

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina e sua associação com o perfil clonal.

Deivid William da Fonseca Batistão

Uberlândia - MG

Agosto 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e sua associação com o perfil clonal.

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas

Co-Orientadores: Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho
Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva
Prof. Dra. Rosário Oliveira

Deivid William da Fonseca Batistão

Uberlândia - MG

Agosto 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B333m Batistão, Deivid William da Fonseca, 1986-
2014 Marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme em
 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina e sua
 associação com o perfil clonal / Deivid William da Fonseca Batistão –
 2014.
 87p. : il.

Orientadora: Rosineide Marques Ribas.

Coorientadores: Paulo P. Gontijo Filho , Cláudio Vieira da Silva e
Rosário Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Staphylococcus aureus* - Teses. 3. Biofilme -
Teses. 4. Infecção hospitalar – Teses. I. Ribas, Rosineide Marques, 1974-
II. Gontijo Filho, Paulo Pinto. III. Silva, Claudio Vieira da. IV. Oliveira,
Rosário. V. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. VI. Título.

CDU: 612.017

“People are always blaming their circumstances for what they are. I don't believe in circumstances. The people who get on in this world are the people who get up and look for the circumstances they want, and if they can't find them, make them.”

George Bernard Shaw
Mrs. Warren's Profession, 1894

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela presença constante em cada segundo da minha vida e caminhada, por sua benevolência em me dar saúde para trabalhar, sabedoria para aprender e determinação para alcançar essa vitória tão importante em minha vida.

Aos meus pais, **Benedito Batistão** e **Maria Inês**, os primeiros responsáveis por minha educação, meus primeiros mestres e meus maiores incentivadores, nos quais espelhei a construção do meu caráter.

Aos meus amados avós maternos **Terezinha** e **André**, e paternos **Zica** e o saudoso avô **Pascoal Batistão**. Obrigado pelos seus sábios ensinamentos de vida, pelas muitas orações e bons pensamentos que me enviam diariamente, por todo amor e carinho e por sempre terem me motivado a seguir em frente quando tudo se tornava difícil.

Ao meu irmão **Dênis** e minha irmã **Danielle**, por sempre acreditarem nas minhas escolhas e serem meus cúmplices nas aventuras da vida, vocês sempre foram minha razão de continuar.

Ao meu querido afilhado **João Pedro** por compreender a distância que o trabalho me impediu de minimizar e me receber com tanto amor cada vez que retorno à minha casa.

À toda a minha **família** pelo amor, paciência e apoio incondicional, sobretudo, nos momentos mais críticos.

À minha orientadora **Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas** por sua disponibilidade e incentivo que foram fundamentais para realização desse trabalho. Obrigado pelo apoio incondicional prestado, a forma interessada e pertinente como sempre me acompanhou desde o mestrado. As suas críticas construtivas, as muitas discussões que tivemos ao longo desses anos de convivência e a liberdade com que permitiu conduzir minhas atividades, foram fundamentais para meu crescimento como pesquisador e me tornaram o profissional que sou hoje. Obrigado pela orientação e amizade.

Ao meus co-orientadores **Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho e Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva** pelo exemplo como pesquisadores e pelas valiosas contribuições para o aprimoramento do trabalho.

À saudosa **Profa. Dra. Rosário de Oliveira**, minha querida orientadora em Portugal, uma profissional extraordinária e uma pessoa admirável. Serei eternamente grato pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal que me proporcionou. Obrigado pelo muito que contribuiu com a realização deste trabalho, pelo carinho e pelo exemplo de força diante das dificuldades da vida. Foi uma honra poder ter convivido com a Dra. Rosário, o seu exemplo será sempre uma lembrança viva na minha caminhada.

À **Profa. Dra. Mariana Henriques, Profa. Dra. Maria Olívia Pereira, Profa. Dra. Pilar Teixeira e Profa. Dra. Margarida Martins** do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho por todo suporte científico durante o meu estágio de doutoramento.

À todos os meus amigos investigadores do **Departamento de Engenharia Biológica (DEB)** e do **Instituto de Ciências da Vida e Saúde (ICVS)** da **Universidade do Minho** pelo acolhimento, convivência e conhecimento partilhado. Foi um presente conviver com todos vocês.

Aos amigos queridos **Cláudia Sousa, Fernando Jesus, Cláudia Botelho, André Antunes, Lúcia Chaves, Ângela Carvalho, Adilson Silva, Rafaela Coelho, Fabiana Sousa, Fabiana Couto, Cíntia Sargo, Joseana Rocha do Monte, Pricila Matos, Susane Chang e Adele Aud** por terem feito com que a saudade das pessoas queridas do Brasil fosse algo suportável. Obrigado por tudo que fizeram por mim e por estarem sempre presentes em minha vida, mesmo com a distância. Nossa amizade é eterna.

À minha família de Uberaba, **Bruno, Deila, Bruna, Jeniffer, André, Cláudia, Emily, Izabela, Giovanni, Tia Neusa, César e Tio Reginaldo**, por me acolherem, apoiarem e se preocuparem comigo... Ao meu grande amigo **Gustavo** pela convivência diária em Uberaba, Uberlândia e Portugal, pelas risadas, discussões e tantas histórias vividas.

À minha família de Uberlândia, **Tia Ângela, Tio Joaquim, Adele e Laura** pelo acolhimento, carinho, amizade, incentivo nos momentos de angústia e pelo exemplo pessoal, profissional e familiar.

A todos os meus amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular, especialmente, **Ana Paula, Melina, Ana Luiza, Bruna, Daiane, Iara, Marcília, Raquel, Sabrina, Cely e Iolanda**, e do Laboratório de Virologia, **Guilherme**, pela construção partilhada de minha formação como investigador, pelas agradáveis horas de convívio e pelo auxílio à realização dos ensaios.

Às minhas amigas e co-autoras deste trabalho, **Paola Amaral de Campos e Nayara Caroline Camilo** pela imensa ajuda na realização dos experimentos.

Agradeço também aos professores da Microbiologia, **Prof. Dr. Geraldo Melo, Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito, Profa. Dra. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges**, pela convivência agradável e ajuda sempre disponível.

Aos demais **professores do Instituto de Ciências Biomédicas** da Universidade Federal de Uberlândia pelo agradável convívio e pelos ensinamentos ministrados.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia **Claudete, Ricardo, Samuel** e do Laboratório de Microbiologia Molecular, **Cristiane Brito e Lícia Ludendorff** pelo apoio técnico, pela paciência e pelas dicas de muita experiência.

Às secretárias da coordenação do PPIPA, **Lucélia e Lucileide** pela disponibilidade, atenção e auxílio constantes.

À **Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka** da Universidade de São Paulo e **Profa. Dra. Teruyo Ito** da *Juntendo University* pelo fornecimento das cepas controle utilizadas nesse estudo.

Agradeço aos integrantes da banca, **Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman, Profa. Dra. Cláudia Botelho, Profa. Dra. Juliana Pena Porto, Profa. Dra. Karinne Spirandelli Carvalho Naves, Profa. Dra. Helisângela de Almeida Silva e Profa. Dra. Daise**

Aparecida Rossi por aceitarem participar da minha defesa, pelo tempo dispendido na leitura deste trabalho e pelo muito que vão acrescentar a ele.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**) por subsidiar-me com a bolsa de estudo durante todo o Doutorado e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma me apoiaram, me incentivaram e contribuíram com a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	10
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVOS GERAIS	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 CEPAS BACTERIANAS.....	30
3.1.1. Identificação das espécies	31
3.1.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	31
3.2. TÉCNICAS MOLECULARES	32
3.2.1. Extração de DNA das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.2.2 Multiplex PCR para detecção do gene <i>mecA</i> e identificação dos tipos de <i>SCCmec</i>	33
3.2.3 Multiplex PCR para detecção do grupo <i>agr</i>	34
3.2.4 Detecção dos genes associados a formação de biofilme	35
3.2.5 Tipagem molecular pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)	37
3.3 ENSAIO DE ADESÃO INICIAL E FORMAÇÃO DE BIOFILME	38
3.3.1 Preparação do inóculo bacteriano	38
3.3.2 Ensaio de adesão à superfície inerte	39
3.3.3 Ensaio de formação de biofilme	39
3.3.3.1 Classificação do biofilme	40
3.4 AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA TENSÃO INTERFACIAL E HIDROFOBICIDADE DA CÉLULA BACTERIANA ATRAVÉS DA MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO	40
3.5 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ADESINA INTERCELULAR	

POLISSACARÍDICA E DA NATUREZA DA MATRIZ DO BIOFILME	43
3.5.1 Ensaio de Hemaglutinação.....	43
3.5.2 Ensaio de estabilidade do biofilme frente ao tratamento com proteinase K e metaperiodato de sódio.....	43
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
3.7 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	44
4 RESULTADOS	45
4.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS AMOSTRAS E PERFIL DE RESISTÊNCIA.....	45
4.2 RELAÇÃO ENTRE HIDROFOBICIDADE E CAPACIDADE DE ADESÃO INICIAL DE CEPAS CLÍNICAS DE MRSA	46
4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O TIPO DE SCC _{mec} E A PRODUÇÃO DE BIOFILME	49
4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DOS GENES <i>bbp</i> , <i>clfA</i> , <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> , <i>fnbB</i> , <i>sasC</i> , A SEQUÊNCIA DE INSERÇÃO <i>IS256</i> , O GRUPO <i>agr</i> E A CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	51
4.5 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ADESINA INTERCELULAR POLISSACARÍDICA E DA NATUREZA DO BIOFILME	54
4.6 TIPAGEM MOLECULAR	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO I.....	80
ANEXO II.....	81
ANEXO III	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
°C	Graus centígrados
μg	Micrograma (s)
μL	Micro litro (s)
μM	Micromolar
<i>agr</i>	<i>Accessory gene regulator</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
Bap	<i>Biofilm associated Protein</i> – Proteína associada ao biofilme
Bbp	<i>Bone sialoprotein-binding protein</i> – Proteína de ligação ao ácido siálico ósseo
BHI	<i>Brain and Heart Infusion</i>
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina de origem comunitária
CC	Complexo clonal
CCIH	Comissão de controle de infecção hospitalar
CDC	Centro de Prevenção Controle de Doenças, Estados Unidos
CIP	Ciprofloxacina
CifA	<i>Clumping factor A</i> – Fator clumping A
CLI	Clindamicina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERI	Eritromicina
FnBB	<i>Fibronectin-binding protein A</i> – Proteína ligadora de fibronectina do tipo B
FnBPs	<i>Fibronectin-binding protein</i> – Proteína ligadoras de fibronectina
γ ⁻	Tensão interfacial do componente doador de elétrons
γ ⁺	Tensão interfacial do componente receptor de elétrons

