

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Mônica de Abreu Rodrigues

**CARACTERIZAÇÃO DOS SCC*mec* E PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
Staphylococcus aureus NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA
MARIA**

Santa Maria, RS
2017

Mônica de Abreu Rodrigues

**CARACTERIZAÇÃO DOS SCC_{mec} E PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
Staphylococcus aureus NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Rosmari Hörner

Santa Maria, RS

2017

Mônica de Abreu Rodrigues

**CARACTERIZAÇÃO DOS SCC_{mec} E PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
Staphylococcus aureus NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 11 de agosto de 2017:

Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Amanda de Souza da Motta , Dr^a. (UFRGS)

Caio Fernando de Oliveira, Dr. (UNISC)

Fábio Lopes Pedro, Dr. (UFSM)

Silvana Oliveira dos Santos, Dr^a.(Externa)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **João Calisto e Anita**, meus grandes incentivadores, que me ensinaram que na vida nada importa sem amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Hoje encerro uma longa etapa de minha vida, marcada por horas de estudo, trabalho e dedicação. Foram 5 anos para me tornar Farmacêutica, 2 anos para me tornar Mestre e mais 4 anos, para agora, me tornar Doutora. E no decorrer desta trajetória, encontrei muitas pessoas que foram importantes e me ajudaram a chegar até aqui, e a quem dedico meu sincero reconhecimento.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida. Por sempre me guiar na minha caminhada, por sempre me fazer levantar quando caí e por nunca deixar que eu perdesse a fé e o sorriso em meu rosto.

Aos meus pais João Calisto e Anita, amores de minha vida, pela dedicação e educação a mim dadas. Muito obrigada pelo esforço em sempre me dar o melhor e pela abdicção de muitos dos seus sonhos para realizarem os meus. Por me tornarem uma pessoa com caráter e princípios. Amo vocês mais do que tudo!

Ao meu esposo Cristian, por todos os anos de amor, amizade, cumplicidade, e paciência. Obrigada por sempre me incentivar a seguir meus estudos e nunca me deixar desistir de meus sonhos, de nossos sonhos. Obrigada por entender as muitas ausências e a falta de tempo. Tu és o homem da minha vida!

Às minhas irmãs Leticia, Josana e Fernanda, minhas primeiras professoras e amigas, que me ensinaram que a família está acima de tudo e que laços de sangue e “amor de irmãs” jamais poderão ser abalados. Ao meu sobrinho João Artur, que torna os meus dias mais leves e cheios de alegria! À toda a minha família, de Santa Maria e de Rio Pardo, em especial à tia Ana e tia Vera, a quem eu dedico um amor de filha!

À minha eterna filha mais velha Natália, que me ensinou que amor a gente não divide, a gente multiplica! Tu és muito mais que uma sobrinha, pois contigo aprendi o real significado da palavra amor, um amor tão puro e verdadeiro que somente quem é mãe sabe explicar. Te amo minha querida, e a realização deste meu sonho foi necessária para que eu consiga contribuir para o teu futuro!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Rosmari Hörner, pelos ensinamentos, confiança e oportunidades que me destes nestes quase oito anos de convívio. Obrigada por contribuir não só com a minha formação profissional, mas também com a pessoal! A senhora foi essencial e decisiva para que a minha afeição se tornasse uma

verdadeira paixão pelo mundo das bactérias. Terás sempre minha eterna gratidão por tudo que fizestes por mim! Meu muito obrigada não é suficiente para agradecer!

Às minhas estagiárias e anjos da guarda Fernanda e Tacieli, que sempre me ajudaram em tudo. Que colocaram os meus interesses acima dos seus, e mesmo nas vezes em que não podia estar presente, davam continuidade ao meu trabalho. Agradeço pelo tempo que passamos juntas, pelas risadas, pelas vezes que tivemos que repetir tudo de novo. Sem vocês meu trabalho não teria sido possível, e talvez, todas os dias e noites de preocupações não teriam valido tanto a pena. Vocês ocupam um lugar cativo em meu coração, para sempre!

A todos os colegas do Laboratório de Bacteriologia pela amizade, pelas trocas de experiência! Vocês foram fundamentais para o meu amadurecimento e crescimento pessoal, pois foram minha segunda família por todos estes anos! A todos os que estão e passaram pelo LaBac, meus sinceros agradecimentos!

Aos meus colegas de trabalho e amigos da Unidade Básica de Saúde de São Martinho da Serra, por entenderem minhas ausências e me apoiarem sempre! À Vanessa e Isabel, que me representavam na farmácia quando eu estava concretizando o sonho de me tornar Doutora, o meu muito obrigada!

Ao professor Dr. Daniel Graichen e à Me. Patrícia Brites pelos ensinamentos e a paciência em me auxiliarem em meus trabalhos práticos. Agradeço também a todos os funcionários do Laboratório de Biologia Molecular e do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria.

À banca examinadora desta tese, que gentilmente se dispôs a avaliar e contribuir com este trabalho.

Agradeço também a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de conclusão deste trabalho.

“🎵🎵 Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações

A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso eu prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe para perto de mim. 🎵🎵 ”

Ana Vilela

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DOS SCC*mec* E PRODUÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus aureus* NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

AUTORA: Mônica de Abreu Rodrigues
ORIENTADORA: Rosmari Hörner

Staphylococcus aureus, em especial os resistentes à meticilina (MRSA), são relatados mundialmente como patógenos de elevada prevalência na etiologia de infecções. Sua versatilidade como um importante agente etiológico, resulta da combinação de seus fatores de virulência, destacando-se a capacidade de evadir o sistema imune do hospedeiro, muitas vezes através da produção de biofilmes, bem como de desenvolver resistência a múltiplos antimicrobianos. Nos MRSA a resistência se deve principalmente à presença do gene *mecA*, carregado em um elemento genético móvel (SCC*mec*). Desde o surgimento da primeira cepa MRSA, associada ao ambiente hospitalar (HA-MRSA), mudanças significativas na sua epidemiologia puderam ser detectadas, com o aparecimento de cepas resistentes associadas à comunidade (CA-MRSA), que se diferenciam pelos fatores de risco, tipagem dos SCC*mec* e distribuição dos genes de resistência. Este trabalho objetivou caracterizar as cepas de *S. aureus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), quanto a tipagem dos SCC*mec*, bem como avaliar diferentes métodos para determinação da formação de biofilme. Para a tipagem dos SCC*mec* foram avaliados 113 MRSA, gene *mecA* positivos em três períodos: 38 (2008), 37 (2011) e 38 (2015) isolados foram obtidos de diferentes espécimes clínicos de pacientes atendidos no HUSM. A tipagem foi realizada através de PCR e o perfil de suscetibilidade através de metodologia automatizada (MicroScan® e Vitek® 2). Verificamos que o SCC*mec* tipo I foi o mais isolado (39.8%), seguido do tipo IV (23.0%), tipo II (15.1%) e tipo III (6.2%). Isolados não tipados representaram 15.9%. Quando se analisou a origem das cepas, observamos a prevalência das HA-MRSA (72.6%) sobre as CA-MRSA (27.4%). Todos os MRSA foram multirresistentes, apresentando altas taxas de resistência à clindamicina e eritromicina, além de diminuição significativa da resistência para gentamicina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprima. Houve 100% de sensibilidade à vancomicina e linezolida. Para a determinação da produção de biofilme, avaliamos 132 *S. aureus* do ano de 2011 no HUSM. Foram testados o Método de microtitulação em placa (MtP), considerado padrão ouro, além do Método do tubo (TM), Método do Ágar Vermelho Congo (CRA) e pesquisa dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*. O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das estirpes produtoras de biofilme foi realizado através das técnicas de Difusão do Disco e Microdiluição em Caldo. Em 42/132 (31.8%) foram detectadas a produção de biofilme por uma ou mais das 4 metodologias testadas. O MtP foi considerado superior à TM e ao CRA, já que detectou 31/132 (23.5%) isolados produtores de biofilme. No TM houve positividade em 9/132 (6.8%) e no CRA em apenas 1 amostra (0.8%). Genotipicamente detectamos que nossos isolados possivelmente produzem biofilme por mecanismo *ica*-independente. De forma geral esses isolados produtores de biofilme foram bastante sensíveis aos antimicrobianos testados. Através destes resultados podemos concluir que no HUSM houve predomínio de cepas HA-MRSA multirresistentes, sendo o tipo I o mais circulante. Além disso, quando comparados ao método padrão, o TM, CRA e a pesquisa dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD* não se mostraram métodos confiáveis na identificação de estirpes produtoras de biofilme em nossos isolados.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. MRSA. SCC*mec*. Biofilme.

ABSTRACT

SCC*mec* CHARACTERIZATION AND BIOFILM PRODUCTION IN *Staphylococcus aureus* FROM THE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

AUTHOR: Mônica de Abreu Rodrigues

ADVISOR: Rosmari Hörner

Staphylococcus aureus, in particular those resistant to methicillin (MRSA), are reported worldwide as pathogens of high prevalence in the etiology of infections. Its versatility as an important etiological agent results from the combination of its virulence factors, highlighting the ability to evade the host's immune system, often through the production of biofilm, as well as developing resistance to multiple antimicrobials. In MRSA, resistance is due mainly to the presence of the *mecA* gene, carried in a mobile genetic element (SCC*mec*). Since the emergence of the first MRSA strain associated with the hospital environment (HA-MRSA), significant changes in its epidemiology could be detected with the emergence of community-associated resistant strains (CA-MRSA), differentiated by risk factors, SCC*mec* typing and distribution of resistance genes. This work aimed to characterize the strains of *S. aureus* isolated in the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), through the SCC*mec* typing, as well as to evaluate different methods to determine biofilm formation. For the SCC*mec* typing, 113 MRSA, *mecA*-positive genes, were evaluated in three periods: 38 (2008), 37 (2011) and 38 (2015) isolates were obtained from different clinical specimens of patients attended at the HUSM. The typing was performed through PCR and the antimicrobial susceptibility profile through automated methodology (MicroScan® and Vitek® 2). We verified that SCC*mec* type I was the most isolated (39.8%), followed by type IV (23.0%), type II (15.1%) and type III (6.2%). Non-typed isolates represented 15.9%. As to the origin of the strains analyzed we observed the prevalence of HA-MRSA (72.6%) about CA-MRSA (27.4%). All MRSA were multiresistant, presenting high rates of resistance to clindamycin and erythromycin, in addition to a significant decrease in resistance to gentamicin, rifampicin and sulfamethoxazole-trimethoprim. There was 100% sensitivity to vancomycin and linezolid. For the determination of the biofilm production we evaluated 132 *S. aureus* of the year 2011 at the HUSM. The Microtiter Method (MtP), considered gold standard, in addition to the Tube Method (TM), Congo Red Agar Method (CRA) and the search for the *icaA*, *icaC* and *icaD* genes were tested. The antimicrobial susceptibility profile of the biofilm producing strains was carried out using the Disk Diffusion and Broth Microdilution techniques. In 42/132 (31.8%) the biofilm production was detected by one or more of the 4 methodologies tested. MtP was considered superior to TM and CRA, since it detected 31/132 (23.5%) isolates biofilm producers. In TM there was positivity in 9/132 (6.8%) and CRA in only 1 isolate (0.8%). Genotypically we detect that our isolates possibly produce biofilm by an *ica*-independent mechanism. In general these biofilm producing isolates were very sensitive to the antimicrobials tested. Through these results we can conclude that in HUSM there was a predominance of multiresistant HA-MRSA strains, type I being the most circulating. In addition, when compared to the standard method, TM, CRA and *icaA*, *icaC* and *icaD* genes search were not reliable to identify biofilm producing strains in our isolates.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. MRSA. SCC*mec*. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas do desenvolvimento do biofilme em <i>Staphylococcus</i> spp..	20
Figura 2 – Principais características dos SCCmec tipos I, II e III, associados à cepas MRSA de origem hospitalar (HA-MRSA).	31
Figura 3 – Principais características dos SCCmec tipos IV e V, associados à cepas MRSA de origem comunitárias (CA-MRSA).	33

2.1 Manuscrito 1

Figure 1 – Electrophoresis gel with PCR amplification products.	42
Chart 1 – Distribution frequency of the 95 <i>mecA</i> -positive <i>S. aureus</i> (MRSA) typed in 2008, 2011 and 2015 at Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM)..	43

2.2 Manuscrito 2

Figure 1 – Sample of positive <i>S. aureus</i> for <i>icaA</i> , <i>icaC</i> and <i>icaD</i> genes.	58
Graph 1 – <i>icaADC</i> genes found in <i>Staphylococcus aureus</i> isolates at HUSM in the studied period	59

LISTA DE TABELAS

2.1 Manuscrito 1

Table I – Conditions and primers used in PCR reactions.....	41
Table II – Distribution frequency of the 113 <i>mecA</i> -positive <i>S. aureus</i> (MRSA) in 2008, 2011 and 2015 at Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).	43
Table III – Resistance profile of the 95 <i>mecA</i> -positive <i>S. aureus</i> (MRSA) typed in 2008, 2011 and 2015 at Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).	44

2.2 Manuscrito 2

Table 1 – Criteria for interpretation of biofilm production results in MtP, according to Stepanović et al. (2007).....	55
Table 2 – Conditions and primers used in PCR reactions.	57
Table 3 – Results of phenotypic testing of biofilm production.....	58
Table 4 – Antimicrobial susceptibility of 31 biofilm-producing <i>S. aureus</i> strains in the MtP.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - *American Type Culture Collection*
BEC - Clonagem Endêmica Brasileira
BORSA - *Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus*
CA-MRSA - MRSA associado à comunidade
CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CoNS – *Coagulase negative Staphylococci*
CRA – *Congo Red Agar*
DMI - Dispositivos médicos implantáveis
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – *Deoxynucleotide triphosphates*
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid/ ácido etilendiamino tetra-acético*
EPS - Exopolissacarídeos
EUA – Estados Unidos da América
HA-MRSA - MRSA associado ao ambiente hospitalar
HUSM - Hospital Universitário de Santa Maria
LA-MRSA - MRSA associado à criação de animais
MDR – *Multidrug-resistance*
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MIC - *Minimum inhibitory concentration*
MODSA - *Modified Penicillin Binding Protein Staphylococcus aureus*
MRSA - *S. aureus* resistentes à meticilina
MSCRAMMs - Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva
MSSA - *S. aureus* sensíveis à meticilina
MtP – *Microtiter plate*
NaCl – Cloreto de sódio
NT – *Non-typed*
OD – *Optical density*
ODc – *Optical density control*
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORSA - *S. aureus* resistentes à oxacilina,
PBP - Proteínas ligadoras de penicilina
PBS – *Phosphate-buffered saline*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PIA - Adesina Polissacarídica Intracelular
PNAG - poli-N-acetil-β-(1-6)-glicosamina
PVL - Leucocidina Panton-Valentine
RS – Rio Grande do Sul
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
SCCmec - *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*
TE – Tris-EDTA
TM – *Tube method*
TSA - *Trypticase soy agar*
TSB – *Trypticase soy broth*
UFSC – Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.2	Patogenicidade e fatores de virulência	17
1.3	Biofilmes bacterianos	18
1.3.1	Caracterização dos biofilmes	19
1.3.2	Formação do biofilme	20
1.3.2.1	<i>Etapa de adesão</i>	20
1.3.2.2	<i>Etapa de maturação (proliferação ou acumulação)</i>	21
1.3.2.3	<i>Etapa de deslocamento ou dispersão</i>	22
1.3.3	Infecções por <i>S.aureus</i> associadas ao biofilme	23
1.4	Resistência aos antimicrobianos	24
1.4.1	Resistência dos <i>S. aureus</i> à penicilina	25
1.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)	25
1.4.2.1	<i>Mecanismos de resistência à oxacilina</i>	26
1.4.2.2	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec)</i>	27
1.4.2.3	<i>Panorama global das infecções causadas por MRSA</i>	28
1.4.2.4	<i>Classificação das cepas MRSA</i>	29
1.4.2.4.1	MRSA associado ao ambiente hospitalar (HA-MRSA).....	30
1.4.2.4.2	MRSA associado à comunidade (CA-MRSA).....	32
1.4.2.4.3	MRSA associado à criação de animais (LA-MRSA).....	34
1.5	Justificativa	34
1.6	Objetivos	35
1.6.1	Objetivo geral	35
1.6.2	Objetivos específicos.....	35
2	PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	36
2.1	Manuscrito 1 - SCCmec typing of MRSA strains isolated for three years at a teaching hospital in Brazil	36
	ABSTRACT	36
	INTRODUCTION	37
	MATERIAL & METHODS.....	38
	Collection of bacteria strains.....	38
	Selection of MRSA.....	39
	Antimicrobial Susceptibility Testing.....	39
	DNA Extraction	39
	Molecular typing by PCR	40
	Classification criteria	40
	Ethical Considerations	40
	RESULTS	42
	DISCUSSION	44
	REFERENCES	47
2.2	Manuscrito 2 - Evaluation of different methods for detection of biofilm production in <i>Staphylococcus aureus</i> isolates	51
	ABSTRACT	51
	INTRODUCTION	52
	MATERIAL AND METHODS	53
	Bacterial strains	53
	Tests for detection of biofilm production	54
	Microtiter Plate (MtP) production	54

	Tube Method.....	54
	Congo Red Agar (CRA)	55
	Genotypic detection of <i>icaA</i> , <i>icaD</i> and <i>icaC</i> genes	55
	Antibiotic susceptibility testing	56
	Ethical considerations	57
	RESULTS	57
	DISCUSSION	60
	CONCLUSION.....	62
	REFERENCES	63
3	DISCUSSÃO	66
4	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	91
	ANEXO B – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1	94
	ANEXO C – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 2	95

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está estruturada na seguinte disposição: **INTRODUÇÃO, PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES e REFERÊNCIAS.**

Os itens **MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO DOS RESULTADOS e REFERÊNCIAS** se encontram inseridos nos manuscritos que estão contidos na seção denominada **PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS** e representam a íntegra deste estudo.

O item **REFERÊNCIAS** se refere somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO** desta tese.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é composto atualmente por 45 espécies e 24 subespécies, das quais muitas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). O *Staphylococcus aureus*, espécie mais virulenta e conhecida do gênero, foi descrita pela primeira vez por Alexandre Ogston, no século XIX, como sendo um grupo de cocos causadores de processos inflamatórios e supurativos (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; CHENG et al., 2011).

Os *S. aureus* são cocos Gram-positivos catalase-positiva, oportunistas, que possuem um crescimento padrão semelhante a um cacho de uvas, podendo se apresentar como células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas, quando isoladas de espécimes clínicos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Medem aproximadamente de 0,5 - 1,5 μm de diâmetro, são imóveis, não formadores de esporos. Devido à sua grande versatilidade de adaptação a diferentes ambientes, possuem a capacidade de crescer em uma variedade de condições, muitas vezes hostis, como aero e anaerobiose, em temperaturas que variam de 18 – 40 °C, em altas concentrações de sal (NaCl a 10%), bem como em ambientes com deficiência de nutrientes (CEPEDA et al., 2005; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

São bactérias colonizantes da pele, axilas, narinas e mucosas da orofaringe, trato gastrointestinal e trato genitourinário dos seres humanos (LOWY, 1998; YANG et al., 2010; BONESSO; MARQUES; CUNHA, 2011; BRAGA et al., 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; OLIVEIRA et al., 2014). As fossas nasais são consideradas o principal reservatório dos *S. aureus* e estima-se que 30% da população mundial seja portadora desta bactéria (THUNBERG et al., 2015 CDC, 2017).

Falhas na defesa imunológica ou a quebra da barreira cutânea natural, por cortes, cirurgias, traumas ou queimaduras, fornecem ótimas oportunidades para a invasão estafilocócica, que geralmente se manifesta com a formação de abscessos. Através deles estas bactérias se disseminam na pele ou conseguem penetrar na linfa e sangue, levando à formação novos focos infecciosos em diferentes sítios anatômicos. Dessa forma, os *S. aureus* passam a ser o agente etiológico mais

comum de infecções cutâneas e causa freqüente de sepse, muitas vezes como consequência de doença invasiva proveniente de um ou mais focos de abscessos (LOWY, 1998; SANTOS et al., 2007; CHENG et al., 2011).

