

**QUEZIA ROSEANE CÉSAR**

**Análise da modulação antimicrobiana na expressão do  
biofilme produzido por amostras de *Staphylococcus aureus*  
carreadoras da leucocidina de Panton-Valentine  
de diferentes linhagens clonais**



**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/2016**

**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 Raiane Cardoso Chamon.**

**FICHA CATALOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

C421a César, Quezia Roseane  
Análise da modulação antimicrobiana na expressão do biofilme produzido por amostras de *Staphylococcus aureus* carreadoras da leucocidina de Panton-Valentine de diferentes linhagens clonais / Quezia Roseane César. -- Rio de Janeiro, 2016.  
68 f.

Orientador: Kátia Regina Netto dos Santos.  
Coorientador: Raiane Cardoso Chamon.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Biofilmes. 3. Antimicrobianos. 4. Fatores de virulência. I. Santos, Kátia Regina Netto dos, orient. II. Chamon, Raiane Cardoso, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Quezia Roseane César**

Análise da modulação antimicrobiana na expressão do biofilme produzido por amostras de *Staphylococcus aureus* carreadoras da leucocidina de Panton-Valentine de diferentes linhagens clonais

Rio de Janeiro, 15 de Dezembro de 2016

---

(Dra. Rosana Barreto Rocha Ferreira, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

(Dr. Felipe Lopes Teixeira, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

(Msc. Wesley de Paiva Santos, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

(Dra. Renata Martins do Souto, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

## Agradecimentos

*Foram diversas dificuldades, mas que agora ao olhar para trás consigo enxergar que cada momento vivido, sendo eles difíceis ou não, valeram a pena! Se valeram! Não só porque me ajudaram a crescer, mas porque me fizeram aprender muito além do que eu poderia imaginar.*

*Durante a graduação diversas vezes somos confrontados com nossas dúvidas sobre o futuro incerto e muitas vezes não conseguimos fechar os nossos olhos e nos ver como estamos aqui...agora... E diante de tantos desafios ao entrar na universidade, mudar de cidade, lidar com a distância, criar novos laços... É. Foi nesses momentos que pude enxergar além de mim e perceber que sem Deus, meu primeiro apoio durante toda a jornada, que me permitiu chegar até aqui e me sustentou todos os dias, sem sua permissão nada disso seria concluído e nem mesmo estaria aqui. Creio que foi sob sua direção que decidi que pelos próximos 4 anos cursaria Microbiologia e Imunologia, então a Ti sempre serei grata.*

*Sair de casa aos 18 anos não era bem o que havia planejado, mas na medida em que avaliei as oportunidades diante de mim tomei essa decisão e foi nessa ocasião também que percebi o quanto minha família é essencial para mim e que sempre querem meu melhor e por isso, me apoiaram sair de casa e me dar todo o suporte em tudo. Tudo mesmo! Pelas visitinhas que me fizeram muito feliz, muitas vezes, quando mais precisava, serei sempre grata a vocês mãe, pai e irmão.*

*Às minhas amigas de longe, mas sempre por perto Daniele, Patrícia, Raíssa e Yasmim que me fizeram mais forte a cada risada dividida ou com uma simples conversa sincera, meu profundo agradecimento. As minhas companheiras durante todo o percurso Luíza, Tamires e Scarlathe...bem o que falar de vocês? Com vocês dividi tantos momentos, mas mais valiosos foram os aprendizados. Apesar das nossas tantas diferenças, aprendi com a individualidade de cada uma. Desde companheirismo, amizade, compromisso quanto a superarmos as dificuldades juntas...E vencemos!!! E com certeza essa amizade será para vida!!!*

*À minha orientadora, Kátia e a cada um dos componentes do LIH, que me permitiram trabalhar lado a lado na bancada. Obrigada pelo apoio e pela oportunidade de consolidar meus conhecimentos além da sala de aula.*

*À minha coorientadora, Raiane ou simplesmente Rai, que me acolheu de uma maneira tão linda e tão na hora certa. Obrigada pela grande paciência com sua filha científica, pelos ensinamentos na bancada e para além da bancada, mais do que minha coorientadora se tornou minha amiga, obrigada por apostar em mim, dedicar tanto tempo me ajudando, corrigindo, ensinando e tudo isso sem deixar de lado seu coração, que é incrível. Sempre guardarei na memória. Muito obrigada!*

*À dona Yvone, tia Lídia e tia Luísa, que me acolheram em sua casa e me ofereceram o melhor que podiam, sou grata por entenderem meus objetivos de estar aqui e pude aprender muito sobre hospitalidade, generosidade, atenção e carinho pelo próximo observando vocês. Tenham certeza que levo vocês no meu coração e que pude aprender muito com vocês.*

*Àqueles que me ajudaram de tantas formas, seja com a minha mudança para o RJ e que sempre me perguntava 'E aí carioquinha?', rs, quanto aos demais amigos, irmãos da Igreja e*

*familiares, que certamente oraram por mim, com certeza Deus ouviu cada oração, meu muito obrigado*

*O que levo comigo desta jornada é muito maior do que qualquer tristeza e alegria que vivi, mas é o desenrolar de um futuro, que ainda é incerto, sim, mas com certeza não seria tão bom avançar o próximo capítulo da minha vida, se não houvesse essa história para contar.*

## RESUMO

QUEZIA ROSEANE CÉSAR

Análise da modulação antimicrobiana na expressão do biofilme produzido por amostras de *Staphylococcus aureus* carreadoras da leucocidina de Panton-Valentine de diferentes linhagens clonais

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* é um patógeno relacionado a infecções invasivas, as quais normalmente estão associadas a sua virulência. A leucocidina de Panton-Valentine (PVL) é uma leucotoxina formadora de poros que atua na membrana celular de células susceptíveis, enquanto o biofilme está associado com infecções persistentes e de difícil tratamento. Este estudo teve como objetivo avaliar a produção do biofilme em amostras de *S. aureus* carreadoras dos genes da PVL de diferentes linhagens clonais e avaliar a modulação antimicrobiana na sua formação, além de detectar genes associados à formação do biofilme. Foi utilizada uma coleção de 34 amostras, previamente caracterizadas quanto às linhagens clonais, sendo 18 amostras associadas à linhagem USA1100/CC30, cinco à linhagem USA400/CC1, duas à USA800/CC5 e nove relacionadas aos clones esporádicos, dentre eles, uma amostra USA300/CC8. As 34 amostras foram avaliadas quanto à produção do biofilme através do micrométodo quantitativo em meio TSB suplementado com 1% de glicose. Para a detecção dos genes *icaA* e *sasG* foi utilizada a técnica de PCR. Além disso, 20 das 34 amostras foram submetidas a diferentes concentrações de oxacilina e vancomicina, de acordo com a sua Concentração Mínima Inibitória (CMI), em TSB acrescido de 1% de glicose nas condições de  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 e 2 x a CMI durante a produção do biofilme e no biofilme pré-formado. Entre as 34 amostras de *S. aureus* a produção de biofilme foi diferenciada entre as diferentes linhagens, sendo 17 amostras classificadas como produtoras moderadas de biofilme, cinco amostras como fortes produtoras, sete como fracas e cinco não produtoras de biofilme. As amostras da linhagem USA400 apresentaram maior produção de biofilme. Apenas uma amostra foi negativa para o gene *icaA*. Dezenove amostras apresentaram-se positivas para ambos os genes *icaA* e *sasG*. Contudo, a presença dos genes não esteve relacionada com a formação do biofilme. De acordo com a modulação da produção do biofilme, de maneira geral, as diferentes concentrações de vancomicina não modularam a formação relativa do biofilme entre as amostras pertencentes às diferentes linhagens clonais. Contudo todas as amostras avaliadas, principalmente as relacionadas à linhagem USA1100, tiveram um aumento na formação relativa do biofilme em concentrações sub-inibitórias de oxacilina testadas, independente da resistência à esta droga, indicando modulação positiva deste antimicrobiano na produção de biofilme. A exposição a diferentes concentrações de oxacilina no biofilme pré-formado das amostras USA400 e USA1100 levou ao aumento na formação do mesmo. A formação de biofilme por amostras de *S. aureus* carreadoras dos genes da PVL que estão associadas com difícil tratamento poderia agravar o quadro clínico do paciente.

**Palavras-Chave:** *Staphylococcus aureus*; Biofilmes; Antimicrobianos; Fatores de virulência.

**ABSTRACT**

QUEZIA ROSEANE CÉSAR

Analysis of antimicrobial modulation in biofilm expression produced by Panton-Valentine leukocidin bearing *Staphylococcus aureus* samples from different clonal lineages

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

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

*Staphylococcus aureus* is a pathogen related to invasive infections, which are usually associated with its virulence. The Panton-Valentine leukocidin (PVL) is a pore-forming leukotoxin that acts on the cell membrane of susceptible cells, while the biofilm formation is associated with persistent and difficult-to-treat infections. The objective of this study was to evaluate the biofilm production in samples of *S. aureus* carrying the genes of the PVL and of different clonal lineages and to evaluate the antimicrobial modulation in its formation, besides detecting associated genes. A collection of 34 previously characterized clonal lineages was used, 18 samples associated with the USA1100 / CC30 lineage, five to the USA400/CC1 clone, two to USA800/CC5 and nine were related to sporadic clones, being among them, an USA300/CC8 isolate. All 34 isolates were characterized as the biofilm production through the quantitative micro-method in TSB medium supplemented with 1% glucose. For the detection of *icaA* and *sasG* genes the PCR technique was used. In addition, 20 of the 34 samples were submitted to different concentrations of oxacillin and vancomycin according to their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in TSB with 1% glucose under the conditions of  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 and 2 x the MIC during the biofilm production and in the preformed biofilm. Among the 34 *S. aureus* isolates, the biofilm production was differentiated among the different strains, with 17 isolates classified as moderate biofilm producers, 5 as strong producers, seven as weak producers and five as non – producers of biofilm. Isolates belonging to the USA400/CC1 lineage presented higher biofilm production. Only one sample was negative for the *icaA* gene. Nineteen isolates were positive for both *icaA* and *sasG* genes. However, the presence of the genes was not related to the biofilm formation. According to the modulation of the biofilm production, in general, different concentrations of vancomycin did not modulate the relative formation of the biofilm between the samples belonging to the different clonal lineages. However, all samples evaluated, especially those related to the USA1100 lineage, had an increase in the relative formation of the biofilm at oxacillin subinhibitory concentrations tested, independent of the resistance to this drug, indicating positive modulation of this antimicrobial in biofilm production. In addition, exposure to different concentrations of oxacillin in the preformed biofilm of USA400 and USA1100 isolates led to increased formation of the biofilm. The formation of biofilm by isolates of *S. aureus pvl* + that are normally associated with difficult treatment could worsen the clinical picture of the patient.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; Biofilms; Antimicrobials; Virulence Factors



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	Coleção de cultura tipo americana ( <i>American Type Culture Collection</i> )
CC	Complexo Clonal
CLSI	Instituto de normativas para laboratório clínico ( <i>Clinical Laboratory Standard Institute</i> )
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DO	Densidade Óptica
DOC	Densidade Óptica "cut-off"
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxiribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido atilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
hVISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com heterorresistência à vancomicina ( <i>Heteroresistant Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus</i> )
MEC	Matriz Extracelular
MLST	Sequencia Tipo multilocus ( <i>Multilocus Sequence Typing</i> )
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina ( <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
MSCRAMMs	Componentes da superfície microbiana reconhecedores de moléculas adesivas da matriz extracelular ( <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i> )
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina ( <i>Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus</i> )
LPNS	Lista de nomes procarióticos com nomenclatura convencionada ( <i>List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature</i> )
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina ( <i>Penicillin Binding Proteins</i> )
PBS	Salina tamponada com fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> )
PIA	Adesina Intercelular Polissacarídica ( <i>Polisaccharidic intracellular adhesine</i> )
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares ( <i>Polymorphonuclear leukocytes</i> )

PVL	Leucocidina de Panton-Valentine ( <i>Panton-Valentine Leukocidin</i> )
SCC <sub>mec</sub>	Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> ( <i>Staphylococcal Cassete Chromosome mec</i> )
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativos
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivos
ST	Sequência tipo ( <i>Sequence Type</i> )
Sub-CMI	Concentrações Mínimas Sub-Inibitórias
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tris/EDTA
TSA	Ágar tripticaseína de soja ( <i>Trypticase Soy Agar</i> )
TSB	Caldo tripticaseína de soja ( <i>Trypticase Soy Broth</i> )
TSST-1	Toxina-1 do Choque Tóxico Estafilocócico ( <i>Toxic shock syndrome toxin 1</i> )
U	Unidade internacional
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à Vancomicina ( <i>Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus</i> )
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina ( <i>Vancomycin Resistant Enterococcus</i> )
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina ( <i>Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus</i> )

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. <i>Staphylococcus</i> .....	1
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
1.3. Resistência a antimicrobianos .....	3
1.4. Virulência .....	5
1.5. Papel de antimicrobianos na modulação da expressão de fatores de virulência .....	11
1.6. Epidemiologia das infecções por <i>S. aureus</i> .....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b> .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
4.1. Desenho do estudo e fluxograma da metodologia utilizada .....	17
4.2. Produção de biofilme por amostras de <i>S. aureus</i> em placa de microtitulação .....	19
4.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória em TSB suplementado com 1% de glicose .....	21
4.4. Estudo da modulação antimicrobiana na formação do biofilme e no biofilme pré-formado .....	23
4.5. Avaliação da presença de genes de virulência relacionados ao biofilme .....	25
4.6. Análise estatística .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	27
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48
<b>ANEXO 1</b> .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por 50 espécies e 26 subespécies da família *Staphylococcaceae* (LPSN, 2016). Membros do gênero são classificados como cocos gram-positivos, com diâmetro variando de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , apresentando-se isoladamente, aos pares, em tétrades, em pequenas cadeias (3 ou 4 células) ou em arranjos irregulares, na forma de cachos. Esses microrganismos são imóveis, apresentam em seu genoma baixo conteúdo G+C, não formam esporos e são resistentes a 0,04 U de bacitracina. São anaeróbios facultativos e capazes de crescer em até 10% de NaCl, e sua temperatura ótima de crescimento é 35°C. Suas colônias são geralmente opacas ou podem ter tonalidade branca a creme e, algumas vezes, podem variar de amarelo à laranja, quando crescidos em ágar contendo sangue de carneiro. Normalmente produzem a enzima catalase, com exceção de *Staphylococcus saccharolyticus* e *S. aureus* subespécie *anaerobius*. A enzima em questão promove a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, podendo ser usada em testes laboratoriais para diferenciá-los de outros cocos gram-positivos, como *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (Ryan, 2004; Bannerman e Peacock, 2007). Baseado na capacidade de coagular o plasma, por meio da ação de uma proteína extracelular denominada coagulase, capaz de converter fibrinogênio sanguíneo em fibrina, as espécies do gênero se dividem em dois grandes grupos: *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) (Archer, 2000; Brooks *et al.*, 2012).

Apesar de serem descritos como membros da microbiota humana, os SCN são importantes patógenos oportunistas, sendo frequentemente isolados de hemoculturas (Rahman *et al.*, 2013). Os SCN, apesar de serem considerados menos virulentos do que os SCP como o *S. aureus*, estão geralmente envolvidos em infecções causadas pelo uso de cateteres e outros dispositivos médicos como válvulas cardíacas e próteses articulares, e também associados a intervenções realizadas em pacientes imunocomprometidos (Bannerman e Peacock, 2007; Faria *et al.*, 2014), podendo causar infecções graves como endocardites e septicemia em indivíduos susceptíveis.

## 1.2. *Staphylococcus aureus*

A espécie *S. aureus* apresenta um genoma de cerca de três milhões de pares de bases (Holden *et al.*, 2004) e está incluída no grupo dos *Staphylococcus* coagulase positivos. Aproximadamente 97% das amostras produz também o fator *clumping*, uma adesina da parede celular bacteriana capaz de se ligar ao fibrinogênio, provocando a formação de agregados celulares. As colônias de *S. aureus* são relativamente grandes, de coloração amarelo-dourada e a  $\beta$ -hemólise pode ser frequentemente observada quando a bactéria é crescida por 24 a 48 h em ágar com sangue desfibrinado de carneiro, a 35° C (Becker, Skov e Von Eiff, 2015).

*S. aureus* é uma das espécies mais encontradas na microbiota de pele humana e mucosas, principalmente nas narinas (Obadia *et al.*, 2015). Entretanto, é um agente patogênico de grande relevância clínica apresentando altos índices de mortalidade e morbidade (Otto, 2014a). De maneira geral, a infecção por *S. aureus* ocorre quando há uma quebra na barreira cutâneo-mucosa, com o subsequente acesso deste patógeno aos tecidos adjacentes e/ou à corrente sanguínea (Iwatsuki *et al.*, 2006). Assim, o patógeno pode causar desde enfermidades superficiais, como celulite, impetigo e abscesso cutâneo até infecções invasivas, como pneumonia, meningite, endocardite e sepse (Casey, Lambert e Elliot 2007; Kubica *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2012; Buetti *et al.*, 2016). Infecções de ossos e articulações, como osteomielite aguda e vertebral, também são comumente causadas por *S. aureus* (Casey *et al.*, 2007; Damasco *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2016), assim como infecções cutâneas como a fasciite necrosante (Cooke Brown, 2010). Além disso, *S. aureus* pode causar determinadas síndromes a partir da produção de toxinas, como as Síndromes do Choque Tóxico e da Pele Escaldada, além de intoxicações alimentares (Murray *et al.*, 2006).

O sucesso de *S. aureus* como patógeno se deve a três características principais: sua capacidade de colonização assintomática, a produção de um amplo repertório de fatores de virulência, que incluem a formação de biofilme e a multirresistência aos antimicrobianos apresentada por grande parte das amostras (Gordon e Lowy, 2008; Schlievert *et al.*, 2010).

### 1.3. Resistência a antimicrobianos

#### 1.3.1. Resistência à oxacilina

A descoberta e introdução da penicilina, a partir da década de 1940, marcou o início da utilização de antimicrobianos no combate às infecções bacterianas. Como mecanismo de ação, a penicilina interfere na síntese da parede celular bacteriana, através da sua ligação à enzimas transpeptidases, denominadas Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP). No final da década de 1950 foram desenvolvidas penicilinas semissintéticas resistentes às  $\beta$ -lactamases, como a meticilina, a oxacilina e a nafcilina, com fins terapêuticos para o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes à penicilina. Porém, após um ano da introdução das penicilinas semissintéticas, foi isolada na Inglaterra, em 1960, a primeira amostra resistente à oxacilina/meticilina, sendo então classificada como *S. aureus* resistente à oxacilina/meticilina (MRSA, do inglês *methicillin-resistant S. aureus*) (Jevons, 1961 apud Crum *et al.*, 2006).

O gene *mecA*, presente em amostras MRSA, codifica a PBP alterada, denominada PBP2a, de 78 kDa, que apresenta baixa afinidade pela penicilina e por  $\beta$ -lactâmicos em geral. Portanto, a proteína permanece capaz de manter a atividade de transpeptidase, necessária à formação de ligações cruzadas na parede celular bacteriana (Chambers, 1993). O gene *mecA* encontra-se em um elemento genético móvel inserido no cromossomo bacteriano, conhecido como cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*) e é altamente conservado entre as linhagens de *S. aureus* (Katayama, Ito e Hiramatsu, 2000).

O SCC*mec* pode apresentar diferentes tamanhos, que variam de 20 a 68 kb e é caracterizado pela presença de dois complexos gênicos: *ccr* e *mec*. O complexo *ccr* contém genes que codificam para recombinases da família invertase/resolvase, responsáveis pela mobilidade do cassete. O complexo *mec* é caracterizado pela presença do gene *mecA*, por terminais invertidos, reconhecidos pelas recombinases, além dos genes *mecI* e *mecR1*, reguladores da transcrição deste gene (Hiramatsu *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2004; Chambers e De Leo, 2009).

Segundo dados do *International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements* (IWG-SCC, 2016), já foram descritos 11 tipos de SCC*mec* apresentando combinações diferentes de seis classes do complexo do gene *mec* (A, B, C1, C2, D, E) e oito tipos de complexo *ccr*. Os SCC*mec* tipos I, II, III, VI e VIII normalmente estão associados a amostras de origem hospitalar ou IRAS (Infecções

Relacionadas à Assistência à Saúde), enquanto amostras que apresentam o SCC $mec$  dos tipos IV, V e VII são, geralmente, de origem comunitária (Ito *et al.*, 2001; Oliveira, Milheiriço e De Lencastre, 2006; Christianoson *et al.*, 2007; Deurenberg e Stobberingh, 2009). Já os SCC $mec$  tipos IX e X foram identificados no Japão e, assim como o tipo XI, foram descritos em 2011 em algumas estirpes comunitárias (Li *et al.*, 2011). Este último tipo de SCC $mec$  contém o gene *mecC* e foi identificado em amostras de rebanho e humanos cuidadores destes animais, sendo sugerido por alguns autores que haja a ocorrência de transmissão cruzada destas amostras entre estes indivíduos (Garcia-Álvarez, *et al.*, 2011; Sabat *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 2013; Vandendriessche *et al.*, 2013). Tal SCC $mec$  foi primeiramente identificado no Reino Unido, Dinamarca e Irlanda (Shore *et al.*, 2011). Em 2013, houve um relato de um caso fatal de infecção da corrente sanguínea (ICS) causada por MRSA carreador do gene *mecC* na Espanha (Garcia-Garrote *et al.*, 2013). Apesar disto, estes três últimos tipos de SCC $mec$  ainda permanecem raros e nunca foram identificados no Brasil.