GEN	Gentamicina
γ^{LW}	Tensão interfacial das forças de interações apolares de Lifshitz-van der Waals
h	Horas
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina de origem hospitalar
HC	Hospital de Clínicas
<i>ica</i>	<i>Intercellular adhesin</i>
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas
IRAS	Infecção relacionada à assistência à saúde
IS	Sequência de inserção
kb	Quilobase (s)
M	Molar
<i>mec</i>	<i>Methicillin resistant gene</i>
MET	Meticilina
mg	Miligrama (s)
min	Minutos
mL	Mililitro (s)
MLST	<i>Multilocus Sequencing Type</i>
mM	Milimolar
mrMRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina multirresistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSCRAMMs	Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz extracelular
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
nm	Nanômetro
nmMRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina não multirresistente
p/v	Peso por volume
pb	Par (es) de base (s)
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PEN	Penicilina
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese de campo elétrico pulsado
pH	Potencial de hidrogênio
PIA	Adesina intercelular polissacarídica

PM	Peso molecular
PPIPA	Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
RIF	Rifampicina
s	Segundo (s)
SasC	<i>S. aureus</i> surface protein C – Proteína C de superfície de <i>Staphylococcus aureus</i>
SasG	<i>S. aureus</i> surface protein G – Proteína G de superfície de <i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> – Cassete cromossômico estafilocócico
SD	Desvio padrão
ST	<i>Sequence type</i> – Tipo sequencial
STX	Sulfametoxazol/Trimetoprima
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris EDTA
TET	Tetraciclina
Tn	Transposon (s)
TSA	<i>Trypticase soy agar</i> – Ágar tripcaseína de soja
TSB	<i>Trypticase soy broth</i> – Caldo tripcaseína de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UI	Unidade internacional
UMinho	Universidade do Minho
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	Volts
V/cm	Volts por centímetro
v/v	Volume por volume
xg	Força gravitacional
ΔG_{iwi}	Energia livre global de interação/ Grau de hidrofobicidade
θ_A	Ângulos de contato em graus da água
θ_F	Ângulos de contato em graus da formamida
$\theta_{\alpha-B}$	Ângulos de contato em graus do α -bromonaftaleno

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura básica dos 11 tipos de SCC*mec* descritos até o momento. As setas vermelhas indicam o local de integração no cromossomo bacteriano. A localização das classes do complexo do gene *mec* (rosa), do gene *ccr* (azul), sequências de inserção e transposons (amarelo) e genes relacionados a resistência a metais pesados estão representados na imagem. Adaptado de Hiramatsu et al.,2013 ... **19**
- Figura 2:** Interações físico-químicas envolvidas com a adesão inicial acordo com a distância entre a célula bacteriana e a superfície de adesão. Fonte: BUSSCHER; WEERKAMP, 1987; KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; ARMENTANO et al. 2014. **21**
- Figura 3:** Dinâmica da formação de biofilme em *S. aureus*. Na parte inferior da figura estão indicados os principais componentes bacterianos envolvidos em cada fase do processo de formação de biofilme. FnBPs, Proteínas ligadoras de fibronectina; ClfA, ClfB, fator clumping A e B, respectivamente; Bbp, proteína de ligação ao ácido siálico ósseo; MSCRAMMs, componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas da matriz do hospedeiro; PIA, adesina intercelular polissacarídica; Bap, proteína associada ao biofilme; SasG, proteína G de superfície de *Staphylococcus aureus*. Adaptado de Otto, 2009..... **22**
- Figura 4:** Síntese da adesina intercelular polissacarídica (PIA). (A) A imagem evidencia o processo de síntese (1), alongamento e exportação (2) e desacetilação da cadeia polissacarídica (3). (B) Estrutura do locus *ica* em espécies do gênero *Staphylococcus*. Os reguladores de virulência SigB, SarA e LuxS têm ação importante sobre a expressão desse locus. Sombras verdes representam cargas negativas enquanto as azuis cargas positivas. C, grupo carboxila; N, grupo amina. Adaptado de Otto, 2009..... **23**
- Figura 5.** Estrutura e função do locus *agr*. Adaptado de Cegelski, 2008. **26**
- Figura 6:** Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície teste. γ_s tensão interfacial do sólido; γ_{LV} , tensão interfacial do líquido em equilíbrio com o vapor; γ_{SL} , tensão interfacial superfície/líquido **41**
- Figura 7:** Número de células aderidas a uma superfície de poliestireno após 2 horas de adesão, expressas como Log UFC/ml para 15 amostras clínicas de MRSA (A) e de acordo com o tipo de SCC*mec* (B). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. *** $P < 0,001$, usando Kruskal-Wallis, Teste de comparação múltipla de Dunn. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle. **48**

Figura 8: Componentes da tensão interfacial e hidrofobicidade da superfície celular de amostras clínicas de MRSA apresentadas de acordo com o tipo de SCCmec. γ^{LW} , tensão interfacial das forças de interações apolares de Lifshitz-van der Waals; γ^+ , tensão interfacial do componente aceptor de elétrons; γ^- , tensão interfacial do componente doador de elétrons; ΔG_{iwi} , grau de hidrofobicidade. 49

Figura 9: Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO_{570nm}) para 15 amostras clínicas de MRSA (A) e de acordo com o tipo de SCCmec (B). Concentração celular do biofilme expresso como Log UFC/ml para 15 amostras clínicas de MRSA (A) e de acordo com o tipo de SCCmec (B). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. A linha pontilhada na Fig. 3A representa o *cutoff* calculado de acordo com os critérios estabelecidos por Stepanovic et al (2007) *** $P < 0,001$, usando Kruskal-Wallis, Teste de comparação múltipla de Dunn. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle. 50

Figura 10: Frequência de resistência antimicrobiana entre amostras clínicas de MRSA positivas (IS256 POS) e negativas (IS256) para a sequência de inserção IS256. GEN, Gentamicina; CIP, Ciprofloxacino; ERI, Eritromicina; CLI, Clindamicina; TET, Tetraciclina; RIF, Rifampicina; STX, Sulfametoxazol/Trimetoprima. 53

Figura 11. Efeito do tratamento com proteinase K (1mg/mL em solução com 20 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl 10 mM) e metaperiodato de sódio (10 mM em solução com 50 mM tampão acetato de sódio [pH 4,5]) sobre o biofilme de amostras clínicas de MRSA SCCmecIII fortemente produtoras de biofilme. Os poços evidenciam o efeito desses componentes sobre os biofilmes pré-formados sobre placas de poliestireno. Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. *** $P < 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$ usando Análise de Variância simples (One way ANOVA) /Teste de comparação múltipla de Bonferroni ou Kruskal-Wallis/Teste de comparação múltipla de Dunn quando apropriado. 54

Figura 12. Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de 15 amostras clínicas de MRSA baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (parâmetro de tolerância de 1,25%, otimização 0,5%, similaridade $\geq 80\%$). 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização epidemiológica das amostras utilizadas no estudo quanto ao tipo de <i>SCCmec</i> , origem, sítio de infecção, unidade de internação e evolução clínica do paciente infectado	30
Tabela 2: Linhagens controle utilizadas em cada experimento.....	31
Tabela 3: Sequências dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR para identificação dos tipos de <i>SCCmec</i> e variantes.....	34
Tabela 4: Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para identificação dos alelos <i>agr</i>	35
Tabela 5: Sequência dos <i>primers</i> , condições de amplificação e tamanho do produto amplificado nas reações de PCR para identificação dos genes associados a formação de biofilme em <i>S. aureus</i>	36
Tabela 6: Critério para classificação da produção de biofilme	40
Tabela 7: Componentes da tensão interfacial dos líquidos a 25°C utilizados no ensaio	42
Tabela 8: Relação entre o perfil de resistência aos antimicrobianos, o tipo de <i>SCCmec</i> e o sítio de isolamento das 15 amostras clínicas de MRSA usadas no estudo.....	46
Tabela 9: Ângulos de contato (em graus) da água (θ_A), formamida (θ_F), e α -bromonaftaleno ($\theta_{\alpha-B}$), componentes de tensão interfacial e grau de hidrofobicidade (em mJ/m^2) da superfície celular de amostras clínicas de MRSA, diferenciadas individualmente e de acordo com o tipo de <i>SCCmec</i>	47
Tabela 10: Associação entre a produção de biofilme e a multirresistência em amostras clínicas de MRSA.....	51
Tabela 11: Classificação das cepas clínicas de MRSA usadas no estudo quanto as características genotípicas relacionadas a virulência e produção de biofilme.....	52

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um dos principais patógenos humanos em todo o mundo e sua epidemiologia tem sido foco de numerosos estudos de vigilância unicêntricos e multicêntricos ao longo dos últimos anos. Neste estudo utilizamos abordagens fenotípicas e genotípicas para determinar os fatores que influenciam a adesão inicial e produção de biofilme em cepas clínicas de MRSA carreando os tipos de cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*) mais frequentes nos hospitais brasileiros, e sua relação com resistência, genes de virulência e perfil clonal. As cepas de MRSA utilizadas neste estudo foram selecionadas a partir de uma coleção de amostras clínicas recuperadas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, isoladas de infecções em diversos sítios anatômicos. Foram selecionadas para o estudo quinze cepas carreando diferentes cassetes cromossômicos, cinco SCC*mec* II, cinco SCC*mec* III e cinco SCC*mec* IV, recuperadas predominantemente de sangue (67%), sítio cirúrgico (27%) e pneumonia (6,0%). O tipo de SCC*mec*, o grupo *agr* e a presença de genes de virulência (*bbp*, *clfA*, *icaA*, *icaD*, *fnbB*, *bap*, *sasC* e *IS256*) foram avaliados por PCR. A relação genética entre as amostras e a possível associação com a capacidade de formação de biofilme foram investigadas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A adesão inicial e a capacidade de formação de biofilme foram examinadas por ensaios quantitativos. Adicionalmente, a associação entre a hidrofobicidade e a capacidade da célula de MRSA aderir a uma superfície de poliestireno não modificada, foi avaliada através da medida dos ângulos de contato. Houve associação entre o grau de hidrofobicidade e a capacidade de adesão. Cepas clínicas de MRSA carreando SCC*mec* III e IV foram menos hidrofílicas, apresentaram valores mais altos de tensão interfacial do componente acceptor de elétrons e aderiram melhor do que as cepas SCC*mec*II. As análises da produção de biofilme mostraram que cepas carreando SCC*mec* III foram caracterizadas como fortemente produtoras de biofilme, com a média da biomassa do biofilme de $0,53 \pm 0,12$ em comparação com $0,04 \pm 0,04$ daquelas não-produtoras/fraco produtoras (SCC*mec* II e SCC*mec* IV). A tipagem molecular por PFGE evidenciou cinco pulsotipos (A-E) com uma grande diversidade clonal observada pelo número de subtipos em cada pulsotipo. Entretanto, a produção de biofilme esteve relacionada a disseminação de um clone específico (Clone C). Os genes *agrI*, *fnbB* e *IS256* em cepas clínicas de MRSA carreando SCC*mec* III, foram considerados marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme por uma via independente de *ica*. Nosso estudo contribui para a compreensão da produção de biofilme como um fator de virulência, potencialmente envolvido na severidade e persistência de infecções causadas por *S. aureus* pertencentes a este genótipo.