Podem causar infecções simples e de fácil tratamento, bem como doenças invasivas graves como: infecções cutâneas: celulite, espinhas, feridas, foliculites, furúnculos, impetigo; infecções sistêmicas: abscessos musculares e cerebrais, artrite séptica, empiema, endocardite, meningite, osteomielite, pneumonia, septicemia; infecções mediadas por toxinas: intoxicações alimentares, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada estafilocócica (LOWY, 1998; SANTOS et al., 2007; DAVID; DAUM, 2010; BONESSO; MARQUES; CUNHA, 2011; KANG et al., 2011; DONG et al., 2013; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; SPEZIALE et al., 2014; THUNBERG et al., 2015; BHATTA et al., 2016)

1.2 Patogenicidade e fatores de virulência

Para causar uma doença, as bactérias, assim como outros agentes patogênicos, empregam um conjunto de fatores, conhecidos como fatores de virulência, que as protegem do sistema imune inato e lhes permitem ultrapassar as barreiras das mucosas, se disseminarem e se replicarem em diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro (RAMACHANDRAN, 2014). Muitos destes fatores são codificados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou profagos, podendo facilmente ser transferidos intra ou interespecies (OTTO, 2014).

A versatilidade dos *S. aureus* como um dos mais importantes patógenos de infecções em humanos resulta de uma combinação de alguns destes fatores de virulência (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; OLIVEIRA et al., 2014; OTTO, 2014; THUNBERG et al., 2015; BHATTA et al., 2016). Dentre eles, destacam-se (i) a produção de proteínas de superfície, que interferem na sua adesão aos tecidos do hospedeiro; (ii) a virulência mediada pela produção de proteínas extracelulares, como enzimas e toxinas específicas; (iii) seu caráter invasivo, caracterizado pela fácil multiplicação e disseminação nos tecidos; (iv) evasão da capacidade imune e (v) facilidade de aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos (SANTOS et al., 2007; VIEIRA, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Outro fator de virulência importante nesta espécie é a produção de biofilmes, que caracterizam-se por ser estruturas multicelulares altamente complexas, capazes de proteger as bactérias contra as células do sistema imune do hospedeiro e impedir a ação de agentes antimicrobianos (WELLS et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; CHUNG; TOH, 2014; ARCIOLA et al., 2015; McCARTHY et al., 2015; NOURBAKSH; NAMVAR, 2016).

1.3 Biofilmes bacterianos

O reconhecimento de que alguns microrganismos, como fungos e bactérias, produziam um material mucilaginoso, denominado “*slime*”/ “limo”, representou uma descoberta importante na área da microbiologia (DONLAN, 2002; ARCIOLA et al., 2015). As primeiras pesquisas sobre bactérias produtoras de *slime* datam da década de 1970 e foram imprescindíveis para a formulação do conceito de biofilme, projetando a ideia de um estilo de vida sésil e da formação de comunidades bacterianas, envolvidas dentro de uma matriz extracelular com função protetora, derivada da elaboração de um *slime* (MACK; MACK; ACKERSON, 1975; COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; ARCIOLA et al., 2015).

Em 1978, Costerton, Geesey e Cheng (1978), baseados em observações de placas dentárias, estabeleceram a “Teoria do biofilme”, que explica os mecanismos pelos quais os microrganismos aderem a materiais vivos e não vivos e os benefícios deste nicho ecológico, demonstrando pela primeira vez a importância médica do biofilme bacteriano.

Evolutivamente, os biofilmes permitiram que bactérias com um fenótipo planctônico, mais suscetíveis às defesas do hospedeiro e à quimioterapia antibiótica, pudessem se habituar a uma forma de vida sésil, mais adaptada para sobreviver a ambientes agressivos, como no caso dos tecidos do hospedeiro. Além disso, assumiu um significado específico na patogênese das infecções clínicas, especialmente àquelas associadas aos materiais implantáveis (ARCIOLA et al., 2015).

1.3.1 Caracterização dos biofilmes

O biofilme caracteriza-se por ser uma comunidade de células sésseis aderidas a uma superfície, embebidas em uma matriz polimérica extracelular, por elas produzidas. Nessa estrutura, as bactérias podem exibir diferentes fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética, facilitando a interação das células bacterianas com o organismo hospedeiro (DONLAN; COSTERTON, 2002; ARCHER et al., 2011; WELLS et al., 2011; FOULSTON et al., 2014; CHUNG; TOH, 2014; SPEZIALE et al., 2014). São estruturas altamente complexas e hidratadas, com canais que possibilitam a difusão e a concentração de nutrientes (carbono, fosfato, nitrogênio) e oxigênio, que permitem que as bactérias enfrentem de maneira satisfatória as diversas situações de stress ambiental e pressões externas a que são submetidas (DONLAN, 2002; RANI et al., 2007; CHUNG; TOH, 2014; FIGUEIREDO et al., 2017).

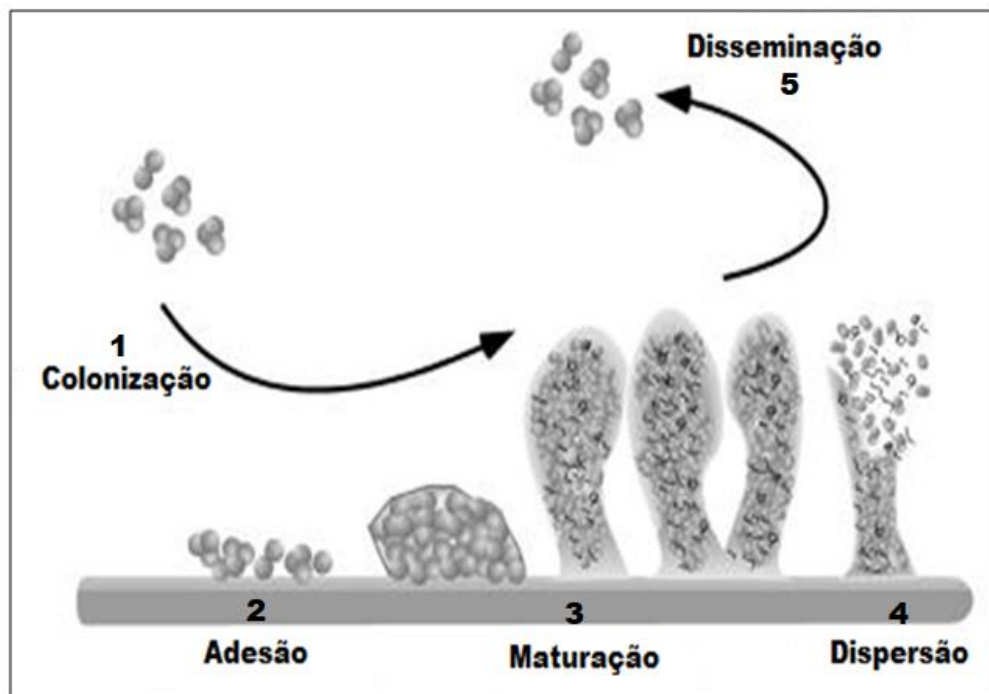
As bactérias produtoras de biofilme beneficiam-se de uma série de vantagens sobre àquelas que não o produzem. Dentre as muitas, podemos citar a habilidade da matriz extracelular em sequestrar e concentrar nutrientes do ambiente, a capacidade de evadir múltiplos mecanismos de defesa produzidos pelo hospedeiro e de bloquear fisicamente a ação dos antibióticos utilizados na terapia (ARCHER et al., 2011; WELLS et al., 2011; CHA et al., 2013; ARCIOLA et al., 2015; McCARTHY et al., 2015; NOURBAKHS; NAMVAR, 2016; FIGUEIREDO et al., 2017). Podem também contribuir para a aquisição de resistência aos antimicrobianos, possivelmente por promover um maior contato célula-célula e, dessa forma, aumentar a taxa de transferência de genes (DE ARAUJO et al., 2006; SAVAGE; CHOPRA; O'NEILL, 2013).

Além disso, a vantagem final para o desenvolvimento dessas estruturas é uma potencial dispersão ou descolamento celular, nos quais as colônias podem se separar, pelas forças de cisalhamento mecânicas dos fluidos ou através de uma resposta programada geneticamente (BOYD; CHAKRABARTY, 1994). Dessa forma, as colônias isoladas migram a partir da comunidade original, para regiões não infectadas do hospedeiro, e promovem o crescimento e a formação de um novo biofilme (ARCHER et al., 2011).

1.3.2 Formação do biofilme

A formação do biofilme é um processo que ocorre em três etapas, incluindo uma fase inicial de adesão, seguida da maturação ou proliferação e o evento final de descolamento, também chamado de dispersão (OTTO, 2008; CROES et al., 2009; PERIASAMY et al., 2012; FOULSTON et al., 2014; SPEZIALE et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2017). A Figura 1 demonstra esquematicamente cada uma destas etapas.

Figura 1 – Etapas do desenvolvimento do biofilme em *Staphylococcus* spp.



Fonte: Adaptado de Otto, 2008. (acesso 22/06/17).

1.3.2.1 Etapa de adesão

A adesão pode ocorrer sobre qualquer superfície biótica ou abiótica. Os *S. aureus*, em particular, têm uma extraordinária capacidade de fixarem-se tanto a dispositivos médicos implantáveis (DMI) quanto às proteínas da matriz extracelular de células humanas (OTTO, 2008; PERIASAMY et al., 2012).

Esta espécie expressa dezenas de “componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva” (MSCRAMMs). Os MSCRAMMs

reconhecem e conseguem se ligar às proteínas de matriz extracelular das células humanas, tais como o fibrinogênio ou fibronectina (PATTI et al., 1994; OTTO, 2008; CROES et al., 2009; FOULSTON et al., 2014).

Se houver a implantação de DMI, tais como cateteres, implantes, stents, válvulas cardíacas, próteses, entre outros, as proteínas da matriz extracelular das nossas células cobrem a superfície deste dispositivo, e poderá ocorrer a interação específica entre estas proteínas com os MSCRAMMs, que posteriormente irão colonizar e formar o biofilme (OTTO, 2008; CROES et al., 2009; FOULSTON et al., 2014). Quando esta condição ocorre, aumenta-se a gravidade das infecções nosocomiais relacionadas aos *S. aureus* (NOURBAKSH; NAMVAR, 2016) e conseqüentemente, aumenta-se a probabilidade de desenvolvimento de infecções persistentes, crônicas e recorrentes (WELLS et al., 2011; CHUNG; TOH, 2014).

1.3.2.2 Etapa de maturação (proliferação ou acumulação)

Esta fase é caracterizada pela produção da matriz extracelular, que contribui para a agregação entre as células das bactérias que formarão o biofilme (OTTO, 2008; CROES et al., 2009). A maturidade acontece, principalmente, por meio do aumento da densidade populacional e também pela pronunciada produção e deposição desta matriz, composta basicamente por exopolissacarídeos (EPS), ácido teicóico, proteínas específicas e pelo DNA das células lisadas. Juntos irão modelar a estrutura do biofilme, aumentando a sua espessura, garantindo maior estabilidade e culminando na típica aparência tridimensional de um biofilme maduro (OTTO, 2008; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009; PERIASAMY et al., 2012).

No gênero *Staphylococcus*, a principal molécula responsável pela adesão entre as células bacterianas é a Adesina Polissacarídica Intracelular (PIA), também conhecida como poli-N-acetil- β -(1-6)-glicosamina (PNAG) que funciona como uma “cola” capaz de unir as células através de interações eletrostáticas (OTTO, 2008). A biossíntese da PIA/PNAG é regulada pelo produto dos genes do operon *ica*, o qual compreende os genes *icaABCD*, além do gene regulador *icaR* (ARCIOLA; BALDASSARRI; MONTANARO, 2001; OTTO, 2008; ARCIOLA et al., 2015; MCCARTHY et al., 2015; NOURBAKSH; NAMVAR, 2016). Além de ser fundamental na adesão das células bacterianas à superfície e nas funções

estruturais na arquitetura do biofilme, PIA/PNAG está implicada na evasão da capacidade imune do hospedeiro (ARCIOLA et al., 2015).

Inicialmente, pensava-se que a formação de biofilmes de *S. aureus* fosse dependente da produção da PIA (CRAMTON et al., 1999; O'GARA, 2007). No entanto, pesquisas mais recentes indicam que, em muitas estirpes, a PIA é dispensável para a formação de biofilmes (*ica*-independente) (GEOGHEGAN, et al., 2010; FERREIRA et al., 2012; FOSTER et al., 2014; FOULSTON et al., 2014; ARCIOLA et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2017). Embora ambos os tipos possam ser encontrados em isolados MSSA e MRSA, existem relatos na literatura propondo que a produção de biofilme pelo mecanismo *ica*-dependente seja mais comum em MSSA, enquanto que os biofilmes independentes de *ica* sejam freqüentemente observados em isolados MRSA (O'NEILL et al., 2007; CROES et al., 2009; FERREIRA et al., 2012; MCCARTHY et al., 2015; TAN et al., 2015).

1.3.2.3 Etapa de deslocamento ou dispersão

O biofilme maduro possui uma estrutura tridimensional, descrita na literatura como semelhante a uma “torre ou cogumelo” (Figura 3). Entre estas torres, existem canais cheios de fluido que têm uma função vital no fornecimento de nutrientes para as células das camadas mais profundas dessa estrutura (COSTERTON et al., 1995; OTTO, 2008; PERIASAMY et al., 2012). Em circunstâncias de privação de nutrientes, poderá ocorrer o deslocamento do biofilme e a dispersão de bactérias para outras regiões corpóreas não infectadas (CROES et al., 2009).

Esta etapa de dispersão, que pode ocorrer pelo desprendimento de células individuais ou grupos de células, é crítica durante uma infecção associada ao biofilme, pois permite que as bactérias se espalhem, através do sangue e outros fluidos corporais para novos locais, onde haverá a colonização e posterior infecção (OTTO, 2008; ARCHER et al., 2011; PERIASAMY et al., 2012). Além da escassez de nutrientes, outros fatores podem contribuir para que este descolamento ocorra, dentre eles (i) as forças mecânicas de cisalhamento, tais como o fluxo dentro de um vaso sanguíneo; (ii) a cessação da produção de EPS, responsáveis pelo aumento da espessura; e (iii) a presença de fatores de descolamento, como enzimas que destroem a matriz ou surfactantes (OTTO, 2008; PERIASAMY et al., 2012).

1.3.3 Infecções por *S.aureus* associadas ao biofilme

Os *Staphylococcus* spp. estão frequentemente envolvidos em infecções associadas ao biofilme, já que este é um dos mecanismos de virulência do gênero, que é formado por bactérias reconhecidamente comensais da pele e de mucosas humanas. Este fato coloca os *Staphylococcus* spp em lugar estratégico para infectar qualquer DMI que penetrar essas superfícies (OTTO, 2008; CROES et al., 2009; PERIASAMY et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2017). Entre os *S. aureus*, pode haver a formação dessas comunidades multicelulares em DMI, assim como em feridas crônicas, o que dificulta e muitas vezes impede o tratamento antiestafilocócico (JAMES et al., 2008; OTTO, 2008; FOULSTON et al., 2014; SPEZIALE et al., 2014).

Apesar de um progresso considerável no tratamento e controle de doenças infecciosas, um número significativo de pacientes são afetados por infecções associadas ao uso de DMI, causadas por *S. aureus* (PEEL et al., 2012; SINGHAI et al., 2012; SANCHEZ et al., 2013; CHATTERJEE et al., 2014; FRANCISCHETTO et al., 2014). Geralmente graves, podem ocorrer pouco tempo após o procedimento cirúrgico ou muito tempo após a implantação do dispositivo e incluem as infecções sanguíneas associadas a cateter venoso central, pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções do trato urinário associadas a cateter, infecções associadas a implantes ortopédicos e cardíacos (PEEL et al., 2012; DEEPTI et al., 2014; GARDNER et al., 2014; KIM et al., 2014; SULIS et al., 2014).

Uma vez estabelecidas na superfície dos DMI, as estirpes formadoras de biofilme são capazes de sobreviver e resistir a antibióticos em concentrações até 1000 vezes mais altas do que àquelas ativas nas mesmas bactérias no estado planctônico (CERI et al., 1999), o que dificulta de maneira direta e preocupante a erradicação deste tipo de infecção, que representa atualmente um dos maiores desafios a serem superados no ambiente hospitalar (FERREIRA et al., 2012; ARCIOLA et al., 2015). Em estudo realizado na Índia, por Singh e colaboradores (2010), foi demonstrado que vários antibióticos, como oxacilina, cefotaxima e vancomicina tinham reduzida penetração nos biofilmes produzidos por *S. aureus* e *S. epidermidis*.

1.4 Resistência aos antimicrobianos

A descoberta de compostos com atividade antimicrobiana no combate às infecções tornou-se imprescindível na prática clínica, pois reduziu drasticamente os altos níveis de mortalidade causados por doenças bacterianas na era pré-antibiótica (BARLOW, 2009; RANG et al., 2012). Além disso, o desenvolvimento e a comercialização dos antibióticos revolucionaram a medicina moderna, pois possibilitaram que procedimentos cirúrgicos de ponta, transplantes de órgãos, tratamento de pacientes com câncer, entre outros, pudessem ser realizados e aprimorados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; MUNITA; ARIAS, 2016).

No entanto, o aumento dos índices de resistência aos antimicrobianos na atualidade, vem resultando em cada vez menos opções terapêuticas suficientes para o tratamento infeccioso, visto a ineficiência das terapias de primeira e segunda escolhas para tratar alguns tipos de infecções (BASSETTI et al., 2013; GOLL; FARIA, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; VENTOLA, 2015). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a resistência aos antibióticos como uma das três ameaças mais importantes para a saúde pública do século XXI e um desafio para o controle das doenças infecciosas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; VENTOLA, 2015).

O uso indiscriminado e intensivo de alguns antimicrobianos, bem como a falta de desenvolvimento de novos fármacos pelas indústrias farmacêuticas, contribuíram de maneira significativa para o surgimento de microrganismos resistentes (DUPLESSIS; CRUM-CIANFLONE, 2011; BASSETTI et al., 2013; VENTOLA, 2015; MEEKER et al., 2016). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que cerca de 2 milhões de pessoas desenvolvam infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos, anualmente nos Estados Unidos, e que cerca de 23.000 morram como resultado direto dessas infecções (CDC, 2017).

As bactérias de forma geral possuem uma notável plasticidade genética, o que lhes permite responder a uma ampla gama de ameaças ambientais. Do ponto de vista evolutivo, as bactérias utilizam algumas estratégias para se adaptarem aos antibióticos, como: (i) a transferência horizontal de genes, através de plasmídeos e transposons, que permite a aquisição de fragmentos de DNA de fontes externas, que codificam para determinantes de resistência; (ii) as mutações nos genes associados ao mecanismo de ação dos antimicrobianos (alteração do sítio alvo); (iii)

as bombas de efluxo que conseguem remover o antimicrobiano de dentro da célula bacteriana (BARLOW, 2009; CHAMBERS; DELEO, 2009; OPLUSTIL et al., 2010; HAABER et al., 2015; MUNITA; ARIAS, 2016).

1.4.1 Resistência dos *S. aureus* à penicilina

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, foi um dos principais eventos que levaram à chamada “Era dos antibióticos”. Empregada com sucesso na terapia anti-estafilocócica, contribuiu consideravelmente para a redução das altas taxas de mortalidade causada pelos *S. aureus* (BARLOW, 2009; CHAMBERS; DELEO, 2009).

Entretanto, em meados da década de 1940, logo após a sua introdução na prática clínica, foram descritas as primeiras cepas que passaram a desenvolver resistência a esse antibiótico beta-lactâmico. Dentro de uma década, tornou-se também um problema significativo na comunidade, o que limitou o uso da penicilina e seus derivados nos anos subsequentes (RAMMELKAMP; MAXON, 1942; KIRBY, 1944; CHAMBERS; DELEO, 2009). Nos dias atuais, a resistência à penicilina se estende a grande maioria das estirpes de *S. aureus* (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2012; HAGSTRAND ALDMAN; SKOVBY; PÅHLMAN, 2017), sendo que nos Estados Unidos apenas 10% dos isolados de *S. aureus* são suscetíveis à penicilina (CDC, 2017).

Esta resistência é mediada pelo gene plasmidial *blaZ* que codifica a produção de beta-lactamases (penicilinasas), que hidrolisam e inativam o anel beta-lactâmico da penicilina, essencial para sua atividade antimicrobiana (LOWY, 2003; CHAMBERS; DELEO, 2009).