### 1.3.2. Resistência à vancomicina

A vancomicina, descoberta em meados da década de 1950, é um glicopeptídeo que atua ligando-se fortemente ao terminal D-Ala-D-Ala dos precursores do peptideoglicano, impedindo a atuação das transpeptidases que sintetizam a parede celular do microrganismo (Reynolds, 1989). Apesar de apresentar uma série de desvantagens, como o espectro de atuação limitado a Gram-positivos, necessidade de administração parenteral, baixa perfusão tecidual e toxicidade renal, a vancomicina ainda é o antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções sistêmicas por amostras de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (Finch, 2006; Stevens, 2006; Smith *et al.*, 2009).

Até a década de 1970, o uso da vancomicina era bastante limitado, uma vez que a taxa de resistência aos antimicrobianos de primeira escolha ainda era muito baixa (Van Bameke *et al.*, 2004). Contudo, a crescente utilização dos glicopeptídeos levou ao isolamento da primeira amostra de *Enterococcus* resistente à vancomicina, no final da década de 1980 (Uttley *et al.*, 1989). *S. aureus* apresentando heterorresistência à vancomicina (hVISA) e resistência intermediária à vancomicina (VISA) foram primeiramente isolados no Japão em 1996 (Hiramatsu *et al.*, 1997). Esse tipo de resistência, no entanto, é intermediária, ou seja, associada com alterações na fisiologia celular de *S. aureus* e diferente do mecanismo identificado em *Enterococcus*.

Recentemente, amostras VISA e hVISA foram isoladas de bacteremias de pacientes internados em um Hospital Universitário do Rio de Janeiro (da Costa *et al.*, 2016). A resistência intermediária consiste no acúmulo de precursores da parede celular, resultando em uma camada do peptidoglicano mais espessa, capaz de reter o antimicrobiano (Hiramatsu, 2001).

Em 2002, foram descritos os primeiros casos de infecções causadas por *S. aureus* plenamente resistentes à vancomicina (VRSA) nos Estados Unidos (CDC, 2002a; CDC, 2002b). Em 2012, Banarjee e Anupurba relataram dois casos de infecção por VRSA na Índia. No mesmo ano, o primeiro caso de uma amostra VRSA na América Latina foi reportado no Brasil, pelo laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (PAHO / WHO, 2013). Esse tipo de resistência é caracterizado pela aquisição do gene *vanA* proveniente de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) (Chang *et al.*, 2003). Esse gene dá origem a um precursor D-alanil-D-lactato que apresenta menor afinidade pela vancomicina, que não consegue, dessa forma, impedir a síntese da parede celular (Arthur e Courvalin, 1993). Na Europa, o primeiro caso de uma estirpe *S. aureus* apresentando resistência plena à vancomicina foi descrita em Portugal, onde o paciente apresentava co-infecção por *S. aureus* e *Enterococcus* e ambas as cepas apresentavam-se positivas para o gene *vanA* (Melo-Cristino *et al.*, 2013). A transferência plasmidial do gene *vanA* de *Enterococcus* para *Staphylococcus* parece ocorrer de forma consideravelmente lenta, porém o uso continuado de vancomicina pode acelerar a seleção de amostras resistentes (Courvalin, 2006).

Devido à emergência de cepas de *S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina, novos antibióticos, como a daptomicina (lipopeptídeo cíclico), a linezolida (oxazolidinona), a tigeciclina e a ceftarolina tem sido utilizados no tratamento de infecções causadas por cepas VRSA (Yu *et al.*, 2012).

#### **1.4. Virulência**

O arsenal de fatores de virulência de *S. aureus* é extenso e seu sucesso como patógeno tem sido atribuído a esta habilidade (Gordon e Lowy, 2008; Kubica *et al.*, 2008; Lambris, Ricklin e Geisbrecht, 2008; Zecconi e Scali, 2013). Para estabelecer a infecção, *S. aureus* possui um conjunto de proteínas de superfície denominadas de MSCRAMMs (do inglês *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) que são adesinas de superfície específicas que desencadeiam o início



da infecção no tecido do hospedeiro (Gordon e Lowy, 2008). Essas adesinas bacterianas reconhecem os componentes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro, tais como fibronectina (tecidual e sanguínea), laminina, colágeno, vitronectina, sialoproteína, elastina e trombospondina. A maioria das MSCRAMMs está ancorada covalentemente na peptidoglicana da parede celular bacteriana através de ligações de transpeptidação e, algumas delas, podem ser reconhecidas também como importantes invasinas, capazes de promover a entrada do patógeno em vários tecidos (Heilmann *et al.*, 2011). Além disso, praticamente todas as amostras são capazes de produzir enzimas como proteases, nucleases, hialuronidases, lipases e colagenases, cuja principal função está associada à disseminação do microrganismo no hospedeiro (Gordon e Lowy, 2008). *S. aureus* também apresenta uma proteína denominada proteína A, espécie-específica, inserida na estrutura do ácido teicóico e do peptidoglicano, que apresenta alta afinidade pela porção Fc das imunoglobulinas (Powers e Wardenburg, 2014). Essa proteína permite que *S. aureus* tenha a capacidade de agregar anticorpos e inibir o sistema complemento, impedindo que haja ativação da fagocitose (John e Barg, 2004). Além disso, mais de 90% das amostras produz uma cápsula polissacarídica que atua como fator antifagocitário (Gordon e Lowy, 2008).

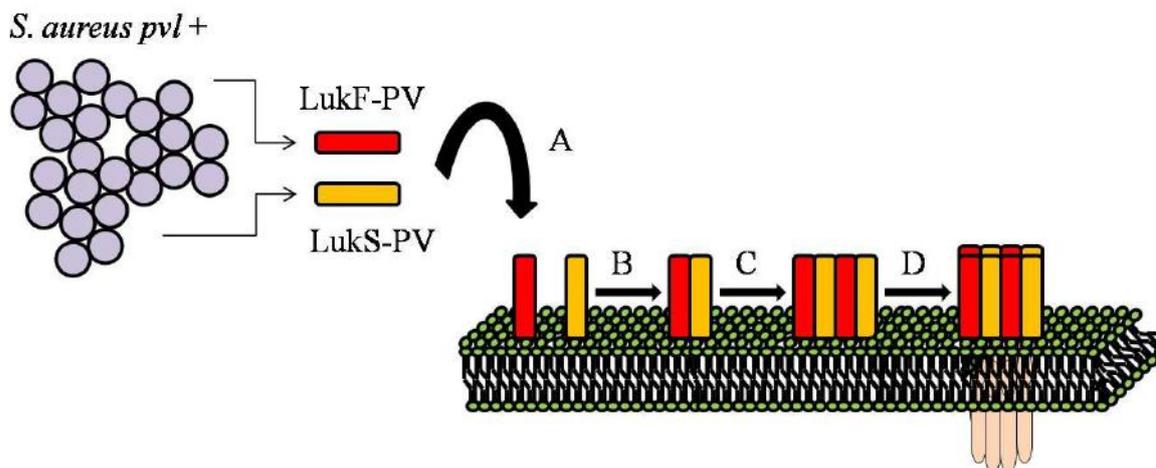
*S. aureus* ainda apresenta uma estratégia eficaz e complexa de patogenicidade que resulta na secreção de várias exoproteínas que afetam diretamente o metabolismo de células eucarióticas (Otto, 2014a). Esta espécie é capaz de secretar diferentes toxinas, e dentre as principais, encontram-se quatro hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ), além de exoproteínas adicionais que incluem a toxina da síndrome do choque-tóxico (TSST-1), enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEM, SEN, SEO e SEU), toxinas esfoliativas (ETA e ETB), e leucocidinas (Gordon e Lowy, 2008; Otto, 2014b).

A maioria dos genes destas toxinas se encontra em ilhas de patogenicidade, associadas a elementos genéticos móveis capazes de transferir seu conteúdo genético entre amostras. A possibilidade de transferência desses genes pode acarretar em rápidas alterações na virulência de amostras de *S. aureus* tornando-as capazes de causar infecções (Holden *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2008).

#### **1.4.1. Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)**

A Leucocidina de Panton-Valentine (PVL) é uma leucotoxina formadora de poro codificada pelos genes *lukF-PV* e *lukS-PV*, transcritos simultaneamente, que dão origem a duas proteínas, LukF-PV (33 kDa) e LukS-PV (34 kDa). Essas proteínas atuam

sinergicamente na membrana de células susceptíveis, por exemplo, em células polimorfonucleares, monócitos e macrófagos sendo capazes de formar poros que causam permeabilidade celular, e, em alguns casos, lise de células (Prevóst et al., 1995; Kaneko e Kamio, 2004; Jayasinghe e Bayley, 2005). Os genes da PVL são encontrados no genoma bacteriano em fagos lisogênicos, passíveis de serem transferidos entre amostras de *S. aureus* (Kaneko e Kamio, 2004). A função dos dois componentes formadores da PVL está relacionada à ocorrência de uma sequência de eventos na membrana da célula alvo. Inicialmente, as proteínas monoméricas se ligam à membrana celular formando heterodímeros. Em seguida, os heterodímeros são oligomerizados em heterotetrâmeros, caracterizados pela alternância das subunidades LukF-PV e LukS-PV. O próximo passo se caracteriza pela formação de uma estrutura octamérica, formada pelas duas subunidades em uma estequiometria de 1:1 (Jayasinghe e Bayley, 2005). Por fim, a estrutura formada resulta em mudanças conformacionais que formam um poro transmembrana, permitindo o influxo de íons cálcio e promovendo a morte celular (Nguyen *et al.*, 2003). A Figura 1 ilustra a formação de poros nas membranas das células susceptíveis à ação da PVL.



**Figura 1:** Figura esquemática do modelo de ataque à membrana de células susceptíveis à PVL. **A)** Os componentes LukF-PV e LukS-PV se ligam à superfície celular, **B)** formam heterodímeros, **C)** que se oligomerizam e formam heterotetrâmeros caracterizados pela alternância das subunidades. **D)** Em seguida, há a formação de uma estrutura octomérica, seguida pela formação de um poro na membrana plasmática que permite o influxo de íons. (Imagem cedida por Raiane Cardoso Chamon)

A PVL, além de sua toxicidade para polimorfonucleares (PMNs), provoca a liberação de grânulos contendo concentrações fisiológicas de cálcio, o que poderia estar

envolvido no desenvolvimento de necrose tecidual observada em doenças dérmicas causadas por cepas produtoras desta leucotoxina (Gillet *et al.*, 2002).

A identificação dos genes da PVL por técnicas moleculares, como a PCR, tornou capaz a associação desta toxina com infecções graves (Lina *et al.*, 1999; Gillet *et al.*, 2002; Vandenesch *et al.*, 2003). A PVL foi classificada, portanto, como um fator de virulência importante nas infecções por amostras de *S. aureus* de origem comunitária, sendo produzida tanto em amostras MRSA, quanto em amostras MSSA (Lina *et al.*, 1999; Vandenesch *et al.*, 2003; Wannet *et al.*, 2005; Berla-Kerzhner *et al.*, 2016;).

Infecções por amostras MRSA carreadoras do gene da PVL tem ocorrido predominantemente em indivíduos jovens e saudáveis sem fatores de risco associados à aquisição de infecções por este patógeno (Vandenesch *et al.*, 2003; Berla-Kerzhner *et al.*, 2016). Dados clínicos e epidemiológicos (Gillet *et al.*, 2002; Vandenesch *et al.*, 2003) sugerem que o alto potencial virulento de amostras MRSA comunitárias está associado com a presença desses genes. Além disso, *S. aureus* produtores de PVL causam infecções graves geralmente associadas com a formação de abscessos, osteomielite, endocardite e pneumonia, que normalmente necessitam uma antibioticoterapia agressiva e prolongada (Genestier *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2012; Damasco *et al.*, 2012; Karli *et al.*, 2016). Uma das infecções mais comuns associadas à presença dos genes da PVL é a pneumonia necrosante (Roberts *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2012; Lavoue *et al.*, 2016), além de infecções de pele e tecidos moles (SSTI – *skin and soft tissue infections*) (Berla-Kerzhner *et al.*, 2016;). As peculiaridades biológicas e a clínica da pneumonia necrosante causada por *S. aureus* podem estar intimamente relacionadas à presença da PVL. Pneumonias associadas à amostras de *S. aureus* que carregam os genes da PVL são caracterizadas por sepse, febre alta, leucopenia, hemoptise, efusão pleural, e frequentemente levam o paciente ao óbito (Gillet *et al.*, 2002; Lavoue *et al.*, 2016).

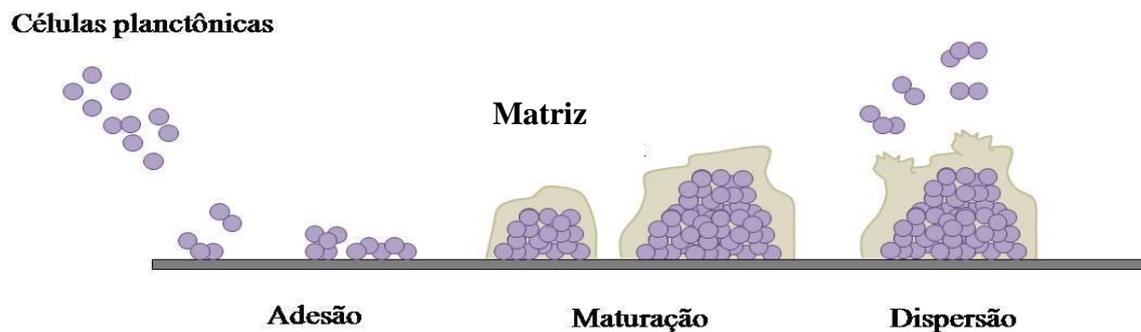
#### **1.4.2. Biofilme e genes relacionados**

Uma estratégia comum empregada por bactérias para que sobrevivam em diferentes condições ambientais é o desenvolvimento de uma comunidade de células, denominada biofilme (Payne e Boles, 2016). Infecções causadas por *S. aureus* estão frequentemente associadas à formação do biofilme, uma estrutura complexa, presente tanto em componentes biológicos quanto em superfícies inanimadas (Costerton *et al.*, 1999; Boles e Horswill, 2011). Donlan e Costerton (2002) definiram biofilme como

uma comunidade microbiana sésil e estruturada de células bacterianas, embebidas em uma matriz polimérica, produzida por estas bactérias, e aderidas à uma superfície biótica ou abiótica. Além disso, as células dos microrganismos formadores de biofilme exibem um fenótipo alterado no que se refere ao crescimento, expressão genética e produção de proteínas (Donlan e Costerton, 2002). Os biofilmes são, basicamente, formados por três componentes: o microrganismo, uma superfície e um ambiente favorável (Agarwal, Singh e Jain, 2010). Sua formação se dá em quatro etapas principais: adesão, agregação intercelular, maturação e dispersão a partir do biofilme maduro (Fey e Olson, 2010).

O biofilme atua como barreira física à ação do sistema imunológico do paciente e tem se tornado um grave problema na área de saúde, pois está intrinsecamente relacionado ao aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, além de atuar como foco para disseminação do patógeno (Fey e Olson, 2010; Otto, 2012). Além disso, está associado a infecções relacionadas a dispositivos médicos e a dificuldade de tratamento dessas infecções, uma vez que as células embebidas no biofilme (sésseis) encontram-se menos expostas aos antimicrobianos, e adicionalmente, neste microambiente pode existir maior concentração de nutrientes, como carbono e nitrogênio (Donlan, 2001; Otto, 2008; Kiedrowski e Horswill, 2011).

A formação de biofilme em *Staphylococcus* spp. é um processo multifatorial e complexo que pode ser subdividido em fases distintas: (1) uma fase de rápida aderência da bactéria à superfície biótica ou abiótica e (2) uma fase mais prolongada de acúmulo de células, que envolve proliferação, adesão entre células bacterianas e a produção de uma matriz levando a formação do biofilme maduro (Otto, 2008). A figura 2 ilustra as etapas da formação e da dispersão do biofilme bacteriano. A aderência inicial a superfícies não depende apenas da natureza do material do polímero, mas também das características da superfície celular bacteriana (Götz, 2002). Essa interação inicial envolve forças físico-químicas não específicas, como força de van der Waals, interações hidrofóbicas e polaridade (Von Eiff, Peters e Heilmann, 1999).



**Figura 2:** Etapas da formação de um biofilme. (Imagem cedida por Raiane Cardoso Chamon)

Na fase de acúmulo, adesinas polissacarídicas têm papel importante na interação entre as células bacterianas (Götz, 2002). Vários polissacarídeos têm sido estudados, porém, a maioria dos estudos tem mostrado que o principal composto presente nessa fase de formação de biofilme é a PIA (adesina intercelular polissacarídica), sendo sua biossíntese dependente de genes do operon *icaADBC* (Arciola, Baldassarri e Montanaro, 2015). O operon *ica* é composto pelo gene *icaR* (regulatório) e pelos genes *icaADBC*. Esse operon foi inicialmente descrito em *S. epidermidis* e mais tarde foi observada sua presença também em *S. aureus* (Cramton *et al.*, 1999). Os produtos IcaA e D têm atividade de glicosiltransferase, atuando na síntese dos oligômeros e utilizando como substrato UDP-N-acetilglicosamina, enquanto IcaC estaria envolvida na externalização do polissacarídeo crescente. IcaB seria responsável pela reação de deacetilação (Vuong *et al.*, 2004). O gene *icaR* que está localizado à montante do operon *ica*, codifica o repressor desse operon (Conlon *et al.*, 2002).

Em *Staphylococcus* spp., outros fatores, além da PIA, parecem ter papel relevante na formação do biofilme, chamado *ica*-independente. A proteína associada ao biofilme (Bap – *biofilm associated protein*), que apresenta uma similaridade com proteínas de superfície de outras espécies Gram-positivas (*Enterococcus* spp.) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) (Cucarella *et al.*, 2011), foi a primeira proteína descrita envolvida na formação do biofilme em amostras de *Staphylococcus* isoladas de glândulas mamárias de animais que apresentaram mastite (Spezialle *et al.*, 2014). Alguns estudos também demonstram que amostras de *S. aureus* que sofreram deleção no locus *ica* foram capazes de continuar produzindo biofilme, revelando que há outros mecanismos envolvidos nesta produção (Fitzpatrick, Humphreys e O’Gara, 2005; O’Neill *et al.*, 2007).

No caso de amostras de *S. aureus*, os principais componentes da matriz consistem em polissacarídeos (Cramton *et al.* 1999), proteínas (O'Neill, Humphreys e O'gara, 2009) e DNA extracelular (eDNA) (Kaplan *et al.*, 2012). A proteína SasG de superfície de *S. aureus* e sua homóloga plasmina sensível (Pls), proteínas FnBPA e FnBPB, que se ligam à fibronectina A e B e a proteína estafilocócica A (Spa) têm sido associadas com a fase de acúmulo do biofilme estafilocócica (Savolainen *et al.*, 2001; Corrigan *et al.*, 2007; Merino *et al.*, 2009; O'Neill, Humphreys e O'gara, 2009). Além disso, a composição da matriz extracelular de biofilme de *S. aureus* pode conter proteínas citoplasmáticas que se associam a superfície celular bacteriana em resposta a diminuição do pH da própria matriz (Foulston *et al.*, 2014).

A proteína de superfície SasG de *S. aureus* apresenta um domínio N-terminal A e repetidos resíduos de aminoácidos, designados domínios B, e está envolvida na fase de acúmulo do biofilme, um processo que requer concentração fisiológica do  $Zn^{+2}$  (Geoghegan *et al.*, 2010). Em estudo realizado por Corrigan e colaboradores (2007), amostras que expressaram a proteína SasG formaram biofilmes independentes da PIA.

Os biofilmes formados por amostras MRSA e MSSA tornam-se resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos disponíveis, uma vez que tais aglomerados dificultam a penetração dos fármacos e, conseqüentemente, a erradicação bacteriana (Donlan, 2001; Donlan e Costerton, 2002). De acordo com Wells e colaboradores (2011), além da dificuldade de penetração, outros fatores podem prejudicar a eficácia antimicrobiana no biofilme como taxas de crescimento bacteriano reduzido e o aumento na expressão de alguns genes de resistência.

Além disso, ácidos teicóicos extracelulares foram purificados da matriz de biofilme de *Staphylococcus* (Chaignon *et al.*, 2007) e tem sido sugerido que o peptidoglicano da parede celular bacteriana também pode apresentar um papel não identificado na composição desta matriz (Kokai-Kun *et al.*, 2009). Além disso, fatores do hospedeiro podem ser incorporados na matriz do biofilme, dependendo do sítio da infecção (Payne e Boles, 2016).

### **1.5. Papel de antimicrobianos na modulação da expressão de fatores de virulência**

Embora o verdadeiro papel da PVL em infecções ainda não esteja bem estabelecido, alguns estudos têm sido conduzidos na obtenção de tratamentos mais eficazes para infecções por amostras produtoras de PVL. Estudos realizados para avaliar a indução da expressão da PVL pelo uso de concentrações sub-inibitórias (sub-CMI –

Concentração Mínima Inibitória) de alguns antimicrobianos mostraram que a oxacilina aumenta os níveis de PVL, enquanto a clindamicina e a linezolida reduzem significativamente a liberação da toxina, tanto por amostras MSSA, quanto MRSA (Dumitrescu *et al.*, 2007). Já foi relatado também que estes antimicrobianos reduzem a produção de outras toxinas (Van Langevelde *et al.*, 1997; Bernardo *et al.*, 2004), possivelmente através de seu impacto na síntese de proteínas (Herbert, Barry e Novick, 2001). Em um artigo publicado por nosso grupo, foi mostrado que a terapêutica utilizada no paciente necessitou ser alterada para clindamicina para que a infecção por uma amostra MRSA comunitária PVL positiva fosse erradicada, confirmando a importância da terapêutica específica em casos de amostras produtoras desta toxina (Ferreira *et al.*, 2012).

