommenger, B., Kopron, K., Kolata, J., Giedrys-Kalemba, S., Steinmetz, I., Witte, W., e Bröker, B.M. (2007). Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. 45, 2669-2680.

Hu, W., Li, L., Sharma, S., Wang, J., McHardy, I., Lux, R., Yang, Z., He, X., Gimzewski, J.K., Li, Y., e Shi, W. (2012). DNA builds and strengthens the extracellular matrix in *Myxococcus xanthus* biofilms by interacting with exopolysaccharides. PLoS One. 7, e51905.

Ikonomidis, A., Vasdeki, A., Kristo, I., Maniatis, A.N., Tsakris, A., Malizos, K.N., e Pournaras, S. (2009). Association of biofilm formation and methicillin-resistance with accessory gene regulator (*agr*) loci in Greek *Staphylococcus aureus* clones. Microb Pathog. 47, 341-344.

Ito, T., Katayama,Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., e Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1323-1336.

Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S., e Oono, T. (2006). Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. J. Dermatol. Sci. 42, 203-214.

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

Jakubovics, N.S., Shields, R.C., Rajarajan, N., e Burgess, J.G. (2013). Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. Lett Appl Microbiol. 57, 467-475.

Janzon, L., e Arvidson, S. (1990). The role of the δ-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. EMBO J. 9, 1391-1399.

Jevons, M.P. (1961). “Celbenin”-resistant staphylococci. Br. Med. J. 1, 124– 125.

Ji, G., Beavis, R., e Novick, R.P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. Science 276, 2027-2030.

Jiang, B., Yin, S., You, B., Gong, Y., Huang, G., Yang, Z., Zhang, Y., Chen, Y., Chen, J., Yuan, Z., Hu, X., e Peng, Y. (2018). Antimicrobial resistance and virulence genes profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a burn center: A 5-year study. Microb Pathog. 114, 176-179.

Kaito, C., Saito, Y., Ikuo, M., Omae, Y., Mao, H., Nagano, G., Fujiyuki, T., Numata, S., Han, X., Obata, K., Hasegawa, S., Yamaguchi, H., Inokuchi, K., Ito, T., Hiramatsu, K., e Sekimizu, K. (2013). Mobile genetic element SCC*mec*-encoded *psm-mec* RNA suppresses translation of *agr*A and attenuates MRSA virulence. PLoS Pathog. 9, e1003269.

Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W., e Horswill, A.R. (2012). Low levels of β-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. MBio. 3, e00198-12.

Kaplan, J.B., LoVetri, K., Cardona, S.T., Madhyastha, S., Sadovskaya, I., Jabbouri, S., e Izano, E.A. (2012). Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. J Antibiot (Tokyo) 65, 73-77.

Katayama, Y., Ito, T., e Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1549-1555.

Kawamura, H., Nishi, J., Imuta, N., Tokuda, K., Miyanohara, H., Hashiguchi, T., Zenmyo, M., Yamamoto, T., Ijiri, K., Kawano, Y., e Komiya, S. (2011). Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 63, 10-15.

Keynan, Y., e Rubinstein, E. (2013). *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. Crit Care Clin 29, 547-562.

Khoramrooz, S.S., Mansouri, F., Marashifard, M., Malek Hosseini, S.A., Akbarian Chenarestane-Olia, F., Ganavehei, B., Gharibpour, F., Shahbazi, A., Mirzaii, M., e Darban-Sarokhalil, D. (2016). Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. Microb Pathog. 97, 45-51.

King, J.M., Kulhankova, K., Stach, C.S., Vu, B.G., e Salgado-Pabón, W. (2016). Phenotypes and virulence among *Staphylococcus aureus* USA100, USA200, USA300, USA400, and USA600 clonal lineages. mSphere 1, e00071-16.

Kloos, W.E., e Bannerman, T.L. (1999). *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology. 7. ed. (Washington: ASM Press.), pp. 264-282.

Le, K.Y., Dastgheyb, S., Ho, T.V., e Otto, M. (2014). Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. Front Cell Infect Microbiol. 4, 167.

Le, K.Y., e Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. Front. Microbiol. 6, 1174.

Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., e Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat. Rev. Dis. Primers 4, 1-23.

Li, M., Diep, B.A., Villaruz, A.E., Braughton, K.R., Jiang, X., DeLeo, F.R., Chambers, H.F., Lu, Y., e Otto M. (2009). Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 5883-5888.