1.4.2 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Historicamente os *S. aureus* vêm aprimorando seus mecanismos de resistência aos antimicrobianos e eventos significativos na sua evolução estão ocorrendo desde meados do século passado. O desenvolvimento das penicilinas beta-lactamase estáveis, como a meticilina e a oxacilina, em 1959, permitiu a introdução na terapia clínica de drogas capazes de resistir à ação destas enzimas (SANTOS et al., 2007; SOUZA, 2011). No entanto, esta foi uma solução provisória,

já que em 1961 começaram a ser detectadas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina/oxacilina, denominadas MRSA/ORSA, que se disseminaram rapidamente, em vários países (BARBER, 1961; JEVONS, 1961; CHAMBERS; DELEO, 2009; HAVAEI et al., 2012). Os MRSA representam, ainda hoje, um grave problema de saúde pública tanto a nível hospitalar, quanto na comunidade (DAVID; DAUM, 2010; TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011; ITO et al., 2012; VAN HAL; LODISE; PATERSON, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; RAJEH et al., 2015; CDC, 2017).

1.4.2.1 Mecanismos de resistência à oxacilina

Estirpes de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) tornaram-se resistentes aos beta-lactâmicos pela aquisição do gene *mecA*, carregado em um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome-SCCmec*) (UTSUI; YOKOTA, 1985; LOWY, 2003; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; IWG-SCC, 2009; ITO et al., 2012; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; MARTINS et al., 2014). Ao contrário da resistência mediada por penicilinases, que são de estreito espectro, a resistência à meticilina se estende a todos os beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (CHAMBERS, 1988; CHAMBERS; DELEO, 2009; SOUZA, 2011; BRAGA et al., 2014; CDC, 2017), exceto à nova classe de cefalosporinas de 5ª geração, representada pela Ceftarolina e Ceftabiprole, que apresentam atividade anti-MRSA (FILE; WILCOX; STEIN, 2012; BATISTA et al., 2015; CDC, 2017).

Para a etapa final de síntese da parede celular bacteriana, deve haver a participação de cinco proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que são essenciais e têm alta afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos (VIEIRA, 2010; SOUZA, 2011; SERAFIM, 2013). No caso de cepas MRSA, o gene *mecA* codifica a produção de uma proteína adicional, PBP2a ou PBP2', que substitui as funções essenciais das PBPs. Isso permite a síntese da parede celular, mesmo na presença de altas doses desses fármacos, que em outras condições seriam letais à sobrevivência da célula bacteriana (UTSUI; YOKOTA, 1985; CHAMBERS, 1988; CHAMBERS, 2001; ZETOLA et al., 2005; SANTOS et al., 2007; CHAMBERS; DELEO, 2009; VIEIRA, 2010; SOUZA, 2011; ITO et al., 2012; BHATTA et al., 2016).

A resistência à oxacilina também pode ocorrer por outros mecanismos, menos comuns, não mediados pelo gene *mecA*. As cepas podem apresentar resistência *boderline* à oxacilina (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus* - BORSA), mediada por plasmídeos, que se caracteriza pela hiperprodução de beta-lactamases (McDOUGAL; THORNSBERRY, 1986; TOMASZ et al., 1989; SANTOS et al., 2007; MATHEWS et al., 2010; MAALEJ et al., 2012). Há também cepas conhecidas como *Modified Penicillin Binding Protein Staphylococcus aureus* (MODSA), que produzem PBPs modificadas, que não a PBP2a. (TOMASZ et al., 1989; SANTOS et al., 2007; MATHEWS et al., 2010).

Em ambos os casos as estirpes não possuem o gene *mecA*, são suscetíveis à cefoxitina, porém as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da oxacilina estão próximas aos pontos de corte (entre 1 e 8 µg/mL) (MATHEWS et al., 2010; SHORE; COLEMAN, 2013; KRUPA et al., 2014). Estudos demonstram que isolados MRSA *mecA* negativos resistentes a múltiplos beta-lactâmicos podem ser incorretamente classificados como sensíveis à meticilina com base na detecção do gene *mecA* ou PBP2a, levando a falhas no tratamento (BANERJEE et al., 2010; GRIFFITHS; O'NEILL, 2012; BA et al., 2014; ELHASSAN et al., 2015)

1.4.2.2 *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*)

No ano de 2001, a descoberta de que o gene *mecA* encontra-se sempre dentro de um elemento genético móvel (SCC*mec*), contribuiu de maneira considerável para a melhor compreensão da resistência à meticilina. Este avanço na biologia dos MRSA forneceu um recurso adicional no que diz respeito às relações evolutivas entre estas cepas, evidenciando ser uma importante ferramenta epidemiológica para a diferenciação destas estirpes (ITO et al., 2001; CHAMBERS; DELEO, 2009; MARTINS et al., 2014; GHASEMIAN; MIRZAEI, 2016).

Os SCC*mec* estão integrados dentro do gene *orfX*, com função ainda desconhecida (CHAMBERS; DELEO, 2009; DAVID; DAUM, 2010; LI et al., 2011; ITO et al., 2014). São formados por três elementos genéticos essenciais: (1) complexo do gene *mec*, seus genes regulatórios *mecR1* (indutor do gene *mecA*) e *mecI* (repressor do gene) e suas sequências de inserção (IS431); (2) complexo do gene *ccr*, que codifica a produção de recombinases, responsáveis pela integração, excisão e mobilidade deste elemento no genoma dos *S. aureus*; e (3) regiões

junkyard (J), que codificam resistência a antibióticos não beta-lactâmicos e metais pesados (ITO et al., 2001; MA et al., 2002; ITO et al., 2004; CHAMBERS; DELEO, 2009; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; DAVID; DAUM, 2010; VIEIRA, 2010; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; ITO et al., 2014).

Até o momento, doze tipos de SCC*mec* (I-XII) já estão descritos na literatura, que se diferenciam entre si pelo seu tamanho e pelos tipos de combinação entre os complexos dos genes *mec* e *ccr*, que formam sua estrutura (ITO et al., 2001; MA et al., 2002; ITO et al., 2004; OLIVEIRA; MILHEIRIÇO; LENCASTRE, 2006; BERGLUND et al., 2008; HIGUCHI et al., 2008; REINERT et al., 2008; CHAMBERS; DELEO, 2009; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009, IWG-SCC, 2009; ZHANG et al., 2009; LI et al., 2011; SHORE et al., 2011; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; ITO et al., 2014; WU et al., 2015).

Dentre estes, os SCC*mec* dos tipos I ao V são os mais comumente relatados em pesquisas científicas em todo o mundo (BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014). Os outros tipos de SCC*mec* foram mais recentemente descritos: (1) em 2006, tipo VI, em Portugal; (2) em 2008, tipo VII, em Taiwan; (3) em 2009, tipo VIII, no Canadá; (4) em 2011, tipos IX e X; (5) em 2011, tipo XI, na Irlanda; (6) em 2015, tipo XII, na China (OLIVEIRA; MILHEIRIÇO; LENCASTRE, 2006; BERGLUND et al., 2008; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; LI et al., 2011; SHORE et al., 2011; WU et al., 2015).

1.4.2.3 Panorama global das infecções causadas por MRSA

No final dos anos 2000, o número de óbitos decorrentes de infecções por MRSA em hospitais norte-americanos eram maiores do que as mortes causadas pelo vírus HIV e tuberculose juntos (BOUCHER et al., 2009). Em 2003, a resistência representava em torno de 60% das infecções causadas por *S. aureus* nos Estados Unidos (EUA) (NNIS, 2004).

Dados recentes publicados por Dantes e colaboradores (2013), mostraram que houve uma queda de 54,2% das infecções invasivas causadas por MRSA iniciadas três dias após a admissão hospitalar, porém a redução nos casos de infecções associadas à comunidade foi de apenas 5,0%, entre 2005 e 2011 nos EUA (DANTES et al., 2013).

Na Europa, a prevalência dos MRSA variou desde menos de 5% na Dinamarca, Suíça, Finlândia, até mais de 24% na Espanha, Reino Unido e Portugal, em 2009 (ECDC, 2009; DULON et al., 2011; DULON et al., 2014). Na China, em trabalho conduzido por Chen e colaboradores (2017), encontrou-se uma taxa de 23,9% de estirpes resistentes.

No Brasil, essas taxas variam muito dependendo do material clínico e da região geográfica de isolamento (FERREIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2010; CATÃO et al., 2013; BRAGA et al., 2014; MEDEIROS et al., 2015). Em trabalho inédito, realizado no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), verificou-se que as taxas de prevalência de infecções por MRSA, neste nosocômio, diminuíram significativamente, passando de 43,4% no ano de 2007, para 27,5% no ano de 2011 (RODRIGUES et al., 2015).

Resultados recentes de Programas de Vigilância em diferentes regiões norte-americanas vêm sugerindo um declínio na incidência dos tipos mais graves de infecções por MRSA (BURTON et al., 2009; KALLEN et al., 2010; DANTEs et al., 2013), como a que ocorreu no HUSM, o que reflete o sucesso das medidas das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (DULON et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015). Além disso, as melhorias no manejo precoce de infecções não-invasivas e as mudanças na virulência das cepas circulantes também podem ser apontadas como responsáveis pela queda nas taxas de MRSA em muitas instituições ao redor do mundo (DANTEs et al., 2013).

1.4.2.4 Classificação das cepas MRSA

Desde o aparecimento da primeira cepa MRSA, na década de 1960, vários clones emergiram e se tornaram uma importante causa de infecções nosocomiais em todo o mundo. Contudo, mudanças significativas na sua epidemiologia puderam ser detectadas, trinta anos mais tarde, com o surgimento de cepas MRSA associadas à comunidade, em pessoas sem exposição prévia a ambientes de cuidados de saúde e sem fatores de risco (CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010; DAVID; DAUM, 2010; VIEIRA, 2010; KIKUTA et al., 2011; DAVID et al., 2014).

Atualmente a epidemiologia das infecções por MRSA está se tornando cada vez mais complexa, com o acesso de estirpes comunitárias, que adquiriram

fragmentos adicionais e determinantes de resistência, em ambientes hospitalares, assim como certas linhagens, que são tipicamente hospitalares, circulando e infectando pacientes na comunidade (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; RAJEH et al., 2015).

Algumas características são importantes para classificar e diferenciar as infecções contraídas no ambiente hospitalar daquelas adquiridas na comunidade, tais como (i) tipagem dos *SCCmec*, (ii) distribuição dos genes de resistência, (iii) suscetibilidade aos antimicrobianos e (iv) fatores de risco associados à infecção por MRSA (DRYDEN, 2008; CHAMBERS; DELEO, 2009).

1.4.2.4.1 MRSA associado ao ambiente hospitalar (HA-MRSA)

As infecções por HA-MRSA são aquelas que ocorrem após hospitalização por um período superior a 48 horas; em pacientes imunocomprometidos; admitidos em unidades de terapia intensiva; pacientes com doenças crônicas, hemodialisados; submetidos à cirurgia recente, ventilação mecânica, tubo endotraqueal, nasogástrico ou traqueostomia. Outros fatores de risco incluem: consulta médica em ambiente hospitalar; convivência com profissionais de saúde ou pacientes colonizados por MRSA; terapia com antimicrobianos nos últimos 12 meses e presença de cateter percutâneo no momento da coleta da amostra (CHAMBERS, 2001; COHEN, 2007; RAJAN ET AL., 2015; CDC, 2017).

Estirpes de HA-MRSA se disseminaram em todo o mundo, com um número limitado de clones, carreando geralmente os *SCCmec* tipos I, II e III (OKUMA et al., 2002; ITO et al., 2003; CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; BONESSO et al., 2014; MARTINS et al., 2014). Apresentam resistência a outras classes de drogas utilizadas no tratamento de infecções estafilocócicas, como as lincosamidas, macrolídeos, tetraciclina e aminoglicosídeos, o que restringe muito as opções para o tratamento deste tipo de infecção (ITO et al., 2001; ZETOLA et al., 2005; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

As principais características de cepas HA-MRSA estão descritas resumidamente na Figura 2.

Figura 2 – Principais características dos SCCmec tipos I, II e III, associados à cepas MRSA de origem hospitalar (HA-MRSA).

<p>SCCmec tipo I</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tamanho: 34.3 kb • 1º caso: Reino Unido, 1960 • Clones: Arcaico (I), Ibérico (IA) • Características: possuem o gene <i>mecA</i> como o único determinante de resistência
<p>SCCmec tipo II</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tamanho: 53.0 kb • 1º caso: Japão, 1982 • Clones: New York/Japão , EMRSA-16 • Características: multirresistente, com vários determinantes de resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos, podendo conter genes de resistência adicionais integrados em plasmídeos e transposons
<p>SCCmec tipo III</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tamanho: 66.9 kb • 1º caso: Nova Zelândia, 1985 • Clones: Clone Endêmico Brasileiro (BEC) • Características: multirresistente, apresentando vários determinantes de resistência às drogas utilizadas na terapia antiestafilocócica

Fonte: Adaptado de JEVONS, 1961; ITO et al., 2001; ZETOLA et al., 2005; CHAMBERS; DELEO, 2009; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009.

Estudos recentes, realizados em hospitais de Porto Alegre, no ano de 2012, e Santa Catarina, entre 2009 e 2013, observaram maior prevalência de infecções causadas por cepas de MRSA hospitalares, sendo que no estado catarinense o índice de infecções causadas por HA-MRSA foi superior a 80% (SILVEIRA et al., 2015; BATISTA; D'AZEVEDO, 2016). No Brasil, o clone Endêmico Brasileiro (BEC), carreador de SCCmec tipo III (CHAMBERS; DELEO, 2009), é o clone circulante mais prevalente dentre os hospitais, responsável pela maioria das infecções nos serviços de saúde em todo o país (PEREZ; D'AZEVEDO, 2008; CAMPOS et al., 2012; SILVEIRA et al., 2015; ANDRADE-FIGUEIREDO, LEAL-BALBINO, 2016).

1.4.2.4.2 MRSA associado à comunidade (CA-MRSA)

S. aureus resistentes à metilina associados à comunidade emergiram na década de 1990, entre aborígenes australianos sem acesso a serviços de saúde e sem fatores de risco estabelecidos para uma infecção por MRSA (UDO; PEARMAN; GRUBB, 1993). Desde então, têm sido reportadas mundialmente em pacientes hígidos e em sub-populações específicas como recrutas militares, crianças que freqüentam creches, presidiários, equipes esportivas, entre outros, tornando-se um alerta global de saúde pública (CHAMBERS; DELEO, 2009; DAVID; DAUM, 2010; UDO et al., 2011; BRAGA et al., 2014; MIU-LING et al., 2014).

A rapidez e a extensão com que os CA-MRSA se espalharam têm sido notável e alguns estudos têm mostrado que estas cepas estão substituindo cepas HA-MRSA dentro de ambientes de cuidados de saúde (VALESIA et al., 2010; KIKUTA et al., 2011). São consideradas mais virulentas e transmissíveis do que as cepas HA-MRSA, podendo levar a surtos e hospitalizações de adultos jovens ou adolescentes saudáveis (DELEO et al., 2010; MIU-LING et al., 2014; RAJAN et al., 2015).

Caracterizam-se por causar infecções na ausência de fatores de risco e adquiridas com menos de 48 horas de internação hospitalar (UDO et al., 2011; LEUNG et al., 2012; RAJAN ET AL., 2015; CDC, 2017). Podem ser identificadas através de suas características genéticas, pois na grande maioria dos casos, carregam *SCCmec* dos tipos IV e V (MA et al., 2002; VIEIRA, 2010; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; BONESSO et al., 2014) e genes implicados na produção da leucocidina Pantón-Valentine (PVL), um importante fator de virulência que está associado com abscessos cutâneos e pneumonia necrotizante (MACHUCA; GONZÁLEZ; SOSA, 2014; SHRESTHA et al., 2014; BHATTA et al., 2016).

São tipicamente susceptíveis a múltiplos antimicrobianos, com padrões de suscetibilidade aos antibióticos não beta-lactâmicos bastante semelhantes às de cepas MSSA e estão associados a uma maior diversidade clonal em comparação com HA-MRSA (ITO et al., 2001; MA et al., 2002; OKUMA et al., 2002; ITO et al., 2003; ZETOLA et al., 2005; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; BONESSO et al., 2014). Devido ao seu menor tamanho, quando comparado

com os tipos II e III, são possivelmente mais móveis, o que lhes confere uma vantagem evolutiva na pressão relacionada aos antibióticos no ambiente hospitalar, e a possibilidade de se disseminarem rapidamente na comunidade (COHEN, 2007).

Na Figura 3, encontram-se descritas algumas características importantes de cepas de CA-MRSA, carreadoras de *SCCmec* tipos IV e V.

Figura 3 – Principais características dos *SCCmec* tipos IV e V, associados à cepas MRSA de origem comunitárias (CA-MRSA).



Fonte: Adaptado de ITO et al., 2001; MA et al., 2002; ITO et al., 2004; ZETOLA et al., 2005; CHAMBERS; DELEO, 2009; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; BALAKUNTLA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014.

No Brasil, os primeiros relatos de infecções por CA-MRSA foram verificados em pacientes com bacteremia em hospitais do Rio Grande do Sul, (RIBEIRO et al., 2005), e desde então, outros estudos vem identificando estirpes carreadoras de *SCCmec* tipo IV disseminados em outras instituições brasileiras (MIMICA et al., 2011; GELATTI et al., 2013; LIMA et al. 2014; CARVALHO et al., 2017).

1.4.2.4.3 MRSA associado à criação de animais (LA-MRSA)

Mais recentemente, um novo tipo de MRSA começou a ser estudado. Os *S. aureus* resistentes à meticilina associados à criação de animais (*Livestock associated MRSA - LA-MRSA*), colonizam gados, cavalos, porcos, aves e cães. A transmissão zoonótica de tal MRSA para os seres humanos, através do contato direto com estes animais, contaminações ambientais ou consumo de carnes é um motivo de preocupação, pois nos últimos anos, estas estirpes têm sido introduzidas em ambiente hospitalar (CUNY; KÖCK; WITTE, 2013; MONACO et al., 2013; BALLHAUSEN et al., 2014; CUNY; WIELER.; WITTE, 2015).

O principal complexo clonal (CC) envolvido em infecções por LA-MRSA é o CC 398, carreador de *SCCmec* tipos IV, V ou VII, porém outras linhagens clonais, incluindo CC5, CC9 e CC97 foram também detectadas (CUNY; KÖCK; WITTE, 2013; MONACO et al., 2013; PRICE et al., 2013; CUNY; WIELER.; WITTE, 2015). Quando introduzido no hospital, podem causar infecções de feridas pós-operatórias e até mesmo septicemia (CUNY; KÖCK; WITTE, 2013).

1.5 Justificativa

As altas taxas de morbimortalidade associadas a infecções por *Staphylococcus aureus*, em especial por MRSA, que se espalharam rapidamente tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, representam nos dias atuais uma preocupação para instituições de saúde e autoridades governamentais de todo o mundo.

Em estudo defendido em minha dissertação (RODRIGUES et al., 2015), comprovou-se que as taxas de prevalência das infecções por MRSA vêm diminuindo anualmente no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Apesar desta diminuição, as características epidemiológicas acerca dos *SCCmec*, bem como seus fatores de patogenicidade, como a produção de biofilmes permanecem desconhecidas neste nosocômio, que atende a mais de 40 municípios da região central do Estado do Rio Grande do Sul.

Estes resultados nos motivaram a dar continuidade a este trabalho, inédito no HUSM, para que o conhecimento da potencial virulência imposta pelos *S. aureus*

possa contribuir de maneira positiva para a conduta clínica, prevenção e controle da sua disseminação em nosso nosocômio.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo geral

Caracterizar as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), quanto a tipagem fenotípica e molecular dos SCC*mec*, bem como a produção de biofilme.

1.6.2 Objetivos específicos

- Determinar a porcentagem de estirpes MRSA, gene *mecA* positivas
- Avaliar os tipos de SCC*mec* mais prevalentes no HUSM, através da PCR;
- Determinar a prevalência de estirpes HA-MRSA e CA-MRSA nos anos de 2008, 2011 e 2015;
- Comparar se houve mudança no perfil dos MRSA nos três anos;
- Traçar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos MRSA isolados;
- Avaliar diferentes testes fenotípicos e genotípico na determinação da formação de biofilme pelas cepas, no ano de 2011;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados produtores de biofilme.

2 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

2.1 Manuscrito 1

SCC*mec* typing of MRSA strains isolated for three years at a teaching hospital in Brazil*

Mônica de Abreu Rodrigues^a, Fernanda Aguirre Carvalho^a, Tacieli Fagundes da Rosa^a, Angelita Bottega^a, Silvana Oliveira dos Santos^a, Daniel Ângelo Sganzerla Graichen^b, Patrícia Chaves Brites^c, Manfredo Hörner^d, Rosmari Hörner^{a,e}

^aLaboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^bDepartamento de Zootecnia e Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^cHospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^dDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^eDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

* Manuscrito submetido ao *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Anexo B).