Diferentes antimicrobianos já foram testados quanto à modulação do biofilme, tanto aqueles que atuam na síntese da parede celular das bactérias como oxacilina, cefalotina, cefalexina e vancomicina, como aqueles que atuam na síntese de proteínas como a linezolida. (Frank *et al.*, 2007; Haddadin *et al.*, 2010; Mirani e Jamil, 2011; Subrt, Mesak e Davies, 2011). Estes estudos apontam que tais drogas são capazes de estimular a formação de biofilme de *S. aureus* em até 4 vezes o biofilme ou seja, na presença de  $\frac{1}{2}$  da concentração mínima inibitória para a oxacilina, a amostra seria capaz de formar cerca de 4 vezes mais biofilme do que na ausência deste antimicrobiano (Kaplan, *et al.*, 2012).

Além disso, alguns trabalhos vêm demonstrando que sub-CMI de alguns antimicrobianos, apesar de não serem capazes de eliminar completamente as bactérias, podem inibir a formação do biofilme em diferentes gêneros bacterianos (Ichimiya *et al.*, 1996; Blickwede *et al.*, 2004; Schilcher *et al.*, 2016). Por outro lado, alguns estudos têm relatado que antimicrobianos, quando em concentrações sub-CMI, podem induzir significativamente a formação do biofilme em amostras de *S. aureus*, como amostras da linhagem USA300/ST8/SCC*mec* IV. O aumento da formação do biofilme na presença de sub-CMIs de antibióticos como a oxacilina se deve a resposta global bacteriana ao estresse ambiental é a conclusão de alguns desses trabalhos que envolvem sub-MIC (Kaplan *et al.*, 2012).

### **1.6. Epidemiologia das infecções por *S. aureus***

Com os adventos tecnológicos no campo da pesquisa científica, principalmente com a inovação das técnicas de biologia molecular, o estudo epidemiológico de

infecções bacterianas aprimorou-se nos últimos anos. A técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após o tratamento com enzimas de restrição e de separação por eletroforese de campo pulsado PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) tem sido amplamente utilizada devido ao seu alto poder discriminatório entre as linhagens de *S. aureus*, além de permitir a diferenciação entre amostras de origem comunitária e hospitalar (Mcdougal *et al.*, 2003).

Com os avanços em relação a técnicas de sequenciamento de genoma completo, novas metodologias tem sido propostas a fim de auxiliar os estudos epidemiológicos. A partir do sequenciamento de genes constitutivos envolvidos no metabolismo celular bacteriano foi desenvolvida a técnica de tipagem por sequenciamento de multilocus enzimáticos (MLST) para diferentes espécies bacterianas. Para amostras de *S. aureus*, sete genes constitutivos são sequenciados (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yquiL*) e suas sequências analisadas e comparadas com sequências já depositadas no banco de dados do site [www.mlst.net](http://www.mlst.net), a fim de detectar mutações pontuais em cada gene específico. A combinação da sequência dos sete genes forma um perfil alélico (*sequence type*, ST) para cada amostra avaliada (Enright *et al.*, 2000). A determinação do ST permite agrupar as amostras em linhagens genéticas distintas, contribuindo ainda mais para a análise epidemiológica das infecções. Tal agrupamento em clones distintos permite identificar a proximidade evolutiva entre diferentes linhagens de *S. aureus*.

Alguns clones de MRSA são conhecidos por sua facilidade de transmissão, longa persistência, rápida disseminação intra e inter-hospitalar e facilidade de cruzar barreiras geográficas (Papakyriacou *et al.*, 2000). Em 2003, McDougal e colaboradores propuseram a uniformização da nomenclatura dos clones mais comuns nos Estados Unidos. Assim, foram descritos oito clones (USA100, USA200, USA300, USA400, USA500, USA600, USA700 e USA800), observados a partir da associação da técnica de PFGE com a técnica de MLST, além da tipagem do SCC*mec*. Desta forma, o clone USA100/ST5 (SCC*mec*II) está associado a perfis característicos do clone Nova Iorque/Japão, o USA200/ST36 (SCC*mec* II) ao clone EMRSA-16, o USA500/ST8 (SCC*mec* I) ao clone Ibérico, o USA600/ST45 ao clone Berlim (SCC*mec* IV) e o USA800/ST5 (SCC*mec* IV) ao clone Pediátrico. Os perfis genotípicos relacionados aos clones USA300/ST8, USA400/ST1 e USA700/ST72 (carreadores do SCC*mec* IV), encontrados em estirpes comunitárias, foram descritos pela primeira vez por McDougal e colaboradores (2003) e, sendo assim, não foram associados a outros clones já descritos. Atualmente, a classificação USA já conta com mais três clones de amostras



carreadoras do SCCmecIV disseminados nos EUA: USA900/ST15 e USA1000/ST59, essencialmente restritos aos EUA e USA1100/ST30, associado ao clone Oceania ou *Southwest Pacific Clone* (Tenover *et al.*, 2008; Monecke *et al.*, 2011).

No Brasil, a maioria das estirpes circulantes em hospitais estava associada ao clone endêmico brasileiro – CEB/ST8 (De Miranda *et al.*, 2007; Souza Júnior *et al.*, 2009), clonalidade que não foi incluída na classificação “USA” de McDougal (2003) por não haver amostras desta clonalidade nos EUA. Nos últimos anos, esse clone tem sido substituído nos hospitais brasileiros por estirpes de *S. aureus* carreando o SCCmecIV, tradicionalmente associados à comunidade (Schuenck *et al.*, 2009; Silva-Carvalho *et al.*, 2009, Caboclo *et al.*, 2013), assim como dando lugar a estirpes carreadoras do SCCmecII, pertencentes ao ST5 e ST105 (Caboclo *et al.* 2013; Caiaffa-Filho *et al.*, 2013).

As estirpes com SCCmec IV isoladas de pacientes internados em hospitais brasileiros geralmente apresentam o genótipo USA400/ST1, USA800/ST5 ou USA1100/ST30. As estirpes carreadoras dos genes da PVL detectadas no Brasil são em sua maioria, associadas à clonalidade USA1100 (Ribeiro *et al.*, 2007; Silva-Carvalho *et al.*, 2009; de Araújo *et al.*, 2010; Gelatti *et al.*, 2013; Chamon *et al.*, 2015). Ultimamente essas amostras também emergiram nos hospitais, configurando um novo problema de saúde pública, em função da rápida disseminação e virulência acentuada (Schuenck *et al.*, 2009; Schuenck *et al.*, 2012; Pardo *et al.*, 2013; Chamon *et al.*, 2015). Em um estudo recente do nosso grupo, uma coleção de 50 amostras carreadoras dos genes da *pvl* foi avaliada, sendo estas isoladas de dez hospitais da cidade do Rio de Janeiro. Dentre elas, 25 (50%) pertenciam a linhagem USA1100/ST30/CC30/SCCmecIV, presente em oito hospitais, indicando a crescente incidência desta linhagem em amostras isoladas dentro de hospitais brasileiros. Além disso, uma amostra desta linhagem foi caracterizada como VISA (Chamon *et al.*, 2015).

As linhagens USA300 e USA400, ambas com SCCmec IV e encontradas na comunidade, foram descritas como principais carreadoras dos genes da PVL nos Estados Unidos (McDougal *et al.*, 2003; O'Hara *et al.*, 2012; David *et al.*, 2013). Amostras MRSA comunitárias tem emergido em hospitais no Brasil como um agente causador de infecções graves, mas ao contrário das amostras encontradas nos EUA, em geral não carregam os genes da PVL (Schuenck *et al.* 2009; Silva-Carvalho *et al.*, 2009; Caboclo *et al.*, 2013; Caiaffa-Filho *et al.*, 2013; Damasco *et al.*, 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Infecções causadas por amostras de *S. aureus* carreadoras dos genes da PVL geralmente são graves e associadas com quadros clínicos de difícil tratamento, e normalmente requerem uma antibioticoterapia agressiva e prolongada. Além disso, a terapêutica em infecções por *S. aureus* pode não ser eficaz em virtude da produção de biofilme pelo microrganismo, o que dificulta a difusão da droga e a morte bacteriana. É possível que a baixa perfusão dos antimicrobianos no biofilme produzido por essas amostras module positivamente a expressão de diferentes genes de virulência, incluindo os da PVL, dificultando ainda mais a terapêutica.

Pelo fato de dispormos de uma coleção de amostras bem caracterizadas quanto a clonalidade e carreadoras dos genes da PVL, oriundas de diferentes espécimes clínicos, este estudo visa analisar a modulação antimicrobiana da expressão do biofilme bacteriano, além de avaliar a presença de genes relacionados a esta produção. Os resultados poderão auxiliar no entendimento de alterações fenotípicas associadas à ação de antimicrobianos no biofilme formado por amostras de *S. aureus* PVL positivas de diferentes linhagens, direcionando uma terapia mais adequada nas infecções por estas amostras.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo do estudo é avaliar a produção do biofilme em amostras de *S. aureus* carreadoras dos genes da PVL de diferentes linhagens clonais e detectar genes associados a esta formação, além de avaliar a modulação antimicrobiana na formação do biofilme.

Estratégias:

- Analisar a produção de biofilme pelo micrométodo quantitativo;
- Detectar a presença dos genes *icaA* e *sasG*;
- Determinar os valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) para oxacilina e vancomicina;
- Avaliar a modulação de concentrações sub-CMI ( $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$ ), 1x CMI e 2x CMI de oxacilina e vancomicina durante a formação do biofilme;
- Avaliar a modulação de concentrações sub-CMI ( $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$ ), 1x CMI e 2x CMI de oxacilina e vancomicina no biofilme pré-formado.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Desenho do estudo e fluxograma da metodologia utilizada

Esse estudo laboratorial e descritivo foi realizado utilizando 34 amostras de *S. aureus pvl* positivas, previamente caracterizadas quanto à resistência antimicrobiana e diversidade clonal (Chamon *et al.*, 2015), conforme descritas no Anexo I. As amostras foram obtidas de sítios de colonização e infecção de pacientes atendidos em diferentes hospitais do estado do Rio de Janeiro e fazem parte da coleção do laboratório de Infecção Hospitalar, do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPPG) da UFRJ. Dentre as 34 amostras, 21 foram caracterizadas como MRSA e 13 como MSSA, e pertencem às principais linhagens clonais encontradas, como descrito na Tabela 2.

As amostras foram mantidas em caldo TSB (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) com 20% (v/v) de glicerol, a -20°C (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989). Para os testes fenotípicos e moleculares realizados neste estudo foram utilizadas cepas controles listadas na Tabela 1. A Figura 3 ilustra o fluxograma da metodologia utilizada no estudo.

**Tabela 1:** Características das amostras controles de *Staphylococcus aureus* utilizadas no presente estudo

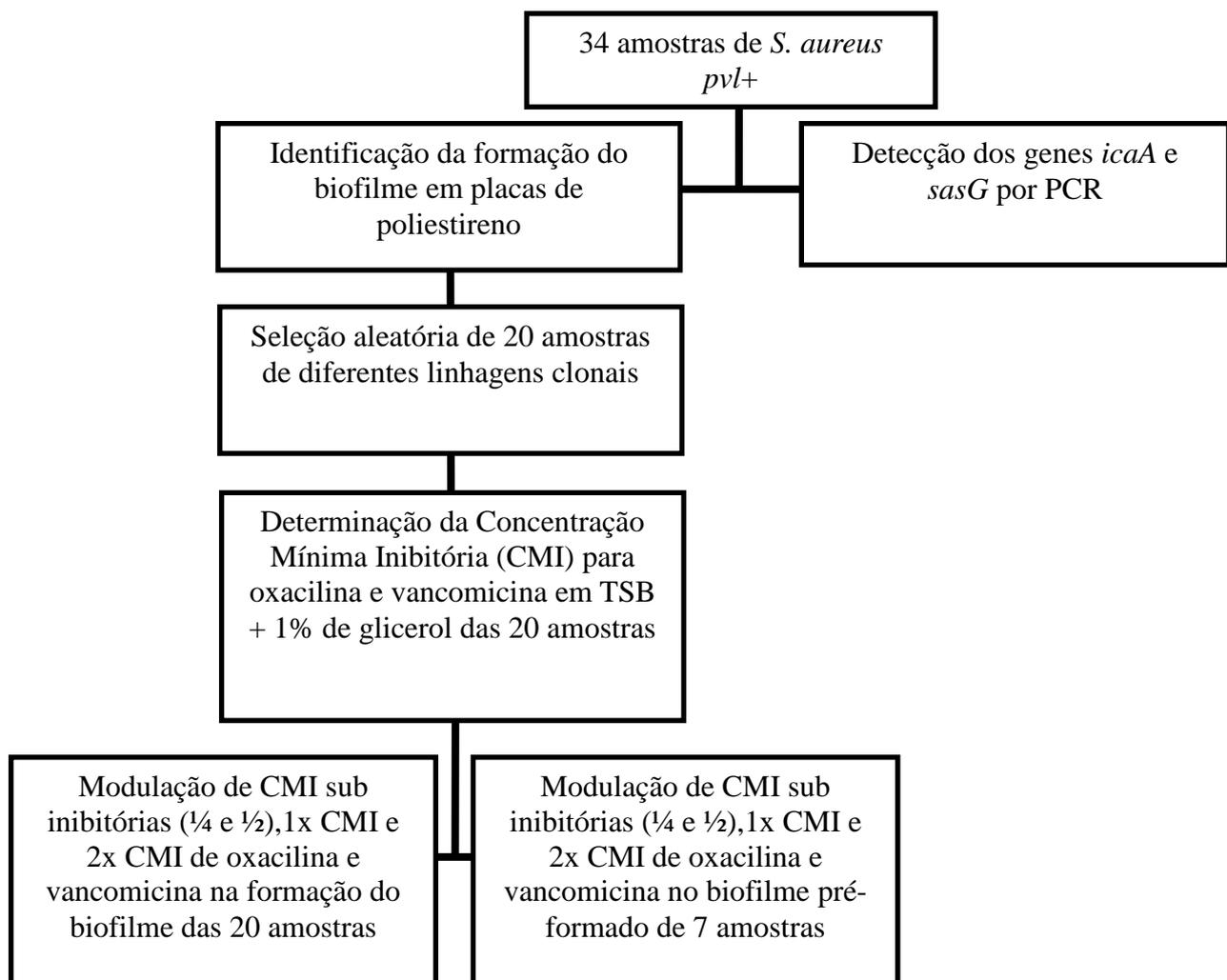
Amostra	Descrição	Referência
ATCC 33591	Produtora de biofilme e positiva para o gene <i>icaA</i>	CLSI
ATCC 29213	Amostra sensível à oxacilina	CLSI
1125*	Amostra clínica de secreção de ferida cirúrgica associada a prótese em MIE – positiva para o gene <i>sasG+</i>	Este estudo

ATCC – “American Type Culture Collection”; \*A amostra foi sequenciada e utilizada como controle positivo; MIE – membro inferior esquerdo.

**Tabela 2:** Características gerais das 34 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* carreadoras dos genes da PVL, previamente caracterizadas por Chamon e colaboradores (2015)

Amostras	Data de Isolamento	Fonte de Isolamento	SCC <i>mec</i>	Clonalidade	ST
<b>526*</b>	20/06/2005	Abscesso renal	IV	USA300	8
<b>912*</b>	14/11/2006	Swab Nasal	IV	USA400	1
<b>945*</b>	14/11/2006	Swab Nasal	IV	USA400	1
<b>1348*</b>	14/05/2009	Sangue	-	USA400	1
<b>1349*</b>	14/05/2009	Sangue	-	USA400	1
1444	02/04/2012	Endocardite	-	USA400	1
<b>553*</b>	18/10/2005	Swab Nasal	IV	USA800	5
<b>1213*</b>	05/06/2009	Sangue	IV	USA800 <sup>b</sup>	83
<b>596*</b>	02/02/2006	SSTI	IV	USA1100	30
<b>806*</b>	16/08/2006	Swab Nasal	IV	USA1100	30
809	06/07/2006	Swab Nasal	IV	USA1100	30
826	24/10/2006	Sangue	IV	USA1100	30
<b>827*</b>	24/10/2006	SSTI	IV	USA1100	30
<b>932*</b>	14/11/2006	Swab Nasal	IV	USA1100	30
943	14/11/2006	SSTI	IV	USA1100	30
<b>1155*</b>	03/05/2006	Secreção Óssea	IV	USA1100	30
1179	05/02/2009	SSTI	IV	USA1100	30
1180	09/02/2009	SSTI	IV	USA1100	30
<b>1342*</b>	24/03/2009	Sangue	IV	USA1100	30
<b>1463*</b>	18/04/2012	SSTI	IV	USA1100	30
1079	03/01/2008	Sangue	-	USA1100	30
1086	10/01/2008	Sangue	-	USA1100	30
<b>1462*</b>	18/04/2012	SSTI	-	USA1100	30
584	15/07/2004	Secreção Traqueal	IV	USA1100 <sup>a</sup>	714
1204	18/03/2009	Swab Nasal	IV	USA1100 <sup>a</sup>	2369
1314	08/11/2008	Sangue	IV	USA1100 <sup>a</sup>	484
<b>1174*</b>	17/01/2007	SSTI	-	ND	30
<b>622*</b>	06/04/2006	Swab Nasal	IV	ND	97
<b>1453*</b>	26/04/2012	Sangue	-	ND	121
874	14/11/2006	Swab Nasal	-	ND	718
1132	30/04/2007	Prótese de Joelho	-	ND	1462
<b>1168*</b>	08/09/2006	Fragmento ósseo	-	ND	1462
1085	29/01/2008	Sangue	-	ND	2104
<b>1334*</b>	19/12/2009	Sangue	-	ND	2104

\*Amostras selecionadas para serem testadas quanto a modulação antimicrobiana na formação do biofilme; SSTI – *Skin and soft tissue infections*– Infecções de pele e tecidos moles; SCC*mec* – Cassete cromossômico estafilocócico *mec*; ND – não determinado; <sup>a</sup>relacionado à clonalidade USA1100; <sup>b</sup>relacionado à clonalidade USA800; ST – Sequência Tipo.

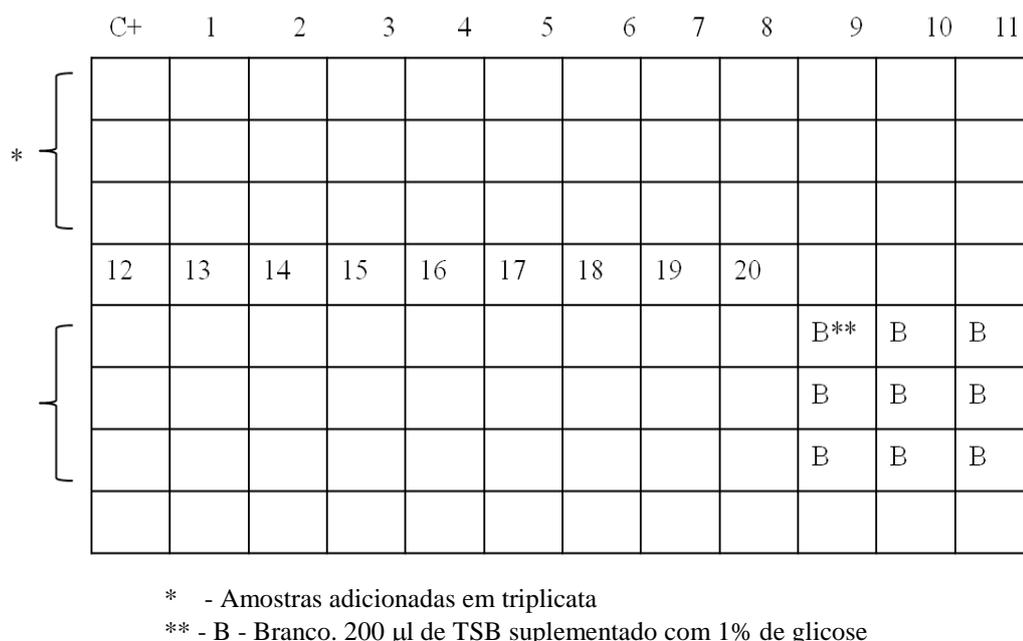


**Figura 3:** Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo.

#### 4.2. Produção de biofilme por amostras de *S. aureus* em placa de microtitulação

A produção de biofilme foi realizada através do micrométodo quantitativo (Stepanovic *et al*, 2007), com algumas modificações. O método consiste na avaliação quantitativa da produção de biofilme em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato modelo TPP 92096 (Techno PlasticProducts, Trasadingen, Suíça). O inóculo das amostras foi realizado a partir de colônias crescidas em meio TSA (Bacto™) e inoculadas em 3 mL de água destilada estéril para obtenção de uma suspensão bacteriana correspondente à escala 0,5 de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). Em seguida, foram adicionados 20  $\mu$ L desta suspensão a 180  $\mu$ L de TSB (Bacto™) adicionado de 1% de glicose nos poços da placa de poliestireno e esta foi submetida à incubação a 37 °C por 24 h. As amostras foram inoculadas em triplicata, conforme

ilustrado na Figura 4, e o experimento foi realizado em três momentos independentes. Após o período de incubação, o meio foi descartado, e três etapas de lavagem utilizando 200  $\mu$ L de PBS pH 7,2 (Laboclin, Paraná, Brasil) estéril foram realizadas para retirada das células não aderidas (planctônicas). Em seguida, a placa foi incubada a 60 °C por 1 h, para fixação do biofilme. Após fixação, foram adicionados 150  $\mu$ L de safranina 0,1% (Fisher Scientific Company, Nova Hampshire, EUA) a cada poço e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse tempo, a safranina foi desprezada, e foi realizada uma lavagem adicional utilizando 150  $\mu$ L de PBS. Em seguida, a eluição foi feita em 150  $\mu$ L de etanol 92% e após 30 minutos foi realizada a leitura da densidade óptica a 492 nm de comprimento de onda em leitor espectrofotômetro (Thermoplate TP Reader MN).