Palavras-chave: MRSA, SCC*mec*, biofilme, hidrofobicidade, PFGE

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major human pathogens worldwide and its epidemiology has been the focus of numerous single and multicenter surveillance studies over the past years. In this study, a phenotypic and genotypic approach were used to determine the factors that influence adherence and biofilm production of the most common MRSA SCCmec types, and its relationship with antimicrobial resistance, virulence genes and the genetic background of *S. aureus* isolates. The strains used in this study were selected from a collection of clinical MRSA strains recovered from patients hospitalized in the Teaching Hospital of the Federal University of Uberlandia, isolated from infections at various anatomical sites and evaluated for SCCmec type. Fifteen strains carrying different chromosomal cassettes were selected, five SCCmec II, five SCCmec III and five SCCmec IV, recovered predominantly from blood (67%), surgical site infections (27%) and pneumonia (6.0%). The SCCmec type, agr group and the presence of the virulence genes (*bbp*, *clfA*, *icaA*, *icaD*, *fnbB*, *bap*, *sasC* and *IS256*) were assessed by PCR. The genetic relationship between the isolates and a possible association with the ability to form biofilm were investigated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The initial adhesion and biofilm formation were examined by quantitative assays. To evaluate the association between the hydrophobicity and the ability of MRSA cell to adhere to an unmodified polystyrene surface, the surface tension and hydrophobicity of the strains were measured by contact angle technique. There were association among the values of the electron acceptor parameter, the degree of hydrophobicity and adhesion ability. SCCmec III and IV strains were less hydrophilic, showed higher values of the electron acceptor parameter and adhered better than SCCmec II strains. The analysis of biofilm production showed that SCCmec III strains were characterized as strong biofilm producers; with the average biomass of biofilm from 0.53 ± 0.12 compared with 0.04 ± 0.04 those non-producers/weak producers (SCCmec II e IV). The analysis of this study showed five major pulsotypes according to the PFGE (A-E) with a large genomic diversity observed by the number of subtypes in each pulsotype. However, biofilm production was related to the dissemination of one specific PFGE clone (Clone C). The presence of the genes *agrI*, *fnbB* and *IS256* in clinical MRSA SCCmec III strains, were considered as genetic risk markers for strong biofilm-formation by an *ica*-independent biofilm pathway. This study contributes for the understanding of biofilm production as a virulence factor potentially involved in the persistence and severity of infections caused by *Staphylococcus aureus* belonging to this genotype.

Keywords: MRSA, SCCmec, biofilm, hydrophobicity, PFGE

1 INTRODUÇÃO

A epidemiologia de *Staphylococcus aureus* é dinâmica, tem sido foco de numerosos estudos de vigilância unicêntricos e multicêntricos, e têm mudado significativamente nos últimos anos (CHAMBERS; DELEO, 2009). Esse micro-organismo é considerado o patógeno gram-positivo clinicamente mais importante nos hospitais, responsável por infecções superficiais e invasivas destacando-se aquelas de corrente sanguínea, ferida cirúrgica, pneumonia, endocardite e osteomielite. A maior frequência dessas infecções está associada ao uso de dispositivos médicos invasivos como cateter venoso central, ventilação mecânica, sonda vesical, válvulas artificiais, marcapasso e implantes ortopédicos (LOWY, 1998; AL-RAWAJFAH; STETZER; BEAUCHAMP, 2009; JORGE; CHUEIRE; ROSSIT, 2010; MALACARNE et al., 2010; ROSENTHAL et al., 2010, 2012; DAMASCO et al., 2014).

O tratamento das infecções causadas por esse micro-organismo é frequentemente complicado pela elevada prevalência de cepas multirresistentes, selecionadas pelo uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos, associado à transferência vertical e horizontal de genes de resistência (CHAMBERS; DELEO, 2009; STEFANI; GOGLIO, 2010).

Nas últimas décadas o *Staphylococcus aureus* com fenótipo de resistência à meticilina (MRSA, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) tornou-se um problema clínico e epidemiológico em todo o mundo, representando um desafio às práticas de prevenção e controle de infecções nos hospitais da maioria dos países (CHAMBERS; DELEO, 2009; STEFANI; GOGLIO, 2010; ROSENTHAL et al., 2012). No Brasil, esse fenótipo ocorre numa frequência de 30% a 60%, particularmente em hospitais de assistência terciária e de ensino (CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010; ROSENTHAL et al., 2010; ROSSI, 2011).

O MRSA produz uma proteína ligadora de penicilina (PBP, *Penicillin Binding Protein*) com baixa afinidade aos beta-lactâmicos, chamada PBP2a ou PBP2' (HARTMAN; TOMASZ, 1984; REYNOLDS; BROWN, 1985; UTSUI; YOKOTA, 1985). Essa proteína é codificada pelo gene cromossômico *mecA* (MATSUHASHI et al., 1986; SONG et al., 1987), carregado por um elemento genético móvel denominado de cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*, *Staphylococcal cassette chromosome mec*) (ITO et al., 1999; KATAYAMA et al., 2000). O SCC*mec* é uma ilha genômica e desde o descobrimento do primeiro elemento genético, vários outros foram identificados por meio de sequenciamento de nucleotídeos. Até o momento, onze

Os SCCmec dos tipos I, II e III carregam múltiplos determinantes de resistência e estão presentes predominantemente em amostras hospitalares de MRSA (HA-MRSA, *Healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), enquanto os tipos IV e V são encontrados em amostras de origem comunitária (CA-MRSA, *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e, geralmente, codificam resistência apenas aos beta-lactâmicos (CHAMBERS; DELEO, 2009; HIRAMATSU et al., 2013; OTTO, 2013a; SOWASH; UHLEMANN, 2014). Entretanto, recentemente, amostras de MRSA SCCmec IV, muitas vezes multirresistentes, têm surgido nos hospitais, e essa mudança na sua epidemiologia passa a ter impacto sobre as escolhas terapêuticas em infecções relacionadas a essas cepas e seu controle (SEYBOLD et al., 2006; NAVES, 2011).

Embora a resistência tenha papel importante no prognóstico das infecções e na probabilidade de falha terapêutica, a virulência do MRSA é o resultado de uma multiplicidade de fatores que agem simultaneamente para evadir das defesas do hospedeiro. A capacidade patogênica desse micro-organismo é produto do efeito combinado da produção de fatores de virulência, tais como enzimas e toxinas, capacidade de invasão e multiplicação intracelular, disseminação nos tecidos e órgãos e, particularmente, sua habilidade de produzir biofilme (GORDON; LOWY, 2008; GARZONI; KELLEY, 2009; SCHLIEVERT et al., 2010; GARZONI; KELLEY, 2011; EDWARDS; MASSEY, 2011; HEILMANN, 2011; LAABEI et al., 2014).

Biofilmes são comunidades bacterianas nas quais as células se aderem umas às outras e a uma superfície viva ou inerte. Estas células são envolvidas em uma matriz de polímero extracelular composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (AZEVEDO; CERCA, 2012). Estima-se que mais de 80% das infecções bacterianas crônicas estejam associadas à produção de biofilme (DAVIES, 2003).

A formação do biofilme tem como primeira etapa interações físico-químicas que permitem a adesão das células diretamente à superfície (Figura 2). Essas interações são classificadas como de longo alcance e curto alcance. As forças de interação inespecíficas de longo alcance que atuam sobre a adesão bacteriana inicial incluem as forças de Lifshitz-van der Waals, forças eletrostáticas de dupla camada elétrica, interações ácido-base e movimentos brownianos. Interações específicas de curto alcance operam em regiões altamente localizadas das superfícies de interação e incluem pontes de hidrogênio, interações iônicas e dipolos. Bactérias

são transportadas à superfície por interações de longo alcance e quando em contato com ela (distâncias $> 1,5$ nm), as interações de curto alcance se tornam mais importantes (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987; KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; ARMENTANO et al. 2014). A hidrofobicidade da superfície de adesão e da célula bacteriana desempenha papel importante na remoção do filme de água entre as superfícies de contato permitindo que as interações de curto alcance ocorram (SOUSA, 2009). De fato, a hidrofobicidade é uma das propriedades mais importantes envolvidas no fenômeno de adesão e pode ser definida como atração entre moléculas apolares ou fracamente polares quando imersas em um meio aquoso (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987; VAN OSS; GIESE, 1995; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; ABDALLAH et al., 2014). Células bacterianas desenvolveram diversas maneiras para usar o efeito hidrofóbico com o objetivo de aderir a um substrato. Um micro-organismo pode aderir a uma superfície via efeito hidrofóbico se os sítios de ligação ao substrato possuem grandes densidades de áreas apolares (DOYLE, 2000). Em espécies de *Staphylococcus*, as áreas hidrofóbicas são formadas por proteínas ligadas covalentemente a parede celular (HOGT; DANKERT; FEIJENMEYER, 1983; MEYER; GATERMANN, 1994; FOSTER et al., 2014).