Lim, Y., Shin, H.J., Kwon, A.S., Reu, J.H., Park, G., e Kim, J. (2013). Predictive genetic risk markers for strong biofilm-forming *Staphylococcus aureus*: *fnb*B gene and SCC*mec* type III. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 76, 539-541.

Lister, J.L., e Horswill, A.R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4, 178.

Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339, 520-532.

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

Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., e Hiramatsu, K. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 1147-1152.

MacFaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3. ed. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).

Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., e Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bacteriol. 178, 175-183.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., e Stahl, D.A. (2016). Microbiologia diagnóstica. In: Microbiologia de Brock. 14. ed. (Porto Alegre: ArtMed), pp. 794-797.

Martín-López, J.V., Pérez-Roth, E., Claverie-Martín, F., Díez Gil, O., Batista, N., Morales, M., e Méndez-Álvarez, S. (2002). Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for biofilm establishment. J. Clin. Microbiol. 40, 1569-1570.

Matos, P.D.M. (2013). Caracterização da resistência antimicrobiana e da virulência em amostras de *Staphylococcus aureus* portadoras do SCC*mec* IV de diferentes linhagens isoladas de hospitais do Rio de Janeiro. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências - Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, f: 99-135.

McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., e O'Gara, J.P.. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 5, 1.

McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., e Tenover, F.C. (2003). Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J. Clin. Microbiol. 41, 5113-5120.

Monecke, S., Lüdicke, C., Slickers, P., e Ehricht, R. (2009). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 28, 1159-1165.

Monecke, S., Coombs, G., Shore, A.C., Coleman, D.C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F.G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., Tan, H.L., Weber, S., e Ehricht, R. (2011). A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 6, e17936.

Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., e Bayles, K.W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. MBio. 5, e01341-14.

Muñoz, P., Hortal, J., Giannella, M., Barrio, J.M., Rodríguez-Créixems, M., Pérez, M.J., Rincón, C., e Bouza, E. (2008). Nasal carriage of *S. aureus* increases the risk of surgical site infection after major heart surgery. J Hosp Infect. 68, 25-31.

Novick, R. (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. Virology 33, 155-166.

Novick, R.P., e Muir, T.W. (1999). Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram positive bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 2, 40-45.

Novick, R.P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol. Microbiol. 48, 1429–1449.

Novick, R.P., e Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. Annu. Rev. Genet. 42, 541-564.

Okshevsky, M., e Meyer, R.L. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. Crit Rev Microbiol. 41, 341-352.

Okshevsky, M., Regina, V.R., e Meyer, R.L. (2015). Extracellular DNA as a target for biofilm control. Curr Opin Biotechnol. 33, 73-80.

Okuma, K., Iwakawa, K., Turnidge, J.D., Grubb, W.B., Bell, J.M., O'Brien, F.G., Coombs, G.W., Pearman, J.W., Tenover, F.C., Kapi, M., Tiensasitorn, C., Ito, T., e Hiramatsu, K. (2002). Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J. Clin. Microbiol. 40, 4289-4294.

Oliveira, D.C., Wu, S.W., e de Lencastre H. (2000). Genetic organization of the downstream region of the *mec*A element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1906-1910.

Oliveira, D., Borges, A., e Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. Toxins 10, 1-19.

O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A., e O'Gara, J.P. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. J. Clin. Microbiol. 45, 1379-1388.

Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322, 207-228.

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annu. Rev. Med. 64, 175-188.

Otto, M. (2018). Staphylococcal Biofilms. Microbiol Spectr. 6, 1-17.

Paharik, A.E., e Horswill, A.R. (2016). The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. Microbiol Spectr. 4, 1-27.

Papakyriacou, H., Vaz, D., Simor, A., Louie, M., e McGavin, M.J. (2000). Molecular analysis of the accessory gene regulator (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 181, 990-1000.

Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., e Höök, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu. Rev. Microbiol. 48, 585- 617.

Pereira, E.M., Teixeira, C.A.A., Alvarenga, A.L.M., Schuenck, R.P., Giambiagi-Demarval, M., Holandino, C., Mattos-Guaraldi, A.L., e Santos, K.R.N. (2012). A Brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere and invade lung epithelial cells. J. Med. Microbiol. 61, 463-469.