**Figura 4:** Esquema ilustrativo da distribuição das amostras de *Staphylococcus aureus* testadas quanto à produção do biofilme em placa de 96 poços.

Os resultados foram interpretados de acordo com os padrões estabelecidos por Stepanovic e colaboradores (2007). Para determinação qualitativa da produção de biofilme foram calculadas as médias das triplicatas de cada amostra testada e descontada de cada resultado a média da triplicata do controle negativo (meio TSB + 1% de glicose, sem amostra bacteriana). Em seguida, foi calculado o DOC (ponto de corte da DO), que foi a média do branco (controle negativo) somada à três vezes o desvio padrão do mesmo. Assim, amostras que tiverem seus valores de DO menores que

a DOC foram consideradas não produtoras, para valores de DO entre uma e duas vezes o valor do DOC as amostras foram consideradas fracas produtoras, DO entre duas e quatro vezes o valor do DOC foram consideradas produtoras moderadas, e as fortes produtoras foram aquelas que apresentarem valores de DO maiores que quatro vezes o valor do DOC, conforme descrito na Tabela 3. A amostra ATCC33591 foi utilizada como controle positivo do teste por ser uma amostra forte produtora de biofilme. Além disso, apenas o valor da DO de cada amostra também foi considerado para análises futuras.

**Tabela 3:** Cálculo para classificação qualitativa da produção de biofilme formado pelas amostras estafilocócicas

DOC	Classificação
$N \leq \text{DOC}$	Não produtora de biofilme
$\text{DOC} < N \leq 2\text{DOC}$	Fraca produtora de biofilme
$2\text{DOC} < N \leq 4\text{DOC}$	Moderada produtora de biofilme
$N > 4\text{DOC}$	Forte produtora de biofilme

DOC – Ponto de corte definido por média do branco + 3 vezes o desvio padrão; N – DO da Amostra.

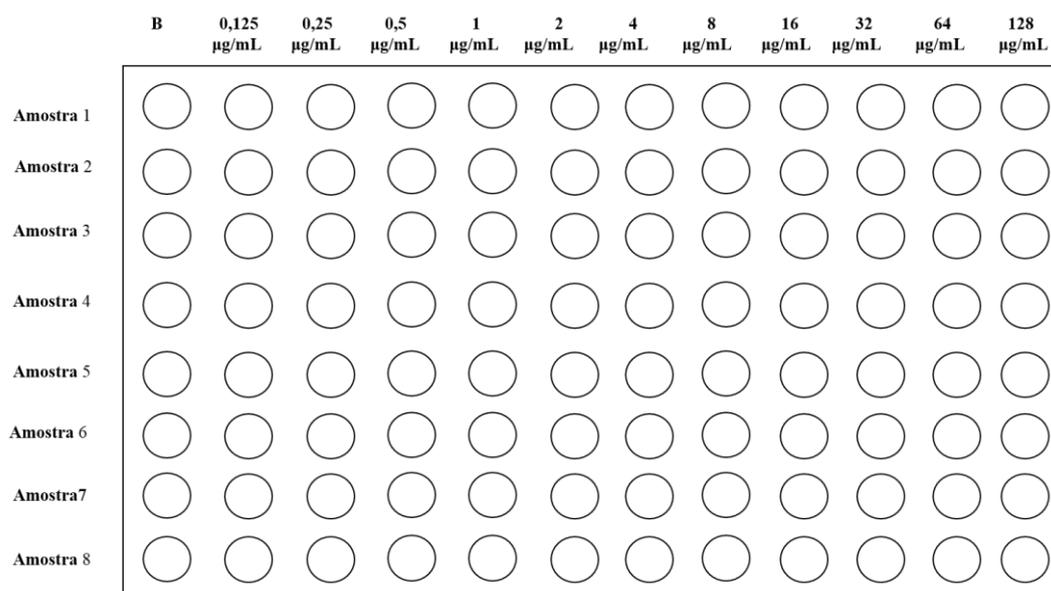
#### 4.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória em TSB suplementado com 1% de glicose

Para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 20 amostras escolhidas aleatoriamente dentro das diferentes linhagens clonais (Tabela 2, amostras em negrito), foi realizado o teste de microdiluição em caldo, de acordo com o CLSI (2016), com algumas modificações. Os antimicrobianos testados foram oxacilina (concentrações testadas de 0,125 a 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e vancomicina (0,06 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma Chemical Company, Missouri, EUA). Os antimicrobianos utilizados para o teste foram diluídos em caldo TSB suplementado com 1% de glicose, tendo em vista que o biofilme é formado nestas condições (Stepanovic *et al.*, 2007), na proporção de 1:20 (v/v). A diluição dos antimicrobianos foi realizada em placa de microdiluição com fundo côncavo, em que 0,1 mL de cada concentração do antimicrobiano foram transferidos para cada poço de uma fileira vertical da placa. Ao final do procedimento, cada fileira horizontal da placa apresentou concentrações crescentes do antimicrobiano,



de acordo com a faixa de concentração utilizada para cada antimicrobiano. A primeira fileira vertical funcionou como controle do teste, sendo preenchido somente com caldo TSB + 1% de glicose, sem antibiótico, mas com adição posterior da amostra a ser testada (controle de crescimento bacteriano). A figura 5 ilustra a montagem da placa de 96 poços. O preparo do inóculo bacteriano foi realizado a partir do crescimento obtido em uma placa de TSA após 24 h de incubação 35 °C. De três a quatro colônias foram diluídas em salina estéril e comparada à escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida o inóculo foi novamente diluído, em salina estéril, em proporção 1:10 (v/v). Desta última suspensão, foram transferidos 5 µl para cada poço de uma coluna horizontal da placa de microtitulação. As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C.

A leitura das placas foi realizada visualmente, sendo a CMI o valor da concentração do primeiro poço no qual não foi possível observar crescimento bacteriano ou turvação do meio. A amostra *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle do teste.

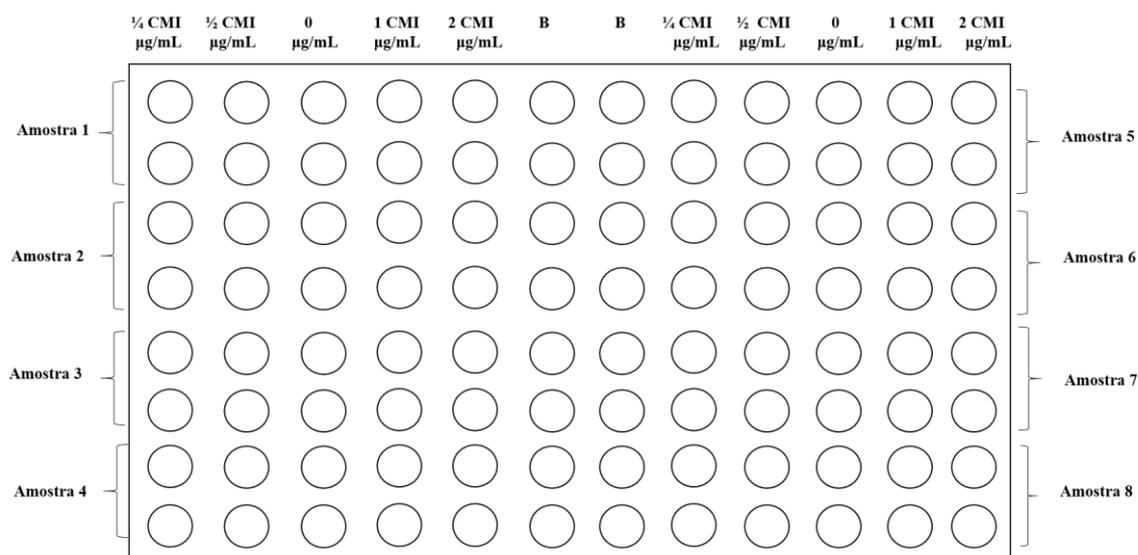


**Figura 5:** Exemplo da montagem da placa de 96 poços para determinação da CMI de oxacilina em amostras de *Staphylococcus aureus*.

#### 4.4. Estudo da modulação antimicrobiana na formação do biofilme e no biofilme pré-formado

Para avaliar os efeitos modulatórios de concentrações sub-inibitórias ( $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  da CMI), 1x a CMI e 2x a CMI de oxacilina e vancomicina durante a formação do biofilme, vinte amostras *pvl* positivas, escolhidas aleatoriamente (MRSA e MSSA) entre diferentes linhagens clonais, foram avaliadas, de acordo com a Tabela 2 (amostras em negrito). O inóculo bacteriano foi realizado a partir de colônias crescidas em meio TSA (Bacto™) e inoculadas em 3 mL de água destilada estéril para obtenção de uma suspensão bacteriana correspondente a escala 0,5 de McFarland ( $10^8$ UFC/mL). Em seguida, foram adicionados 20  $\mu$ L desta suspensão a 180  $\mu$ L de TSB (Bacto™) adicionado de 1% de glicose nos poços da placa de poliestireno, contendo concentrações crescentes de antimicrobiano, de acordo com o valor de CMI obtido para cada amostra, nas seguintes condições:  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1x e 2x a CMI, além da ausência do antimicrobiano. A placa para avaliação da produção do biofilme foi montada de acordo com a Figura 6. A placa foi submetida à incubação a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, as células planctônicas foram retiradas e em seguida, três etapas de lavagem foram realizadas utilizando 200  $\mu$ L PBS 1x pH 7,2 (Laboclin, Paraná, Brasil) estéril. Em seguida, a placa foi incubada a 60 °C por 1h, para fixação do biofilme. Após fixação, foram adicionados 150  $\mu$ L de safranina 0,1% a cada poço (Fisher Scientific Company, Nova Hampshire, EUA) e uma incubação a temperatura ambiente por 15 minutos foi realizada. Após esse tempo, a safranina foi desprezada, e foi realizada uma lavagem utilizando 150  $\mu$ L de PBS. Em seguida, a eluição da safranina foi feita com 150  $\mu$ L de etanol 95% e após 30 minutos foi realizada a leitura da  $DO_{492nm}$ . Todas as amostras foram testadas em duplicata, e o experimento foi realizado em três momentos independentes.

Como controle negativo do teste, o meio TSB suplementado com 1% de glicose foi inoculado em poços específicos da placa de microdiluição (Figura 6), e a sua média descontada das médias das amostras avaliadas. Os resultados foram avaliados a partir da comparação relativa das medidas de  $DO_{492nm}$  obtidas em diferentes concentrações do antimicrobianos com a leituras da produção do biofilme na ausência das drogas (100% de formação).



**Figura 6:** Exemplo do mapa da placa de 96 poços para avaliação dos efeitos modulatórios de concentrações sub-inibitórias (¼ e ½ da CMI) e 1x da CMI e 2x da CMI de oxacilina e vancomicina em amostras de *Staphylococcus aureus*.

Para avaliar os efeitos modulatórios de concentrações sub-inibitórias (¼ e ½ da CMI), 1x a CMI e 2x a CMI de oxacilina e vancomicina no biofilme pré-formado, o inóculo bacteriano foi realizado a partir de colônias crescidas em meio TSA (Bacto™) e inoculadas em 3 mL de água destilada estéril para obtenção de uma suspensão bacteriana correspondente a escala 0,5 de McFarland ( $10^8$ UFC/mL). Em seguida, foram adicionados 15 µL desta suspensão a 135 µL de TSB (Bacto™) adicionado de 1% de glicose nos poços de uma placa de microdiluição com fundo côncavo, sendo utilizada uma tampa contendo *pegs* (Nunc™). Após 24 h de incubação, a tampa contendo *pegs* foi transferida para uma nova placa de fundo côncavo. Esta nova placa, por sua vez, continha 150 µL do meio TSB acrescido de 1% de glicose por poço, suplementado com concentrações crescentes de oxacilina e vancomicina, como ilustrado previamente na Figura 6. A placa foi novamente incubada por um período de 24 h. Passado este período, a tampa foi retirada e lavada 3 vezes em uma nova placa de fundo côncavo, utilizando 200 µL PBS 1x pH 7,2 (Laborclin, Paraná, Brasil) estéril. Em seguida, a tampa contendo os *pegs* foi incubada a 60 °C por 1 h, para fixação do biofilme. Após fixação, a tampa foi encaixada em uma nova placa de microdiluição, contendo 200µL de safranina 0,1% (Fisher Scientific Company, Nova Hampshire, EUA) por poço e uma incubação a temperatura ambiente por 15 minutos foi realizada. Após esse tempo, os *pegs* foram novamente submetidos ao processo de lavagem utilizando 200µL de PBS. Em seguida, a eluição da safranina foi feita com a deposição da tampa com os *pegs* em

uma placa de microdiluição de poliestireno de 96 poços com fundo chato modelo TPP 92096 (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) contendo 200 µL de etanol 95% por poço. Após 30 minutos foi realizada a leitura da DO<sub>492nm</sub>.

Como controle negativo do teste, o meio TSB suplementado com 1% de glicose foi inoculado em poços específicos da placa de microdiluição (Figura 6), e a sua média descontada das médias das amostras avaliadas. Os resultados foram avaliados a partir da comparação relativa das medidas de DO<sub>492nm</sub> obtidas em diferentes concentrações do antimicrobiano com a leituras da produção do biofilme na ausência das drogas (100% de formação).

#### **4.5. Avaliação da presença de genes de virulência relacionados ao biofilme**

##### **4.5.1. Extração do DNA**

O DNA de todas as amostras foi obtido através da lise térmica, de acordo com metodologia proposta por Shuenck *et al.*, 2006. Cinco colônias isoladas previamente em ágar sangue foram transferidas para um tubo contendo caldo TSB (Oxoid) e incubadas a 35° C durante 18 h. Em seguida, 1 mL do crescimento bacteriano foi transferido para um microtubo (Eppendorf®) e centrifugado por 5 min a 8000 xg. O sedimento foi diluído em 1 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) e novamente centrifugado a 8000 xg por mais 5 min. Ao sedimento foram adicionados 100µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) e os microtubos foram incubados por 10 min a uma temperatura de 100 °C. Em seguida, os microtubos foram resfriados por 5 min em gelo. Posteriormente, foram novamente centrifugados por 5 min a 13000 xg e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo microtubo para ser estocado a -20° C. O DNA obtido foi utilizado para todos os testes de PCR.

##### **4.5.2. PCR para detecção da presença dos genes *icaA* e *sasG***

A reação de PCR foi realizada para pesquisa dos genes *icaA* e *sasG*. Os pares de oligonucleotídeos, fragmentos gerados, ciclos de amplificação e referência para cada reação estão listados na Tabela 4. A mistura para cada reação, em um volume total de 25 µL, foi composta por 3µl (100 ng) de DNA, 2,5 µl de tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Biotools), 1 µM de cada um dos iniciadores e 1,5 U de Taq DNA

polimerase (Biotools). As reações foram realizadas em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha), de acordo com os ciclos descritos na Tabela 4. A análise dos produtos das reações de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5 X a 80 V. Ao gel de agarose (100 mL) foram adicionados 4 µl de solução de GelRed 1 X (Biotium). Após a eletroforese, o resultado foi visualizado com luz UV e a imagem capturada por um fotodocumentador (VilberLourmat). O marcador molecular de 100 pares de base (pb) e 1000 pb foram utilizados (Biotools) na eletroforese para os genes *sasG* e *icaA*, respectivamente.

**Tabela 4:** Sequências e referências dos iniciadores a serem utilizados na metodologia de PCR

Iniciadores	Sequência de oligonucleotídeos (5' - 3')	Amplicon (pb)	Ciclo	Referência
<i>icaA</i>	5' - AAAC TTGGT GCGG TTACAGG TCTGGGCTTGACGTTG - 3'	750	1	Martín-Lopes <i>et al.</i> , 2002
<i>sasG</i>	5' - GGGA ACTCAACAAGAGGCAG CAGAACGAGCTTTTCTAACC - 3'	311	2	Roche <i>et al.</i> , 2003

Ciclos: **1** - Desnaturação inicial: 95 °C por 4 minutos; 35 ciclos: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 90 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos; Extensão final: a 72 °C por 1 minuto; **2** - Desnaturação inicial: 94°C por 3 minutos; 30 ciclos: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão 72 °C por 1 minuto; Extensão final: a 72 °C por 1 minuto.

#### 4.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste do Qui-Quadrado para o cálculo do *p*-valor (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>). Foi utilizado o GraphPad Prism<sup>®</sup> 7 (La Jolla, California, USA) para construção de gráficos e considerada significância estatística quando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Descrição das amostras selecionadas

No presente estudo foram utilizadas 34 amostras de *S. aureus* pertencentes a diferentes linhagens clonais, as quais foram selecionadas de acordo com a susceptibilidade à meticilina e o perfil clonal. A tabela 5 mostra a distribuição das amostras de *S. aureus* utilizadas. As 34 amostras selecionadas foram majoritariamente (75%; 25/34) pertencentes à três clonalidades principais (USA1100, USA400 e USA800), comumente encontradas nos hospitais do Rio de Janeiro.

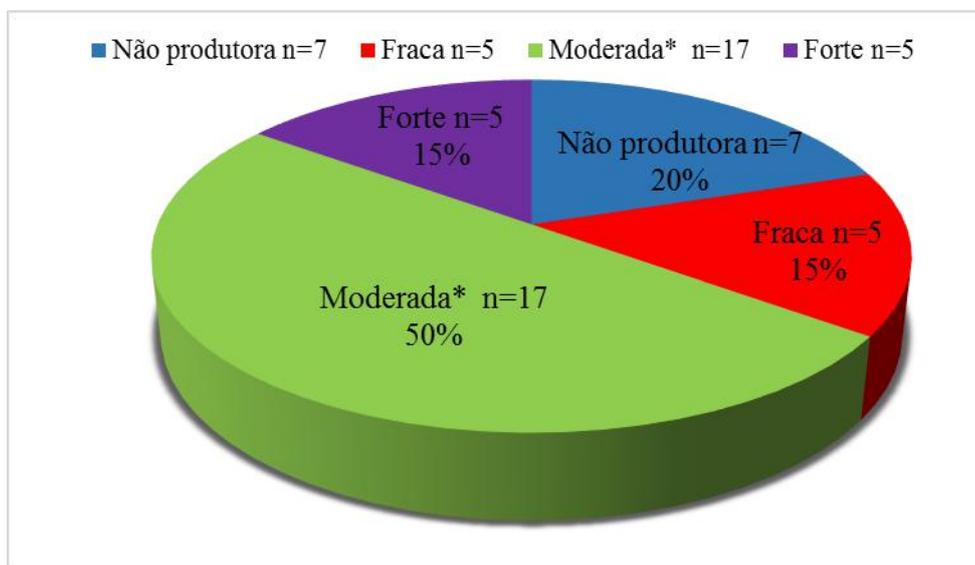
**Tabela 5:** Distribuição das 34 amostras de *Staphylococcus aureus* de acordo com a clonalidade, ST e susceptibilidade à meticilina

Clones/Complexo clonal (n)	Número de amostras		
	STs	MSSA	MRSA
USA400/CC1 (n=5)	1 (5)	3	2
USA800/CC5 (n=2)	5 (2)	na	2
USA1100/CC30 (n=18)	30 (15)	3	12
	484 (1)	na	1
	714 (1)	na	1
	2369 (1)	na	1
Esporádicos (n=9)	8 (1)	na	1
	30 (1)	1	na
	97 (1)	na	1
	121 (1)	1	na
	814 (1)	1	na
	1462 (2)	2	na
	2104 (2)	2	na

ST - "Sequence Type"/Sequência Tipo; CC - Complexo Clonal; MSSA - "Methicillin-Susceptible *S. aureus*"; MRSA - "Methicillin-Resistant *S. aureus*"; na - Não aplicável.

## 5.2. Produção de biofilme por amostras de *S. aureus pvl* +

As 34 amostras foram analisadas quanto a produção do biofilme a partir do micrométodo quantitativo. Dentre elas, apenas 5 (15%) amostras não foram capazes de produzir biofilme em placas de poliestireno contendo TSB suplementado com 1% de glicose, sendo uma amostra caracterizada como MSSA e quatro como MRSA tipo IV. Além disso, a maior parte das amostras (17/34; 56%) foi classificada como produtora moderada de biofilme, conforme mostra a figura 7. Ao avaliar os valores absolutos da  $DO_{492nm}$ , duas amostras da linhagem USA400, uma MSSA e outra MRSA, apesar de terem sido classificadas como produtoras moderadas de biofilme, apresentaram  $DO_{492nm} \geq 1,5$ , sendo então classificadas como produtoras moderadas/fortes, sendo incluídas no grupo das amostras fortes produtoras de biofilme ( $DO_{492nm} \geq 1,5$ ). Além disso, o valor médio das  $DO_{492nm}$  das amostras que foram produtoras de biofilme, ao todo 29, mostrou que aquelas pertencentes à linhagem USA400 foram predominantemente fortes produtoras de biofilme ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ), como mostra a Tabela 6.



**Figura 7:** Distribuição das 34 amostras de *Staphylococcus aureus pvl* + de acordo com a classificação da produção do biofilme. \* Duas amostras que foram consideradas moderadas/ fortes produtoras no anexo 1, por apresentarem  $DO_{492nm} \geq 1,5$  foram transferidas para o grupo de fortes produtoras, portanto o gráfico acima leva em consideração essa classificação.