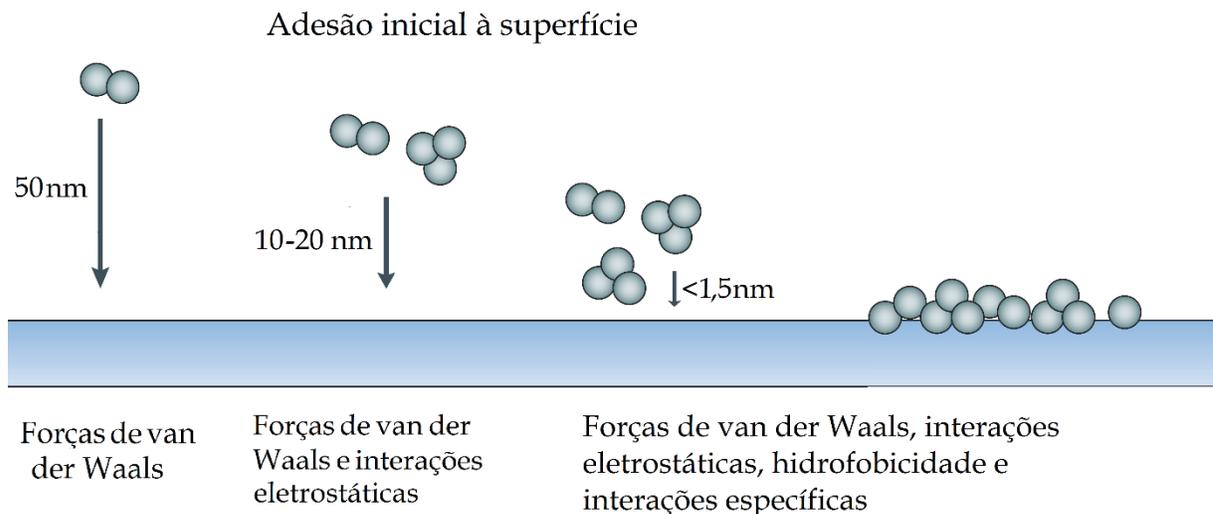


Figura 2: Interações físico-químicas envolvidas com a adesão inicial acordo com a distância entre a célula bacteriana e a superfície de adesão. Fonte: BUSSCHER; WEERKAMP, 1987; KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; ARMENTANO et al. 2014.

Embora essas interações não específicas iniciais sejam importantes, a adesão estável à superfície depende de interações específicas entre as adesinas da parede celular dos microorganismos e macromoléculas do próprio ambiente. Esta adesão é quase sempre mediada por polímeros extracelulares. Apêndices celulares externos, como flagelos, fimbrias e pili, também desempenham papel significativo na adesão celular inicial, além de formarem pontes entre as células e a superfície (MARSHALL; STOUT; MITCHELL, 1971; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; FOSTER et al., 2014). O contato com a superfície e a instalação microbiana, é seguido pela fase de crescimento e divisão celular. Material extracelular é agregado fortalecendo as ligações entre as células e a superfície. Dentro de dias a meses, a adesão de outros microorganismos é facilitada, bem como a liberação de novos colonizadores capazes de formar novos biofilmes, que se desprendem do biofilme maduro iniciando novo ciclo (Figura 3) (OTTO, 2008; 2009; 2013b).

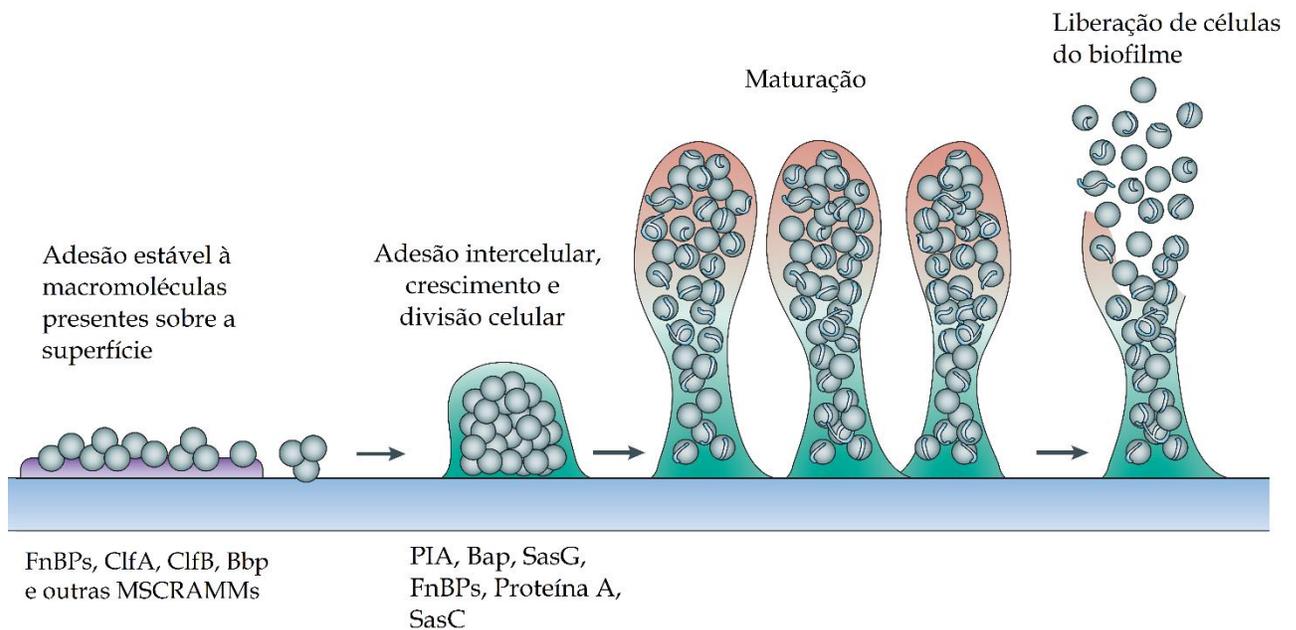


Figura 3: Dinâmica da formação de biofilme em *S. aureus*. Na parte inferior da figura estão indicados os principais componentes bacterianos envolvidos em cada fase do processo de formação de biofilme. FnBPs, Proteínas ligadoras de fibronectina; ClfA, ClfB, fator clumping A e B, respectivamente; Bbp, proteína de ligação ao ácido siálico ósseo; MSCRAMMs, componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas da matriz do hospedeiro; PIA, adesina intercelular polissacarídica; Bap, proteína associada ao biofilme; SasG, proteína G de superfície de *Staphylococcus aureus*. Adaptado de Otto, 2009.

Até recentemente, a formação de biofilme em espécies do gênero *Staphylococcus* era essencialmente atribuída à produção da adesina intercelular polissacarídica (PIA). A PIA envolve e conecta as células no biofilme e sua produção é o resultado da expressão dos genes que constituem o locus *ica* (*ica*, *Intercellular adhesion*), o qual compreende o operon *icaADBC* e o gene regulatório *icaR* (Figura 4b). O operon *icaADBC* codifica as proteínas IcaA e IcaD, N-acetilglicosamina transferases responsáveis pela síntese da cadeia de N-acetilglicosamina; IcaC parece estar envolvida no alongamento e consequente externalização do polissacarídeo crescente. A proteína IcaB, é responsável pela desacetilação parcial da PIA, produzindo resíduos carregados positivamente essenciais para a ligação do polissacarídeo à superfície e outras funções biológicas envolvidas na formação do biofilme (Figura 4) (O'GARA, 2007; OTTO, 2008; 2009; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013).

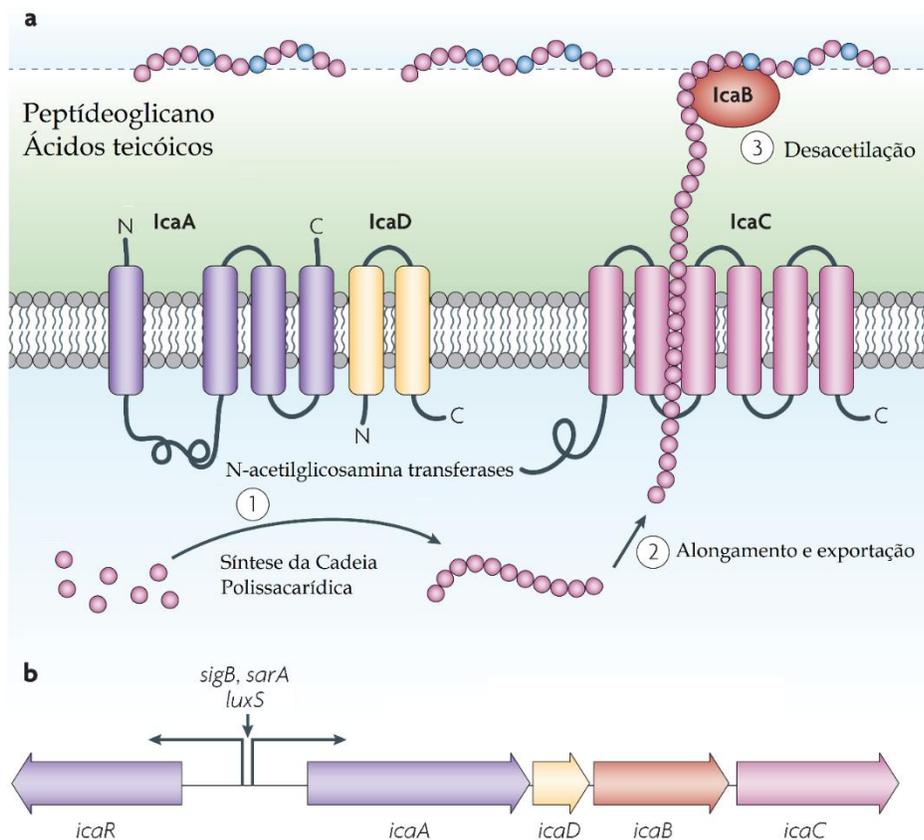


Figura 4: Síntese da adesina intercelular polissacarídica (PIA). (A) A imagem evidencia o processo de síntese (1), alongamento e exportação (2) e desacetilação da cadeia polissacarídica (3). (B) Estrutura do locus *ica* em espécies do gênero *Staphylococcus*. Os reguladores de virulência SigB, SarA e LuxS têm ação importante sobre a expressão desse locus. Sombras verdes representam cargas negativas enquanto as azuis cargas positivas. C, grupo carboxila; N, grupo amina. Adaptado de Otto, 2009.