ABSTRACT

Background & objectives: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is known worldwide as one of the pathogens most frequently associated to nosocomial and community infections. The molecular characterization of types of SCC*mec* is very important considering the constant changes in MRSA epidemiology, what makes it the best criterium to differentiate strains of hospital origin (HA-MRSA) from the ones of community origin (CA-MRSA). The aim of this study was to determine the most common types of SCC*mec* in MRSA isolated for three years at a university hospital in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Methods:** One hundred thirteen

mecA-positive MRSA were assessed in three distinct periods: 38 samples (2008), 37 (2011) and 38 (2015), obtained from different clinical specimens of patients assisted at a teaching hospital in Santa Maria, RS. SCC*mec* typing was performed through PCR and the susceptibility profile was performed through automated methods (MicroScan® - Siemens and Vitek® 2 - bioMérieux). **Results:** SCC*mec* type I was the most isolated (39.8%), followed by type IV (23.0%), type II (15.1%), and type III (6.2%). Non-typed samples represented 15.9%. HA-MRSA (72.6%) predominated over CA-MRSA (27.4%) in the analysis of strains origin. All MRSA were multidrug resistant, with high resistance rates to clindamycin and erythromycin, besides a significant decrease of resistance to gentamycin, rifampicin and trimethoprim-sulfamethoxazole. There was 100% susceptibility to vancomycin and linezolid. **Interpretation & conclusions:** Multidrug resistant HA-MRSA strains were the most predominant in the studied hospital, being HA-MRSA type I the most recurrent.

Keywords: bacterial resistance – community origin – hospital origin – MRSA – molecular typing – SCC*mec* - *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus stands out as one of the pathogens most associated with soft tissues and skin infections, pneumonia, endocarditis, septicemia, among others, what results in high rates of morbimortality worldwide^{1,2}. Their innate ability to adapt as well as the acquisition of mobile genetic elements has led to the occurrence of resistance to several classes of antimicrobial drugs used in antistaphylococcal therapy^{3,4}.

The *mecA* gene, responsible for the resistance to beta-lactam antibiotics, is carried inside a mobile genetic element called Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*), and its insertion in the chromosome of susceptible strains has culminated with the occurrence of *S. aureus* strains resistant to methicillin (MRSA)^{5,6}.

Some factors may be cited to express the significant role of MRSA transmission and the success of its dissemination worldwide, with the increase of movement of people to different areas within a country, or distinct countries or

continents through international travels^{7,8}, besides the excessive and indiscriminate use of broad spectrum antimicrobials⁹.

For several years, most MRSA have been limited to hospital environments (HA-MRSA), mainly infecting patients with multiple comorbidities, with compromised immune system, submitted to surgery, or making use of medical devices^{2,10}. Nevertheless, in the mid-1990s, considerable changes occurred in their epidemiology, detected by the increased number of infections caused by community-acquired strains (CA-MRSA) in patients without previous risk factors and with no exposure to health care environments, what represented a competitive advantage in relation to HA-MRSA^{2, 10-12}.

SCC*mec* relates to hospital and community isolates, showing to be an important epidemiological tool for the differentiation of these strains^{5,6}. Genotypic variations reflect on their characteristics of resistance to antimicrobials, being SCC*mec* types I, II, III associated to HA-MRSA¹³⁻¹⁵, generally difficult to treat and resistant to multiple classes of antibiotics such as aminoglycosides, macrolides and quinolones due to additional resistance genes¹⁶. On the other hand, CA-MRSA strains, which carry smaller cassette chromosomes (SCC*mec* types IV and V) have been recognized for being more susceptible to non beta-lactam antibiotics^{2,5,13,14}. Currently, 11 types of SCC*mec* are described in literature, being types from I to V the most studied and best characterized¹⁷.

Due to the complex nature and the increasing diversity of the SCC*mec*, which reflect on constant changes in the epidemiology of MRSA in health services worldwide, this study aimed to determine the most prevalent types of SCC*mec* in MRSA strains isolated for three years at a teaching hospital in Santa Maria, Rio Grande do Sul, south Brazil.

MATERIAL & METHODS

Collection of bacteria strains

A total of 476 *S. aureus* was collected, being isolated from different clinical materials of patients assisted at Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), in Santa Maria, Rio Grande Sul (RS), in three distinct periods: 2008 (192 strains), 2011 (140 strains) and 2015 (144 strains). HUSM is a teaching hospital with 403 beds,

being 354 for hospitalization and 49 for Intensive Care Unit (ICU), besides 58 outpatient rooms that assist more than 30 cities of the central region in Rio Grande do Sul, south Brazil.

Identification of *S. aureus* was performed out in the Clinical Analysis Laboratory at HUSM through conventional standardized phenotypic tests¹⁸. Only one sample per patient was included in this study. Bacteria were randomly collected and remained stored in Tryptic Soy Agar with 15% glycerol at -80 °C, in the Laboratory of Bacteriology, of the Department of Clinical and Toxicological Analysis of Federal University of Santa Maria (UFSM) until all tests were performed.

Selection of MRSA

To characterize strains as MRSA, screening with cefoxitin disk (30 µg) was performed in all collected samples, through the Disk Diffusion technique, according to recommendations from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), using the *S. aureus* strain ATCC 25923 for quality control testing¹⁹.

Furthermore, all strains were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) to confirm the presence of the *mecA* gene, according to the conditions described in Table I.

Antimicrobial Susceptibility Testing

Following MRSA selection, susceptibility of these strains to antimicrobials was tested with the automated systems MicroScan® (Siemens), in 2008 and 2011, and Vitek® 2 (bioMérieux) in 2015. Interpretation of results followed recommendations from CLSI, and *S. aureus* ATCC 29213 was used for quality control¹⁹. The antimicrobials tested were clindamycin, erythromycin, gentamicin, linezolid, rifampicin, trimethoprim-sulfamethoxazole and vancomycin.

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted by thermal lysis based on the protocol used by Moosavian et al., with alterations²⁰. MRSA were firstly inoculated in Mueller-Hinton agar, and two to five isolated colonies were suspended in 750 µL TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8). The suspension was then submitted to dry boil for 20 min at 100 °C, and frozen at -80 °C for 20 more minutes. The extracted DNA performance

was confirmed through Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen™) before the assays based on PCR were developed.

Molecular typing by PCR

Amplification of genes 16S

The gene 16S worked as an internal control to assess the quality of DNA extraction and to discard any amplification inhibitors. The conditions and the primers used are described in Table I, following the protocol by Lina et al., with adaptations²¹.

Typing of SCC*mec*

All MRSA isolates were submitted to PCR to detect five types of SCC*mec* (I, II, III, IV and V). Primers sequence and PCR conditions used were based on the work by Boye et al., with adaptations²².

PCR was performed in a Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA). An aliquot of 2,0 µL of DNA was added to 23 µL of PCR mix, containing 13.8 µL of Mili-Q ultrapure water, 2.5 µL of buffer 10X, 2.0 µL MgCl₂ 50 mM, 2.0 µL dNTP set 100mM (dATP, dUTP, dGTP and dCTP), 1,25 µL of each primer, and 0.2 µL of Taq DNA polymerase 5U/ µL. A negative control was used in all assays, without a DNA sample. PCR amplicons were visualized in transilluminator after 2% agarose gel electrophoresis containing 0,5 µg/mL of ethidium bromide.

Classification criteria

In this work, strains that presented SCC*mec* types I, II and III were considered HA-MRSA, and types IV and V were considered CA-MRSA.

Ethical Considerations

The present study was submitted to the Research Ethics Committee of UFSM and approved under CAAE: 0117.0.243.000-08 and CAAE: 38850614.4.0000.5346.

Table I. Conditions and primers used in PCR reactions.

Gene	Primer [#]	Primer sequence (5' → 3')	Band size	Ref.	PCR conditions
ccrA2-B (SCCmec type II and IV)	β	ATTGCCTTGATAAT AGCCYTC	937 bp	22	Initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles of 4 min at 94 °C; 30 s at 94 °C; 60 sec at 56 °C; 60 sec at 72 °C; final extension of 4 min at 72 °C.
	α3	TAAAGGCATCAAT GCACAAACACT			
ccrC (SCCmec type III and V)	ccrCF	CGTCTATTACAAGA TGTTAAGGATAAT	518 bp	22	
	ccrCR	CCTTTATAGACTGG ATTATTCAAATAT			
IS1272 (SCCmec type I and IV)	1272F1	GCCACTCATAACAT ATGGAA	415 bp	22	
	1272R1	CATCCGAGTGAAA CCCAA			
mecA– IS431 (SCCmec type V)	5RmecA	TATACCAAACCCG ACAACACTAC	359 bp	22	
	5R431	CGGCTACAGTGAT AACATCC			
16S	16S_F	TTGTACACACCCGC CCGTCA	492 pb	21	
	16S_R	GGTACCTTAGATG TTTCAGTTC			
mecA	mecA	GTGAAGATATACC	147 pb	23	
	147-F	AAGTGATT			
	mecA	ATGCGCTATAGATT			
	147-R	GAAAGGAT			

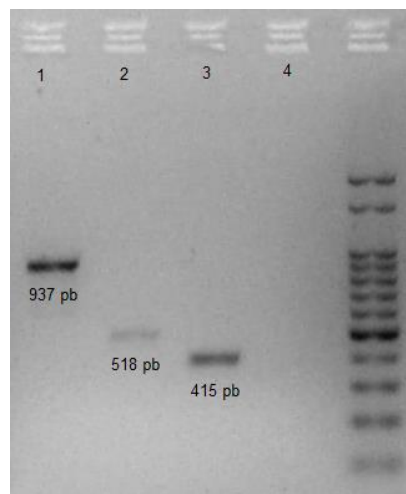
[#] All primers used in this work were synthesized by Ludwig Biotec® (Alvorada, RS).

RESULTS

From the 476 *S. aureus* collected, 113 were identified as *mecA*-positive MRSA: 38 in 2008, 37 in 2011 and 38 in 2015. The highest isolation occurred in clinical samples from lower respiratory tract secretions (39.0%), followed by surgical wound secretions (10.6%), blood (9.7%), liquids in general (6.2%), catheter tip (4.4%), urine (3.5%) and bedsore (1.8%). Secretions in general, from several sites, comprised 24.8% of isolations.

Among the 113 MRSA we verified that SCC*mec* type I was the most isolated (39.8%), followed by type IV (23.0%), type II (15.1%) and type III (6.2%). Eighteen samples (15.9%) showed no amplification of any studied primers and were considered non-typed (NP). Figure 1 shows an agarose gel with the studied SCC*mec* types.

Figure 1. Electrophoresis gel with PCR amplification products.



1- *ccrA2-B* gene; 2- *ccrC* gene; 3- *IS1272* gene; 4- negative control.

Through the analysis of each year separately, as shown in Table II, we detected that strains carrying SCC*mec* type I were the most prevalent in 2008 totalling more than half of all tested strains isolated in the period. The same could be observed in 2011 when 54.11% of isolates were type I. In this year, the number of strains amplified to SCC*mec* type IV increased 10 times compared to the previous year. In 2015, an increase of strains of SCC*mec* type IV was detected, as well as a

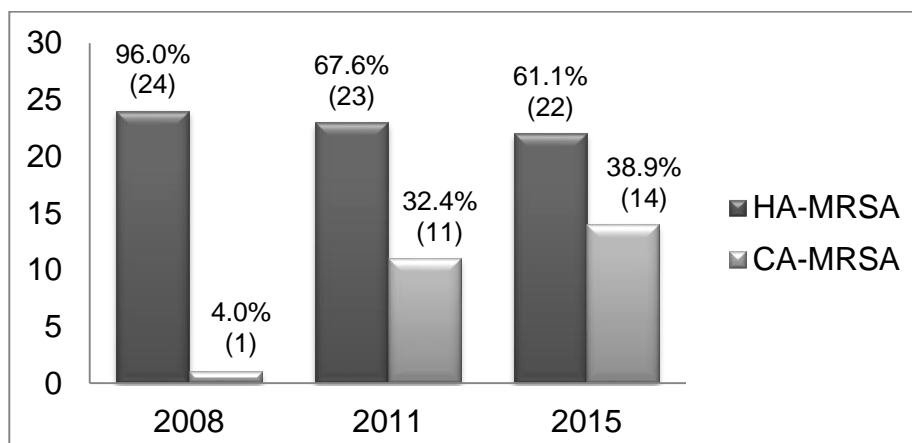
decrease in type I, and the occurrence of type II strains, which were not detected in previous periods.

Table II. Distribution frequency of the 113 *mecA*-positive *S. aureus* (MRSA) in 2008, 2011 and 2015 at Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

SCC <i>mec</i>	2008	2011	2015	Total
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
I	52.7 (20)	54.1 (20)	13.2 (5)	39.8 (45)
II	-	-	44.7 (17)	15.1 (17)
III	10.5 (4)	8.1 (3)	-	6.2 (7)
IV	2.6 (1)	29.7 (11)	36.8 (14)	23.0 (26)
V	-	-	-	-
NT	18.4 (13)	8.1 (3)	5.3 (2)	15.9 (18)
Total % (n)	100 (38)	100 (37)	100 (38)	100 (113)

When classifying *S. aureus* according to their origin, we verified that HA-MRSA strains (69/95 – 72.6%) predominated in comparison to CA-MRSA (26/95 – 27.4%) in the three studied periods, as shown in Chart 1. For such classification, 18 non-typed samples were excluded. We verified that respiratory tract secretions were the clinical material with most isolates not only hospital (43.5%) but also community strains (23.1%).

Chart 1. Distribution frequency of the 95 *mecA*-positive *S. aureus* (MRSA) typed in 2008, 2011 and 2015 at Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).



Regarding MRSA susceptibility, it is possible to observe that all tested strains were 100% susceptible to vancomycin and linezolid, in the three periods studied. For the other antimicrobials, they showed different susceptibility rates, as shown in Table III.

Table III. Resistance profile of the 95 *mecA*-positive *S. aureus* (MRSA) typed in 2008, 2011 and 2015 at Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

Antimicrobials	HA-MRSA			CA-MRSA		
	2008	2011	2015	2008	2011	2015
	% (n = 24)	% (n = 23)	% (n = 22)	% (n = 1)	% (n = 11)	% (n = 14)
Clindamycin	91.7	56.5	90.9	100	63.6	71.4
Erythromycin	95.8	65.2	95.5	100	72.7	71.4
Gentamicin	95.8	43.5	9.1	100	36.4	7.1
Rifampicin	58.3	4.4	0	0	0	0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	16,7	34.8	4.5	100	36.4	14.3

DISCUSSION

MRSA are considered the main etiological agent of nosocomial and community infections worldwide^{8,11,24}. In recent decades, epidemiology of infections caused by MRSA has become increasingly complex, with the access of CA-MRSA strains with additional and determinant resistance fragments in hospital environments, as well as certain strains that are typically HA-MRSA circulating in the community^{25,26}. Thus, molecular characterization has been considered the best criteria to differentiate MRSA strains of hospital or community origin²⁶.

The present work shows that HA-MRSA infections predominated over those caused by community strains in the three periods studied at HUSM, as shown in Chart 1. Batista and d'Azevedo²⁷ reported the prevalence of infections caused by HA-MRSA strains in a study developed in hospitals in Porto Alegre, in 2012. The same has happened in a study developed by Silveira et al.²⁸ in hospitals in Santa

Catarina, between 2009 and 2013, which evidenced rates higher than 80% of infections caused by HA-MRSA strains. These data reinforce the need to control these strains in hospital environments, and confirm the high rates of circulation of HA-MRSA strains in south Brazil.

This has been clearly shown by the high number of strains carrying SCC*mec* types I, II and III, that together totalled 72.6% of isolations within the whole period studied, being type I the most prevalent (39.8%). When we analyze the three years separately, the predominance of type I continues to be observed in the first two periods, being surpassed only by type II in 2015. Our results are similar to other studies that also evidenced prevalence of cassettes types I and II^{27,29-32}.

The Brazilian Endemic Clone (BEC), carrier of SCC*mec* type III, has been recognized as the most prevalent circulating clone in Brazilian hospitals, being responsible for most infections in health services in the whole country^{28, 33-35}. However, at HUSM, these strains represented only 6.2% of the total number of studied MRSA.

Although HA-MRSA were identified as the major responsible for infections by methicillin-resistant *S. aureus* at HUSM, it is important to highlight the predominance of type IV carrier strains, which increased considerably in the second period studied in relation to the previous period, being second in the total number of isolations (23.0%). These strains have predominated in other health institutions in several parts of the world, making CA-MRSA strains prevalent over hospital strains^{11,15,26,36,37}. Our results evidence the importance of continuous investigation of prevalent types of MRSA in our hospital in order for the necessary measures to control their dissemination to be promptly implemented.

Non-typed isolates (NT) represented 15.9% of MRSA studied, and their presence could be probably attributed to other types of SCC*mec* than the ones researched in this study, or variations of genetic elements inserted in cassettes that result in variants of the most frequent types^{5,27}.

Most isolations of MRSA occurred in lower respiratory tract secretions in both HA-MRSA (43.5%) and CA-MRSA (23.1%), and included tracheal secretion, sputum and bronchoalveolar lavage. Subsequently, there was predominance in surgical wound secretions and blood. Similar results were found in other studies that evidence respiratory secretions as the main sources of isolation and dissemination of MRSA^{28,30}.

When comparing the susceptibility profile to antimicrobials, we observe that all strains were resistant to more than three classes of antimicrobials, and could be classified as multidrug resistant (MDR), both the ones isolated in hospitals and in the community. It was verified that in 2008 and 2015 all strains (HA-MRSA and CA-MRSA) showed high resistance rates (>70%) to clindamycin and erythromycin, whereas resistance to other antimicrobials decreased considerably from the first to the last period studied, remaining unchanged to rifampicin among the CA-MRSA.

For hospital strains, these results are justified by the characteristics of distribution of resistance genes and susceptibility profile to antimicrobials of HA-MRSA, generally multiresistant to therapy drugs such as aminoglycosides, lincosamides and macrolides, largely restricting the options to treatment of this type of infection^{13,16,38}.

Among CA-MRSA strains, although they are more susceptible to non beta-lactam antimicrobials^{2,5,13} as other studies described in the literature have demonstrated^{11,36,37}, in the HUSM this tendency was not observed. As in the study developed in Saudi Arabia by Eed et al.³¹ between 2013 and 2014, where they found high rates of resistance to non beta-lactam antimicrobials, the same has possibly been happening with these bacteria at HUSM, and many times they are acquired in the community before admission to hospital, leading to new resistance determinants in the hospital^{25,26}.

The predominance of HA-MRSA strains in our hospital highlights the importance to make a careful choice of adequate antibiotics therapy for these cases. It is also possible to observe that all tested strains showed 100% susceptibility to vancomycin and linezolid in the three periods studied, similarly to other studies that also demonstrate high susceptibility to these drugs^{24,30,36}. According to our results, it is possible to list rifampicin and trimethoprim-sulfamethoxazole, besides vacomycin and linezolid, as alternatives for the two types of MRSA infections, since they are the antimicrobials to which *S. aureus* showed higher susceptibility.

The results of this study allow us to conclude that multidrug resistant strains carrying SCC*mec* type I are the most predominant at HUSM, and that epidemiological characterization of methicillin-resistant *S. aureus* is vital to prevent and control the dissemination of these strains in our hospital. The epidemiological profile in this hospital is different from the one found in other Brazilian hospitals, where SCC*mec* type III is predominant.

REFERENCES

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339 : 520-32.
2. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23 : 616-87.
3. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7 : 629–41.
4. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, *et al.* Cole detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 : 3765-73.
5. Martins A, Riboli DFM, Pereira VC, Cunha MLRS. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. *Braz J Infect Dis* 2014; 18 : 331-5.
6. Ghasemian A, Mirzaee M. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains and the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types in Iran. *Infect Epidemiol Med* 2016; 2 : 31-4.
7. Rogers BA, Aminzadeh Z, Hayashi Y, Paterson DL. Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clin Infect Dis* 2011; 53 : 49-56.
8. Abdulgader SM, Shittu AO, Nicol MP, Kaba M. Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review. *Front Microbiol* 2015; 6 : 1-21.
9. Navidinia M, Fallah F, Lajevardi B, Shirdoost M, Jamali J. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolated from health care providers in Mofid Children Hospital. *Arch Pediatr Infect Dis* 2015; 3 : e16458.
10. Rajan V, Schoenfelder SM, Ziebuhr W, Gopal S. Genotyping of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in a tertiary care centre in Mysore, South India: ST2371-SCCmec IV emerges as the major clone. *Infect Genet Evol* 2015; 34 : 230-5.
11. Tavares A, Miragaia M, Rolo J, Coelho C, de Lencastre H, CA-MRSA/MSSA working group. High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community-hospital boundaries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32 : 1269-83.
12. Balakuntla J, Prabhakara S, Arakere G. Novel rearrangements in the staphylococcal cassette chromosome *mec* type V elements of Indian ST772 and

ST672 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *PLoS One* 2014; 9 : e94293.

13. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, *et al.* Structural comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 : 1323-36.

14. Kuo SC, Chiang MC, Lee WS, Chen LY, Wu HS, Yu KW, *et al.* Comparison of microbiological and clinical characteristics based on SCC*mec* typing in patients with community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39 : 22-6.

15. Gomez E, Chiang T, Hogan PA, Myers DE, Huang DB. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* SCC*mec* Type and its association with clinical presentation, severity, and length of stay among patients with complicated skin and skin structure infections. *Adv Infect Dis* 2014; 4 : 111-5.

16. Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40 : 101-11.

17. Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, *et al.* Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA. *Methods Mol Biol* 2014; 1085 : 131-48.

18. Winn Jr W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, *et al.* Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, Document M100-S25. Wayne (USA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

20. Moosavian M, Shoja S, Rostami S, Torabipour M, Farshadzadeh Z. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to *erm* genes, Iran. *Iran J Microbiol* 2014; 6 : 421-7.

21. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to Macrolides, Lincosamides and Streptogramins among Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 : 1062-6.

22. Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Møller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCC*mec* types I-V. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 : 725-7.

23. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal Cassette

Chromosome *mec* types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43 : 5026-33.

24. Mohammadi S, Sekawi Z, Monjezi A, Maleki MH, Soroush S, Sadeghifard N, *et al.* Emergence of SCC*mec* type III with variable antimicrobial resistance profiles and *spa* types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from healthcare- and community-acquired infections in the west of Iran. *Int J Infect Dis* 2014; 25 : 152-8.

25. Figueiredo AMS, Ferreira FA. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109 : 265-78.

26. Rajeh M, Sabra A, Kissoyan KAB, Fadlallah S, Matar GM. Molecular characterization of staphylococcal cassette chromosome *mec* and virulence encoding genes in methicillin-resistant Staphylococci at a medical center in Lebanon. *Int Arabic J Antimicrob Ag* 2015; 5 : 1-12.

27. Batista BG, d'Azevedo PA. Profile of SCC*mec* types in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a hospital in Southern Brazil. *J Health Biol Sci* 2016; 4 : 5-7.

28. Silveira ACO, Cunha GR, Caierão J, Cordova CM, d'Azevedo PA. MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. *Braz J Infect Dis* 2015; 19 : 384-9.

29. Buntaran L, Hatta M, Sultan AR, Dwiyantri R, Sabir M. Scc*mec* type II gene is common among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Jakarta, Indonesia. *BMC Res Notes* 2013; 6 : 1-7.

30. Ebrahim-Saraie HS, Motamedifar M, Sarvari J, Alfatemi SMH. Emergence of SCC*mec* type I obtained from clinical samples in Shiraz Teaching Hospitals, South-West of Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8 : e16998.

31. Eed EM, Ghonaim MM, Hussein YM, Saber TM, Khalifa AS. Phenotypic and molecular characterization of HA-MRSA in Taif hospitals, Saudi Arabia. *J Infect Dev Ctries* 2015; 9 : 298-303.

32. Hussein NR. Prevalent genotypes of *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthcare workers in Duhok City, Kurdistan Region, Iraq. *Int J Infect* 2016; 3 : e35375.

33. Perez LR, D'Azevedo PA. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in south Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50 : 135-7.

34. Campos GB, Souza SG, Lobão TN, da Silva DC, Sousa DS, Oliveira PS, *et al.* Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. *New Microbiol* 2012; 35 : 183-90.

35. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiology* 2016; 16 : 1-9.
36. Lima DF, Brazão NB, Folescu TW, Neves FP, Ferreira AG, Santos EA, *et al.* Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene carriage among *Staphylococcus aureus* strains with SCC*mec* types I, III, IV, and V recovered from cystic fibrosis pediatric patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 78 : 59-62.
37. Machuca MA, González CI, Sosa LM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causes both community-associated and health care-associated infections in children at the Hospital Universitario de Santander. *Biomedica* 2014; 34 : 163-9.
38. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect Dis* 2001; 5 : 163-70.

2.2 Manuscrito 2

Evaluation of different methods for detection of biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolates**

Mônica de Abreu Rodrigues^a, Silvana Oliveira dos Santos^a, Fernanda Aguirre Carvalho^a, Angelita Bottega^a, Tacieli Fagundes da Rosa^a, Marissa Bolson Serafim^a, Patrícia Chaves Brites^b, Rosmari Hörner^{a,c}

^aLaboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^bHospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^cDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

** Manuscrito submetido ao *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* (Anexo C).

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* is known worldwide as a frequent cause of a great variety of infectious diseases. Recognized for their ability to form biofilms, they are also associated with chronic and recurrent infections in humans. Different phenotypic methods are described to detect biofilm production and to search for the *ica* gene. **Objective:** This study aimed to evaluate different phenotypic and genotypic methods for determination of biofilm formation in *S. aureus* isolates. **Material and methods:** The study was conducted with 132 *S. aureus*, isolated from different clinical specimens, from April to December, 2011 at a university hospital, at southern Brazil. The Microtiter Plate (MtP) Method, considered as gold standard, as well as the Tube Method (TM), Congo Red Agar (CRA) method and search for *icaA*, *icaC* and *icaD* genes were tested. Antimicrobial susceptibility testing of the biofilm-producing strains was conducted using the Disc Diffusion and Broth Microdilution techniques. **Results:** In 42/132 (31.8%) isolates, biofilm formation was detected by one or more of the four methods used. MtP was considered more effective than TM and CRA, because it detected 31/132 (23.5%) biofilm producers. According to the TM, positivity was found in 9/132 (6.8%), while in CRA there was only one sample (0.8%).

Genotypically, we found that our isolates likely produce biofilm by an *ica*-independent mechanism. In general, these biofilm-producing isolates were highly sensitive to the antimicrobial agents tested. **Conclusion:** We can conclude that when compared to the standard method, TM, CRA and *icaA*, *icaC* and *icaD* genes search were not reliable to identify biofilm-producing strains in our isolates.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, biofilm-related infections, *ica*-independent biofilm.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is an important human pathogen that stands out worldwide as a frequent cause of a variety of infections (Chung and Toh, 2014; Otto, 2014). It is recognized for its high morbidity and mortality rates (Otto, 2014) and also for its ability to form complex multicellular structures known as biofilms (Mirani et al., 2013; Chung and Toh, 2014; McCarthy et al., 2015).

Biofilms are defined as a cluster of microorganisms that attach to a surface and are embedded in complex polymeric substances that form a delimited extracellular matrix (Wells et al., 2011; Chung and Toh, 2014). Besides being a protection agent against the host's immune system cells, biofilms also prevent the action of antimicrobial agents (Wells et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Mirani et al., 2013; Arciola et al., 2015; McCarthy et al., 2015; Nourbakhsh and Namvar, 2016).

When biofilm formation occurs on an abiotic surface, as in medical devices such as catheters, implants, stents, heart valves, prosthesis, among others, the severity of *S. aureus*-related nosocomial infections increases (Nourbakhsh and Namvar, 2016) and, consequently, likelihood of development of persistent, chronic and recurrent infections also increases (Wells et al., 2011; Chung and Toh, 2014).

In *S. aureus*, as well as in other species of the genus, formation of multi-layers of cells in the biofilm (clustering) is usually associated with the production of Polysaccharide Intracellular Adhesin (PIA), also known as poly-N-acetyl- β -(1-6)-glucosamine (PNAG). PIA/PNAG synthesis is encoded by the *ica* operon, which comprises four biosynthesis genes (*icaA*, *icaD*, *icaB* and *icaC*) and one regulation gene (*icaR*) (Arciola et al., 2001; Arciola et al., 2015; McCarthy et al., 2015; Nourbakhsh and Namvar, 2016). In addition to being vital for the adhesion of

bacterial cells on surfaces and for structural functions in the biofilm architecture, PIA is involved in the evasion of the host's immune ability (Arciola et al., 2015). But some studies have pointed out that biofilm formation in *S. aureus* is independent of *ica* operon, demonstrating that PIA production is not essential for the formation of these structures (Fitzpatrick et al., 2005; Geoghegan et al., 2010; Ferreira et al., 2012; Figueiredo et al., 2017).

Thus, this study aimed to test different methods for determination of biofilm formation in *S. aureus* and to evaluate the susceptibility of these isolates to antimicrobials in a tertiary hospital in southern Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

A total of 132 *S. aureus* were collected, isolated from patients attended in all clinical units of the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) between April and December 2011. HUSM is a tertiary hospital school with 403 beds, 354 for inpatients and 49 in the Intensive Care Unit, in addition to 58 outpatient rooms, and serves more than 30 municipalities in the central region of the state of Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil.

The samples were collected at random and clinical specimens of isolation included blood, tracheal secretion, urine, sputum, bronchoalveolar lavage, catheter tip, secretions in general (wounds, surgery wound, abscess, ulcer, secretion from bone, ocular, nasal, urethral, and vaginal tissues, umbilical stump, scrotal sac) and fluids in general (pleural, peritoneal, from dialysis). Until the date of tests, these samples remained stored in trypticase soy broth (TSB) (Himedia®) with 15% glycerol at -80 °C, in the Bacteriology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

All strains were identified at the HUSM's Laboratory of Clinical Analyses by conventional, standard phenotypic tests (Gram stain, coagulase and catalase tests, colony morphology, biochemical tests) and automated methodology (MicroScan® – Siemens). Standard strains of *S. aureus* ATCC 25923 (biofilm producer) (Wells et al., 2011) and *S. epidermidis* ATCC 12228 (non-biofilm producer) (Liu et al., 2015) were used as controls in all tests that evaluated biofilm formation.

Tests for detection of biofilm production

Microtiter Plate (MtP) method

The protocol developed by Christensen et al. (1985), which is considered the gold standard test for biofilm detection, was used with adaptations (Stepanović et al., 2007). The experiment was conducted in four consecutive days. In the first day, *S. aureus* were reactivated in trypticase soya agar (TSA) (Himedia®) and incubated at aerobic atmosphere during 24 h, at 35 °C ± 2 °C. Afterwards, three to four colonies grown in tubes containing 5 mL of TSB were inoculated and then incubated in the same above conditions. In the third day, the tubes were first vortexed and then diluted at 1:100 in TSB supplemented with 1% glucose (Neon®). The diluted bacteria were agitated and then inoculated into a 96-well U-bottom microtiter polystyrene plate (200 µL per well). The plates were incubated for 24 h, 35 °C ± 2 °C, at an aerobic atmosphere. On the fourth and final day, supernatant was discarded from the wells, which were then washed three times with 300 µL of sterile phosphate-buffered saline (PBS), at pH 7.2, room temperature. After washing, the bacteria remaining in the wells were thermo-fixed for 60 min at 60°C, in inverted position. After this period, the wells were stained with 150 µL of 2% crystal violet for 15 min. After discarding the dye, 150 µL of 95% ethanol per well were added. The plates remained capped at room temperature for 30 min for re-solubilization of the dye, which was then discarded with the aid of a micropipette. The wells were cleansed with sterile deionized water until removing excess dye completely. After dried, the optical density (OD) of each well was measured at 570 nm using ELISA microplate reader (Epoch™/BioTek®). The test was carried out with four replications, the negative control being the well containing only 200 µL of TSB supplemented with 1% glucose. The results interpretation was made based on the criteria defined by Stepanović et al. (2007), which are described on Table 1.

Tube Method (TM)

S. aureus isolates were tested for biofilm formation according to the standard method proposed by Christensen et al. (1982). We used borosilicate tubes containing 2 mL of TSB, where previously activated bacteria in TSA were inoculated. The tubes were incubated at an aerobic temperature at 35 °C ± 2°C, during 48 h, without stirring. After two days, the contents were discarded, and 2mL of an aqueous solution

of 0.4% Tripan blue (Vetec®) were added to each tube. After one minute, the dye was removed with the aid of a micropipette. Visible presence of a layer of stained matter adhered to the internal walls of the tubes was defined as positive result. Exclusive presence of a colored ring at the liquid-air interface was considered negative. The results were classified according to the amount of biofilm produced by each stain, as follows: 0 – absent/non-producer; 1 – weak; 2 – moderate; 3 – strong. The experiment was conducted with two replications.

Table 1. Criteria for interpretation of biofilm production results in MtP, according to Stepanović et al. (2007).

		Biofilm production
$OD \leq OD_c$	0 (-)	Non-producer
$OD_c \leq 2X OD_c$	1 (+)	Weak
$2X OD_c < OD \leq 4X OD$	2 (++)	Moderate
$4X OD_c < OD$	3 (+++)	Strong

Congo Red Agar (CRA)

This test was carried in duplicate, based on the methodology described by Freeman et al. (1989). CRA was prepared using 50g/L of sucrose (Dinâmica®), 37 g/L of Brain Heart Infusion Broth (Himedia®), 10 g/L of No. 1 Agar Powder, Bacteriological (Himedia®) and 0.8 g/L of Congo Red Dye (Vetec®). The strains were seeded in the CRA and incubated at an aerobic atmosphere, at $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ for 24 h. The results were classified as: positive (biofilm producers) – growth of black colonies with dry crystalline consistency; negative (non-biofilm producers) – growth of pink, red or bordeaux bacterial colonies; undetermined – growth of dark bacterial colonies but without crystalline morphology or looking dry (Freeman et al., 1989). Interpretation of the colonies morphology was made 48 h and 72 h after incubation.

Genotypic detection of *icaA*, *icaD* and *icaC* genes

DNA extraction

The genomic DNA was extracted with thermal lysis, following the protocol used by Moosavian et al. (2014) with changes. Two to five *S. aureus* isolate colonies, previously seeded in Mueller-Hinton agar (Kasvi®), were suspended in 750 μL of TE

buffer (10 mM of Tris, 1mM of EDTA, pH 8.0). The suspension was then subjected to dry bath for 20 min at 100 °C and subsequently was placed in a freezer at -80 °C also for 20 min. The DNA extracted yield was confirmed by Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen™) before PCR-assays.

Amplification of 16S gene

In order to discard any amplification inhibitors and assess the quality of DNA extraction, we conducted Polymerase Chain Reaction (PCR) of the 16S gene (Ludwig Biotec®), following protocol by Lina et al. (1999), with changes. The conditions and primers used are described in Table 2.

Amplification of *icaA*, *icaD* and *icaC* genes

All isolates were subjected to PCR for detection of *ica* genes (Ludwig Biotec®) involved in biofilm production. The primers sequence and PCR conditions used were based on the work of Arciola et al. (2005), with adaptations (Table 2).

PCR was carried out in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). A 2.0 µL aliquot of DNA was added to 23 µL of the PCR mix containing 17.05 µL of Mili-Q ultrapure water, 1.75 µL of 10X buffer, 0.75 µL of MgCl₂ 50 mM, 2.0 µL of deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dUTP, dGTP and dCTP), 0.625 µL of each primer and 0.2 µL of Taq DNA polymerase, 5U/mL. A negative control was used in all tests, without a DNA sample. The PCR amplicons were visualized in transilluminator after electrophoresis in 2% agarose gel containing 0.5 µg/mL of ethidium bromide.

Antibiotic susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was carried out in all biofilm-producing *S. aureus* using the Disc Diffusion method, following recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2011). The antimicrobials (DME Sensidisc®) used were the following: Amoxicillin/Clavulanic acid 20/10 µg, Ampicillin/Sulbactam 10/10 µg, Azithromycin 15 µg, Ceftriaxone 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Clindamycin 2 µg, Erythromycin 15 µg, Gentamycin 10 µg, Imipenem 10 µg, Linezolid 30 µg, Meropenem 10 µg; Oxacillin 1 µg, Penicillin 10 U, Rifampicin 5 µg, Sulfamethoxazole/Trimethoprim 1.25/3.75 µg and Tetracycline 30 µg. Quality control

of the discs was performed using the strains of *S. aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 35218.

To test susceptibility of *S. aureus* to vancomycin, we used the broth microdilution method in 96-well plates to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). For quality control of the technique, strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were used.

Table 2. Conditions and primers used in PCR reactions

Gene	Primer	Primer sequence (5' → 3')	PCR conditions	Band size	Ref.
16S	16S_F	TTGTACACACCGCCCGTCA	Initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 5 min at 94 °C; 60 s at 94 °C; 45 s at 55 °C; 45 s at 72 °C; final extension for 5 min at 72 °C.	492 pb	Lina et al. (1999)
	16S_R	GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC			
icaA	icaA_F	ACAGTCGCTACGAAAAGAA	Initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 5 min at 94 °C; 60 s at 94 °C; 30 s at 55 °C; 45 s at 72 °C; final extension for 5 min at 72 °C.	103pb	Arciola et al. (2005)
	icaA_R	GGAAATGCCATAATGAGAA			
icaC	icaC_F	TAACTTTAGGCGCATATGTT	Initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 5 min at 94 °C; 60 s at 94 °C; 30 s at 55 °C; 45 s at 72 °C; final extension for 5 min at 72 °C.	400 pb	Arciola et al. (2005)
	icaC_R	TTCCAGTTAGGCTGGTATTG			
icaD	icaD_F	ATGGTCAAGCCCAGACAGA	Initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 5 min at 94 °C; 60 s at 94 °C; 30 s at 55 °C; 45 s at 72 °C; final extension for 5 min at 72 °C.	198 pb	Arciola et al. (2005)
	icaD_R	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA			

Ethical considerations

The present work was submitted to the UFSM's Research Ethics Committee, process no. CAAE 0117.0.243.000-08.

RESULTS

Of the 132 *S. aureus* isolates collected, biofilm production was found in 42 isolates (31.8%) by one or more of the four methods used. Kappa measure did not indicate agreement between the tests.

With respect to plaque and tube tests, we found positivity in 31 (23.5%) and 9 (6.8%) samples, respectively, as shown in Table 3.

Table 3. Results of phenotypic testing of biofilm production

Biofilm production		Polystyrene plate test (MtP)	Borosilicate tube test (TM)
Non-producer	0 (-)	101 (76.5%)	123 (93.2%)
Weak	1 (+)	16 (12.1%)	-
Moderate	2 (++)	9 (6.8%)	7 (5.3%)
Strong	3 (+++)	6 (4.6%)	2 (1.5%)
Total		132 (100%)	132 (100%)

In only one isolate (0.8%), black colonies were formed in Congo Red Agar. The other 131 samples (92.2%) were negative after 24h, 48h and 72h of incubation.

PCR results in *S. aureus* demonstrate that in 10 isolates (7.6%), one or more genes were detected (distribution is shown in Graph 1). The *icaA*, *icaC* and *icaD* genes were found in 5 (3.8%), 5 (3.8%) and 8 (6.0%) isolates, respectively. In 122 isolates (92.4%), no amplification of any of the three genes tested was detected, which were then considered negative. Fig. 1 shows a sample that exhibited concomitant amplification of three genes tested.

The susceptibility profile of the biofilm-producing strains is shown in Table 4.

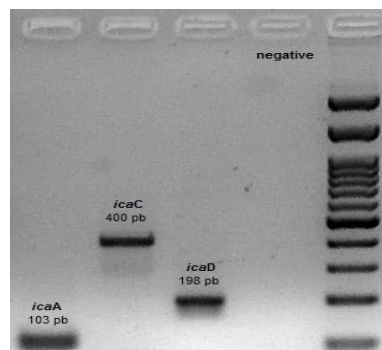
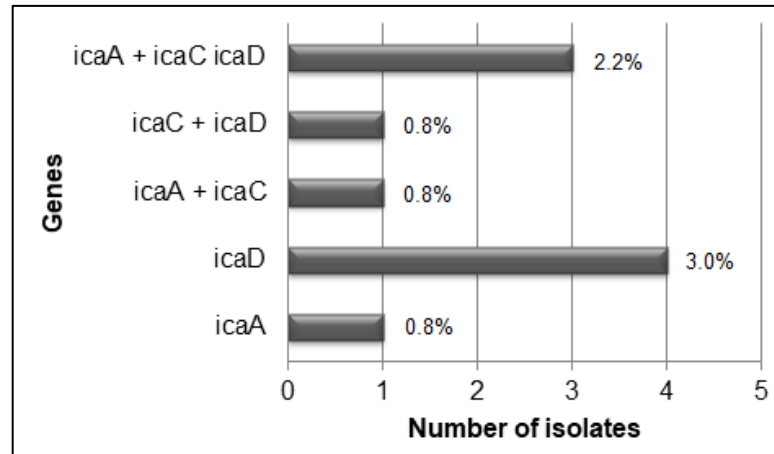


Fig. 1. Sample of positive *S. aureus* for *icaA*, *icaC* and *icaD* genes.