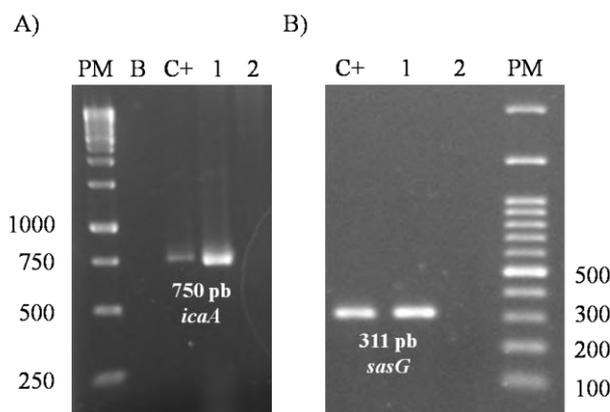
**Tabela 6:** Valor médio das DO<sub>492</sub> de 29 amostras de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilme em relação com as diferentes linhagens clonais

Clonalidade (n)	DO <sub>492nm</sub> (média) *	Desvio Padrão
USA1100 (16)	0,9888	0,2389
USA400 (5)	1,8453 <sup>a</sup>	0,2223
Clones Esporádicos (8)	1,3502	0,2392

\* Amostras com DO<sub>492</sub> ≥ 1,5 foram consideradas como fortes produtoras de biofilme; <sup>a</sup>*p*-valor - *p* ≤ 0,05.

### 5.3. Produção de biofilme por amostras de *S. aureus* e relação com os genes *icaA* e *sasG* e susceptibilidade à meticilina

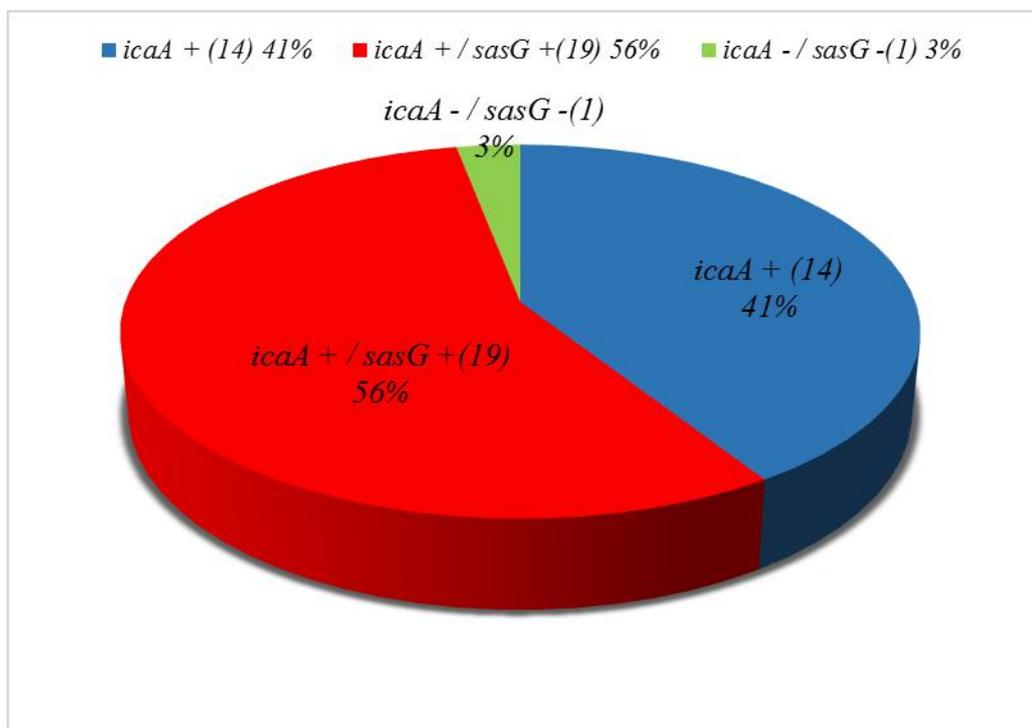
A detecção dos genes *icaA* e *sasG*, relacionados à produção de biofilme, pode ser visualizada na Figura 8.



**Figura 8:** **A)** Eletroforese em gel de agarose para visualização do fragmento amplificado referente ao gene *icaA* em amostras de *Staphylococcus aureus* (750 pb). **B)** Eletroforese em gel de agarose para visualizaçãodo fragmento amplificado referente ao gene *sasG* (311 pb) em amostras de *Staphylococcus aureus*. B – Branco; C+ - Controle positivo; 1 – amostra clínica positiva; 2 – amostra clínica negativa; PM – Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

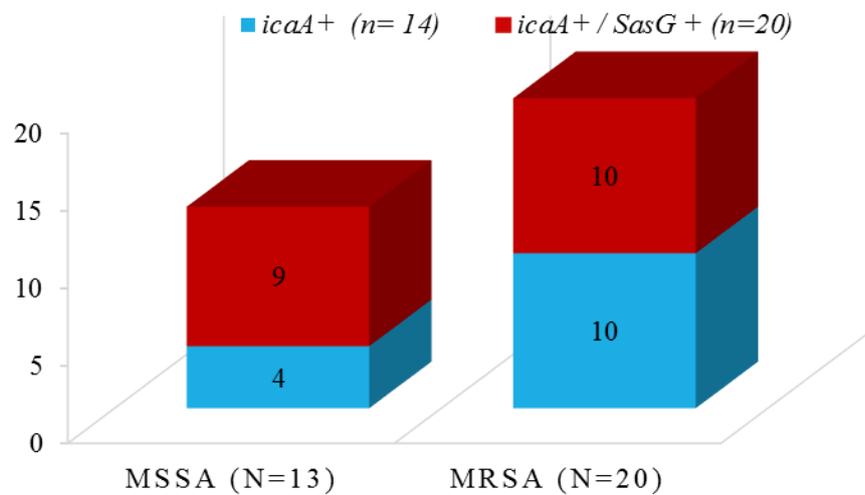


Todas as amostras testadas com exceção de uma, foram positivas para o gene *icaA*. Dentre elas, 14 (41%) foram positivas somente para o gene *icaA*, enquanto 19 (56%) amostras foram carreadoras dos genes *icaA* e *sasG*, simultaneamente. Nenhuma amostra apresentou somente o gene *sasG* (Figura 9).



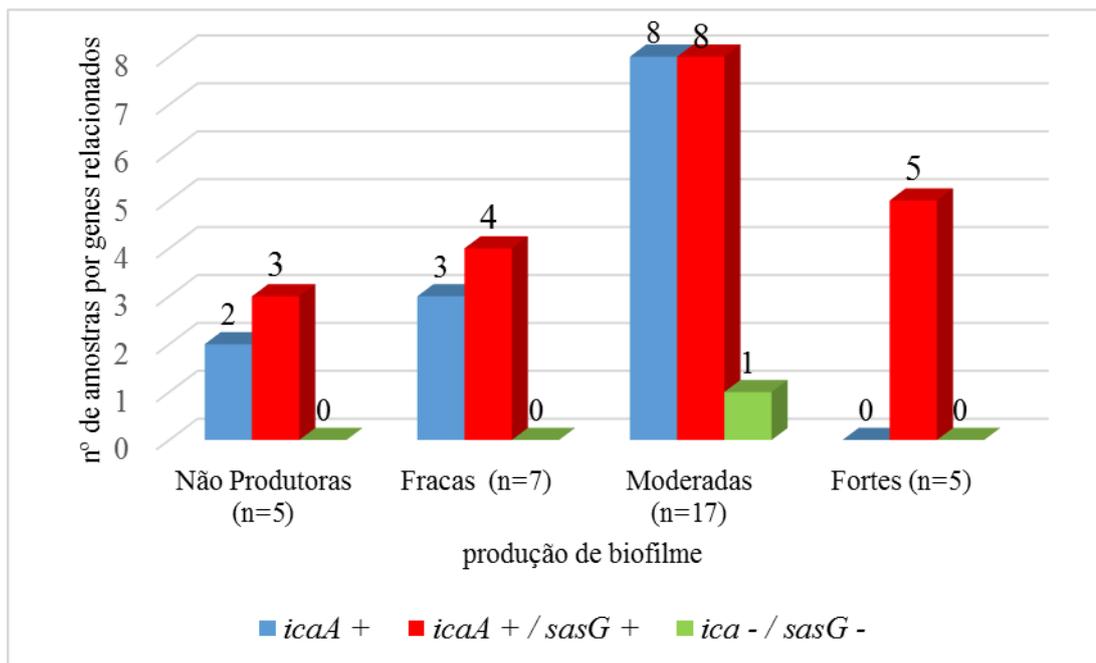
**Figura 9:** Distribuição das 34 amostras de *Staphylococcus aureus pvl* positivas em relação a presença dos genes *icaA* e *sasG*.

Dentre as 13 amostras MSSA, 4 (30,8%) foram positivas somente para o gene *icaA*, enquanto 9 (69,2%) foram positivas para ambos os genes, *icaA* e *sasG*. Entre as 20 amostras MRSA que foram positivas para os genes de virulência, 10 (50%) foram positivas somente para o gene *icaA* e 10 (50%) foram *icaA* e *sasG* positivas. A figura 10 mostra a relação entre a presença dos genes *icaA* e *sasG* e a susceptibilidade à meticilina em amostras de *S. aureus*. Essa relação é importante, já que a literatura aponta diferenças na formação do biofilme entre MSSA e MRSA, podendo estar relacionado com os genes de virulência.



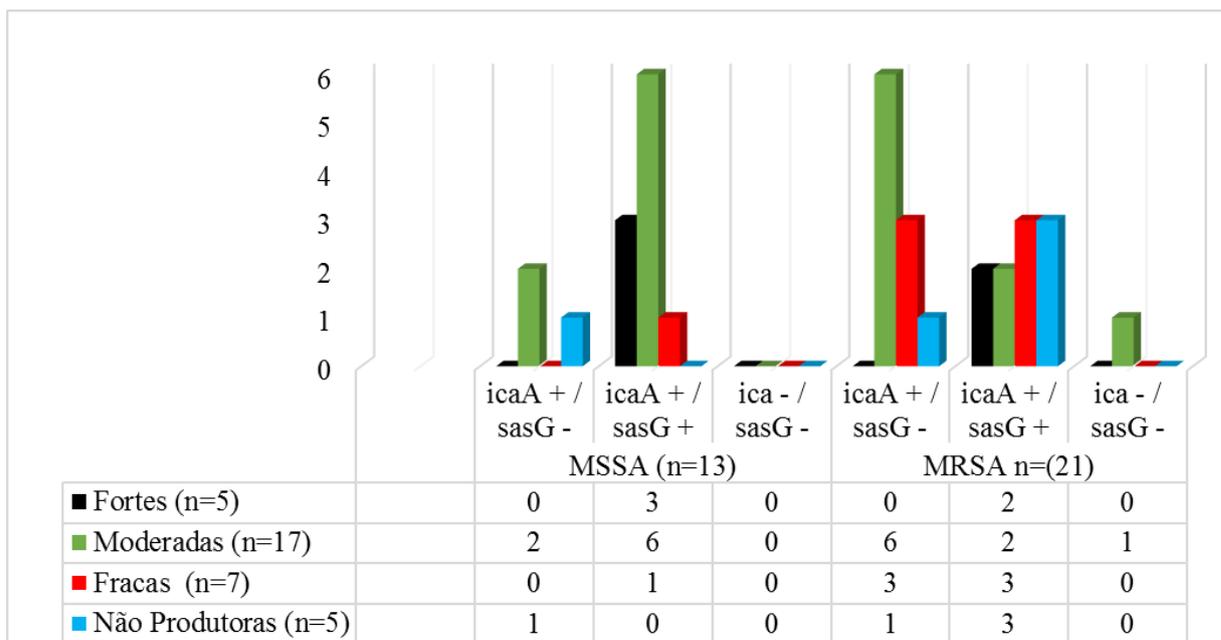
**Figura 10:** Distribuição das amostras MSSA e MRSA em relação a presença dos genes *icaA* e *sasG*.

A análise da produção de biofilme em relação a presença dos genes relacionados mostrou que entre as 5 amostras não produtoras, todas apresentaram o gene *icaA*, sendo que destas, 3 apresentaram também o gene *sasG*. Dentre as 7 fracas produtoras, todas foram *icaA* positivas e apenas 4 foram positivas para o gene *sasG*. Dentre as 17 moderadas, 16 amostras foram *icaA* positivas e dentre elas 8 foram positivas também para o gene *sasG*. 1 amostra (1342, ver anexo 1) classificada como moderada foi negativa para ambos os genes. Amostras forte produtoras apresentaram ambos os genes. Tais diferenças entre produção do biofilme e a presença dos genes relacionados não foi estatisticamente significativa (Figura 11).



**Figura 11:** Relação entre produção de biofilme e a presença de genes relacionados em 34 amostras de *Staphylococcus aureus pvl+*.

Em relação à susceptibilidade à metilina, amostras MSSA foram predominantemente produtoras moderadas de biofilme (8/13; 62%), sendo seis destas positivas para ambos os genes *icaA* e *sasG* (Figura 12). Além disso, três amostras MSSA associadas a infecções da corrente sanguínea foram fortes produtoras de biofilme. Dentre as amostras MRSA, a maioria foi classificada como produtora fraca ou moderada de biofilme (15/21; 71%), apesar da presença de ambos os genes em onze amostras. Tais diferenças entre amostras MSSA e MRSA não foram estatisticamente significativas.



**Figura 12:** Relação entre susceptibilidade à meticilina, produção do biofilme e genes relacionados em 34 amostras de *Staphylococcus aureus pvl+*.

#### 5.4. Relação entre as diferentes clonalidades e a produção do biofilme e genes relacionados

A relação entre a clonalidade das amostras de *S. aureus pvl+* e a produção do biofilme e presença dos genes *icaA* e *sasG* encontra-se descrita na Tabela 7.

As amostras USA1100/CC30 foram em sua maioria (16/18; 89%) produtoras de biofilme fraco ou moderado. Dentre elas, 10 apresentaram-se positivas somente para o gene *icaA* (62,5%), enquanto 5 foram positivas para ambos os genes. Duas amostras não foram capazes de produzir biofilme, apesar de apresentarem o gene *icaA*. Além disso, 1 amostra que produziu biofilme moderado e pertencente a linhagem 1100/CC30 não apresentava os genes *icaA* e *sasG*. Entre as amostras USA400/CC1, todas foram fortes produtoras de biofilme ( $DO_{492nm} \geq 1,5$ ), apresentando ambos os genes. Contrariamente, apesar de serem positivas para os genes *icaA* e *sasG*, as 2 amostras da clonalidade USA800/CC5 não foram produtoras de biofilme. Entre as amostras pertencentes aos clones esporádicos, a maioria (7/9; 78%) foi produtora moderada de biofilme, estando os genes *icaA* e *sasG* associados a 71% destas amostras (Tabela 7).

**Tabela 7:** Relação entre clonalidade, produção de biofilme e presença dos genes *icaA* e *sasG* em 34 amostras de *Staphylococcus aureus pvl +*

Classificação/ genes associados (n/% de amostras)	Clones (n)			
	USA1100/CC30 (18)	USA400/CC1 (5)	USA800/CC5 (2)	Esporádicos*(9)
<b>Fraco (7/20%)</b>		-	-	
<i>icaA +/sasG -</i>	3	-	-	-
<i>icaA +/sasG +</i>	3	-	-	1
<b>Moderado (17/50%)</b>		-	-	
<i>icaA+/sasG -</i>	7	-	-	2
<i>icaA +/sasG +</i>	2	-	-	5
<i>icaA -/sasG -</i>	1	-	-	-
<b>Forte (5/15%)</b>	-		-	-
<i>icaA+/sasG -</i>	-	-	-	-
<i>icaA +/sasG +</i>	-	5	-	-
<b>Não Produtor (5/15%)</b>		-		
<i>icaA+/sasG-</i>	2	-	-	-
<i>icaA/sasG +</i>	-	-	2	1

ST - "Sequence Type"/Sequência Tipo; \* STs variados (8, 30, 97, 121, 814, 1462, 2104).

### 5.5. Concentração Mínima Inibitória (CMI) em meio TSB suplementado com 1% de glicose e modulação antimicrobiana na formação do biofilme

Para avaliar a modulação dos antimicrobianos oxacilina e vancomicina na produção do biofilme, 20 amostras foram selecionadas de acordo com a clonalidade: 8 amostras relacionadas à clonalidade USA1100/CC30, 4 relacionadas a USA400/CC1, 2 a USA800/CC5 e 6 representantes de clones esporádicos. Tais amostras foram submetidas à microdiluição em caldo TSB acrescido de 1% de glicose para determinação da Concentração Mínima Inibitória em condições similares as utilizadas para a análise de formação do biofilme. A Tabela 8 relaciona as diferentes amostras com seus respectivos valores de CMI para oxacilina e vancomicina, incluindo os valores encontrados por Chamon e colaboradores (2015), em meio Mueller Hinton.

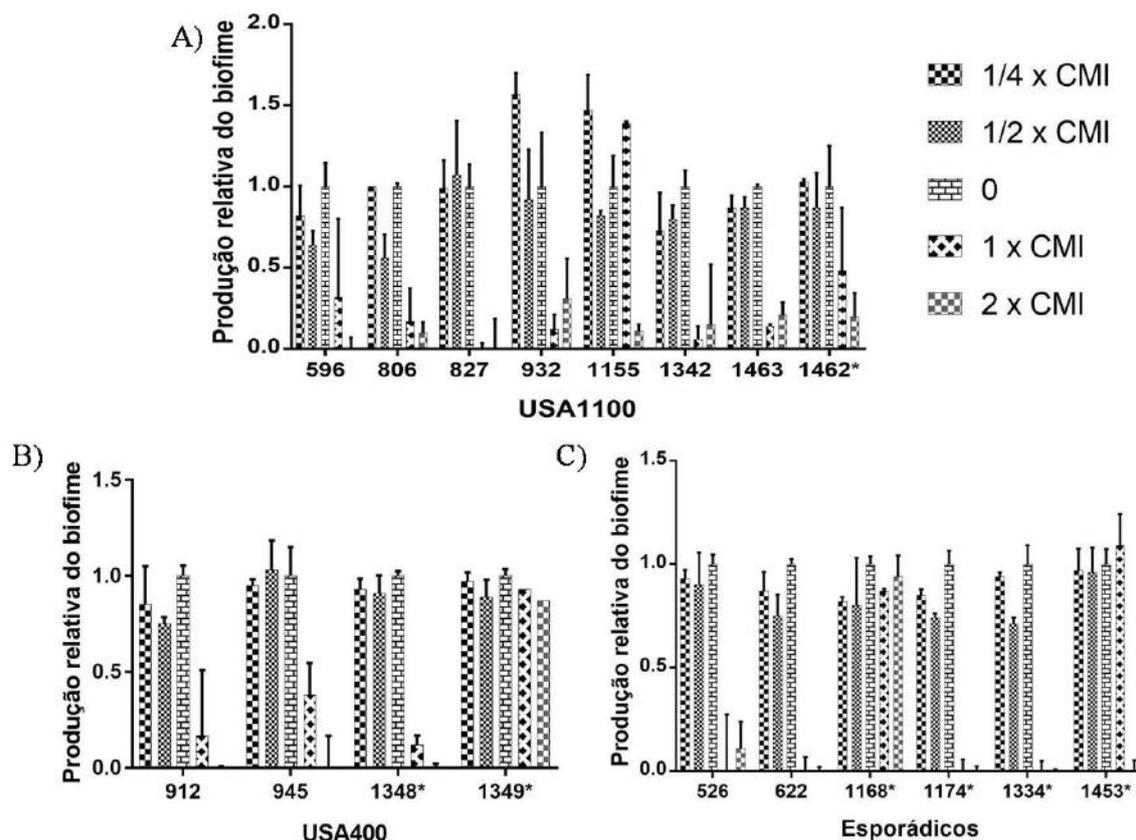
**Tabela 8:** Concentrações Mínimas Inibitórias das 20 amostras *Staphylococcus aureus pvl+*

Clones/ Número da amostra	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Caldo MH <sup>a</sup>		Caldo TSB + 1% glicose	
	OXA	VAN	OXA	VAN
<b>USA1100/CC30</b>				
596	4	2	1	1
806	2	1	1	1
827	1	1	1	1
932	0,5	1	2	1
1155	8	1	2	1
1342	8	4	2	1
1462*	2	2	0,25	1
1463	4	1	2	1
<b>USA400/CC1</b>				
912	16	1	32	2
945	16	1	8	1
1348*	<0,25	1	0,25	1
1349*	<0,25	1	0,25	1
<b>USA800/CC5</b>				
553	32	1	4	1
1213	4	1	8	0,5
<b>Esporádicos</b>				
526	8	1	4	0,5
622	8	1	16	1
1168*	1	1	0,25	0,25
1174*	1	1	0,25	1
1334*	1	1	0,25	1
1453*	<0,25	1	0,25	1

CMI - Concentração Mínima Inibitória; \* Amostras MSSA; MH – Mueller Hinton.<sup>a</sup>CMI determinada previamente por Chamon *et al.*, 2015.