Pérez-Montarelo, D., Viedma, E., Murcia, M., Muñoz-Gallego, I., Larrosa, N., Brañas, P., Fernández-Hidalgo, N., Gavaldà, J., Almirante, B., e Chaves, F. (2017). Pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* endovascular infection isolates from different clonal complexes. Front. Microbiol. 8, 917.

Potel, C., Álvarez, M., Álvarez, P., Otero, I., e Fluiters, E. (2007). Evolution, antimicrobial susceptibility and assignment to international clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated over a 9-year period in two Spanish hospitals. Clin. Microbiol. Infect. 13, 728-730.

Pozzi, C., Waters, E.M., Rudkin, J.K., Schaeffer, C.R., Lohan, A.J., Tong, P., Loftus, B.J., Pier, G.B., Fey, P.D., Massey, R.C., e O'Gara, J.P. (2012). Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. PLoS Pathog. 8, e1002626.

Puah, S.M., Tan, J.A.M.A., Chew, C.H., e Chua, K.H. (2018). Diverse Profiles of Biofilm and Adhesion Genes in *Staphylococcus aureus* Food Strains Isolated from Sushi and Sashimi. J Food Sci. 83, 2337-2342.

Rammelkamp, C. H., e Maxon, T. (1942). Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. Exp Biol Med 51, 386-389.

Rasmussen, G., Monecke, S., Ehricht, R., e Söderquist, B. (2013). Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive *Staphylococcus aureus* isolates in Sweden. PLoS One 10: e77477.

Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis. 197, 1079-1081.

Roberts, R.B., de Lencastre, A., Eisner, W., Severina, E.P., Shopsin, B., Kreiswirth, B.N., Tomasz, A. (1998). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. J. Infect Dis. 178, 164-171.

Roche, F.M., Massey, R., Peacock, S.J., Day, N.P.J., Visai, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M., e Foster, T.J. (2003). Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. Microbiology 149, 643-654.

Rupp, M.E., e Fey, P.D. (2000). *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococci*. In: Principles and practice of infectious diseases. 8. ed. (New York: Elsevier Saunders), pp. 2272-2282.

Ryan, K.J. (2004). Staphylococci. In: Sherris Medical Microbiology. 4. ed. (New York: McGraw-Hill).

Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J.L., Rolain, J.M., e Blin, O. (2018). *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. Front Microbiol. 9, 1-15.

Sambrock, J., Fritsch, E.F., e Maniatis, T. (1989). Extaction and purification of plasmid DNA. In: Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Apêndice A5.

Santajit, S., e Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Biomed Res Int. 2016, 2475067.

Schweizer, M.L., Furuno, J.P., Sakoulas, G., Johnson, J.K., Harris, A.D., Shardell, M.D., McGregor, J.C., Thom, K.A., e Perencevich, E.N. (2011). Increased mortality with accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. Antimicrob Agents Chemother. 55, 1082-1087.

Singer-Sam, J., Tanguay, R.L., e Riggs, A.D. (1989). Use of chelex to improve PCR signal from a small number of cells. Amplifications 3, 11.

Singh, R., Ray, P., Das, A., e Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Antimicrob Chemother. 65, 1955-1958.

Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T.J., e Geoghegan, J.A. (2014). Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. Front Cell Infect Microbiol. 4, 171.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., e 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, 891–899.

Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., e Mizunoe, Y. (2018). Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and-sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. Sci Rep. 8, 2254.
Tan, L., Li, S.R., Jiang, B., Hu, X.M., e Li, S. (2018). Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system. Front Microbiol. 9, 55.

Tang, J., Chen, J., Li, H., Zeng, P., e Li, J. (2013). Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different sources. Foodborne Pathog Dis. 10, 757-763.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., e Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239.

Tenover, F.C., McAllister, S., Fosheim, G., McDougal, L.K., Carey, R.B., Limbago, B., Lonsway, D., Patel, J.B., Kuehnert, M.J., e Gorwitz, R. (2008). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. J. Clin. Microbiol. 46, 2837-2841.

Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., Flack, C.E., e Horswill, A.R. (2011). Peptide signaling in the staphylococci. Chem. Rev. 111, 117-151.

Thurlow, L.R., Hanke, M.L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S.H., Engebretsen, I.L., Bayles, K.W., Horswill, A.R., e Kielian, T. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. J Immunol. 186, 6585-6586.

Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., e Fowler, V.G. Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin. Microbiol. Rev. 28, 603-661.

Torlak, E., Korkut, E., Uncu, A.T., e Şener, Y. (2017). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from a dental clinic in Konya, Turkey. J Infect Public Health. 10, 809-813.