Apesar da importância da PIA, hoje é reconhecido a participação de outras proteínas de superfície associadas com a formação de biofilme, o que tem se tornado cada vez mais relevante em amostras clínicas de MRSA. Neste contexto, vários estudos têm relatado a participação de proteínas da parede celular, tais como a proteína associada ao biofilme (Bap) (CUCARELLA et al. 2001); a proteína G de superfície de *Staphylococcus aureus* (SasG) (GEOGHEGAN et al., 2010); as proteínas ligadoras de fibronectina dos tipos A e B (O'NEILL et al., 2008; VERGARA-IRIGARAY et al., 2009; MCCOURT et al., 2014); a proteína A quando expressa em níveis elevados (MERINO et al., 2009) e a proteína C de superfície de *Staphylococcus aureus* (SCHROEDER et al., 2009).

O primeiro exemplo de uma proteína de superfície capaz de mediar a produção de biofilme foi a Bap, cuja função é mediar a fixação às superfícies abióticas e a adesão intercelular (CUCARELLA et al. 2001; LASA; PENADES, 2006). Até o momento, a presença da Bap tem sido descrita somente em amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina (CUCARELLA et al., 2004; DARWISH; ASFOUR, 2013). O segundo exemplo foi a proteína SasG, muito semelhante à proteína associada à acumulação (Aap, *accumulation associated protein*) de *S. epidermidis*. Essa proteína está envolvida na adesão às células epiteliais descamadas e sua hiperexpressão induz a formação de estruturas fibrilares de várias densidades sobre a parede celular, envolvidas no processo de formação de biofilme (GEOGHEGAN et al., 2010; GRUSZKA et al., 2012). Para algumas amostras de HA-MRSA, a fase de acúmulo do biofilme é mediada por proteínas ligadoras de fibronectina (FnBPs). As FnBPs são proteínas multifuncionais que promovem a ligação das células bacterianas ao fibrinogênio, elastina e fibronectina, o que é extremamente importante em pacientes submetidos a utilização de dispositivos médicos invasivos, rapidamente recobertos por essas proteínas (O'NEILL et al., 2008; O'NEILL et al., 2009; VERGARA-IRIGARAY et al., 2009; MCCOURT et al., 2014). A hiperexpressão da proteína A em amostras com sistema *agr quorum sensing* disfuncional também parece contribuir com o processo de formação de biofilme (MERINO et al., 2009). Mais recentemente, a proteína SasC foi descrita como um fator envolvido na agregação de células e na formação de biofilme em algumas cepas de *S. aureus* (SCHROEDER et al., 2009).

Fica claro a partir de evidências epidemiológicas que o biofilme de *S. aureus* desempenha um papel importante nas doenças infecciosas, com destaque para aquelas de corrente sanguínea e trato urinário, devido a sua habilidade de colonização e multiplicação em dispositivos médicos

invasivos (CHATTERJEE et al., 2014; DONELLI; VUOTTO, 2014). O tratamento de infecções associadas aos biofilmes é especialmente problemático, uma vez que utilizando uma variedade de mecanismos, bactérias em biofilmes podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes a um antibiótico quando comparadas às mesmas células planctônicas (MAH; O'TOOLE, 2001; GIRARD et al., 2010; HENGZHUANG et al., 2011). Além dessa dificuldade, a frequência crescente de resistência aos antibióticos entre as bactérias formadoras do biofilme torna o tratamento ainda mais difícil (KWON et al., 2008).

Embora a relação entre a formação de biofilme e diferentes fenótipos de *S. aureus* ainda não esteja devidamente caracterizada, sabe-se que esse processo é controlado por reguladores globais de virulência tais como SigB, LuxS, SarA (SarA, *staphylococcal accessory regulator*) e *agr quorum sensing* (*agr*, *accessory gene regulator*) (VALLE et al., 2003; CEGELSKI et al., 2008; OTTO, 2008; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013). O locus *agr* é um agrupamento de genes com atividade de *quorum sensing*, constituído por dois operons divergentes, controlados pelos promotores P2 e P3, que regulam a expressão de vários fatores de virulência (Figura 5). O operon cujo promotor é o P2 codifica quatro proteínas (AgrA, AgrB, AgrC e AgrD) enquanto o operon com promotor P3 codifica a molécula efetora do sistema *agr* (RNAIII). Os produtos dos genes *agrB* e *agrD*, respectivamente as proteínas AgrB e AgrD, formam o peptídeo auto-indutor (AIP). AgrC é uma proteína transmembrânica com receptor para AIP. Quando a densidade celular bacteriana crítica é atingida, altas concentrações do AIP se ligam ao receptor AgrC, resultando na sua ativação e subsequente fosforilação de AgrA. Fosforilada, AgrA induz os promotores P2 e P3, ativando a transcrição das proteínas já descritas e, particularmente, do RNAIII. O RNAIII atua como fator de transcrição de diversos genes de virulência e parece ter duas funções: a regulação negativa de genes que codificam as proteínas associadas ao processo de colonização e a regulação positiva de genes que codificam exoproteínas bacterianas associadas com o dano celular do hospedeiro. A regulação negativa e positiva dos genes envolvidos nos processos descritos promove o estabelecimento e desenvolvimento de infecções por MRSA (GEORGE; MUIR, 2007; CEGELSKI et al., 2008; ARYA; PRINCY, 2013; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013)

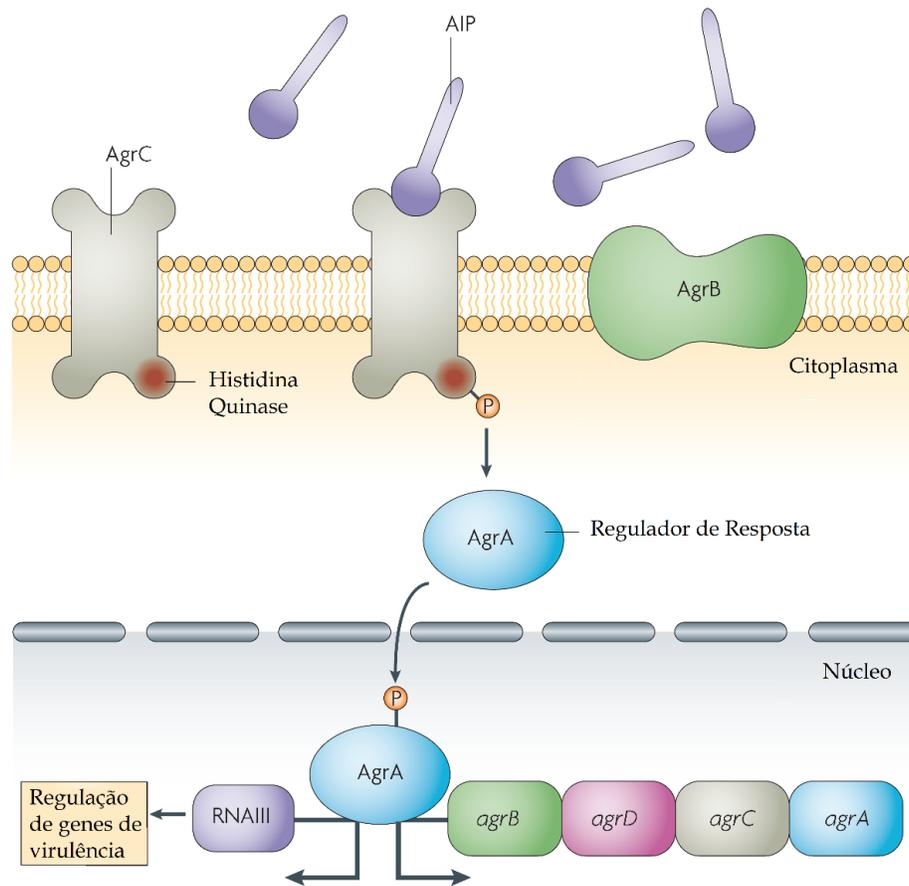


Figura 5: Estrutura e função do locus *agr*. Adaptado de Cegelski, 2008.

Amostras de *S. aureus* podem ser divididas em quatro grupos *agr* (*agrI*, II, III e IV) com base no polimorfismo dos genes *agrC* e *agrD* (SHOPSIN et al., 2003). Embora muitos trabalhos estabeleçam a relação entre o tipo de *agr* com a virulência e produção de biofilme, a maioria dos resultados foi obtido com cepas controle, em diferentes sistemas de crescimento, estático ou dinâmico (PRATTEN et al, 2001; SHENKMAN et al, 2002; YARWOOD et al, 2004), e apenas poucos trabalhos investigaram a associação entre o tipo de *agr*, sua funcionalidade e a capacidade de formação de biofilmes em amostras clínicas (VUONG et al., 2000; VUONG et al., 2003; CAFISO et al., 2007; FERREIRA et al., 2013; INDRAWATTANA et al., 2013; LIM et al., 2013).

Além dos genes responsáveis pela síntese de proteínas, o papel das sequências de inserção na virulência e produção de biofilme tem sido cada vez mais estudado. Trabalhos recentes têm demonstrado que o genoma do *S. aureus* contém diversas cópias de sequências de inserção, como

a *IS256*, que tem sido associada a produção de biofilme (KWON et al., 2008; LIM et al., 2013). A *IS256* é comum em cepas hospitalares de MRSA e foi inicialmente descrita como a região flanqueadora do transposon *Tn4001* responsável por mediar resistência aos aminoglicosídeos (LYON et al., 1987). Entretanto, esse elemento também ocorre em múltiplas cópias independentes no genoma bacteriano (LI et al., 2011; COSTA et al., 2013; SCHREIBER et al., 2013). Estudos prévios têm relatado a inserção desse elemento móvel em genes como *agrC* com consequente disfunção do sistema *agr quorum sensing* (KWON et al., 2008; MCEVOY et al., 2013). Cepas de *S. aureus* com sistema *agr* disfuncional parecem diminuir a produção de proteases extracelulares responsáveis pela digestão da matriz extracelular do biofilme, diminuir a expressão da δ -toxina (proteína que atua como surfactante e limita a capacidade de agregação em biofilmes), além de superexpressar proteína A e as FnBPs (VERGARA-IRIGARAY, 2009).

Os estudos sobre a epidemiologia de *S. aureus*, incluindo prevalência, virulência das cepas, resistência aos antimicrobianos e mecanismos de adaptação ambiental, como a formação de biofilmes, podem contribuir efetivamente com o controle desse micro-organismo. Por essa razão, vários sistemas de vigilância epidemiológica têm incorporado técnicas de tipagem molecular com objetivo de incluir informações adicionais úteis ao melhor entendimento da patogenicidade, propagação e trajetória evolucionária de micro-organismos com potencial de disseminação no ambiente hospitalar.