De acordo com a CMI de cada amostra, concentrações  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 e 2 vezes a CMI foram utilizadas para avaliar a modulação da oxacilina e vancomicina na produção do biofilme por estas amostras. De acordo com a Figura 13, que representa a modulação relativa das concentrações de vancomicina na formação do biofilme das amostras pertencentes às diferentes linhagens clonais, é possível observar que concentrações sub-inibitórias deste antimicrobiano ( $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  vezes a CMI), de maneira geral, não foram

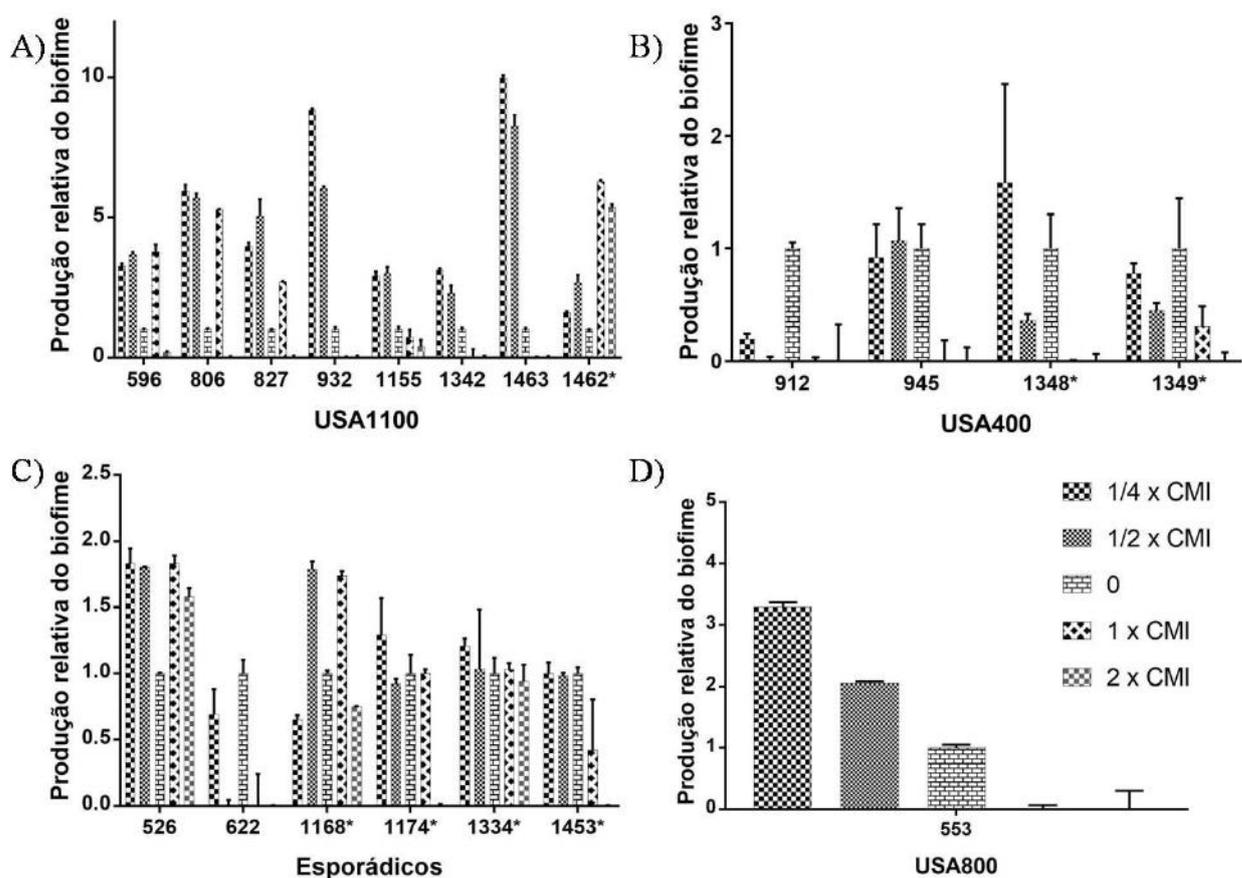
capazes de estimular a formação do biofilme para as amostras de diferentes linhagens clonais, exceto para as amostras 932 e 1155 (USA1100/CC30/MRSA) em  $\frac{1}{4}$  da CMI. A amostra 1155 foi isolada de secreção óssea, e a amostra 932 foi obtida de *swab* nasal. Como as amostras pertencentes a linhagem USA800 não foram capazes de modular o biofilme e por serem não produtoras não constam nos gráficos da Figura 13.



**Figura 13:** Modulação relativa da produção do biofilme na presença de diferentes concentrações de vancomicina em amostras de *Staphylococcus aureus*. **A)** Amostras USA1100 e relacionadas; **B)** Amostras USA400; **C)** Clones esporádicos; \* Amostras MSSA. 0 – ausência de antimicrobiano.

Em relação a modulação relativa da oxacilina em amostras de *S. aureus pvl* positivas, foi possível observar que para todas as amostras USA1100/CC30 testadas, independente da resistência à meticilina/oxacilina, houve um aumento na produção do biofilme nas concentrações de  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  vezes a CMI, tendo esta modulação variado de 1,6 a 10 vezes e 2 a 8 vezes mais para as respectivas concentrações. O mesmo efeito pôde ser observado em uma amostra MRSA pertencente à clonalidade USA800/CC5 para as mesmas concentrações, tendo esta amostra passado a expressar o biofilme. A amostra

526, relacionada ao clone USA300/ST8, apresentou uma maior produção do biofilme em todos os testes contendo oxacilina. Para as demais amostras, esta modulação relativa variou, não tendo sido relacionada com a clonalidade ou resistência à metilina, embora três amostras MSSA, 1168, 1174 e 1334, isoladas de fragmento ósseo, infecção de pele e tecido mole e sangue, respectivamente, tenham aumentado a produção do biofilme em  $\frac{1}{2}$  e 1 vez as suas CMIs para a amostra 1168 e em  $\frac{1}{4}$  para as amostras 1174 e 1334 (Figura 14). As amostras da linhagem USA400 não apresentaram modulação.



**Figura 14:** Modulação relativa na produção do biofilme na presença de diferentes concentrações de oxacilina em amostras de *Staphylococcus aureus*. **A)** Amostras USA1100 e relacionadas; **B)** Amostras USA400; **C)** Clones esporádicos; **D)** Amostra USA800; \*Amostras MSSA

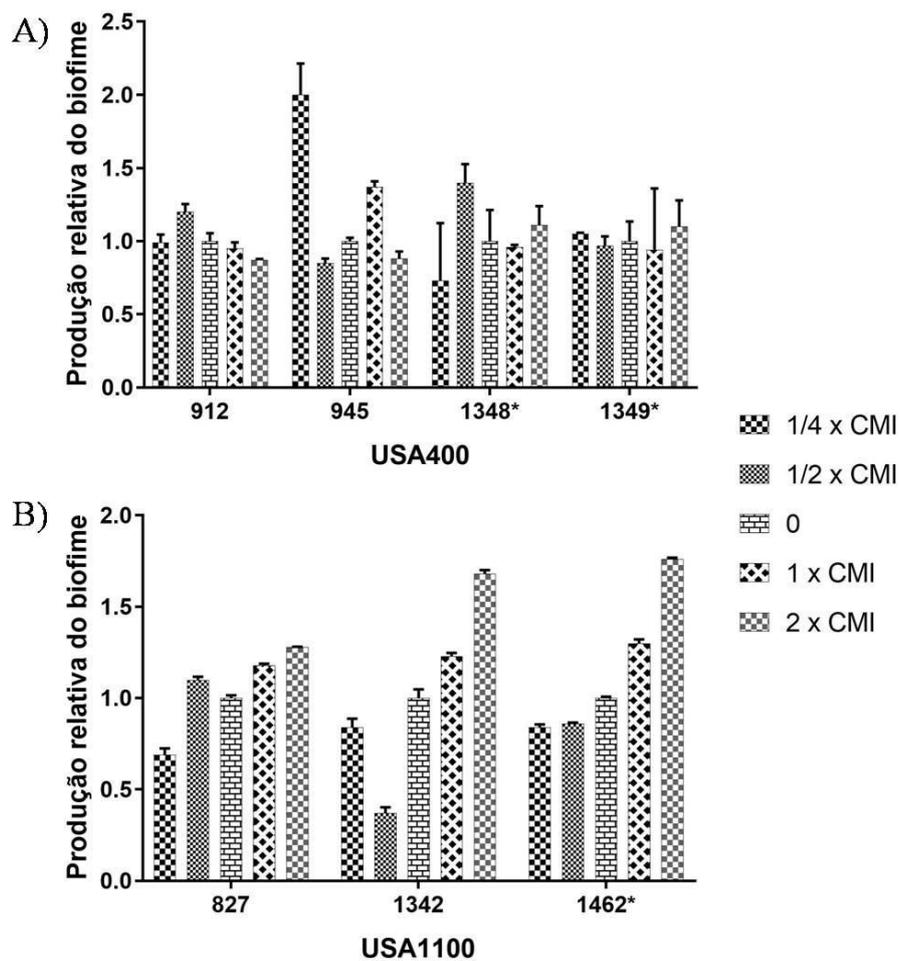


## 5.6. Modulação antimicrobiana de oxacilina e vancomicina no biofilme pré-formado

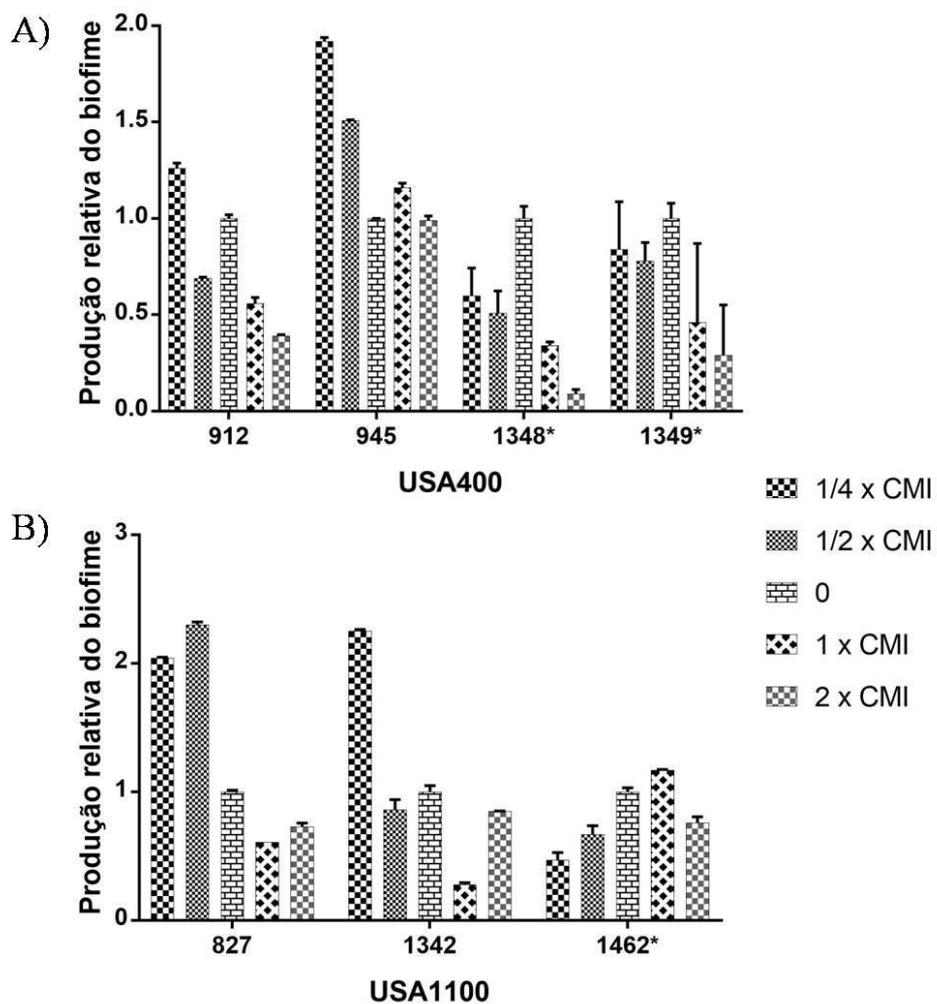
Para avaliar a modulação relativa da oxacilina e da vancomicina no biofilme pré-formado, amostras que fortes produtoras (912, 945, 1348 e 1349), pertencentes a linhagem USA400 e amostras aleatórias pertencentes à linhagem USA1100, com valores de DO elevados (>1.0) foram selecionadas (827, 1342 e 1462).

Para vancomicina, três amostras USA400 (912, 945 e 1348) apresentaram modulação do biofilme pré-formado, onde a produção relativa aumentou em até duas vezes para a amostra 945, proveniente de colonização nasal, em  $\frac{1}{4}$  x CMI, como pode ser observado na Figura 15 A. Além disso, o biofilme desta amostra aumentou quando na presença de 1 x a CMI. Já para a amostra 1348 MSSA, isolada de sangue, concentrações  $\frac{1}{2}$  x CMI e 2 x CMI foram capazes de aumentar a produção relativa do biofilme, em até 1,5 vezes. Para as amostras USA1100, o efeito modulatório da vancomicina foi melhor observado entre as amostras 1342 (sangue) e 1462 (infecção de pele) nas concentrações de 1 e 2 vezes CMI das amostras, com a produção relativa do biofilme aumentando em até 1,6 vezes em relação a condição sem o antimicrobiano (Figura 15 B).

Para oxacilina, amostras MRSA apresentaram um aumento na produção relativa no biofilme previamente formado, como mostra a Figura 16. Entre amostras USA400, a amostra 945 apresentou efeito modulatório da oxacilina de  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  e 1 vez o CMI. Já entre amostras USA1100, os efeitos modulatórios no biofilme pré-formado foram melhor observados nas concentrações 1 e 2 vezes o CMI das amostras 827, 1342 e 1462 mesmo para a amostra MSSA. Este efeito modulatório, entretanto, ao contrário das demais amostras que foram moduladas de maneira a aumentar a expressão do biofilme, ocorreu de maneira negativa, diminuindo, portanto, a expressão do biofilme para estas amostras.



**Figura 15:** Modulação da vancomicina no biofilme pré-formado de amostras (A) USA400 e (B) USA1100. \*Amostras MSSA



**Figura 16:** Modulação da oxacilina no biofilme pré-formado de amostras (A) USA400 e (B) USA1100. \*Amostras MSSA

## 6. DISCUSSÃO

*S. aureus* é um dos patógenos de maior prevalência em infecções relacionadas a cuidados médicos, tanto de origem hospitalar quanto comunitária (Rosenthal *et al.*, 2008; David e Daum, 2010). O sucesso deste microrganismo em causar infecções deve-se a sua habilidade de expressar diversos fatores de virulência, o que favorece a sua adesão e invasão nos tecidos, além de evadir do sistema imune do hospedeiro (Kubica *et al.*, 2008; Lambris, Ricklin e Geisbrecht, 2008). A PVL é uma leucotoxina formadora de poros na membrana de células susceptíveis, como PMNs, monócitos e macrófagos (Prevóst *et al.*, 1995; Kaneko e Kamio, 2004; Jayasinghe e Bayley, 2005). Amostras de *S. aureus* que carregam os genes da PVL apresentam maior potencial virulento (Gillet *et al.*, 2002; Vandenesch *et al.*, 2003), podendo causar infecções graves, que requerem uma antibioticoterapia mais agressiva e prolongada (Genestier *et al.*, 2005; Damasco *et al.*, 2012). Estas amostras também podem estar relacionadas com o desenvolvimento de pneumonia necrosante (Labandeira-rey *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2008; Ra *et al.*, 2012) e doenças de pele e tecidos moles (Casey, Lambert e Elliot 2007; Kubica *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2012; Buetti *et al.*, 2016). Além de exotoxinas, como a PVL, amostras de *S. aureus* podem formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, o que acarreta na persistência da infecção, além da dificuldade na eliminação da mesma (Archer, *et al.* 2011; Mirani, e Jamil, 2011).

No presente estudo, 34 amostras de *S. aureus pvl* positivas previamente caracterizadas quanto a resistência antimicrobiana, presença de genes de virulência e linhagem clonal (Chamon *et al.*, 2015) foram selecionadas para avaliação da produção do biofilme e presença de genes relacionados, como *icaA* e *sasG*, além do efeito de concentrações crescentes de oxacilina e vancomicina na produção relativa do biofilme e no desprendimento ou aumento do biofilme pré-formado.

Dentre as amostras avaliadas, 18 eram da linhagem USA1100/ST30/CC30, cinco eram USA400/ST1/CC1, duas USA800/ST5/CC5, uma USA300/ST8/CC8 e oito estavam associadas a clones esporádicos, e foram isoladas em hospitais da cidade do Rio de Janeiro (Schuenck *et al.*, 2012; Cavalcante *et al.*, 2014). No Brasil, a clonalidade USA1100 tem sido a mais frequentemente relacionada com amostras PVL positivas (Rozembaum *et al.*, 2009; Schuenck *et al.*, 2012; Chamon *et al.*, 2015), assim como em outros países da América Latina, como Uruguai (Benoit *et al.*, 2008; Pardo *et al.*, 2013) e Argentina (Fernandez *et al.*, 2013). Contudo, poucos são os estudos que tenham

avaliaram a produção de biofilme em amostras carreadoras dos genes da *pvl* (Prakash *et al.*, 2016; Rahimi *et al.*, 2016), principalmente no que diz respeito a amostras pertencentes à esta linhagem clonal. Entretanto, estudos sobre a formação do biofilme entre amostras USA300/ST8/CC8 e USA400/ST1/CC1 tem sido realizados, independentemente da relação com a presença dos genes da *pvl* (Kaplan, *et. al.*, 2012; King, *et. al.*, 2016; Mlynek, *et. al.*, 2016). O biofilme é um fator de virulência que pode comprometer o tratamento ou agravar o estado clínico dos pacientes, principalmente imunossuprimidos, o que contribuiria para a severidade de infecções causadas por amostras produtoras da PVL.

O presente estudo caracterizou fenotipicamente a formação do biofilme entre as amostras *S. aureus pvl* positivas. A maior parte delas foi capaz de produzir biofilme em placas de poliestireno, quando crescidas em meio TSB acrescido de 1% de glicose. Outros estudos realizados indicam que esta condição de crescimento é determinante para a produção do biofilme entre amostras de *S. aureus* (Stepanovic *et al.*, 2007; Vasu, *et. al.*, 2014).

Em relação às linhagens clonais, nosso estudo mostrou que amostras pertencentes à linhagem USA400/ST1/CC1 foram fortes produtoras de biofilme, em comparação com as amostras de outras linhagens ( $p$ -valor  $\leq 0,005$ ). King, e colaboradores (2016), ao analisarem uma coleção de amostras dos Estados Unidos de diferentes linhagens clonais de *S. aureus* (USA100, USA200, USA300, USA400 e USA600), obtiveram resultados semelhantes ao deste estudo para a linhagem USA400, que exibiu esta capacidade de ser forte formadora de biofilme.

Dentre as amostras não produtoras, duas amostras eram relacionadas à clonalidade USA800/ST5/CC5. Estudos recentes demonstram que amostras pertencentes ao complexo clonal (CC) 5 produzem biofilmes que variam de moderado a forte (Vanhommerig, *et al.*, 2014; Naicker, *et. al.*, 2016), contrariamente ao encontrado no presente estudo. Entretanto, um viés do presente estudo é que apenas duas amostras pertencentes a este CC foram avaliadas, o que limita a interpretação dos resultados. Em relação às amostras USA1100/ST30/CC30, em sua maioria, produtoras moderadas de biofilme, não foram encontrados estudos que corroborem nossos achados, especialmente quando se trata de amostras carreadoras dos genes da *pvl*. Dessa forma, este é o primeiro estudo que avaliou uma coleção de amostras de *S. aureus pvl* positivas pertencentes a diferentes linhagens clonais, incluindo a USA1100/ST30/CC30, quanto a formação de biofilme.

O biofilme bacteriano tem sido estudado a fim de melhor compreender o seu papel na virulência das amostras bacterianas. Diferentes genes podem estar relacionados a esta produção, como o *operon icaADBC* e o gene *sasG* (Savolainen *et al.*, 2001; Corrigan *et al.*, 2007; Merino *et al.*, 2009; O'Neill, Humphreys e O'gara, 2009; Arciola, Baldassarri e Montanaro, 2015). Dessa forma, a formação do biofilme em amostras de *S. aureus* pode ser caracterizada como *ica*-dependente, quando o *operon icaA* e a PIA encontram-se diretamente relacionado na formação deste biofilme, ou *ica*-independente, quando outras moléculas auxiliam na formação e maturação da matriz extracelular do biofilme (Corrigan *et al.*, 2007). No presente estudo, todas as amostras, exceto uma, foram positivas para o gene *icaA*, independente da formação do biofilme e da clonalidade. Entretanto, 19 (56%) das amostras também foram positivas para o gene *sasG*. A presença dos genes *ica* é relatada na literatura relacionada tanto para amostras produtoras como não produtoras de biofilme em cepas de *S. epidermidis* (Angeles Argudín *et al.*, 2015). Sabemos ainda que o *operon icaADBC* de *S. aureus* e *S. epidermidis* são similares e relaciona-se a presença desse operon em cepas *Staphylococcus spp.* com a capacidade de formação do biofilme (Arciola *et al.*, 2001; Namvar, *et al.*, 2013). Contudo, no presente estudo, a presença de ambos os genes não pôde ser relacionada com a formação do biofilme, já que de acordo com os resultados do nosso estudo, duas amostras da linhagem USA1100/CC30 não foram capazes de produzir biofilme, apesar de apresentarem o gene *icaA*. Também, apesar de serem positivas para os genes *icaA* e *sasG*, as duas amostras da clonalidade USA800/CC5 não foram produtoras de biofilme em placas de poliestireno. Por outro lado, uma amostra que foi produtora moderada de biofilme não apresentou os genes *icaA* e *sasG*. É interessante é que entre as amostras USA400/CC1, fortes produtoras de biofilme, todas apresentaram ambos os genes. Dessa forma, no presente estudo, a presença de ambos os genes não pôde ser relacionada com a formação do biofilme, tendo em vista que amostras não produtoras foram positivas para os mesmos, assim como amostras biofilme positivas não apresentavam os genes relacionados a ele, apesar de amostras USA400/ST1/CC1, apresentando ambos os genes, terem sido caracterizadas como fortes produtoras de biofilme.

A matriz extracelular que envolve o biofilme tem sido estudada como uma barreira para a penetração dos antimicrobianos administrados. Dessa forma, os microrganismos encontrados nessa comunidade bacteriana, não receberão as doses antimicrobianas ideais, capazes de comprometer a viabilidade celular, levando à morte,

no caso de antimicrobianos bactericidas ou impedindo a multiplicação celular, no caso de bacteriostáticos (Singh, *et al.*, 2010; Archer, *et al.*, 2011; Lázaro-Díez, *et al.*, 2016). Dessa forma, o presente estudo analisou o efeito de diferentes concentrações de oxacilina e vancomicina, em diferentes linhagens clonais de *S. aureus*. Para isso, a concentração mínima inibitória (CMI) para oxacilina e vancomicina foi determinada em meio TSB contendo 1% de glicose, condição ideal para a formação do biofilme entre amostras de *S. aureus* (Stepanovic *et al.*, 2007; Vasu, *et al.*, 2014). Os resultados se assemelham aos encontrados por Chamon e colaboradores (2015) que determinou a CMI de acordo com os padrões propostos pelo CLSI.