Graph 1. *icaADC* genes found in *Staphylococcus aureus* isolates at HUSM in the studied period.

Table 4. Antimicrobial susceptibility of 31 biofilm-producing *S. aureus* strains in the MtP

Antimicrobial	Susceptibility		
	R	I	S
Linezolid	-	-	100 (31)
Vancomycin	-	-	100 (31)
Imipenem	3.2 (1)	-	96.8 (30)
Rifampicin	3.2 (1)	-	96.8 (30)
Ampicillin/Sulbactam	3.2 (1)	3.2 (1)	93.6 (29)
Amoxicillin/Clavulanic acid	6.4 (2)	-	93.6 (29)
Meropenem	6.4 (2)	-	93.6 (29)
Penicillin	9.7 (3)	-	90.3 (28)
Sulfamethoxazole / Trimethoprim	9.7 (3)	-	90.3 (28)
Gentamicin	12.9 (4)	-	87.1 (27)
Oxacillin	12.9 (4)	-	87.1 (27)
Tetracycline	12.9 (4)	9.7 (3)	77.4 (24)
Ceftriaxone	9.7 (3)	19.3 (6)	71.0 (22)
Ciprofloxacin	32.3 (10)	-	67.7 (21)
Azithromycin	32.3 (10)	3.2 (1)	64.5 (20)
Clindamycin	32.3 (10)	6.4 (2)	61.3 (19)
Erythromycin	35.5 (11)	3.2 (1)	61.3 (19)

R – resistant; I - intermediate; S – sensible.

DISCUSSION

Formation of biofilms, which are highly complex, hydrated structures, with channels that enable diffusion of nutrients and oxygen, ensures that *S. aureus* face satisfactorily with the most diverse environmental stresses to which they are subjected in nosocomial environments. Besides ensuring protection against the host's defense mechanisms, they hinder the entry of antimicrobials and diffusion in tissues (Donlan, 2002; Chung and Toh, 2014). The ability to form these structures is a key feature in the pathogenesis of infections associated with medical devices and represents today one of the major challenges to be overcome (Ferreira et al., 2012). Therefore, knowledge on methods that identify biofilm-producing *S. aureus* strains is of vital importance, given that most of the studies published referred with coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS).

The method of adhesion to polystyrene plate, or microtiter-plate (MtP), has been reported as a sensitive, accurate method and with good reproducibility for determination of biofilm production in *Staphylococcus* spp., and is also capable of analyzing a considerable number of isolates simultaneously. Furthermore, it has the advantage of being a quantitative test, allowing to compare the adhesion of different strains (Christensen et al. 1985; Mathur et al., 2006; Nasr et al., 2012). For these reasons, many authors consider it a gold standard method to detect microbial biofilms formation (Mathur et al., 2006; Stepanović et al., 2007; Hassan et al., 2011; Nasr et al., 2012; Mirzaee et al., 2014; Panda et al., 2016). So, in our study we also considered this condition.

Our results show that, according to this method, 23.5% of *S. aureus* isolated at HUSM (31/132) were detected as biofilm producers, being 12.1% (16/132) weak, 6.8% (9/132) moderate and 4.6% (6/132) strong producers. When we compared the positivity found with this method with other studies, we observed significant differences both in percentage of producer strains and in intensity of production. Nasr et al. (2012), who examined 50 *Staphylococcus* spp. isolates from hemocultures and intravascular catheters at a University Hospital in Egypt, described that the positivity rate, according to this technique, was 46.0% (26.0% - strong, 12.0% - moderate, 8.0% - weak). On the other hand, in works developed by Mirzaee et al. (2014) and Abdulmir et al. (2015), at hospitals in Iran and Malaysia, respectively, 100% of *S. aureus* isolates were biofilm producers. These differences can be attributed to the heterogeneity as to the origin of *S. aureus* isolated in the different studies, such as

the source of isolation and environmental conditions to which these bacteria were submitted (Mirzaee et al., 2014).

According to the method that uses borosilicate tube for analysis of biofilm formation, we found that it was able to detect only 9 (6.8%) biofilm producers. Our findings disagree from those found by Taj et al. (2012), who studied 115 *S. aureus* in Pakistan and detected 54.78% of positivity (63/115), 23 being strong producers and 40 moderate producers. According to Hassan et al. (2011), in the same country, the TM detected 49% of gram-positive and gram-negative bacteria (54/110) as biofilm producers.

As described by other authors, this method can be easily applied for identification of strong biofilm producers. However, because it is a qualitative method, where variations in the results interpretation by different observers may occur, TM becomes an inadequate method to differentiate moderate, weak, and non-biofilm producers (Mathur et al., 2006; Hassan et al., 2011). Thus, we can infer that TM cannot be suggested as a screening test for identification of biofilm producers in *S. aureus* isolates.

According to the CRA method, only one isolate (0.8%) was considered positive. By comparing *S. aureus* with *S. epidermidis*, it can be seen that the development of black colonies in CRA occurs at different times (72h and 24h, respectively). This is due to the different metabolic routes in the use of sucrose, the main source of carbohydrates contained in the CRA for production of precursor of PIA (Arciola et al., 2001; Elkhatib et al., 2014). Even when we inspected the colonies color 72h after incubation, we did not observe the emergence of black colonies in the other 131 *S. aureus* studied. Other authors (Taj et al., 2012; Elkhatib et al., 2014) also found low positivity rates by this method, which were 3.47% and 13.9%, respectively.

Some studies, however, suggest that the CRA method can be an alternative to the plate method for detection of biofilm-producing bacteria, because it is an easy, fast, sensitive test and with good reproducibility (Elkhatib et al., 2014; Nourbakhsh and Namvar, 2016). However, according to our results, we can conclude that the Congo Red Agar method was not effective to detect biofilm production in our isolates, and so it is not recommended for detection of producer strains in *S. aureus*, as also described by other authors (Mathur et al., 2006; Nasr et al., 2012). This is due to the fact that PIA/PNAG has little influence on the composition of the biofilm matrix in *S.*

aureus and therefore cannot be detected by the CRA method (Taj et al., 2012), thus justifying the low positivity rate found in our research.

When we conducted PCR for detection of *ica* operon genes, we found that in only 10 isolates (7.6%) one or more genes were detected (*icaA*-3.8%, *icaC*-3.8% and *icaD*-6.0%). Although production of PIA, encoded by *ica* operon genes, represents a key mechanism in biofilm formation in *S. aureus* and in CoNS, advances in studies on this topic have shown that biofilm production may occur as an alternative form, especially in *S. aureus*, by *ica*-independent mechanism, without the need for PIA production (Ferreira et al., 2012; Arciola et al., 2015; Figueiredo et al., 2017). This explains the low percentage of biofilm-producing strains found in our group when we searched for *ica* genes. Probably, many of *S. aureus* that were positive in the gold standard test (MtP) and were *ica*-negative produced biofilm by a mechanism different than that investigated in our study (*ica*-independent).

In relation to the susceptibility profile, we can observe that in general our biofilm-producing isolates were very sensitive to the antimicrobials tested. The highest resistance rates were observed against Erythromycin (35.5%), Clindamycin (32.3%), Azithromycin (32.3%) and Ciprofloxacin (32.3%). Nourbakhsh and Namvar (2016), in Iran, also detected the highest resistance rates to ciprofloxacin and erythromycin, but higher than 80%. Linezolid and Vancomycin were effective against all bacterial strains tested. These data demonstrate the effective performance of the Hospital Infection Control Commission in our hospital, who has the responsibility of preventing and controlling hospital-acquired infections through measures that aim to reduce the incidence and severity of these infections.

CONCLUSION

We can conclude that CRA and TM were not effective and reliable for identification of biofilm-producing strains in *S. aureus* isolates when compared to the standard method (MtP). Furthermore, through PCR we detected that most of the strains produce biofilm by an *ica*-independent mechanism. Our isolates were very sensitive to the antimicrobials tested, and the resistance shown to clindamycin is of great concern.

REFERENCES

- Abdulmir, A.S., Jassim, S.A.A., Hafidh, R.R., Bakar, F.A., 2015. The potential of bacteriophage cocktail in eliminating Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms in terms of different extracellular matrices expressed by *PIA*, *ciaA-D* and *FnBPA* genes. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 1-10.
- Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2151–2156.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., Montanaro, L., 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1-10.
- Arciola, C.R., Gamberini, S., Campoccia, D., Visai, L., Speziale, P., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis associated infections. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 75, 408-413.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H., 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37, 318-326.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H., 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22, 996-1006.
- Chung, P.Y., Toh, Y.S., 2014. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* 70, 231-239.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, Document M100-S21. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881-890.
- Elkhatib, W.F., Khairalla, A.S., Ashour, H.M., 2014. Evaluation of different microtiter plate-based methods for the quantitative assessment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Future Microbiol.* 9, 725-735.
- Ferreira, F.A., Souza, R.R., Bonelli, R.R., Américo, M.A., Fracalanza, S.E., Figueiredo, A.M., 2012. Comparison of *in vitro* and *in vivo* systems to study *ica*-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Microbiol. Methods.* 88, 393-398.
- Figueiredo, A.M.S., Ferreira, F.A., Beltrame, C.O., Côrtes, M.F., 2017. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm

development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. Crit. Rev. Microbiol. 43, 1-19.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H., O'Gara, J.P., 2005. Evidence for *ica*ADBC-Independent Biofilm Development Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. J. Clin. Microbiol. 43, 1973–1976.

Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathol. 42, 872-874.

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, 5663-5673.

Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., ; Iqbal, M., 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz. J. Infect. Dis. 15, 305-311.

Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R., Vandenesch, F., Etienne, J., 1999. Distribution of genes encoding resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1062–1066.

Liu, H., Zhao, Y., Zhao, D., Gong, T., Wu, Y., Han, H., Xu, T., Peschel, A., Han, S., Qu, D., 2015. Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical *Staphylococcus* strains. Emerg. Microbes. Infect. 4, e1, 1-6.

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T., Rattan, A., 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian J. Med. Microbiol. 24, 25-29.

McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., O'Gara, J.P., 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 5, 1-9.

Mirani, Z.A., Aziz, M., Khan, M.N., Lal, I., Hassan, N., Khan, S.I., 2013. Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. Microb. Pathog. 61-62, 66-72.

Mirzaee, M., Najar-Peerayeh, S., Behmanesh, M., Moghadam, M.F., Ghasemian, A.M., 2014. Detection of Intracellular Adhesion (*ica*) Gene and Biofilm Formation *Staphylococcus aureus* Isolates from Clinical Blood Cultures. J. Med. Bacteriol. 3, 1-7.

Moosavian, M., Shoja, S., Rostami, S., Torabipour, M., Farshadzadeh, Z., 2014. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to *erm* genes, Iran. Iran. J. Microbiol. 6, 421-427.

Nasr, R.A., AbuShady, H.M., Hussein, H.S., 2012. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. Egypt. J. Med. Hum. Genet. 13, 269-274.

Nourbakhsh, F., Namvar, A.E., 2016. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg. Infect. Control.* 11, 1-5.

Otto, M., 2014. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 17, 32-37.

Panda, P.S., Chaudhary, U., Dube, S.K., 2016. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 59, 177-179.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115, 891-899.

Taj, Y., Essa, F., Aziz, F., Kazmi, S.U., 2012. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dev. Ctries.* 14, 403-409.

Wells, C.L., Henry-Stanley, M.J., Barnes, A.M., Dunny, G.M., Hess, D.J., 2011. Relation between antibiotic susceptibility and ultrastructure of *Staphylococcus aureus* biofilms on surgical suture. *Surg. Infect.* 12, 297-305.

3. DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus, em especial os MRSA, destacam-se mundialmente como um dos patógenos mais comumente implicados em uma gama de infecções, que resultam em altas taxas de morbimortalidade (DAVID; DAUM, 2010; CHUNG; TOH, 2014; OTTO, 2014). Sua versatilidade e capacidade inatas de adaptação levaram ao surgimento de resistência à várias classes de drogas antimicrobianas utilizadas na terapia (CHAMBERS; DELEO, 2009; SHORE et al., 2011), se destacando também pela sua habilidade em formar biofilmes (CHUNG; TOH, 2014; MCCARTHY et al., 2015).

Atualmente a epidemiologia das infecções por MRSA está se tornando cada vez mais complexa, com cepas HA-MRSA e CA-MRSA circulando tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; RAJEH et al., 2015). Neste contexto, a tipagem dos *SCCmec* pode ser considerada um dos melhores critérios para a diferenciação de linhagens MRSA (RAJEH et al., 2015).

Com os resultados obtidos no presente trabalho (**Manuscrito 1**), foi possível demonstrar que nos três períodos estudados no HUSM, houve o predomínio de infecções por estirpes HA-MRSA. Assim como outros estudos desenvolvidos em hospitais no sul do país, que também relataram as altas taxas de circulação de cepas MRSA caracteristicamente hospitalares (SILVEIRA et al. 2015; BATISTA; D'AZEVEDO, 2016), nossos dados reforçam a necessidade do controle deste tipo de estirpe em nosocômios nesta região geográfica do Brasil.

O *SCCmec* tipo I foi o mais frequente, representando 39.8% do total de isolamentos nos três anos. Tanto no ano de 2008 quanto em 2011, o tipo I foi o mais isolado (52,7% e 54,1%, respectivamente); já em 2015, a maior prevalência foi do tipo II (44,7%). Alguns autores vem evidenciando a prevalência destes dois tipos de cassete, principalmente em estudos mais recentes, em países do Oriente Médio (EBRAHIM-SARAIE et al., 2015; EED et al., 2015; HUSSEIN, 2016). A contínua investigação dos tipos prevalentes de MRSA torna-se imprescindível, para que as medidas necessárias para o controle de sua disseminação sejam corretamente implementadas.

Frequentemente envolvidos em infecções de pele e tecidos moles (LOWY, 1998; DAVID; DAUM, 2010; OTTO, 2014), nossos resultados estão de acordo com a literatura, já que tanto os HA-MRSA quanto os CA-MRSA foram predominantemente

isolados de secreções do trato respiratório (39,0%) e secreções de ferida operatória (10,6%).

Quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados, constatamos que todas as estirpes foram multirresistentes (MDR), apresentando altas taxas de resistência à clindamicina e eritromicina. Aos demais antimicrobianos testados, estes índices diminuíram consideravelmente de 2008 para 2015. Entre os HA-MRSA, pelas próprias características deste tipo de estirpe, esperava-se que o perfil de suscetibilidade fosse bastante resistente, o que foi confirmado através de nossos resultados. Porém entre os CA-MRSA, por sabidamente serem mais suscetíveis a antimicrobianos não-beta lactâmicos (BALAKUNTALA; PRABHAKARA; ARAKERE, 2014; MARTINS et al., 2014), essa tendência não foi observada nos isolados de *S. aureus* do HUSM.

Além da investigação acerca dos *SCCmec*, esta pesquisa também avaliou diferentes metodologias para a determinação da formação de biofilme em *S. aureus*, isolados no ano de 2011 no HUSM (**Manuscrito 2**). A formação destas estruturas altamente complexas permite o enfrentamento de maneira satisfatória às diversas situações a que os *S. aureus* são submetidos, além de conferir proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e de dificultar a entrada de antimicrobianos e sua posterior difusão nos tecidos (DONLAN, 2002; CHUNG ;TOH, 2014).

O MtP, método que avalia a aderência em placas de poliestireno, é considerado por muitos autores o padrão-ouro na detecção da produção bacteriana de biofilmes (STEPANOVIĆ et al., 2007; NASR et al., 2012; MIRZAEI et al., 2014). Através desta metodologia, foi possível verificar que 23.5% dos isolados foram detectados como produtores de biofilme: 12.1% (16/132) fracamente, 6.8% (9/132) moderadamente e 4.6% (6/132) fortemente produtores, sendo nossa positividade neste método bastante divergente das de outros autores, tanto nas porcentagens de estirpes produtoras como na intensidade desta produção (NASR et al., 2012; MIRZAEI et al., 2014).

Pelo método do tubo (TM), detectamos que este foi capaz de detectar apenas 9 (6.8%) isolados produtores, enquanto que o método do CRA, somente 1 isolado (0.8%). Alguns estudos descrevem estas duas metodologias como sendo de fácil aplicação, além da vantagem do CRA ser rápido, sensível e apresentar boa reprodutibilidade, sugerindo que estes métodos poderiam servir como alternativas ao método da placa (HASSAN et al., 2011; ELKHATIB; KHAIRALLA; ASHOUR, 2014;

NOURBAKHSI; NAMVAR, 2016). Porém, com base nos nossos resultados, o TM e o CRA tiveram pouca relação com o padrão-ouro, não podendo ser sugeridos como testes de triagem para a identificação de isolados produtores de biofilme em *S. aureus*.

Relacionando-se a pesquisa dos genes *icaACD*, somente em 10 isolados (7.6%) foram detectados um ou mais genes (*icaA*-3.8%, *icaC*-3.8% e *icaD*-6.0%), levando-nos à conclusão de que, possivelmente, a maioria de nossas cepas produziram biofilme por mecanismo *ica*-independente, sem a necessidade de produção de PIA (ARCIOLA et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2017).

Ao analisarmos o perfil de suscetibilidade das cepas produtoras, verificamos 100% de sensibilidade frente à linezolida e vancomicina, sendo que as maiores taxas de resistência observadas foram frente à eritromicina (35.5%), clindamicina (32.3%), azitromicina (32.3%) e ciprofloxacino (32.3%). De modo geral, as cepas testadas se mostraram bastante sensíveis aos antimicrobianos testados, ressaltando a efetividade da atuação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) em nosso nosocômio.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados nesta tese pode-se concluir que:

- Foram isolados 476 *S. aureus* durante os anos de 2008, 2011 e 2015, sendo que 23,7% foram identificados como MRSA (gene *mecA* positivos);
- O maior isolamento dos MRSA ocorreu em amostras clínicas oriundas de secreções do trato respiratório;
- O SCC*mec* tipo I foi o mais isolado no HUSM, seguido do tipo IV, tipo II e tipo III ;
- Quando a análise é feita de cada ano separadamente, concluímos que em 2008 e 2011, houve predomínio de cepas carreadoras de SCC*mec* tipo I, enquanto que em 2015, o tipo II, seguido do tipo IV foram as mais prevalentes;
- Nos três períodos estudados as cepas HA-MRSA prevaleceram sobre as de origem comunitária, levando à conclusão que não houve mudança no perfil geral das estirpes MRSA;
- Tanto as estirpes HA-MRSA quanto as CA-MRSA foram multirresistentes, apresentando altos níveis de resistência à clindamicina e eritromicina nos três anos; porém frente à gentamicina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprima, todos os *S. aureus* tiveram aumento da sensibilidade de 2008 para 2015. Todas as cepas apresentaram 100% de sensibilidade à vancomicina e linezolida;
- O método da placa (MtP), considerado o padrão ouro para detecção da produção de biofilme, identificou 31 isolados produtores, que representou 23,5% das amostras de *S. aureus* coletadas no ano de 2011;
- A maior parte dos isolados foi fracamente produtor de biofilme pelo MtP;
- O método do ágar vermelho Congo foi o que teve menor relação com o método da placa, sendo detectado em apenas 1 amostra, enquanto que no método do tubo 9 amostras foram positivas. Dessa forma concluímos que ambos os testes não se mostraram confiáveis na identificação de cepas produtoras de biofilme em nossos isolados;
- Através da PCR para os genes *icaACD*, identificamos 10 isolados produtores (7,6%), sendo o *icaD* o mais prevalente. A produção de biofilme nos *S. aureus* estudados ocorreu de forma alternativa, por mecanismo *ica*-independente, sem a necessidade de produção de PIA;
- Os isolados produtores de biofilme se mostraram bastante sensíveis aos antimicrobianos testados, sendo a linezolida e a vancomicina ativas contra todas as

estirpes; as maiores taxas de resistência observadas foram frente à eritromicina, azitromicina, clindamicina e ciprofloxacino.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-FIGUEIREDO, M., LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 16, n. 115, p. 1-9, June 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4915036/>>. Acesso em: 29 jun. 2017. DOI: 10.1186/s12866-016-0733-4.
- ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, Sep.-Oct. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322633/>>. Acesso em: 22 jun. 2017. DOI: 10.4161/viru.2.5.17724.
- ARCIOLA, C.R., BALDASSARRI, L., MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 2151–2156, June 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88104/pdf/jm002151.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2017. DOI: 10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001.
- ARCIOLA, C. R. et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 5, n. 7, Feb. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4322838/>>. Acesso em: 17 maio. 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00007.
- BA, X. et al. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 69, n. 3, p. 594-597, Mar. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt418>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1093/jac/dkt418.
- BALAKUNTLA, J.; PRABHAKARA, S.; ARAKERE, G. Novel rearrangements in the staphylococcal cassette chromosome *mec* type V elements of Indian ST772 and ST672 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **PLoS One**, v. 9, n. 4, Apr. 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094293>>. Acesso em: 11 abr. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0094293.
- BALLHAUSEN, B. et al. LA-MRSA CC398 differ from classical community acquired-MRSA and hospital acquired-MRSA lineages: functional analysis of infection and colonization processes. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, n. 7, p. 777-786, Oct. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422114000757?via%3Dihub>>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.06.006.
- BANERJEE, R. et al. A *mecA*-negative strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with high-level β -lactam resistance contains mutations in three genes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 11, p. 4900-4902, Nov. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2976154/>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.00594-10.