Métodos de tipagem molecular, como *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST), são fundamentais para determinar se os organismos epidemiologicamente relacionados são também geneticamente relacionados, além de auxiliar na detecção de surtos, na identificação da transmissão cruzada e fontes de infecção, como também no monitoramento e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde. O método de PFGE tem sido amplamente utilizado para classificação dos isolados em linhagens clonais e é descrito em diversos estudos de epidemiologia molecular, considerando o seu alto poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade (GOERING, 2010). O método de MLST envolve o sequenciamento de genes *housekeeping* e, a partir da designação de perfis alélicos, a definição dos tipos sequenciais e dos respectivos complexos clonais de patógenos de interesse clínico (ENRIGHT et al., 2000; FEIL et al., 2004).

A maioria das infecções hospitalares causadas por MRSA em todo o mundo são derivadas de uma entre cinco linhagens importantes, pertencentes aos complexos clonais (CC): 5, 8, 22, 30

e 45. Dados de vigilância coletados entre 1994 e 2000 identificaram cinco clones predominantes (Brasileiro, Ibérico, Húngaro, Pediátrico e Nova Iorque/Japão) pertencentes a esses complexos clonais. Esses clones representavam quase 70% dos isolados de MRSA em todo o mundo (RODRIGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010). No Brasil, desde o primeiro relato em 1994 (SADER et al., 1994), o clone brasileiro (ST239-SCC*mec* tipo III) vem sendo isolado em hospitais de todo país além de já estar disseminado em outros lugares do mundo (OLIVEIRA et al., 2001; RODRIGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010; ROSSI, 2011; DABUL; CAMARGO, 2013). Foram identificadas diversas variantes genéticas do clone brasileiro, que em conjunto são conhecidas como complexo clonal epidêmico brasileiro (BECC). A patogenicidade do BECC é resultante da sua multirresistência, capacidade de adesão e invasão de células epiteliais humanas, produção de toxinas, além da habilidade de formar biofilmes (AMARAL et al., 2005; SOUZA et al., 2009; RODRIGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010). Por essa razão, estudos utilizando estas técnicas moleculares para esclarecimento de questões relevantes, como a caracterização gênica dos clones epidêmicos de alto risco associados à formação de biofilme são extremamente relevantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Investigar a produção de biofilme por cepas clínicas de MRSA carreando os tipos de *SCCmec* mais comuns (*SCCmecII*, III e IV) e sua relação com a resistência antimicrobiana, os genes de virulência e o perfil clonal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a capacidade de adesão e produção de biofilme em cepas clínicas de MRSA carreando *SCCmec* dos tipos II, III e IV.
- Avaliar a relação entre multirresistência e produção de biofilme.
- Avaliar o grau de hidrofobicidade da parede celular e sua relação com a adesão inicial e a formação de biofilme em cepas clínicas de MRSA.
- Investigar a presença dos genes da adesina intercelular polissacarídica (*icaA* e *icaD*), fator clumping A (*clfA*), proteína de ligação ao ácido siálico ósseo (*bbp*), proteína ligadora de fibronectina do tipo B (*fnbB*), proteína associada ao biofilme (*bap*) e proteína C de superfície de *Staphylococcus aureus* (*sasC*).
- Determinar o tipo de *agr* (*agrI*, II, III e IV) de cada cepa.
- Determinar a presença de marcadores genéticos de risco para produção de biofilme em cepas fortemente produtoras.
- Investigar a expressão da adesina intercelular polissacarídica em amostras fortemente produtoras de biofilme através do teste de hemaglutinação e a constituição do biofilme através do tratamento com proteinase K e metaperiodato de sódio.
- Determinar a relação clonal entre as linhagens produtoras e não produtoras de biofilme por eletroforese em campo pulsado (PFGE)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CEPAS BACTERIANAS

As amostras utilizadas no estudo foram selecionadas a partir de uma coleção recuperada de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no período de setembro de 2006 a setembro de 2008, previamente tipadas quanto ao *SCCmec* e gentilmente cedidas pela Professora Dra. Karinne Spirandelli Carvalho Neves. A identificação e os testes de resistência aos antimicrobianos foram realizados pelo Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, utilizando o sistema automatizado VITEK 2® (bioMérieux) conforme descrito abaixo. As características epidemiológicas das amostras utilizadas no estudo são apresentadas na Tabela 1. As linhagens controle utilizadas no estudo estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1: Caracterização epidemiológica das amostras utilizadas no estudo quanto ao tipo de *SCCmec*, origem, sítio de infecção, unidade de internação e evolução clínica do paciente infectado

Amostras	Tipo de <i>SCCmec</i>	Origem	Sítio de Infecção	Unidade de Internação	Evolução
SAII68	II	IRAS ¹	Sangue	Clínica Médica	Óbito
SAII207	II	IRAS	Sangue	UTI ² Neonatal	Óbito
SAII376	II	IRAS	Sangue	Moléstia Infecciosa	Alta
SAII397	II	IRAS	Sangue	Clínica Médica	Óbito
SAII483	II	IRAS	Sangue	Clínica Cirúrgica	Óbito
SAIII06	III	IRAS	Sangue	Clínica Médica	Óbito
SAIII29	III	IRAS	Ferida Operatória	UTI Adulto	Óbito
SAIII32	III	IRAS	Sangue	Unidade de Queimados	Alta
SAIII108	III	IRAS	Ferida Operatória	Pronto Socorro	Alta
SAIII156	III	IRAS	Ferida Operatória	Clínica Cirúrgica	Alta
SAIV70	IV	IRAS	Pulmão	UTI Adulto	Alta
SAIV321	IV	IRAS	Sangue	Pediatria	Alta
SAIV333	IV	IRAS	Sangue	UTI Neonatal	Alta
SAIV495	IV	IRAS	Sangue	Moléstia Infecciosa	Alta
SAIV533	IV	IRAS	Ferida Operatória	Pronto Socorro	Alta

¹IRAS, Infecção relacionada à assistência à saúde; ²UTI, Unidade de Terapia Intensiva

Tabela 2: Linhagens controle utilizadas em cada experimento

Linhagem - controle	Experimento
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	PCR para os genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>agrII</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Biofilme, PCR para os genes <i>bbp</i> , <i>clfA</i> , <i>agrIII</i> , <i>sasC</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	PCR para o gene <i>fnbB</i>

3.1.1. Identificação das espécies

As amostras bacterianas utilizadas no estudo foram identificadas pelo Laboratório de Microbiologia do HC-UFU através do sistema automatizado VITEK[®]2 (bioMérieux). As culturas testes foram suspensas em solução salina 0,45% com objetivo de obter uma suspensão com turbidez compatível com a escala de 0,50 a 0,63 de McFarland utilizando turbidímetro. Em seguida, os cartões foram inseridos no aparelho e cada teste bioquímico foi preenchido, selado e incubado. Durante o período de incubação (7-10 horas) os cartões foram lidos a cada 15 min através de um sistema óptico de transmitância usando diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Os resultados foram analisados pelo software do aparelho através de algoritmos e reportados automaticamente.

As cepas bacterianas identificadas foram preservadas a -20°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de 15% de glicerol.

3.1.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de diluição em gel, através do sistema automatizado VITEK[®]2 (bioMérieux), no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. As culturas teste foram suspensas em solução salina 0,45% com objetivo de obter uma solução com turbidez compatível com a escala de 0,50 a 0,63 de McFarland e em seguida, diluídas conforme as recomendações do fabricante. Os cartões foram inseridos no aparelho e automaticamente preenchidos com as suspensões bacterianas. No cartão, os antimicrobianos são encontrados em duas a quatro concentrações diferentes. Cada poço com o antibiótico teste foi avaliado automaticamente a cada 15 minutos durante 18 horas de maneira a gerar uma curva de crescimento e, por comparação com um controle, a concentração inibitória mínima (CIM) de

cada antibiótico foi estimada. Esse cálculo foi realizado com um algoritmo específico para cada antimicrobiano.

Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: Benzilpenicilina, Oxacilina, Ciprofloxacina, Eritromicina, Clindamicina, Gentamicina, Vancomicina, Tetraciclina, Rifampicina, Sulfametoxazol/Trimetoprima.

3.2. TÉCNICAS MOLECULARES

3.2.1. Extração de DNA das cepas de *Staphylococcus aureus*

O DNA genômico das amostras bacterianas foi extraído utilizando o kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de MRSA foram cultivadas em ágar BHI a 37°C por 24 horas. Duas a três colônias bacterianas de cada amostra foram ressuspensas em 500µL de água ultrapura e centrifugadas por 10 minutos a 5000xg (7.500rpm). O pellet bacteriano foi ressuspendido em 180 µL da solução de lisozima (20 mg/mL de lisozima; 20mM Tris-HCl, pH8,0; 2mM EDTA; 1,2% Triton) e incubado por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, adicionou-se a cada tubo 20 µL de proteinase K e 200 µL do tampão AL. Os tubos foram homogeneizados e a mistura incubada a 56°C por 30 minutos e, em seguida, por mais 15 minutos a 95°C e então centrifugada brevemente para remoção de gotículas formadas na tampa. 200µL do tampão AL foram adicionados a cada tubo e a mistura foi novamente homogeneizada e incubada a 70°C por 10 minutos. A solução foi centrifugada brevemente, adicionou-se 200µL de etanol (96-100%) e homogeneizou-se por vortex por 15 segundos seguido de outra centrifugação breve.

A mistura foi aplicada à coluna Mini spin QIAamp e centrifugada a 6000xg (8.000rpm) por 1minuto. A coluna foi transferida para um tubo limpo e o conteúdo filtrado foi descartado. Adicionou-se à coluna 500µL de tampão AW1 e centrifugou-se a 6000xg (8.000 rpm) por 1minuto. A coluna foi novamente transferida para outro tubo descartando o filtrado. 500µL de tampão AW2 foi então adicionado seguido de centrifugação a velocidade máxima (20.000xg; 14.000 rpm) por 3minutos. O filtrado foi descartado e uma outra centrifugação foi realizada a velocidade máxima por 1 minuto com objetivo de se eliminar totalmente a contaminação com o tampão AW2.