Entre as 34 amostras do presente estudo, 20 foram selecionadas aleatoriamente, pertencentes a diferentes linhagens clonais, para avaliar o efeito de concentrações  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 e 2 vezes a CMI de cada amostra. Dessa forma, foi possível verificar que amostras carreadoras da PVL, entre todas as linhagens clonais testadas (USA1100, USA400, USA800 e clones esporádicos) foram capazes de aumentar a produção relativa do biofilme na presença da oxacilina, sendo que as amostras USA1100 sofreram um maior efeito destas concentrações, aumentando a sua formação relativa em até 10 vezes a condição sem o antimicrobiano. Contudo, para a linhagem USA1100 na presença de vancomicina, somente duas amostras 932 e 1155 foram capazes de estimular a produção de biofilme e somente na concentração de  $\frac{1}{4}$  da CMI. Kaplan e colaboradores (2012) analisaram cepas de diferentes linhagens clonais (USA500, USA100 e USA300) e a formação do biofilme na presença de diferentes  $\beta$ -lactâmicos como metilicina, ampicilina, amoxicilina e cloxacilina, em concentrações abaixo do CMI. Os autores sugeriram que antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos são capazes de induzir a formação do biofilme, o que corrobora com nossos resultados. No presente estudo, a vancomicina não foi capaz de modular a expressão do biofilme da mesma forma que a oxacilina, não tendo impacto entre as amostras de diferentes linhagens clonais. Alguns autores descrevem um efeito inibitório ou ausência de efeito na formação do biofilme de *S. aureus* na presença de sub-CMIs de diferentes antimicrobianos, como a vancomicina. Entretanto, a maioria desses estudos são limitados por utilizarem apenas uma única cepa de *S. aureus* e testarem apenas uma concentração sub-inibitória, usualmente  $\frac{1}{2}$  de CMI (Carsenti-Etesse *et al.*, 1992; Carsenti-Etesse *et al.*, 1993; Frank *et al.*, 2007; Haddadin *et al.*, 2010). Dessa forma, os resultados obtidos para vancomicina parecem ser correspondentes com os encontrados na literatura, apesar da falta de dados comparativos. Assim mesmo, em nosso estudo foi observado algum efeito modulatório

na presença deste antimicrobiano para 2 amostras (932 e 1155) em  $\frac{1}{4}$  de CMI de vancomicina na formação do biofilme, demonstrando uma modulação cepa-dependente.

Alguns autores propõem que doses abaixo dos valores de CMI podem acarretar em um aumento ou diminuição da expressão do biofilme e de outros fatores de virulência (Gemmell, e Ford, , 2002; Katussevani, *et al.*, 2004; Stevens, , 2007; Otto, *et al.*, 2013). Um estudo recente realizado por Lázaro-Díez e colaboradores (2016) demonstrou que na presença de  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{16}$  CMI de ceftarolina era possível encontrar grande quantidade de células viáveis no biofilme, utilizando microscopia de transmissão, varredura e confocal, para visualização deste efeito. Este mesmo grupo utilizou PCR em tempo real para estudar o efeito do sub-CMI de ceftarolina na expressão de genes relacionados a virulência como o *icaA*, *agrA*, *sarA* e *sasF* em biofilme de amostras MRSA (Lázaro-Díez, *et al.*, 2016). Além disso, também foram avaliadas a composição do biofilme de duas cepas relacionadas ao ST5 e ST125. Segundo esse estudo a ceftarolina foi capaz de inibir a formação de biofilme, quando no seu valor de CMI, mas quando testado para concentrações sub-CMI tal fato não foi observado. Esse estudo aponta que a capacidade de modular a expressão do biofilme foi cepa-dependente. Além disso, as concentrações sub-CMI e o impacto da ceftarolina na expressão dos genes de virulência também foi cepa-dependente e teve valor significativo apenas nas concentrações de  $\frac{1}{4}$  MIC. O aumento da expressão dos fatores de virulência, como biofilme, pode ser um agravante no tratamento de infecções por cepas MRSA e diante disso é importante realçar a necessidade de manutenção efetiva de concentrações bactericidas dos antimicrobianos para evitar a modulação positiva do biofilme em infecções relacionadas a MRSA (Werth, *et al.*, 2014; Lázaro-Díez, *et al.*, 2016).

Embora não hajam estudos recentes em relação ao biofilme pré-formado, é importante investigar o comportamento dos antimicrobianos frente ao biofilme já existente. Já que alguns pacientes com próteses ou presença de cateter, por exemplo, podem apresentar o biofilme pré-formado e ser associado a uma infecção, sendo importante observar se a administração de determinado antimicrobiano, pode levar à uma piora do quadro clínico. No atual estudo, tanto a oxacilina como a vancomicina foram capazes de aumentar a expressão do biofilme pré-formado em todas as concentrações  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 e 2 da CMI das amostras classificadas como fortes produtoras (912, 945, 1348 e 1349) e amostras aleatórias pertencentes à linhagem USA1100 (827, 1342 e 1462). Somente a amostra 912 não foi capaz de aumentar a expressão do



biofilme na presença de oxacilina, em 2 vezes o valor da CMI (64 µg/mL). Diante desses resultados, se faz necessária a realização de mais experimentos, além de aumentar o número de amostras de diferentes linhagens clonais para consolidar o estudo da modulação no biofilme pré-formado. Sendo assim, torna-se necessário um aprofundamento maior nesse estudo, posteriormente, testando mais antimicrobianos e diferentes concentrações.

Este é o primeiro estudo que avaliou uma coleção de amostras de *S. aureus pvl* positivas pertencentes às linhagens clonais prevalentes na cidade do Rio de Janeiro, quanto a produção do biofilme e a modulação da formação do mesmo na presença de oxacilina e vancomicina, assim como a presença de genes relacionados. A co-existência de ambos fatores de virulência pode acarretar à uma piora do quadro clínico de pacientes, necessitando uma antibioticoterapia agressiva e prolongada. Entretanto, apesar de terem sido avaliadas 34 amostras, poucas amostras das linhagens USA400 e USA800 foram testadas, o que caracteriza uma limitação do nosso estudo. Desta forma, novas abordagens devem ser utilizadas para caracterizar a formação de biofilme e a modulação do mesmo em amostras pertencentes à diferentes linhagens de modo a avaliar o papel dos antimicrobianos na modulação deste fator de virulência. Além disso, estudos posteriores são necessários a fim de relacionar a expressão do gene da *pvl* com a expressão de genes relacionados à formação do biofilme, de modo a conduzir a um melhor entendimento dos efeitos regulatórios desta produção.

## 7. CONCLUSÕES

- Foi observado alta taxa de produção de biofilme entre as cepas pertencentes a linhagem USA400. Entretanto, não houve relação entre a produção de biofilme e a presença dos genes *icaA* e/ou *sasG*.
- Todas as amostras, exceto uma, dentre as 34 analisadas, foram positivas para o gene *icaA*, e 14 (41%) foram positivas somente para este gene, enquanto 19 (56%) foram carreadoras dos genes *icaA* e *sasG*, simultaneamente
- As concentrações mínimas inibitórias das 20 amostras selecionadas foram testadas para oxacilina e vancomicina na presença de TSB suplementado com glicose, sendo o CMI entre as amostras sensíveis (MSSA) menor em meio TSB acrescido de 1% de glicose do que em Muller-Hinton.
- Concentrações sub-inibitórias de oxacilina foram capazes de estimular a formação de biofilme, apesar de amostras USA1100 apresentarem um maior efeito modulatório.
- Para vancomicina, concentrações sub-inibitórias da CMI não modularam a formação do biofilme em qualquer das linhagens avaliadas.
- Amostras USA400 foram fortes produtoras de biofilme e quando submetidas a concentrações sub-inibitórias de oxacilina no biofilme pré-formado, foram capazes de aumentar a produção deste biofilme.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A.; Singh, K.P.; Jain, A. (2010). **Medical significance and management of staphylococcal biofilm**. *Fems Immunol Med Microbiol*, 58(2):147-160.
- Angeles Argudín, M., Vanderhaeghen, W., Vandendriessche, S., Vandecandelaere, I., Denis, O., Coenye, T. e Butaye, P. (2015). **Biofilm formation of *ica* operon-positive *Staphylococcus epidermidis* from different sources**. *Apmis*, 123(12), 1081-1089.
- Archer, G.L. (2000). ***Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci**. In: Principles and practice of infectious diseases, 8ed. Edited by Mandall, G.L.; Bennett, J.E.; Dollin, R. Churchill Livingstone, New York, EUA.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E. e Shirtliff, M. E. (2011). ***Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease**. *Virulence*, 2(5), 445-459.
- Arciola, C. R., Baldassarri, L. e Montanaro, L. (2001). **Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections**. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2151-2156.
- Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Ravaoli, S.; Montanaro, L. (2015). **Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects**. *Front Cell Infect Microbiol*. 5, 1-10.
- Arthur, M. e Courvalin, P. (1993). **Genetics and mechanisms of glycopeptides resistance in enterococci**. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(8), 1563-71.
- Atshan, S. S., Shamsudin, M. N., Lung, L. T. T., Ling, K. H., Sekawi, Z., Pei, C. P., e Ghaznavi-Rad, E. (2012). **Improved method for the isolation of RNA from bacteria refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm**. *Gene*, 494(2), 219-224.
- Banerjee, T., e Anupurba, S. (2012). **Colonization with vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains containing the *vanA* resistance gene in a tertiary-care center in north India**. *Journal of clinical microbiology*, 50(5), 1730-1732.
- Bannerman, T. L. e Peacock, S. J. (2007). ***Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci**. In: Manual Of Clinical Microbiology – 9th Edition. 390-410. Edited By: Murray, P.R; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Landry, M.J. e Pfaller, M.A. Washigton – Dc, Asm Press, Usa.
- Becker, K., Skov, R. L., e Von Eiff, C. (2015). ***Staphylococcus*, *micrococcus*, and other catalase-positive cocci**. In manual of clinical microbiology, eleventh edition (Pp. 354-382). American society of microbiology.
- Berla-Kerzhner E., Biber A., Parizade M., Taran D., Rahav G., Regev-Yochay G., Glikman D. (2016). **Clinical outcomes and treatment approach for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) infections in Israel**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1-10.
- Bernardo, K.; Pakulat, N.; Fleer, S.; Schnaith, A.; Hutermohlen, O.; Krut, O.; Muller, S. e Kronke, M.(2004). **Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression**. *Antimicrob Agents Chemother* , 48(2), 546-555.
- Blickwede, M.; Valentin-Weigand, P.; Rohde, M.; Schwarz S. (2004) **Effects of subinhibitory concentrations of florfenicol on morphology, growth, and viability of *Staphylococcus aureus***. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51(6):293-296.
- Boles, B.R. e Horswill, A.R. **Staphylococcal biofilm disassembly**. (2011). *Trends Microbiol.*, 19(9), 449-55. Brauner, J.; Hallin, M.; Deplano, A.; De Mendonça, R.; Nonhoff, C.; De Ryck, R.; Roisin, S.; Struelens, M.J. e Denis, O. (2013). **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones circulating in Belgium from 2005 to 2009: changing epidemiology**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32(5):613-620.
- Brooks, G.F.; Carrol, K.C.; Butel, J.S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A. (2012). **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25 ed. AMGH editora. Porto Alegre.
- Buetti, N. (2016). **National bloodstream infection surveillance in Switzerland 2008-2014: patterns and trends differ between University and community hospitals**. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016 Jun 28:1-8.

Caboclo, R.M.; Cavalcante, F.S.; Iorio, N.L.; Schuenck, R.P.; Olendzki, A.N.; Felix, M.J.; Chamon, R.C. e Dos Santos, K.R. (2013). **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the *usa400/st1* and *usa800/st5* SCCmec type iv and *usa100/st5* SCCmec type ii lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one.** Am J Infect Control, 41(3):E21-6. Doi: 10.1016/J.Ajic.2012.08.008.

Caiaffa-Filho, H.H.; Trindade, P.A.; Gabriela Da Cunha, P.; Alencar, C.S.; Prado, G.V.; Rossi, F. e Levin, A.S. (2013). **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia.** Diagn Microbiol Infect Dis, pii: S0732-8893(13)00263-0. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.024. [Epub ahead of print]

Carsenti-Etesse, H., Durant, J., Bernard, E., Mondain, V., Entenza, J. e Dellamonica, P. (1992). **Effect of subinhibitory concentrations of cefamandole and cefuroxime on adherence of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to polystyrene culture plates.** European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 11(8), 732-737.

Carsenti-Etesse, H., Durant, J., Entenza, J., Mondain, V., Pradier, C., Bernard, E. e Dellamonica, P. (1993). **Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin and teicoplanin on adherence of staphylococci to tissue culture plates.** Antimicrobial agents and chemotherapy, 37(4), 921-923.

Casey, A.L.; Lambert, P.A. e Elliot, T.S. (2007). **Staphylococci.** Int J Antimicrob Agents, 29 (Suppl. 3), S23-s32.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002b). **Public Health Dispatch: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania.** Morb Mortal Wkly Rep, 51, 902.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002a). ***Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States.** Morb Mortal Wkly Rep, 51, 565-567.

Cha, J.O.; Park, Y.K.; Lee Y.S; Chung, G.T. (2011). **In vitro biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones prevalent in Korea.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 70, 112-118.

Chambers, H.F. **Detection of methicillin-resistant Staphylococci.** (1993). Infect Dis Clin North Am, 7(2), 425-433.

Chambers, H.F. e De Leo, F.R. (2009). **Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era.** Nat Rev, 7(9), 629-641.

Chamon, R. C., Iorio, N. L. P., Cavalcante, F. S., Teodoro, C. R., De Oliveira, A. P. C., Maia, F., e Dos Santos, K. R. N. (2014). **Linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*: single and double mutations at the domain v of 23s rrna among isolates from a Rio De Janeiro hospital.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 80(4), 307-310.

Chamon, R. C., Iorio, N. L. P., Da Silva Ribeiro, S., Cavalcante, F. S., e Dos Santos, K. R. N. (2015). **Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates carrying the panton-valentine leukocidin genes from Rio de Janeiro hospitals.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 83(4), 331-334.

Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. L., Tenover, F. C., Downes, F. P. e Cardo, D. (2003). **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* investigative team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *van a* resistance gene.** N Engl J Med, 348(14), 1342-1347.

Christianson, S., G. R.; Golding, J.; Campbel e Mulvey, M. R. (2007). **Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J Clin Microbiol, 45, 1904-1911.

Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. (2015). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th Informational Supplement.** P. M100-S25.

Conlon, K.M.; Humphreys, H.; O'gara, J.P. **Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*.** (2002). FEMS Microbiol Lett. 216, 171-177.

Cooke F.J. e Brown N.M. (2010). **Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections.** Br Med Bull, 94: 215-27.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., e Greenberg, E. P. (1999). **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** Science, 284(5418), 1318-1322.

- Courvalin, P. **Vancomycin resistance in gram-positive cocci.** (2006). *Clin Infect Dis*, 42 (Suppl. 1), S25-S-34.
- Corrigan R.M., Rigby D., Handley P. e Foster T.J. (2007). **The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation.** *Microbiology*. 153(Pt 8):2435-46.
- 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.
- Crum, N.F.; Lee, R.U.; Thornton, S.A.; Stine, O.C.; Wallace, M.R.; Barrozo, C.; Keefer-Norris, A.; Judd, S. e Russel, K.L. (2006). **Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Am J Med*, 119(11), 943-951.
- Damasco PV, Cavalcante FS, Chamon RC, Ferreira DC, Rioja SS, Potsch MV, Pastura MP, Marques VD Castier MB, Marques EA, Santos KR. (2013). **The first case report of non-nosocomial healthcare-associated infective endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA400 in Rio de Janeiro, Brazil.** *Infection*. [Epub ahead of print].
- Damasco, P.V.; Chamon, R.C.; Barbosa, A.T.; Da Cunha, S.; Aquino, J.H.; Cavalcante, F.S. e Dos Santos, K.R.N. (2012). **Involvement of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* related to sequence type 25 and harboring *pvl* genes in a case of carotid cavernous fistula after community-associated sepsis.** *J Clin Microbiol*, 50(1), 196-198.
- David, M.Z.; Taylor, A.; Lynfield, R.; Boxrud, D.J.; Short, G.; Zychowski, D.; Boyle-Vavra, S. e Daum, R.S. (2013). **Comparing pulsed-field gel electrophoresis with multilocus sequence typing, *spa* typing, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, and PCR for Pantone-Valentine Leukocidin, *arcA*, and *opp3* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a U.S. Medical Center.** *J Clin Microbiol*, 51(3):814-819.
- De Araújo BE, Borchert Jm, Manhães PG, Ferreira FA, Ramundo MS, Silvacarvalho MC, Seabra AC, Victal SH, Sá Figueiredo AM. (2010). **A rare case of pyomyositis complicated by compartment syndrome caused by ST30-staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Am J Emerg Med*, 28(4):537.e3-6.
- De Miranda, O.P.; Silva-Carvalho, M.C.; Ribeiro, A.; Portela, F.; Cordeiro, R.P.; Caetano, N.; Vidal, C.F.L. e Figueiredo, A.M.S. (2007). **Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC*mecIV* that are related genetically to the *usa800* clone.** *Clin Microbiol Infect*, 13(12), 1165-1172.
- Deurenberg, R. H., e Stobberingh, E. E. (2009). **The molecular evolution of hospital-and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Current Molecular Medicine*, 9(2), 100-115.
- Dickinson, G. M. e Bisno, A. L. (1989). **Infections associated with indwelling devices: concepts of pathogenesis; infections associated with intravascular devices.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 597-601.
- Donlan, R.M. (2001). **Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process.** *Clin Infect Dis*. 33, 1387-92.
- Donlan, R. M., e Costerton, J. W. (2002). **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.** *Clin Microbiol Rev*. 15(2), 167-193.
- Dumitrescu, O.; Boisset, S.; Badiou, C.; Bes, M.; Benito, Y.; Reverdy, M.E.; Vandenesch, F.; Etienne, J. e Lina, G. (2007). **Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing pantone-valentine leukocidin.** *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4), 1515-1519.B
- Dumitrescu, O., Choudhury, P., Boisset, S., Badiou, C., Bes, M., Benito, Y. e Bowden, M. G. (2011).  **$\beta$ -lactams interfering with PBP1 induce pantone-valentine leukocidin expression by triggering *sarA* and *rot* global regulators of *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(7), 3261-3271.
- 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(3), 1008-1015.
- Faria, N.A.; Conceição, T.; Miragaia, M.; Bartels, M.D.; De Lencastre, H.; Westh, H. (2014). **Nasal carriage of methicillin resistant staphylococci.** *Microbial Drug Resist*. 20.

- Feng, Y.; Chen, C.J.; Su, L.H.; Hu, S.; Yu, J. e Chiu, C.H. (2008). **Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics**. Fems Microbiolog Rev, 32(1), 23-37
- Ferreira, D.C.; Frota, C.A.C.; Cavalcante, F.S.; Abad, E.D. e Santos, K.R.N. (2012). **Necrotizing fasciitis secondary to community pneumonia by panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Am J Respir Crit Care Med, 186(2):202-203.
- Fey, P.D.; Olson, M.E.(2010). **Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis***. Future Microbiol. Jun;5(6):917-33.
- Finch, R.; (2006). **Gram-positive infections: lessons learnt and novel solutions**. Clin Microbiol Infect, 12(Suppl. 8), 3-8.
- Fitzpatrick, F.; Humphreys, H. e O'gara, (2005). J.P. **Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates**. J. Clin. Microbiol., 43, 1973-1976.
- Frank, K. L., Reichert, E. J., Piper, K. E., e Patel, R. (2007). **In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates**. Antimicrob Agents and Chemother, 51(3), 888-895.
- Gemmell, C. G. e Ford, C. W. (2002). **Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50(5), 665-672.
- Genestier, A. L., Michallet, M. C., Prévost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S. e Vandenesch, F. (2005). ***Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils**. The Journal of clinical investigation, 115(11), 3117-3127.
- Geoghegan J.A., Corrigan R.M., Gruszka D.T., Speziale P., O'gara J.P., Potts J.R., Foster T.J. (2010). **Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus***. J Bacteriol. 192(21):566373.
- Gillet, Y.; Issartel, B.; Vanhems, P.; Fournet, J.C.; Lina, G.; Bes, M.; Vandenesch, F.; Piémont, Y., Brousse, N.; Floret, D. e Etienne, J. (2002). **Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for panton-valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients**. Lancet, 359(9308), 753-759.
- Gordon, R. J.; Lowy, F. D. (2008). **Pathogenesis Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection**. Clin Infect Dis., 46(5):350-359.
- Götz, F. (2002). ***Staphylococcus* and biofilms**. Mol Microbiol. 43, 1367-1378.
- Haddadin, R. N. S., Saleh, S., Al-Adham, I. S. I., Buultjens, T. E. J., e Collier, P. J. (2010). **The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms**. Journal Of Applied Microbiology, 108(4), 1281-1291.
- Heilmann, C. (2011). **Adhesion mechanisms of staphylococci**. In Bacterial Adhesion (pp. 105-123). Springer Netherlands.
- Herbert, S.; Barry, P. e Novick, R.P.(2001). **Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus***. Infect Immun, 69(5): 2996–3003.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., e Oguri, T. Fc Tenover. (1997). **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility**. J. Antimicrob. Chemother, 40, 135-34.
- Hiramatsu, K; Cui, L.; Kuroda, M.; Ito, T. (2001). **The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus***. Trends Microbiol, 9(10), 486-493.
- Holden, Mt.; Feil, E.J.; Lindsay, J.A.; Peacock, S.J.; Day, N.P.; Enright, M.C.; Foster, T.J.; Moore, C.E.; Hurst, L.; Atkin, R.; Barron, A.; Bason, N.; Bentley, S.D.; Chillingworth, C.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; Clark, L.; Corton, C.; Cronin, A.; Doggett, J.; Dows, L.; Feltwell, T.; Hance, Z.; Harris, B.; Hauser, H.; Holroyd, S.; Jagels, K.; James, K.D.; Lennard, N.; Line, A.; Mayes, R.; Moule, S.; Mungall, K.; Ormond, D.; Quail, M.A.; Rabinowitsch, E.; Rutherford, K.; Sanders, M.; Sharp, S.; Simmonds, M.; Stevens, K.; Whitehead, S.; Barrell, B.G.; Sprat, B.G. e Parkhill, J. (2004). **Complete genome of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance**. Proc Natl Acad Sci Usa, 101(26), 9786-91.