BARBER M. Methicillin-resistant Staphylococci. **J. Clin. Pathol.**, v. 14, n. 4, p. 385-393, July 1961. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC480239/>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

BARLOW, M. What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. **Methods Mol. Biol.**, v. 532, p. 397-411, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19271198>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1007/978-1-60327-853-9_23.

BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 12, n. 22, p. 1-15, Aug. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3846448/>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1186/1476-0711-12-22.

BATISTA, B. G.; D'AZEVEDO, P.A. Profile of SCC*mec* types in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a hospital in Southern Brazil. **J. Health Biol. Sci.**, v. 4, n. 1, p. 5-7, 2016. Disponível em: <<http://periodicos.unichristus.edu.br/index.php/jhbs/article/view/514>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.12662/2317-3076jhbs.v4i1.514.p5-7.2016.

BATISTA, B. G. et al. Novas cefalosporinas como alternativa no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). **Rev. Epidemiol. Control. Infect.**, v. 5, n. 2, p. 94-99, Abr./Jun. 2015. Disponível em <<https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/4821>>. Acesso 30 jun 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.17058/reci.v5i2.482>.

BERGLUND, C. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 52, n. 10, p. 3512-3516, Oct. 2008. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/52/10/3512.full>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.00087-08.

BHATTA, D. R. et al. Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). **BMC Infect. Dis.**, v. 16, n. 199, p. 1-6, May 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4867903/pdf/12879_2016_Article_1531.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1186/s12879-016-1531-1.

BONESSO, M. F. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in non-outbreak skin infections. **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1401-1407, Mar. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4323316/pdf/bjm-45-1401.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2017.

BONESSO, M. F.; MARQUES, S. A.; CUNHA, M. L. R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA): molecular background, virulence, and relevance for public health. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 378-386, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992011000400004>. Acesso em: 11 abr. 2017. DOI: 10.1590/S1678-91992011000400004.

BOUCHER, H. W. et al. Bad bugs, no drugs: No ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 48, n. 1, p. 1-12, Jan. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/595011>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1086/595011.

BOYD, A.; CHAKRABARTY, A. M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 7, p. 2355-2359, July 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201655/pdf/aem00024-0159.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2017.

BRAGA, E. D. et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, n. 538, Oct. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287590/>>. Acesso em: 10 abr. 2017. DOI: 10.1186/1471-2334-14-538.

BURTON, D. C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* central line-associated bloodstream infections in US intensive care units, 1997-2007. **JAMA**, v. 301, n. 7, p. 727-736, Feb. 2009. Disponível em: <<http://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/183404>>. Acesso em: 9 jul. 2017. DOI: 10.1001/jama.2009.153.

CAMPOS, G. B. et al. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. **New Microbiol.**, v. 35, n. 2, p. 183-190, Apr. 2012. Disponível em: <http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2012/2/183.pdf>. Acesso em: 15 maio 2017.

CARVALHO, K. S.; MAMIZUKA, E. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 14; n. 1, p. 71-76, Jan-Feb. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-6702010000100014>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1590/S1413-86702010000100014.

CARVALHO, S. P. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, May 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867016301611>>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.bjid.2017.04.001.

CATÃO, R. M. R. et al. Prevalência de infecções hospitalares por *Staphylococcus aureus* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. **Rev. Enferm. UFPE on line**, v. 7, n. 8, p. 5257-5264, Ago. 2013. Disponível em: <http://www.revista.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/view/4254/pdf_3233>. Acesso em: 9 jul. 2017. DOI: 10.5205/reuol.3452-28790-4-ED.0708201325.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic/Antimicrobial Resistance**. Atlanta, 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/>>. Acesso em: 2 abr. 2017.

CEPEDA, J. A. et al. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. **Lancet**, London, v.

365, n. 9456, p. 295-304, Jan. 2005. Disponível em: <[http://thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(05\)17783-6.pdf](http://thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(05)17783-6.pdf)>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)17783-6.

CERI, H. et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, June 1999. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/37/6/1771.long>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

CHA, J. O. et al. Investigation of biofilm formation and its association with the molecular and clinical characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Osong Public Health Res. Perspect.**, v. 4, n. 5, p. 225–232, Oct. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3845227/>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1016/j.phrp.2013.09.001.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 7, n. 9, p. 629-641, Sept. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n9/full/nrmicro2200.html>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1038/nrmicro2200.

CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, n. 2, p. 173-186, Apr.1988. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/1/2/173.long>>. Acesso em: 30 jun. 2017. DOI: 10.1128/CMR.1.2.173.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 2, p. 178-182, Mar.-Apr. 2001. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/7/2/70-0178_article>. Acesso em: 26 jun. 2017. DOI: 10.3201/eid0702.700178.

CHATTERJEE, S. et al. Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. **Ann. Med. Health Sci. Res.**, v. 4, n. 1, p. 100-104, Jan.-Feb. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952279/>>. Acesso em: 24 jun. 2017. DOI: 10.4103/2141-9248.126612.

CHEN, X. et al. Molecular and virulence characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in burn patients. **Frontiers Lab. Med.**, v. 1, n. 1, p. 43-47, Mar. 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2542364917300249>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.flm.2017.02.010.

CHENG, A. G. et al. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. **Trends Microbiol.**, v. 19, n. 5, p. 225–232, May 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353779>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.tim.2011.01.007.

CHUNG, P. Y.; TOH, Y. S. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Pathog. Dis.** v. 70, n. 3, p. 231-239, Apr. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/2049-632X.12141>>. Acesso em: 6 maio 2017. DOI: 10.1111/2049-632X.12141.

COHEN, P. R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. **Int. J. Dermatol.**, v. 46, n. 1, p. 1-11, Jan. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03215.x>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2007.03215.x.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, Oct. 1995. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Sci. Am.**, v. 238, n. 1, p. 86-95, Jan. 1978. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/22505827_How_Bacteria_Stick>. Acesso em: 18 jun. 2017.

CRAMTON, S. E. et al. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 10, p. 5427-5433, Oct. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96900/>>. Acesso em: 24 jun. 2017.

CROES, S. et al. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. **BMC Microbiol.**, v. 9, n. 229, p. 1-9, Oct. 2009. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-229>>. Acesso em: 18 jun. 2017. DOI: 10.1186/1471-2180-9-229.

CUNY, C.; KÖCK, R.; WITTE, W. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6-7, p. 331-337, Aug. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S143842211300258?via%3Dihub>>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.010.

CUNY, C.; WIELER, L. H.; WITTE, W. Livestock-Associated MRSA: the impact on humans. **Antibiotics**, v. 4, n. 4, 521-543, Dec. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4790311/>>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.3390/antibiotics4040521.

DANTES, R. et al. National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, United States, 2011. **JAMA Intern. Med.**, v. 173, n. 21, p. 1970-1978, Nov. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24043270>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1001/jamainternmed.2013.10423.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 3, p. 616-687, July 2010. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/23/3/616.full.pdf+html>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1128/CMR.00081-09.

DAVID, M. Z. et al. Replacement of HA-MRSA by CA-MRSA infections at an Academic Medical Center in the Midwestern United States, 2004-5 to 2008. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 1-8, Apr. 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/arti>

cle?id=10.1371/journal.pone.0092760>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0092760.

DEEPTI, S. et al. Central venous catheter related bloodstream infections in medical intensive care unit patients in a tertiary referral centre. **Indian J. Chest Dis. Allied Sci.**, v. 56, n. 2, p. 85-91, Apr.-June 2014. Disponível em: <<http://medind.nic.in/iae/t14/i2/iae14i2p85.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

DELEO, F. R. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet.**, v. 375, n. 9725, p. 1557-1568, May 2010. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIS0140-6736\(09\)61999-1/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIS0140-6736(09)61999-1/fulltext)>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61999-1.

DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Curr. Mol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 100-115, Mar. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275621>>. Acesso em: 9 abr. 2017.

DE ARAUJO, G. L. et al. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, n. 5, p. 855-864, May 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkl071>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1093/jac/dkl071.

DONG, J. et al. Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 338, n. 2, p. 124-131, Jan. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23113475>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1111/1574-6968.12040.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 881-890, Sept. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732559/pdf/02-0063_FinalP.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2017. DOI: 10.3201/eid0809.020063.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, Apr. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18068/pdf/0012.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2017. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

DRYDEN, M. Complicated skin and soft tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology, risk factors and presentation. **Surg. Infect.**, v. 9, n. 1, p. 3-10, Oct. 2008. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/sur.2008.066.supp>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1089/sur.2008.066.supp.

DULON, M. et al. MRSA carriage among healthcare workers in non-outbreak settings in Europe and the United States: a systematic review. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, n. 363, p. 1-14, July 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4094410/>>. Acesso em: 9 jul. 2017. DOI: 10.1186/1471-2334-14-363.

DULON, M. et al. MRSA prevalence in European health care settings: a review. **BMC Infect. Dis.**, v. 11, n. 138, p. 1-13, May 2011. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-11-138>>. Acesso em: 9 jul. 2017. DOI: 10.1186/1471-2334-11-138.

DUPLESSIS, C.; CRUM-CIANFLONE, N. F. Ceftaroline: A new cephalosporin with activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Clin. Med. Rev. Ther.**, v. 3, p. 1-24, Feb. 2011. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3140339/>>. Acesso 30 jun 2017. DOI: 10.4137/CMRT.S1637.

EBRAHIM-SARAIE, H. S. et al. Emergence of SCC_{mec} type I obtained from clinical samples in Shiraz Teaching Hospitals, South-West of Iran. **Jundishapur J. Microbiol.**, v. 8, n. 6, e16998, June 2015. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549488/>>. Acesso 22 jun 2017. DOI: 10.5812/jjm.16998v2.

ECDC - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents.** EMEA: Stockholm, 2009. 42 p.

EED, E. M. et al. Phenotypic and molecular characterization of HA-MRSA in Taif hospitals, Saudi Arabia. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, n. 3, p. 298-303, Mar. 2015. Disponível em <<https://jidc.org/index.php/journal/article/view/25771468/1269>>. Acesso 23 jun 2017. DOI: 10.3855/jidc.5954.

ELHASSAN, M. M. et al. Absence of the *mecA* gene in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical specimens in Shendi City, Sudan. **Biomed Res Int.**, v. 2015, p. 1-5, 2015. Disponível em: <<http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC4531171/>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1155/2015/895860.

ELKHATIB, W. F.; KHAIRALLA, A. S.; ASHOUR, H. M. Evaluation of different microtiter plate-based methods for the quantitative assessment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Future Microbiol.**, v. 9, n. 6, p. 725-735, July 2014. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.14.33?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed>. Acesso em: 22 jun. 2017. DOI: 10.2217/fmb.14.33.

FERREIRA, F. A. et al. Comparison of in vitro and in vivo systems to study *ica*-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. **J. Microbiol. Methods**, v. 88, n. 3, p. 393-398, Mar. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701212000085?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 maio 2017. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.01.007.

FERREIRA, W. A. et al. Prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em Ambulatório de Dermatologia Geral em Manaus-Amazonas. **Rev. Patol. Trop.**, v. 38, n. 2, p. 83-92, Abr. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/6605/4866>>. Acesso em: 9 jul. 2017. DOI: 10.5216/rpt.v38i2.6605.

FIGUEIREDO, A. M. S. et al. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 1-19, Feb. 2017. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1040841X.2017.1282941?journalCode=imby20>>. Acesso em: 22 maio 2017. DOI: 10.1080/1040841X.2017.1282941.

FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 265-278, May 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000300265>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1590/0074-0276140016.

FILE, T. M., WILCOX, M. H., STEIN, G. E. Summary of Ceftaroline fosamil clinical trial studies and clinical safety. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, n. 3, Sep. 2012. Disponível em <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis559>>. Acesso 30 jun 2017. DOI: 10.1093/cid/cis559.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 49-62, Jan. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n1/full/nrmicro3161.html>>. Acesso em: 24 jun. 2017. DOI: 10.1038/nrmicro3161.

FOULSTON, L. et al. The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. **mBio**, v. 5, n. 5, p. 1-9, Sep.- Oct. 2014. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/content/5/5/e01667-14>>. Acesso em: 18 jun. 2017. DOI: 10.1128/mBio.01667-14.

FRANCISCHETTO, O. et al. Healthcare-associated infective endocarditis: a case series in a referral Hospital from 2006 to 2011. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 103, n. 4, p. 292-298, Oct. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4206359/>>. Acesso em: 18 jun. 2017. DOI: 10.5935/abc.20140126.

GARCÍA-SÁNCHEZ, J. E. et al. Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda década. ¿Posibilidades o realidades en un futuro? **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 25, n. 2, p. 100-121, jun. 2012. Disponível em: <<http://seq.es/seq/0214-3429/25/2/garcia.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2017.

GARDNER, A. et al. A point prevalence cross-sectional study of healthcare-associated urinary tract infections in six Australian hospitals. **BMJ Open**, v. 4, e005099, June 2014. Disponível em: <<http://bmjopen.bmj.com/content/bmjopen/4/7/e005099.full.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1136/bmjopen-2014-005099.

GELATTI, L. C. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC*mec* type IV in southern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 1, p. 34-38, Jan.-Feb. 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v46n1/0037-8682-rsbmt-46-01-034.pdf>>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1590/0037-868213022013.

GEOGHEGAN, J. A. et al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 21, p. 5663-5673, Nov. 2010. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/192/21/5663.long>>. Acesso em: 23 jun. 2017. DOI: 10.1128/JB.00628-10.

GHASEMIAN, A.; MIRZAEI, M. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains and the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* types in Iran. **Infect. Epidemiol. Med.**, v. 2, n. 3, p. 31-34, 2016. Disponível em: <http://iem.modares.ac.ir/article_14834_438a435a5128e9142528ba1565f06c8e.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2017. DOI: 10.7508/iem.2016.03.008.

GOLL, A. S.; FARIA, M. G. I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Braz. J. Surg. Clin. Res.**, Maringá, v. 5, n. 1, p. 69-72, dez. 2013. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/periodico/20131130_150425.pdf>. Acesso em: 8 abr. 2017.

GRIFFITHS, J. M.; O'NEILL, A. J. Loss of function of the gdpP protein leads to joint β -lactam/glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 1, p. 579-581, Jan. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3256080>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.05148-11.

HAABER, J. et al. Reversible antibiotic tolerance induced in *Staphylococcus aureus* by concurrent drug exposure. **MBio**, Washington, v. 6, n. 1, Jan. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313918/>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1128/mBio.02268-14.

HAGSTRAND ALDMAN, M., SKOVBY, A.; PÅHLMAN, L. I. Penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: susceptibility testing, resistance rates and outcome of infection. **Infect. Dis.**, London, v. 49, n. 6, p. 454-460, June 2017. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23744235.2017.1280617>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1080/23744235.2017.1280617.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n. 7, p. 1034–1043, July 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x/epdf>>. Acesso em: 22 jun. 2017. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x.

HASSAN, A. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 4, p. 305-311, July-Aug. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjid/v15n4/v15n4a02.pdf>>. Acesso em: 9 mai. 2017. DOI: 10.1590/S1413-86702011000400002.

HAVAEI, S. A. et al. Genetic characterization of methicillin resistant and sensitive, vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* strains isolated from different Iranian Hospitals. **ISRN Microbiol.**, v. 2012, p. 1-6, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/215275/>>. Acesso em: 30 jun. 2017. DOI: 10.5402/2012/215275.

HIGUCHI, W. et al. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 377, n. 3, p. 752-756, Dec. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X08019712?via%3Dihub>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.10.009.

HUSSEIN, N. R. Prevalent genotypes of *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthcare workers in Duhok City, Kurdistan Region, Iraq. **Int. J. Infect.**, v. 3, n. 2, e35375, Apr. 2016. Disponível em: <http://intj.infection.portal.tools/?page=article&article_id=35375>. Acesso em: 14 jun. 2017. DOI: 10.17795/iji-35375.

ITO, T. et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 56, n. 10, p. 4997-4999, Oct. 2012. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=22869575>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.01199-12.

ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist. Updat.**, v. 6, n. 1, p. 41-52, Feb. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764603000037?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1016/S1368-7646(03)00003-7.

ITO, T. et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 48, n. 7, p. 2637-2651, July 2004. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=15215121>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.48.7.2637-2651.2004.

ITO, T. et al. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA. **Methods Mol Biol.**, v. 1085, p. 131-148, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-664-1_8>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1007/978-1-62703-664-1_8.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 45, n. 5, p. 1323-1336, May 2001. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/45/5/1323.long>>. Acesso em: 28 jun. 2017. DOI: 10.1128/AAC.45.5.1323-1336.2001.

IWG-SCC - International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 53, n. 12, p. 4961-4967, Aug. 2009. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/53/12/4961.long>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.00579-09.

JAMES, G. A. et al. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair Regen.**, v. 16, n. 1, p. 37-44, Jan.-Feb. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x/epdf>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x.

JEVONS, M. P. "Celbenin"-resistant Staphylococci. **Br. Med. J.**, v. 1, n. 5219, p. 124-125, Jan. 1961. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1952888/>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

KALLEN, A. J. et al. Health care-associated invasive MRSA infections, 2005-2008. **JAMA**, v. 304, n. 6, p. 641-648, Aug. 2010. Disponível em: <<http://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/186385>>. Acesso em: 9 jul. 2017. DOI: 10.1001/jama.2010.1115.

KANG, C. I. et al., Clinical features and outcome of *Staphylococcus aureus* infection in elderly versus younger adult patients. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 1, p. e58-62, Jan. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971210025208>>. Acesso em: 8 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.09.012.

KIKUTA, H. et al. Predominant dissemination of PVL-Negative CC89 MRSA with SCCmec Type II in children with impetigo in Japan. **Int. J. Pediatr.**, v. 2011, p. 1-8, 2011. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijpedi/2011/143872/>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1155/2011/143872.

KIM, D. H. et al. Cardiac implanted electronic device-related infective endocarditis: clinical features, management, and outcomes of 80 consecutive patients. **Pacing Clin. Electrophysiol.**, v. 37, n. 8, p. 978-985, Aug. 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pace.12452/epdf>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1111/pace.12452.

KIRBY, W. M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant Staphylococci. **Science**, Washington, v. 99, n. 2579, p. 452-453, June 1944. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/99/2579/452.long>>. Acesso em: 5 abr. 2017. DOI: 10.1126/science.99.2579.452.

KRUPA, P. et al. Genotypes and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* from chicken and chicken meat in Poland. **Poult. Sci.**, v. 93, n. 12, p. 3179-3186, Dec. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ps/article-lookup/doi/10.3382/ps.2014-04321>>. Acesso em: 15 jun. 2017. DOI: 10.3382/ps.2014-04321.

LEUNG, Y. H. et al. Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Hong Kong. **J. Infect.**, v. 64, n. 5, p. 494-499, May 2012. Disponível em: <[http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(12\)00039-4/fulltext](http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(12)00039-4/fulltext)>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.jinf.2012.02.009.

LI, S. et al. Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in Clonal Complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 6, p. 3046-3050, June 2011. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/55/6/3046.long>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.01475-10.

LIMA, D. F. et al. Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene carriage among *Staphylococcus aureus* strains with SCCmec types I, III, IV, and V recovered from cystic fibrosis pediatric patients in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 78, n. 1,

p. 59-62, Jan. 2014. Disponível em: <[http://www.dmidjournal.com/article/S0732-8893\(13\)00541-5/fulltext](http://www.dmidjournal.com/article/S0732-8893(13)00541-5/fulltext)>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.004.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, May 2003. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/18535>>. Acesso em: 1 abr. 2017. DOI: 10.1172/JCI18535.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 8, p. 520–532, Aug. 1998. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199808203390806>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1056/NEJM199808203390806.