Para a eluição do DNA a coluna foi transferida a outro tubo, adicionou-se 100µL de tampão AE (tampão de eluição) e incubou-se a temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, a coluna foi centrifugada a 6000xg (8.000rpm) por 1 minuto. O processo foi repetido, adicionando-se 100µL de tampão AE prolongando a incubação por 5 minutos seguindo-se outra centrifugação. O DNA extraído foi então conservado a -20°C até a utilização.

3.2.2 Multiplex PCR para detecção do gene *mecA* e identificação dos tipos de SCC*mec*

A presença do gene *mecA* e o tipo de SCC*mec* foram confirmados para todas as cepas utilizadas nesse estudo através de PCR multiplex conforme descrito por Kondo et al. (2007). A técnica consiste de duas PCR multiplex: M-PCR1, que amplifica genes dos cinco tipos de *ccr*; e a M-PCR2 que detecta as classes do gene *mec*. Na Tabela 3, estão descritas as sequências dos primers utilizados, o tamanho dos amplicons e a especificidade para cada tipo de SCC*mec*.

A reação de PCR foi preparada para um volume final de 50µL utilizando os seguintes reagentes: 10 ng de DNA bacteriano, tampão da Taq 1X, Mix dNTP a 0,2mM, RED Taq[®] DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) com MgCl₂ a 0,05U/µL, 0,5µM de cada *primer* e água ultrapura estéril para completar a reação. A amplificação foi realizada no termociclador *Eppendorf Mastercycler*, programado de acordo com as seguintes etapas: pré-desnaturação a 94°C/2min, seguido por 30 ciclos de desnaturação (94°C/2 min); anelamento (57°C/60s para M-PCR1 e 60°C/60s para M-PCR2), extensão (72°C/2min) e extensão final (72°C/2min).

A eletroforese foi realizada a 100V por cerca de 60 minutos em agarose 3% preparada em TBE 0,5X. O gel foi corado com SYBR[®] Safe (Invitrogen, Brasil) e então fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Tabela 3: Sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR para identificação dos tipos de SCC*mec* e variantes.

<i>Primer</i>	Sequências (5'-3')	Gene Alvo	Produto amplificado (pb)
M-PCR1			
<i>mA1</i>	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i> (<i>mA1-mA2</i>)	286
<i>mA2</i>	AACGTTGTAACCCACCCAAGA		
<i>α1</i>	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1-ccrB</i> (<i>α1-βc</i>)	695
<i>α2</i>	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2-ccrB</i> (<i>α2-βc</i>)	937
<i>α3</i>	AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3-ccrB</i> (<i>α3-βc</i>)	1,791
<i>βc</i>	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		
<i>α4.2</i>	GTATCAATGCACCAGAACTT	<i>ccrA4-ccrB4</i> (<i>α4.2-β4.2</i>)	1,287
<i>β4.2</i>	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT		
<i>γR</i>	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAATAT	<i>ccrC</i> (<i>γR-γF</i>)	518
<i>γF</i>	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT		
M-PCR2			
<i>mI6</i>	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecA-mecI</i> (<i>mA7-mI6</i>)	1,963
<i>IS7</i>	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	<i>mecA-IS1272</i> (<i>mA7-IS7</i>)	2,827
<i>IS2(iS-2)</i>	TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT	<i>mecA-IS431</i> (<i>mA7-IS2 [iS-2]</i>)	804
<i>mA7</i>	ATATACCAAACCCGACAACACTACA		

3.2.3 Multiplex PCR para detecção do grupo *agr*

A reação em cadeia da polimerase para detecção dos alelos *agr* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Shopsin et al. (2003) usando as sequências de primers descritas na Tabela 4. A reação foi preparada para um volume final de 25µL utilizando os seguintes reagentes: 10 ng de DNA bacteriano, tampão da Taq 1X, Mix dNTP a 0,2mM, RED Taq[®] DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) com MgCl₂ a 0,05U/µL, 0,25µM de cada primer e água ultrapura estéril para completar a reação. A amplificação foi realizada no termociclador *Eppendorf Mastercycler*, sob as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, 25 ciclos com desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 58,4°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 4 minutos. Com o objetivo de distinguir produtos amplificados de tamanho similar, duas reações duplex foram realizadas para cada isolado, a primeira usando os primers pan-*agr*, *agrI* e *agrII* e a segunda usando os primers pan-*agr*, *agrIII* e *agrIV*.

A eletroforese foi realizada a 100V por cerca de 60 minutos em agarose 1,5% preparada em TBE 0,5X. O gel foi corado com SYBR[®] Safe (Invitrogen, Brasil) e então fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Tabela 4: Sequências dos *primer* utilizados nas reações de PCR para identificação dos alelos *agr*

<i>Primer</i>	Sequências (5'-3')	Gene Alvo	Produto amplificado (pb)
<i>pan-agr</i>	ATGCACATGGTGCACATGC	-	-
<i>agr I</i>	GTCACAAGTACTATAAGCTGCCGAT	<i>agrD</i> (alelo <i>agrI</i>)	440
<i>agr II</i>	GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	<i>agrC</i> (alelo <i>agrII</i>)	572
<i>agr III</i>	CTGTTGAAAAGTCAACTAAAAGCTC	<i>agrD</i> (alelo <i>agrIII</i>)	406
<i>agr IV</i>	CGATAATGCCGTAATACCCG	<i>agrC</i> (alelo <i>agrIV</i>)	588

3.2.4 Detecção dos genes associados a formação de biofilme

A detecção dos genes associados com a produção de biofilme em *S. aureus* foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Martin-Lopez et al. (2004) para o gene *icaA*; Arciola, Baldassarri e Montanaro (2001) para o gene *icaD*; Cucarella et al. (2001) para o gene da proteína associada ao biofilme (*bap*); Tristan et al. (2013) para os genes do fator clumping A (*clfA*), proteína de ligação ao ácido siálico ósseo (*bbp*) e proteína ligadora de fibronectina do tipo B (*fnbB*); Gu et al. (2005) para a sequência de inserção *IS256* e Schroeder et al. (2009) para o gene da proteína C de superfície de *Staphylococcus aureus*.

Em todos os casos, a reação foi preparada para um volume final de 25µL utilizando os seguintes reagentes: 10 ng de DNA bacteriano, tampão da Taq 1X, Mix dNTP a 0,2mM, RED Taq[®] DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) com MgCl₂ a 0,05U/µL, 0,5µM de cada *primer* e água ultrapura estéril para completar a reação. As condições de amplificação, a sequência dos *primers* utilizados e o tamanho do produto amplificado de cada gene estão descritas na Tabela 5.

A eletroforese foi realizada a 100V por cerca de 60 minutos em agarose 1,5% preparada em TBE 0,5X. O gel foi corado com SYBR[®] Safe (Invitrogen, Brasil) e então fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Tabela 5: Sequência dos *primers*, condições de amplificação e tamanho do produto amplificado nas reações de PCR para identificação dos genes associados a formação de biofilme em *S. aureus*

Gene alvo	Primer	Sequências (5'-3')	Condições da reação	Produto Amplificado (pb)
<i>icaA</i> - Adesina intercelular polissacarídica	icaA-S	AAACTTGGTGCGGTTACAGG	94°C - 5 min; 30 ciclos: 94°C - 30s, 57°C - 30s, 72°C - 45s; 72°C - 10 min	752
	icaA-E	TCTGGGCTTGACCATGTTG		
<i>icaD</i> - Adesina intercelular polissacarídica	icaD1	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	94°C - 5 min; 30 ciclos: 94°C - 30s, 55°C - 30s, 72°C - 30s; Pausa na reação/ Adição de Taq DNA polimerase; 20 ciclos 94°C - 30s, 55°C - 30s, 72°C - 30s; 72°C - 2 min	198
	icaD2	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		
<i>bap</i> - Proteína associada ao biofilme	bap F	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG	94°C - 5 min; 30 ciclos: 94°C - 30s, 57°C - 30s, 72°C - 75s; 72°C - 5 min	971
	bap R	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC		
<i>clfA</i> - Fator clumping A	CLFA-1	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	94°C - 5 min; 25 ciclos: 94°C - 60s, 56°C - 60s, 72°C - 60s; 72°C - 10 min	292
	CLFA-2	CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG		
<i>bbp</i> - Proteína de ligação ao ácido siálico ósseo	BBP-1	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	94°C - 5 min; 25 ciclos: 94°C - 60s, 52°C - 60s, 72°C - 60s; 72°C - 10 min	575
	BBP-2	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT		
<i>fnbB</i> - Proteína ligadora de fibronectina do tipo B	FNBB-1	GTAACAGCTAATGGTTCGAATTGATACT	94°C - 5 min; 25 ciclos: 94°C - 60s, 56°C - 60s, 72°C - 60s; 72°C - 10 min	524
	FNBB-2	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC		
<i>IS256</i> - Sequência de inserção 256	IS256F	AGTCCTTTTACGGTACAATG	94°C - 4 min; 25 ciclos: 94°C - 30s, 55°C - 30s, 72°C - 60s; 72°C - 4 min	762
	IS256R	TGTGCGCATCAGAAATAACG		
<i>sasC</i> - Proteína de superfície SasC	CHsasC1for	GCAACGAATCAAGCATTGG	94°C - 5 min; 30 ciclos: 94°C - 60s, 54°C - 30s, 72°C - 60s; 72°C - 10 min	489
	CHsasC1rev	TGACAGCACTTCGTTAGG		

3.2.5 Tipagem molecular pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

O protocolo experimental utilizado nesse estudo para tipagem molecular pela técnica de PFGE foi formulado a partir das metodologias propostas por Goering (2010) e McDougal et al. (2003).

Uma única colônia de cada amostra teste de *S. aureus* foi inoculada em 3 mL de caldo TSB e incubada *overnight* (16-18 horas) a 37° C, sob agitação vigorosa a 200 rpm. Após o período de incubação, a medida da densidade óptica da suspensão bacteriana resultante foi ajustada para 0,9 a 1,10 (OD_{640nm}). Uma alíquota de 200 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo *ependorf*, centrifugada a 12.000xg, 4°C por 2 minutos e o sobrenadante completamente descartado.