- Ichimiya, T., Takeoka, K., Hiramatsu, K., Hirai, K., Yamasaki, T., e Nasu, M. (1996). **The influence of azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro.** *Chemotherapy*, 42(3), 186-191.
- Ito, T.; Katayama, Y.; Asada, K.; Mori, N.; Tsutsumimoto, K.; Tiensatorn, 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(5), 1323-1336.
- IWG-SCC. (2016). **International Working Group on The Staphylococcal Cassette Chromosome Elements.** Disponível em: [www.sccmec.org](http://www.sccmec.org). Acesso em: 03/07/16.
- Iwatsuki, K.; Yamasaki, O.; Morizane, S. e Oono, T. (2006). **Staphylococcal Cutaneous Infections: Invasion, Evasion and Aggression.** *J Dermatol. Sci*, 42(3): 203-214.
- Jayasinghe, L. e Bayley, H. (2005). **The leukocidin pore: evidence for an octamer with four lukF subunits and four lukS subunits alternating around a central axis.** *Protein Sci*, 14(10), 2550-61.
- John, J.F. e Barg, N.L. (2004). *Staphylococcus aureus*. In: Hospital Epidemiology and Infection Control – 3th Edition. 443-470. Edited By: Mayhall, C.G. Philadelphia, Lippincott Williams e Wilkins, Usa.
- Kaneko, J. e Kamio, Y. (2004). **Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(5), 981-1003.
- Kaplan, Jeffrey B, Era A. Izano, Prerna Gopal, Michael T. Karwaki, Sangho Kim, Jeffrey L. Bose, Kenneth W. Bayles, Alexander R. Horswill.(2012). **Low levels of  $\beta$ -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*.** *Mbio*.3:E00198-12.
- Katayama, Y; Ito, T e Hiramatsu, K. (2000). **A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob Agents Chemother*, 44(6), 1549-1555.
- Kiedrowski, M.R. e Horswill, A.R. (2011). **New approaches for treating staphylococcal biofilm infections.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1241, 104-121.
- 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(3), e00071-16.
- Kubica, M.; Guzik, K.; Koziel, J.; Zarebski, M.; Richter, W.; Gajkowska, B.; Golda, A.; Maciag-Gudowska, A.; Brix, K.; Shaw, L.; Foster, T. e Potempa, J. (2008). **A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages.** *Plos One*, 9(3), 1-16.
- Labandeira-Rey, M.; Couzon, F.; Boisset, S.; Brown, E.L.; Bes, M.; Benito, Y.; Barbu, E.M.; Vazquez, V.; Höök, M.; Etienne, J.; Vandenesch, F. e Bowden, M.G. (2007). ***Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia.** *Science*, 315(5815), 1130-1133.
- Lambris, J.D.; Ricklin, D. e Geisbrecht, B.V. **Complement evasion by human pathogens.** (2008). *Nat Rev Microbiol*, 6(2), 132-142.
- Lázaro-Díez, M., Remuzgo-Martínez, S., Rodríguez-Mirones, C., Acosta, F., Icardo, J. M., Martínez-Martínez, L. e Ramos-Vivas, J. (2016). **Effects of subinhibitory concentrations of ceftaroline on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms.** *PloS one*, 11(1), e0147569.
- Lee, C.Y. e Lee, J.C. (2000). **Staphylococcal capsule.** In: Gram-Positive Pathogens – 1st Edition. 361-366. Edited By: Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferreti, J.J.; Portnoy, D.A. e Rood, J.I. Washington, D.C., Asm Press, Usa.
- Lina, G.; Piémont, Y.; Godail-Gamot, F.; Bes, M.; Peter, M.O.; Gauduchon, V.; Vandenesch, F. e Etienne, J. (1999). **Involvement of panton-valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia.** *Clin Infect Dis*, 29(5), 1128-1132.
- LPSN (2016). **List Of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature.** Disponível Em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>. Acesso em: 06/5/2016.

- Martín-López, J. V., Pérez-Roth, E., Claverie-Martín, F., Gil, O. D., Batista, N., Morales, M., e Méndez-Álvarez, S. (2002). **Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for biofilm establishment.** Journal of clinical microbiology, 40(4), 1569-1570.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., e Sambrook, J. (1989). **Extraction and purification of plasmid DNA.** *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 1, 1-21.
- 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(11):5113-20.
- Melo-Cristino, J.; Resina, C.; Manuel, V.; Lito, L. e Ramirez, M. (2013). **First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe.** Lancet, S0140-6736(13) 61219-2.
- Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J., Solano C., Calvo E., Lopez J.A., Foster T.J., Penadés J.R. e Lasa I.(2009). **Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*.** J Bacteriol. 191(3):832-43.
- Mirani, Z. A., e Jamil, N. (2011). **Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*.**J Basic Microbiol. 51(2), 191-195.
- Mlynek, K. D., Callahan, M. T., Shimkevitch, A. V., Farmer, J. T., Endres, J. L., Marchand, M. e Kaplan, J. B. (2016). **Effects of Low-Dose Amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 Biofilms.** Antimicrobial agents and chemotherapy, 60(5), 2639-2651.
- MLST. (2016). **Multilocus Sequence Typing** .Disponível em: [www.mlst.net](http://www.mlst.net). Acesso em: 05/07/16.
- Monaco, M., de Araujo, F. P., Cruciani, M., Coccia, E. M., & Pantosti, A. (2016). **Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*.**Curr Top Microbiol Immunol.
- Monecke, S.; Coombs, G.; Shore, A.C.; Coleman, D.C.; Akpaka, A.P.; Borg, M.; Chow, H.; Ip, M.; Jatzwauk, L.; Jonas, D.; Kadlec, K.; Kearns, A.; Laurent, F.; O'brien, F.G.; Ehricht, R. (2011). **A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** PLoS One, 6(4), e17936.
- Murray, P.; Rosenthal, K.S.; Pfaller, R.M. (2006). **Microbiologia Médica.** Elviesier, 5ed, Rio de Janeiro, Brasil.
- Naicker, P. R., Karayem, K., Hoek, K. G., Harvey, J. e Wasserman, E. (2016). **Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage.** Microbial pathogenesis, 90, 41-49.
- Namvar, A. E., Asghari, B., Ezzatifar, F., Azizi, G. e Lari, A. R. (2013). **Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates.** GMS hygiene and infection control, 8(1).
- Nguyen, V.T.; Kamio, Y. e Higushi, H. (2003). **Single-molecule imaging of cooperative assembly of g-hemolysin on erythrocyte membranes.** Embo J, 1;22(19),4968-79.
- Obadia, T.; Silhol, R.; Opatowski, L.; Temime, L.; Legrand, J.; Thiébaud, A.C.M.; Herrmann, J.L.; Fleury, E.; Guillemot, D.; Boëlle, P.Y. (2015). **Detailed contact data and the dissemination of *Staphylococcus aureus* in hospitals.** Plos Comput Biol. 11, 1-16.
- Oliveira, D.C.; Milheirigo, C; De Lencastre, H.(2006). **Redefining a structural variant of a *Staphylococcal* cassette chromosome *mec*, *scmec* type vi.** Antimicrob Agents Chemother., 50(10), 3457-3459.
- O'hara, F.P.; Amrine-Madsen, H.; Mera, R.M.; Brown, M.L.; Close, N.M.; Suaya, J.A. e Acosta, C.J.(2012). **Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in the United States 2004-2008 reveals the rapid expansio of USA300 among inpatients and outpatients.** Microb Drug Resist, 18(6):555-561.
- 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.** Journal Of Clinical Microbiology, 45(5), 1379-1388.



- O'Neill, E.; Humphreys, H. e O'gara, J.P. (2009). **Carriage of both the *fnbA* and *fnbB* genes and growth at 37°C promote FnBP-mediated biofilm development in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates.** J. Med. Microbiol., 58, 399–402.
- Otto, M. **Staphylococcal biofilms.** Curr. (2008). Top. Microbiol. Immunol., 322, 207-228.
- Otto, M. (2012). **MRSA virulence and spread.** Cell. Microbiol., 14(10), 1513-1521.
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F. e Dumitrescu, O. (2013). **Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, dkt073.
- Otto, M. (2014a). **Phenol-soluble modulins.** Intern J Med Microbiol.
- Otto, M. (2014b). ***Staphylococcus aureus* toxins.** Current opinion in microbiology, 17, 32-37.
- PAHO/WHO. Pan America Health Organization/World Health Organization. **Epidemiological alert: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*.** (2013) Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22187&Itemid](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22187&Itemid). Acesso em 06/07/16.
- 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.
- Pardo, L.; Vola, M.; Macedo-Viñas, M.; Machado, V.; Cuello, D.; Mollerach, M.; Castro, M.; Pérez, C.; Varela, G. e Algorta, G. (2013). **Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in children treated in Uruguay.** J Infect Dev Ctries, 15;7(1):10-16.
- Powers, M. E., e Wardenburg, J. B. (2014). **Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis.** PLoS Pathog, 10(2), e1003871.
- Prakash, P. H., Rajan, V. e Gopal, S. (2016). **Predominance of SCCmec types IV and V among biofilm producing device-associated *Staphylococcus aureus* strains isolated from tertiary care hospitals in Mysuru, India.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. [Epub ahead of print]
- Prévost, G.; Couppié, P.; Prévost, P.; Gayet, S.; Petiau, P.; Cribier, B. ; Monteil, H. e Piémont, Y. (1995). **Epidemiological Data On *Staphylococcus aureus* Strains Producing Synergohymenotropic Toxins.** J Med Microbiol, 42(4), 237-245.
- Rahimi, F., Katouli, M., e Karimi, S. (2016). **Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection.** Microbial Pathogenesis, 98, 69-76.
- Rahman, Z.A.; Hamzah, S.H.; Hassan, S.A.; Osman, S.; Md Noor, S.S. (2013). **The significance of coagulase-negative staphylococci bacteremia in a low resource setting.** J Infect Dev Ctries. 7, 448-452.
- Reynolds, P.E. (1989). **Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 8(11), 943-950.
- Ribeiro, A.; Coronado, A.Z.; Silva-Carvalho, M.C.; Ferreira-Carvalho, B.T.; Dias, C.; Rozenbaum, R.; Del Peloso, P.F.; Da Costa Ferreira Leite, C.; Teixeira, L.A. e Figueiredo, A.M. (2007). **Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases.** Diagn Microbiol Infect Dis, 59(3), 339-345.
- Roberts, J.C.; Gulino, S.P.; Peak, K.K.; Luna, V.A. e Sanderson, R.(2008). **Fatal necrotizing pneumonia due to a panton-valentine leukocidin positive community-associated methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and influenza co-infection: a case report.** Ann Clin Microbiol Antimicrob, 19, 7-5.
- Roche, F. M., Massey, R., Peacock, S. J., Day, N. P., Visai, L., Speziale, P. e Foster, T. J. (2003). **Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences.** Microbiology, 149(3), 643-654.
- Ryan, K.J. **Staphylococci.** (2004). In Sherris Medical Microbiology – 4 th edition. Edites by: Ryan, K.J. e Ray, C.G. McGraw Hill, USA.

- Savolainen, K.; Paulin, L.; Westerlund-Wikstrom, B.; Foster, T.J.; Korhonen, T.K.; Kuusela, P..(2001). **Expression of *pls*, a gene closely associated with the *mecA* gene of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, prevents bacterial adhesion in vitro.** *Infect. Immun.*, 69, 3013–3020.
- Schlievert Pm, Strandberg Kl, Lin Yc, Peterson MI, Leung Dy. (2010). **Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis.** *J Allergy Clin Immunol.*, 125(1):39–49.
- Silva-Carvalho, M.C.; Bonelli, R.R.; Souza, R.R.; Moreira, S.; Dos Santos, L.C.; De Souza Conceição, M.; De Mello Júnior, S.J.; Carballido, J.M.; Rito, P.N.; Vieira, V.V.; Teixeira, L.A. e Sá Figueiredo, A.M.(2009). **Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage st1-sccmeciv in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.** *Diagn Microbiol Infect Dis*, 65(3), 300-305.
- Schuenck, R.P.; Nouér, S.A.; Winter, C.O.; Cavalcante, F.S.; Scotti, T.D.; Ferreira, A.L.; Giambiagi-De-Marval, M. Dos Santos, K.R. (2009). **Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil.** *Diagn Microbiol Infect Dis*, 64, 434-441.
- Schuenck, R.P.; Cavalcante, F.S.; Emery, E.; Marval, M.G. e Santos, K.R. (2012). ***Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles.** *FEMS Immunol Med Microbiol*, [Epub ahead of print].
- Smith, K., Perez, A., Ramage, G., Gemmell, C. G., & Lang, S. (2009). **Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin.** *International journal of antimicrobial agents*, 33(4), 374-378.
- Singh, R., Ray, P., Das, A. e Sharma, M. (2010). **Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(9), 1955-1958.
- Souza Júnior, F.C.; Silva-Carvalho, M.C.; Fernandes, M.J.B.C.; Vieira, M.F.P.; Pellegrino, F.L.Pc.; Figueiredo, Am.S. De Melo, M.C.N e Milan, E.P.(2009). **Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil.** *Braz J Med Biol Res*, 42(10), 877-881.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, 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(8), 891-899.
- Stevens, D.L. (2006). **The role of vancomycin in the treatment paradigm.** *Clin. Infect. Dis.*, 42 (Suppl.1), S51-S57.
- Stevens, D. L., Ma, Y., Salmi, D. B., McIndoo, E., Wallace, R. J., e Bryant, A. E. (2007). Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases*, 195(2), 202-211.
- Stone, B., Street, M., Leigh, W., e Crawford, H. (2016). **Pediatric tibial osteomyelitis.** *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 36(5), 534-540.
- Subrt, N., Mesak, L. R., e Davies, J. (2011). **Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*.** *J Antimicrob Chemother*, 66(5), 979-984.
- 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(9), 2837-2841.
- Uttley, A.H.; George, R.C.; Naidoo, J.; Woodford, N.; Johnson, A.P.; Collins, C.H.; Morrison, D.; Gilfillan, A.J.; Fitch, L.E. e Heptonstall, J.( 1989). **High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections.** *Epidemiol Infect*, 103(1), 173-181.
- Van Bameke, F.; (2004). **Glycopeptides in clinical development: pharmacological profile and clinical perspectives.** *Curr Opin Pharmacol*, 4(5), 471-478.

- Van Langevelde, P.; Van Dissel, J.T.; Meurs, C.J.C.; Renz, J. e Groeneveld, P.H.P.( 1997). **Combination of flucloxacillin and gentamicin inhibits toxic shock syndrome toxin 1 production by *Staphylococcus aureus* in both logarithmic and stationary phases of growth.** Antimicrob Agents Chemother, 41(8), 1682-1685.
- Vandenesch, F.; Naimi, T.; Enright, M.C.; Lina, G.; Nimmos, 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(8), 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(8), e104561.
- Vasu, D., Kumar, P. S., Prasad, U. V., Swarupa, V., Yeswanth, S., Srikanth, L., Sunitha M., Choudhary A e Sarma, P. V. G. K. (2014). **Phosphorylation of *Staphylococcus aureus* Protein-Tyrosine Kinase Affects the Function of Glucokinase and Biofilm Formation.** Iranian Biomedical Journal, 0-0. [Epub ahead of print]
- Vuong, C.; Kocianova, S.; Voyich, J.M.; Yao, Y.; Fischer, E.R.; Deleo, F.R.; Otto, M.(2004). **A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence.** J Biol Chem. 279, 54881–54886.
- Von Eiff, C., Heilmann, C., Herrmann, M., e Peters, G. (1999). **Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections.***Infection*, 27, S7-S10.
- Wannet, W.J.B.; Spalburg, E.; Heck, M.E.O.C.; Pluister, G.N.; Tiemersma, E.; Willems, R.J.L.; Huijsdens, X.W.; De Neeling, A.J.; Etienne, J. (2005). **Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying panton-valentine leukocidin genes in the netherlands.** J Clin Microbiol, 43(7), 3341-3345.
- Werth, B. J., Barber, K. E., Ireland, C. E. e Rybak, M. J. (2014). **Evaluation of ceftaroline, vancomycin, daptomycin, or ceftaroline plus daptomycin against daptomycin-nonsusceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model of simulated endocardial vegetations.** Antimicrobial agents and chemotherapy, 58(6), 3177-3181.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., e Chomczynski, P. (1997). **Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.***Biotechniques*, 22(3), 474-6.
- Yu, R.; Dale, S.E.; Yamamura, D.; Stankus, V. e Lee, C. (2012). **Daptomycin-nonsusceptible, vancomycin-intermediate, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis.** Can J Infect Dis Med Microbiol, 23(2):E48-50.
- Zecconi, A. e Scali, F. (2013). ***Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases.** Immunol Lett, 150(1-2):12-22.

## ANEXO 1

**Tabela 9:** Características gerais das 34 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* carreadoras dos genes da PVL com relação à produção do biofilme e genes associados

Amostras	Fonte de Isolamento	Tipo de SCCmec	Clonalidade	ST	Biofilme			Genes relacionados	
					DO <sub>492nm</sub>	DP	Classificação	icaA	sasG
526	Abscesso renal	IV	USA300	8	1,3221	0,0280	Moderado	+	+
912	Swab Nasal	IV	USA400	1	1,9801	0,1360	Forte	+	+
945	Swab Nasal	IV	USA400	1	1,6536	0,0524	Moderado / Forte	+	+
1348	Sangue	-	USA400	1	2,0286	0,0402	Forte	+	+
1349	Sangue	-	USA400	1	2,0073	0,1654	Forte	+	+
1444	Endocardite	-	USA400	1	1,5571	0,1254	Moderado / Forte	+	+
553	Swab Nasal	IV	USA800	5	0,1767	0,0539	Não Produtor	+	+
1213	Sangue	IV	USA800	83	0,3315	0,0126	Não Produtor	+	+
596	SSTI	IV	USA1100	30	0,6950	0,1091	Fraca	+	-
806	Swab Nasal	IV	USA1100	30	0,7062	0,0835	Moderado	+	-
809	Swab Nasal	IV	USA1100	30	1,2308	0,1166	Moderado	+	-
826	Sangue	IV	USA1100	30	1,0855	0,1187	Moderado	+	-
827	SSTI	IV	USA1100	30	1,2111	0,2481	Moderado	+	-
932	Swab Nasal	IV	USA1100	30	0,8089	0,0821	Moderado	+	-
943	SSTI	IV	USA1100	30	0,6845	0,1042	Fraca	+	+
1155	Sec. Óssea	IV	USA1100	30	1,0517	0,0187	Moderado	+	+
1179	SSTI	IV	USA1100	30	0,7827	0,0789	Fraca	+	-
1180	SSTI	IV	USA1100	30	0,7403	0,1808	Fraca	+	-
1342	Sangue	IV	USA1100	30	1,344	0,1039	Moderado	-	-
1463	SSTI	IV	USA1100	30	0,4378	0,0444	Não Produtora	+	-
1079	Sangue	-	USA1100	30	1,1225	0,1363	Moderado	+	+
1086	Sangue	-	USA1100	30	0,3719	0,0669	Não Produtora	+	-
1462	SSTI	-	USA1100	30	1,1598	0,0722	Moderado	+	-
584	Sec. Traqueal	IV	USA1100	714	1,3802	0,0699	Moderado	+	-
1204	Swab Nasal	IV	USA1100	2369	0,8930	0,1672	Fraca	+	+
1314	Sangue	IV	USA1100	484	0,9258	0,0576	Fraca	+	+
1174	SSTI	-	ND	30	1,0981	0,0268	Fraca	+	+
622	Swab Nasal	IV	ND	97	0,4729	0,1629	Não Produtora	+	+
1453	Sangue	-	ND	121	1,4571	0,0925	Moderado	+	+
874	Swab Nasal	-	ND	718	1,6511	0,1316	Moderado	+	+
1132	Prót. Joelho	-	ND	1462	1,7311	0,0473	Moderado	+	-
1168	Frag. ósseo	-	ND	1462	1,2171	0,4282	Moderado	+	-
1085	Sangue	-	ND	2104	1,1835	0,0522	Moderado	+	+
1334	Sangue	-	ND	2104	1,1416	0,1677	Moderado	+	+

SSTI – *Skin and soft tissue infections* – Infecções de pele e tecidos moles; SCCmec – Cassete cromossômico estafilocócico; ND – não determinado; <sup>a</sup> relacionado à clonalidade USA1100; <sup>b</sup> relacionado à clonalidade USA800; ST – Sequência Tipo; DO<sub>492nm</sub> - densidade óptica em 492nm; DP - desvio padrão; Sec. – secreção; Prót. – prótese; Frag. - fragmento.