MAALEJ, S. M. et al. Analysis of Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) strains isolated in Tunisia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 10, p. 3345-3348, Oct. 2012. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/50/10/3345.full>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1128/JCM.01354-12.

MACHUCA, M. A.; GONZÁLEZ, C. I.; SOSA, L. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causes both community-associated and health care-associated infections in children at the Hospital Universitario de Santander. **Biomedica**, v. 34, p. 163-169, Apr. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572014000500019&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1590/S0120-41572014000500019.

MACK, W. N.; MACK, J. P.; ACKERSON, A. O. Microbial film development in a trickling filter. **Microb. Ecol.**, v. 2, n. 3, p. 215-226, Sept. 1975. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24241336>>. Acesso em: 18 jun. 2017. DOI: 10.1007/BF02010441.

MARTINS, A. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 18, n. 3, p. 331-335, May-Jun. 2014. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413-8670\(13\)00287-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413-8670(13)00287-0)>. Acesso em: 25 mai. 2017. DOI: 10.1016/j.bjid.2013.11.003.

MATHEWS, A. A. et al. Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant *S. aureus*. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v. 53, n. 1, p. 79-82, Jan.-Mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ijpmonline.org/article.asp?issn=0377-4929;year=2010;volume=53;issue=1;spage=79;epage=82;aulast=Mathews>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.4103/0377-4929.59189.

McCARTHY, H. et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 5, Jan. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4309206/>>. Acesso em: 3 maio 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00001.

McDOUGAL, L. K.; THORNSBERRY, C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. **J.**

Clin. Microbiol., v. 23, n. 5, p. 832-839, May 1986. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC268732/>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

MEDEIROS, L. B. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from medical students of a Brazilian educational institute. **Microbiol. Res. Int.**, v. 3, n. 1, p. 14-19, Mar. 2015. Disponível em: <<http://www.netjournals.org/pdf/MRI/2015/1/14-019.pdf>>. Acesso em: 9 jul. 2017.

MEEKER, D. G. et al. Synergistic photothermal and antibiotic killing of biofilm-associated *Staphylococcus aureus* using targeted antibiotic-loaded gold nanoconstructs. **ACS Infect. Dis.**, v. 2, n. 4, p. 241-250, Apr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4945994/>>. Acesso em: 12 abr. 2017. DOI: 10.1021/acsinfecdis.5b00117.

MIMICA, M. J. et al. SCCmec Type IV, PVL-Negative, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis Patients from Brazil. **Curr. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 388-390, Feb. 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00284-010-9718-y>>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1007/s00284-010-9718-y.

MIRZAEI, M. et al. Detection of Intracellular Adhesion (ica) Gene and Biofilm Formation *Staphylococcus aureus* Isolates from Clinical Blood Cultures. **J. Med. Bacteriol.** V. 3, n. 1-2, p. 1-7, 2014. Disponível em: <<http://jmb.tums.ac.ir/index.php/jmb/article/view/8/6>>. Acesso em: 2 jul. 2017.

MIU-LING, W. et al. An outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a boarding school in Hong Kong Special Administrative Region (China). **Western Pac. Surveill. Response J.**, v. 5, n. 1, p. 1-6, Jan. 2014. Disponível em: <<http://ojs.wpro.who.int/ojs/index.php/wpsar/article/view/1223/361>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.5365/WPSAR.2013.4.4.005.

MONACO, M. et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* responsible for human colonization and infection in an area of Italy with high density of pig farming. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, n. 258, p. 1-6, June 2013. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-234-13-258>>. Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1186/1471-2334-13-258.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol. Spectr.**, v. 4, n. 2, p. 1-37, Apr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/>>. Acesso em: 2 abr. 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 888 p.

NASR, R. A.; ABUSHADY, H. M.; HUSSEIN, H. S. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. **Egypt. J. Med. Hum. Genet.** v. 13, n. 3, p. 269-274, Oct. 2012. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1110863012000407/1-s2.0-S1110863012000407-main.pdf?_tid=f2faccc6-7016-11e7-abf7-00000aab>

0f26&acdnat=1500863132_92c48c0d81ccbe56c1e89b4a50effd78>. Acesso em: 5 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.ejmhg.2012.04.007.

NNIS - NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. National Nosocomial Infections Surveillance System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **Am. J. Infect. Control**, v. 32, n. 8, p. 470-485, Dec. 2004. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/data/stat/nnis_2004.pdf>. Acesso em: 25 maio 2017. DOI: 10.1016/j.ajic.2004.10.001.

NOURBAKSH, F.; NAMVAR, A. E. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. **GMS Hyg. Infect. Control**. v. 11, p. 1-5, Mar. 2016. ; 11: Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4804124>> Acesso em: 7 maio 2017. DOI: 10.3205/dgkh000267.

OKUMA, K. et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 11, p. 4289-4294, Nov. 2002. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/40/11/4289.long>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1128/JCM.40.11.4289-4294.2002.

OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRIÇO, C.; LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* Type VI. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 10, p. 3457-3459, Oct. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1610060/>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.00629-06.

OLIVEIRA, P. S. et al. Isolation, pathogenicity and disinfection of *Staphylococcus aureus* carried by insects in two public hospitals of Vitória da Conquista, Bahia, **Brazil. Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 18, n. 2, p. 129-136, Mar.-Apr. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702014000200129>. Acesso em: 10 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.bjid.2013.06.008.

OPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010. 544 p.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 322, p. 207-228, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2777538/>>. Acesso em: 22 jun. 2017.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 17, p. 32-37, Feb. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581690>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.mib.2013.11.004.

O'GARA, J. P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 270, n. 2, p. 179-188, May 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x/epdf>>. Acesso em: 23 jun. 2017. DOI: DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x.

O'NEILL, E. et al. Association between methicillin susceptibility and Biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 1379-1388, May 2007. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/45/5/1379.full>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1128/JCM.02280-06.

PATTI, J. M. et al. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 585-617, Oct. 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7826020>>. Acesso em: 21 jun. 2017. DOI: 10.1146/annurev.mi.48.100194.003101.

PEEL, T. N. et al. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 5, p. 2386-2391, May 2012. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/56/5/2386.long>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1128/AAC.06246-11.

PEREZ, L. R. R.; D'AZEVEDO, P. A. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in South Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 50, n. 3, p. 135-137, May 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652008000300001>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1590/S0036-46652008000300001.

PERIASAMY, S. et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, n. 4, p. 1281-1286, Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/109/4/1281.long>>. Acesso em: 21 jun. 2017. DOI: 10.1073/pnas.1115006109.

PRICE, L. B. et al. *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of Methicillin Resistance in Livestock. **mBio**. v. 4, n. 1, e00520-12, Jan.-Feb. 2013. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/content/3/1/e00305-11.full?..>>. Acesso em: 20 jul. 2017. DOI: 10.1128/mBio.00520-12.

RAJAN, V. et al. Genotyping of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in a tertiary care centre in Mysore, South India: ST2371-SCCmec IV emerges as the major clone. **Infect. Genet. Evol.**, v. 34, p. 230-235, Aug. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134815002312?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 jun. 2017. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.05.032.

RAJEH, M. et al. Molecular characterization of staphylococcal cassette chromosome *mec* and virulence encoding genes in methicillin-resistant *Staphylococci* at a medical center in Lebanon. **Int. Arabic J. Antimicrob. Ag.**, v. 5, n. 1:3, p. 1-12, Aug. 2015. Disponível em: <<http://imed.pub/ojs/index.php/IAJAA/article/view/1234/965>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.3823/765.

RAMACHANDRAN, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 213-218, Jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916377/>>. Acesso em: 10 abr 2017. DOI: 10.4161/viru.27024.

RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. **Exp. Biol. Med.**, v. 51, n. 3, p. 386-389, Dec. 1942. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-51-13986>>. Acesso em: 5 abr. 2017.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 808 p.

RANI, S. A. et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial Biofilms reveal diverse physiological states. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 11, p. 4223-4233, June 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1913414/>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1128/JB.00107-07.

REINERT, C. et al. Type IV SCCmec found in decade old Brazilian MRSA isolates. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 3, p. 213-216, June 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjid/v12n3/a10v12n3.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1590/S1413-8670200800030010.

RIBEIRO, A. et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 4, p.1985-1988, Apr. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1081335/>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1128/JCM.43.4.1985-1988.2005.

RODRIGUES, M. A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital in the South of Brazil. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 35-41, Jan./Mar. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v51n1/1984-8250-bjps-51-01-00035.pdf>>. Acesso em: 9 jul. 2017. DOI: 10.1590/S1984-82502015000100004.

SANCHEZ, C. J. JR. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro. **BMC Musculoskelet. Disord.**, v. 14, n. 187, p. 1-11, June 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3691632/>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1186/1471-2474-14-187.

SANTOS, A. L. S. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v43n6/v43n6a05.pdf>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1590/S1676-24442007000600005.

SANTOS, H. B. et al. Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, n. 328, p. 1-7, Nov. 2010. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2334-10-328?site=bmcinfectdis.biomedcentral.com>>. Acesso em: 9 jul. 2017. DOI: 10.1186/1471-2334-10-328.

SAVAGE, V. J.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A. J. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 4, p. 1968-1970, Apr. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/arti>

cles/PMC3623343/>. Acesso em: 22 maio 2017. DOI: 10.1128/AAC.02008-12.

SERAFIM, M. L. R. C. **Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes amostras provenientes do aterro controlado da cidade de Campos dos Goytacazes- RJ.** 2013. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: recent advances and new insights. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6-7, p. 350-359, Aug. 2013. Disponível em: <>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.002.

SHORE, A. C. et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* Type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, Aug. 2011. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=21636525>>. Acesso em: 01 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.00187-11.

SHRESTHA, B. et al. High prevalence of Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) genes in nosocomial-acquired *Staphylococcus aureus* isolated from Tertiary Care Hospitals in Nepal. **Biomed Res. Int.**, v. 2014, p. 1-7, June 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/790350/>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1155/2014/790350.

SILVEIRA, A. C. O. et al. MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 19, n. 4, p. 384-389, July-Aug. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867015001026?via%3Dihub>> Acesso em: 3 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.bjid.2015.04.009.

SINGH, R. et al. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, n. 9, p. 1955-1958, Sep. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkq257>>. Acesso em: 23 jun. 2017. DOI: 10.1093/jac/dkq257.

SINGHAI, M. et al. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 193-198, Oct.-Dec. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543538/>>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.4103/0974-777X.103896.

SOUZA, M. P. *Staphylococcus aureus* Resistente à Oxacilina. **NewsLab**, ed. 105, p. 120-132, 2011.

SPEZIALE, P. et al. Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, Lausanne, v. 4, Dec. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00171/full>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00171.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, Aug. 2007. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x/pdf>. Acesso em: 29 jun. 2017. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.

SULIS, C. A. et al. Outcomes of a ventilator-associated pneumonia bundle on rates of ventilator-associated pneumonia and other health care-associated infections in a long-term acute care hospital setting. **Am. J. Infect. Control**, v. 42, n. 5, p. 536-568, May 2014. Disponível em: <[http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(14\)00045-5/fulltext](http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(14)00045-5/fulltext)>. Acesso em: 25 jun. 2017. DOI: 10.1016/j.ajic.2014.01.020.

TAN, X. et al. Transcriptome analysis of the biofilm formed by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Sci. Rep.**, v. 5, n. 11997, p. 1-12, July 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149474>>. Acesso em: 24 jun. 2017. DOI: 10.1038/srep11997.

THUNBERG, U. et al. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with chronic rhinosinusitis. **APMIS**, New York, v. 123, n. 1, p. 37-44, Jan. 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.12299/full>>. Acesso em: 10 abr. 2017. DOI: 10.1111/apm.12299.

TOMASZ, A. et al. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 33, n. 11, p. 1869-1874, Nov. 1989. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/33/11/1869.long>>. Acesso em: 1 jul. 2017.

TURLEJ, A.; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. **Pol. J. Microbiol.**, v. 60, n. 2, p. 95-103, 2011. Disponível em: <<http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol6022011095.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

UDO, E. E. et al. Detection and characterization of an ST97-SCC*mec*-V community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in a neonatal intensive care unit and special care baby unit. **J. Med. Microbiol.**, v. 60, p. 600-604, May 2011. Disponível em: <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.028381-0#tab2>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1099/jmm.0.028381-0.

UDO, E. E.; PEARMAN, J. W.; GRUBB, W. B. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. **J. Hosp. Infect.**, v. 25, n. 2, p. 97-108, Oct. 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/019567019390100E>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1016/0195-6701(93)90100-E.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered Penicillin-Binding Protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 28, n. 3, p. 397-403, Sept. 1985. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180261/>>. Acesso em: 1 jul. 2017.

VALESIA, G. et al. Emergence of SCC mec type IV and SCC mec type V methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leukocidin genes in a large academic teaching hospital in central Switzerland: external invaders or persisting circulators? **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 720-727, Mar. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/48/3/720.long>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1128/JCM.01890-09.

VAN HAL, S. J.; LODISE, T. P.; PATERSON, D. L. The clinical significance of vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, n. 6, p. 755-771, Mar. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cir935>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1093/cid/cir935.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and Threats. **P. T.**, v. 40, n. 4, p. 277–283, Apr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

VIEIRA, M. A. S. **Estudo epidemiológico e molecular de portador nasal de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus aureus* metilina resistente em Pronto Atendimento Pediátrico e em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal de Goiânia.** 2010. 96 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2010.

WELLS, C. L. et al. Relation between antibiotic susceptibility and ultrastructure of *Staphylococcus aureus* biofilms on surgical suture. **Surg. Infect.** v. 12, n. 4, p. 297-305, Aug. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3192185/>>. Acesso em: 5 maio 2017. DOI: 10.1089/sur.2010.104.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance.** Geneva, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. Acesso em: 9 abr. 2017.

WU, Z. et al. Novel type XII Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* harboring a new Cassette Chromosome Recombinase, CcrC2. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 12, p. 7597-7601, Dec. 2015. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/59/12/7597.long>>. Acesso em: 1 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.01692-15.

YANG, E. S. et al. Body site colonization in patients with community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other types of *S. aureus* skin infections. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, n. 5, p. 425-431, May 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14633139>>. Acesso em: 9 abr. 2017. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02836.x.

ZETOLA, N. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **Lancet Infect. Dis.**, v. 5, n. 5, p. 275-286, May 2005. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(05\)70112-2/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(05)70112-2/fulltext)>. Acesso em: 29 jun. 2017. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)70112-2.

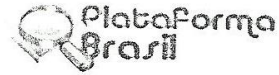
ZHANG, K. et al. Novel Staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated Type VIII, harboring Class A *mec* and Type 4 *ccr* gene complexes in a canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 2, p. 531-540, Feb. 2009. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/53/2/531.long>>. Acesso em: 2 jul. 2017. DOI: 10.1128/AAC.01118-08.

ANEXOS

ANEXO A – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS E DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

Pesquisador: Rosmari Horner

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38850614.4.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 928.497

Data da Relatoria: 12/01/2015

Apresentação do Projeto:

As infecções hospitalares constituem uma importante causa de aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes e contribui diretamente na elevação dos custos assistenciais. Nas últimas décadas, o grande problema têm sido os surtos de infecções hospitalares provocados por microrganismos multirresistentes (MDR) como por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *Staphylococcus Coagulase Negativa* (SCoN), família *Enterobacteriaceae*, principalmente as produtoras de carbapenemases tipo KPC, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), um hospital terciário, centro de referência em diagnóstico e tratamento na região central do Rio Grande do Sul que recebe pacientes de mais de 30 municípios representa um nosocômio onde este tipo de microrganismo tem probabilidade frequente de isolamento. Torna-se evidente a crescente importância destas bactérias como agentes etiológicos de infecções hospitalares, especialmente pela escassez de esquemas terapêuticos efetivos e pela presença desses microrganismos potencialmente causadores de infecções. Assim, devido à importância no ambiente hospitalar e sua grande capacidade de disseminação, o objetivo deste projeto será efetuar a identificação e avaliação do perfil de sensibilidade frente os antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bem como o perfil

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 928.497

epidemiológico das bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria, com a finalidade de contribuir de forma significativa na escolha do tratamento empírico a ser administrado a cada paciente.

Objetivo da Pesquisa:

Efetuar a identificação e avaliação do perfil de sensibilidade frente os antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bem como o perfil epidemiológico das bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos de maneira adequada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma: aquele apresentado no projeto não é detalhado;

Orçamento: cfme apresentado no projeto, o custo do Material de Consumo é de cerca de R\$ 34 mil, que seria obtido com a submissão do projeto a editais públicos internos e externos.

Termo de Confidencialidade: Ok;

Autorização Institucional: foi apresentada autorização da GEPE;

Registro no GAP: Ok;

Folha de Rosto: Ok;

Registro na GEPE: foi apresentada;

TCLE: foi solicitado, formalmente a dispensa, o que é adequado ao tipo de projeto.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 928.497

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como a amostra é de material biológico, optou-se pela aprovação do projeto, mesmo que a mesma não tenha sido justificada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 05 de Janeiro de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

ANEXO B – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences



SCCmec typing of MRSA strains isolated for three years at a teaching hospital in Brazil

Journal:	<i>Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences</i>
Manuscript ID	BJPS-2017-0268
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	08-May-2017
Complete List of Authors:	Rodrigues, Mônica ; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Carvalho, Fernanda; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Da Rosa, Tacieli; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Bottega, Angelita; Universidade Federal de Santa Maria Graichen, Daniel; Universidade Federal de Santa Maria, Campus 55 55Palmeira das Missões dos Santos, Silvana ; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Brites, Patrícia; Universidade Federal de Santa Maria, Hospital Universitário de Santa Maria Hörner, Manfredo; Universidade Federal de Santa Maria Hörner, Rosmari; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Keyword:	Staphylococcus aureus, MRSA, Community origin, Hospital origin, SCCmec

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO C – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 2

Manuscript Details

Manuscript number	BJID_2017_557
Title	Evaluation of different methods for detection of biofilm production in <i>Staphylococcus aureus</i> isolates
Article type	Full Length Article

Abstract

Staphylococcus aureus is known worldwide as a frequent cause of a great variety of infectious diseases. Recognized for their ability to form biofilms, they are also associated with chronic and recurrent infections in humans. Different phenotypic methods are described to detect biofilm production and to search for the *ica* gene. This study aimed to evaluate different phenotypic and genotypic methods for determination of biofilm formation in *S. aureus* isolates. The study was conducted with 132 *S. aureus*, isolated from different clinical specimens, from April to December, 2011 at a university hospital, at southern Brazil. The Microtiter Plate (MTP) Method, considered as gold standard, as well as the Tube Method (TM), Congo Red Agar (CRA) method and search for *icaA*, *icaC* and *icaD* genes were tested. Antimicrobial susceptibility testing of the biofilm-producing strains was conducted using the Disc Diffusion and Broth Microdilution techniques. In 42/132 (31.8%) isolates, biofilm formation was detected by one or more of the four methods used. MTP was considered more effective than TM and CRA, because it detected 31/132 (23.5%) biofilm producers. According to the TM, positivity was found in 9/132 (6.8%), while in CRA there was only one sample (0.8%). Genotypically, we found that our isolates likely produce biofilm by an *ica*-independent mechanism. In general, these biofilm-producing isolates were highly sensitive to the antimicrobial agents tested. We can conclude that when compared to the standard method, TM, CRA and *icaA*, *icaC* and *icaD* genes search were not reliable to identify biofilm-producing strains in our isolates.

Keywords	<i>Staphylococcus aureus</i> ; biofilm-related infections; <i>ica</i> -independent biofilms.
Corresponding Author	Rosmari Horner
Order of Authors	Mônica de Abreu Rodrigues, Silvana Oliveira dos Santos, Fernanda Aguirre Carvalho, Angelita Bottega, Tacieli Fagundes da Rosa, Marissa Bolson Serafim, Patrícia Chaves Brites, Rosmari Horner
Suggested reviewers	Agnes Figueiredo, Pedro Romão

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

COVER LETTER.docx [Cover Letter]
PÁGINA DE TÍTULO.docx [Title Page (with Author Details)]
ARTIGO ESTRUTURADO.docx [Manuscript (without Author Details)]
FIGURE 1.jpg [Figure]
FIGURE 2.jpg [Figure]
FIGURES LEGEND.docx [Figure]
TABLES.docx [Table]
AUTHOR AGREEMENT.docx [Author Agreement]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.