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Baba, T., e Hiramatsu, K. (2010). Staphylococcal cassette chromosome *mec*-like element in *Macrococcus caseolyticus*. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 1469-1475.

Uhlén, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L., e Lindberg, M. (1984). Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. J. Biol. Chem. 259, 1695-1702.

Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., e Struelens, M. (2009). Guidelines for the validation and application of typing methodos for use in bacterial epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13, 1-46.

Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E., e Etienne, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg. Infect. Dis. 9, 978-984.

Vanhommerig, E., Moons, P., Pirici, D., Lammens, C., Hernalsteens, J.P., de Greve, H., Kumar-Singh, S., Goossens, H., e Malhotra-Kumar, S. (2014). Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 9, e104561.

Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G., e Yarlagadda, P.K. (2014). Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. Proc. Inst. Mech. Eng. H. 228, 1083-1099.

Velazquez-Meza, M.E., Aires de Sousa, M., Echaniz-Aviles, G., Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, G., Silva-Sanchez, J., e de Lencastre, H. (2004). Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. J. Clin. Microbiol. 42, 3877-3880.

Vivoni, A.M., Diep, B.A., de Gouveia Magalhães, A.C., Santos, K.R.N., Riley, L.W., Sensabaugh, G.F., e Moreira, B.M. (2006). Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. J. Clin. Microbiol. 44, 1686-1691.

Vuong, C., Saenz, H.L., Götz, F., e Otto, M. (2000). Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 182, 1688-1693.

Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A.B., e Otto, M. (2004). Increased colonization of indwelling medical devices by *quorum-sensing* mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. J Infect Dis. 190, 1498-1505.

Walsh, P.S., Metzger, D.A., e Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10, 506-513.

Wang, X., Li, X., Liu, W., Huang, W., Fu, Q., e Li, M. (2016). Molecular characteristic and virulence gene profiles of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients in Shanghai, China. Front Microbiol. 7, 1818.

Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., e Nouwen, J.L. (2005). Lancet Infect Dis. 5, 751-762.

WHO, World Health Organization. (2014). Health care-associated infections Fact Sheet. Disponível em: http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf. Acesso em: 15/06/2018.

Wu, Z., Li, F., Liu, D., Xue, H., e Zhao, X. (2015). Novel type XII staphylococcal cassette chromosome *mec* harboring a new cassette chromosome recombinase, *ccr*C2. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 7597-7601.

Zapotoczna, M., O'Neill, E., e O'Gara, J.P. (2016). Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. PLoS Pathog. 12, e1005671.

Zautner, A.E., Krause, M., Stropahl, G., Holtfreter, S., Frickmann, H., Maletzki, C., Kreikemeyer, B., Pau, H.W., e Podbielski, A. (2010). Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. PLoS One. 5, e9452.

Zecconi, A., e Scali, F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunol. Lett. 150, 12-22.

ANEXO

Tabela 9. Características gerais e resultados obtidos para 63 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina da linhagem USA100/ST5/SCC*mec* II utilizadas neste estudo.

Amostra	Linhagem (ST-SCC*mec*)	Biofilme	Média DO final ± desvio padrão	Fibrinogênio ± desvio padrão	Composição	δ-hemolisina	*agr*	*ica*A	*sas*G
554a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,655 ±0,134	ND	ND	+	II	+	+
555a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,963 ±0,053	ND	ND	+	II	+	+
557a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,850 ±0,131	ND	ND	+	II	+	+
572a	USA100 (ST5-II)	Fraco	0,581 ±0,035	ND	ND	-	II	+	+
618a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,538 ±0,251	ND	ND	-	II	+	+
649a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,816 ±0,110	ND	ND	+	II	+	+
655a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,835 ±0,192	ND	ND	+	II	+	+
659a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,363 ±0,605	ND	ND	+	II	+	+
663a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,982 ±0,111	ND	ND	+	II	+	+
670a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,767 ±0,186	ND	ND	+	II	+	+
758a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,850 ±0,123	ND	ND	+	II	+	+
881a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,165 ±0,132	ND	ND	+	II	+	+
913a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,005 ±0,080	ND	ND	+	II	+	+
1087a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,873 ±0,228	ND	ND	+	II	+	+
1223a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,809 ±0,046	ND	ND	+	II	+	+
1224a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,814 ±0,084	ND	ND	+	II	+	+
1238a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,212 ±0,085	ND	ND	+	II	+	+
1240a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,712 ±0,116	ND	ND	+	II	+	+
1255a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,873 ±0,096	1,142 ±0,066	ND	-	II	+	+
1258a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,006 ±0,076	ND	ND	+	II	+	+
1260a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,360 ±0,302	ND	ND	-	II	+	+
1263a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,856 ±0,257	ND	ND	-	II	+	+
1265a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,148 ±0,025	ND	ND	+	II	+	+
1266a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,998 ±0,066	ND	ND	+	II	+	+

Amostra	Linhagem (ST-SCC*mec*)	Biofilme	Média DO final ± desvio padrão	Fibrinogênio ± desvio padrão	Composição	δ-hemolisina	*agr*	*ica*A	*sas*G
1275a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,027 ±0,259	ND	ND	+	II	+	+
1276a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,057 ±0,188	ND	ND	+	II	+	+
1284a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,626 ±0,154	ND	ND	+	II	+	+
1285a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,600 ±0,181	ND	ND	+	II	+	+
1288a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,032 ±0,086	ND	ND	+	II	+	+
1289a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,827 ±0,237	ND	ND	+	II	+	+
1290a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,509 ±0,263	ND	ND	-	II	+	+
1291a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,162 ±0,256	ND	ND	+	II	+	+
1301a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,358 ±0,114	ND	Proteico com DNA extracelular	+	II	+	+
1305a	USA100 (ST5-II)	Não produtor	0,274 ±0,064	ND	ND	+	II	+	+
1308a	USA100 (ST5-II)	Não produtor	0,272 ±0,044	ND	ND	+	II	+	+
1309a	USA100 (ST5-II)	Não produtor	0,238 ±0,101	ND	ND	+	II	+	+
1579a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,916 ±0,082	0,864 ±0,063	ND	+	II	+	+
1582a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,741 ±0,033	ND	ND	-	II	+	+
1587a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,737 ±0,016	ND	ND	-	II	+	+
1591a	USA100 (ST5-II)	Não produtor	0,162 ±0,069	ND	ND	+	II	+	+
1592a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,657 ±0,094	0,945 ±0,174	ND	+	II	+	+
1594a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,873 ±0,070	ND	ND	+	II	+	+
1601a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,898 ±0,246	ND	ND	-	II	+	+
1606a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,996 ±0,328	ND	ND	-	II	+	+
1615a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,146 ±0,291	ND	ND	-	II	+	+
1616a	USA100 (ST5-II)	Fraco	0,423 ±0,054	ND	ND	-	II	+	+
1621a	USA100 (ST5-II)	Não produtor	0,205 ±0,066	ND	ND	-	II	+	+
1626a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,601 ±0,245	ND	ND	-	II	+	+
1628a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,928 ±0,034	ND	ND	-	II	+	+
1653a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,698 ±0,128	ND	ND	+	II	+	+
1655a	USA100 (ST5-II)	Fraco	0,556 ±0,088	1,028 ±0,105	ND	+	II	+	+
1658a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,723 ±0,039	ND	ND	-	II	+	+

Amostra	**Linhagem (ST-SCC*mec*)**	**Biofilme**	**Média DO final ± desvio padrão**	**Fibrinogênio ± desvio padrão**	**Composição**	**δ-hemolisina**	***agr***	***ica*A**	***sas*G**
1661a	USA100 (ST5-II)	Fraco	0,425 ±0,068	0,624 ±0,071	ND	-	II	+	+
1664a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,626 ±0,086	ND	ND	+	II	+	+
1728a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,274 ±0,518	ND	ND	-	II	+	+
1742a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,295 ±0,442	ND	ND	-	II	+	+
1758a	USA100 (ST5-II)	Moderado	1,093 ±0,130	ND	ND	+	II	+	+
1770a	USA100 (ST5-II)	Fraco	0,480 ±0,094	0,558 ±0,044	ND	-	II	+	+
1776a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,745 ±0,939	ND	ND	+	II	+	+
1810a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,618 ±0,126	ND	ND	-	II	+	+
1840a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,904 ±0,277	ND	ND	+	II	+	+
1844a	USA100 (ST5-II)	Moderado	0,655 ±0,009	ND	ND	-	II	+	+
1856a	USA100 (ST5-II)	Forte	1,540 ±0,725	ND	ND	+	II	+	+

DO - Densidade óptica; ND - Não determinado.