O pellet foi gentilmente ressuspendido em 200 µL do tampão de lise - EC (6mM Tris HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, Brij 58 0,5%, deoxicolato de sódio 0,2%, lauril sarcosinato de sódio 0,5%). Imediatamente, 200 µL de agarose *low melting point* (Ludwig Biotecnologia, Brasil) 2% (p/v) preparada em tampão EC e previamente equilibrada a 55°C foram adicionadas a suspensão celular, seguido por 30 µL de lisostafina (solução estoque a 1 mg/mL em 20 mM de tampão acetato de sódio [pH 4,5] [L-7386, Sigma Aldrich, Estados Unidos). A solução foi rapidamente homogeneizada, dispensada em moldes e mantida à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos até a solidificação.

Os blocos de agarose foram removidos e transferidos para tubos contendo 10 mL de tampão EC e incubados a 37° C, sob leve agitação (50 rpm), durante 1 hora. Após a incubação, o tampão EC foi substituído por tampão Tris-EDTA (TE, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8,0]) e os tubos novamente incubados a 55°C, sob agitação a 50 rpm por 1 hora. O TE foi então descartado, substituído por uma nova solução do tampão e os tubos incubados *overnight*, a 37° C, sob agitação a 50 rpm. A etapa de lavagem se repetiu por pelo menos mais 2 vezes, a 37° C, sob agitação a 50 rpm durante 1 hora cada. Os blocos foram então estocados a 4° C, em tampão TE, até a digestão enzimática.

Para digestão do DNA, uma pequena parte do bloco de agarose (~2 mm) foi incubada em 40 µL da solução tampão da enzima *SmaI* 1X (Ludwig Biotecnologia, Brasil) e mantida a 25° C por 2 horas. Essa solução foi desprezada, e uma nova solução acrescida de 30 U da enzima de restrição *SmaI* foi adicionada em cada tubo. A reação foi incubada a 25° C por 10 horas.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% (Agarose Campo Pulsado, Agargen, Brasil) preparado em TBE 0,5X. Os blocos de agarose já digeridos foram dispostos no pente e o peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs) carregado diretamente nos poços somente após a solidificação do gel. A corrida eletroforética foi realizada no aparelho CHEF DR[®] III (BioRad, Estados Unidos), utilizando-se a solução tamponante TBE 0,5X, nas seguintes condições: pulso inicial de 5 segundos e final de 40 segundos, ângulo de 120°, 200 V (6V/cm), a temperatura de 12° C durante 21 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio 1µg/mL sob leve agitação por 45 minutos, e descorado em água destilada pelo mesmo período de tempo.

O perfil eletroforético de macrorrestrrição foi analisado utilizando o software BioNumerics versão 5.01 (Applied Maths, Bélgica). A similaridade genética dos isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice e o dendrograma foi construído segundo o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*). Isolados com similaridade genética superior a 80% foram considerados do mesmo tipo clonal, os parâmetros de tolerância e otimização foram de 1,25 e 0,5%, respectivamente.

3.3 ENSAIO DE ADESÃO INICIAL E FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os ensaios de adesão inicial e formação de biofilme foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Cassat et al. (2004), com modificações conforme descrito abaixo. Todos os experimentos foram realizados em pelo menos três ensaios independentes. Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923, produtora de biofilme. O meio de cultura puro, sem inóculo bacteriano, foi utilizado como controle negativo nos ensaios.

3.3.1 Preparação do inóculo bacteriano

Uma colônia bacteriana de cada amostra teste de *S. aureus* foi inoculada em 20mL de caldo TSB (*Tripticase Soy Broth*) e incubada a 37°C, durante 18 horas, sob agitação a 120 rpm. A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* (~10⁹ células/mL) foi lavada duas vezes em solução salina estéril (20 mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos) e utilizada nos ensaios de adesão e formação de biofilme.

3.3.2 Ensaio de adesão à superfície inerte

A suspensão celular de cada isolado contendo aproximadamente 10^9 células/mL foi diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL em TSB. 200 μ L dessa suspensão de células foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, 3 poços para cada isolado testado. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Após o período de adesão, os poços foram raspados por 90 segundos para remoção das células aderidas (*scrapping*), diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em ágar TSA para enumeração das células.

3.3.3 Ensaio de formação de biofilme

A suspensão celular de cada isolado contendo aproximadamente 10^9 células/mL foi diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL em TSB. 200 μ L dessa suspensão de células foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços. Para os ensaios de quantificação de biomassa por cristal violeta, cada bactéria teste foi inoculada em 8 poços da placa, enquanto para os ensaios de enumeração de células do biofilme, 3 poços foram inoculados com cada isolado. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm.

Para quantificação da biomassa, os biofilmes foram lavados três vezes com solução salina estéril e, em seguida, os poços preenchidos com metanol por 15 minutos para fixação do biofilme. Após esse período, o metanol foi descartado e as placas secas em posição invertida a temperatura ambiente. Em seguida, 200 μ L de uma solução de cristal violeta 1% foram adicionados em cada poço por 5 minutos. Os poços foram então lavados vigorosamente com água destilada estéril e secos a temperatura ambiente. 200 μ L de ácido acético 33% foram adicionados a cada poço para solubilizar o corante. As microplacas foram incubadas por 10 minutos, 100 μ L da solução de cristal violeta solubilizado foram transferidos para novas placas e a absorbância avaliada em leitor de placas a 570 nm com ácido acético 33% como branco.

Para quantificação das células do biofilme, os poços foram raspados por 90 segundo para remoção das células aderidas (*scrapping*). Diluições seriadas realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em ágar TSA para enumeração das células.

3.3.3.1 Classificação do biofilme

A classificação das amostras testadas nas categorias de não produtor/fraco produtor, moderado produtor e forte produtor de biofilme, foi realizada de acordo com os critérios descritos por Stepanovic et al. (2007) (Tabela 6).

Tabela 6: Critério para classificação da produção de biofilme

Valor médio da DO	Produção de biofilme
$DO_I^1 \leq DO_C^2$ ou $DO_C < DO_I \leq 2x DO_C$	Não produtor/Fraco produtor
$2x DO_C < DO_I \leq 4x DO_C$	Moderado produtor
$DO_I > 4x DO_C$	Forte produtor

Valor de *cutoff* da densidade ótica (DO): média da DO do controle negativo + 3x desvio padrão; ¹ DO_I do isolado; ² DO_C do controle negativo.

3.4 AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA TENSÃO INTERFACIAL E HIDROFOBICIDADE DA CÉLULA BACTERIANA ATRAVÉS DA MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO

Os parâmetros de hidrofobicidade da superfície da célula bacteriana foram avaliados através da técnica de medida do ângulo de contato de gota séssil, utilizando um goniômetro (OCA 15 Plus; Dataphysics, Alemanha) de acordo com o protocolo descrito por Sousa et al., (2009) com algumas modificações. Uma colônia bacteriana de cada amostra teste de *S. aureus* foi inoculada em 20mL de caldo TSB e incubada a 37°C, durante 18 horas, sob agitação a 120 rpm. A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* (~10⁹ células/mL) foi lavada duas vezes em solução salina estéril (20 mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos). O pellet bacteriano foi então ressuspendido em solução salina e depositado sobre um filtro de acetato de celulose com poros de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Pall-Life Sciences, Estados Unidos) por filtração a vácuo. Para uniformizar o conteúdo de umidade, os filtros foram mantidos em Placas de Petri contendo 1% de ágar (p/v) e 10% de glicerol (v/v) por pelo menos 3 horas. Para a realização das medidas foram utilizados dois líquidos polares (água e formamida) e um apolar (α-bromonaftaleno), dos quais são conhecidos todos os valores dos componentes de tensão interfacial. O ângulo de contato (θ) formado por uma gota do líquido sobre a superfície teste é

considerado o ângulo entre o plano tangente à gota e a superfície onde o líquido encontra-se depositado (Figura 6).

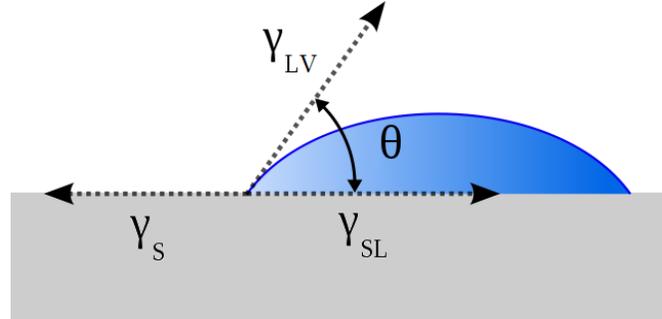


Figura 6: Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície teste. γ_s tensão interfacial do sólido; γ_{LV} , tensão interfacial do líquido em equilíbrio com o vapor; γ_{SL} , tensão interfacial superfície/líquido.

Foram realizadas a temperatura ambiente, para cada amostra bacteriana, ao menos 25 determinações do ângulo de contato para cada líquido de referência testado. A medida dos ângulos de contato permitiu o cálculo dos parâmetros da tensão interfacial e hidrofobicidade da célula bacteriana utilizando a abordagem matemática proposta por van Oss (VAN OSS; GIESE, 1995; VAN OSS, 1997; BERNARDES, 2008) e descrita resumidamente a seguir.

$$(1 + \cos\theta)\gamma_l^{TOT} = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+})$$

(Equação 1)

A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes (Equação 1) relaciona o ângulo de contato (θ) formado pelo líquido de referência sobre uma superfície sólida com os componentes da tensão interfacial do líquido (γ_l^{LW} , γ_l^+ , γ_l^- ; já conhecidos) e da superfície teste (no caso, a superfície bacteriana). Na equação 1, γ_l^{TOT} é a tensão interfacial total do líquido teste; γ_l^{LW} é a tensão interfacial das forças de interações apolares de Lifshitz-van der Waals; γ_l^+ é a tensão interfacial do componente aceitador de elétrons e γ_l^- é a tensão interfacial do componente doador de elétrons (γ^+ e γ^- são componentes das interações ácido-base de Lewis). Os subscritos s e l indicam superfície e líquido, respectivamente. Após a medição do ângulo de contato da superfície com três líquidos de polaridades diferentes, cujos parâmetros anteriormente mencionados são conhecidos, usando-se a equação 2 podem ser obtidos os valores das tensões superficiais da superfície testada (superfície bacteriana).

A energia livre global de interação (ΔG_{iwi}^{TOT}) entre moléculas da superfície (i) e a água (w) (grau absoluto de hidrofobicidade), é calculada pelo somatório das componentes apolar (ΔG_{iwi}^{LW} - interações de Lifshitz-van der Waals) e polar (ΔG_{iwi}^{AB} - interações ácido base de Lewis) da energia livre global de interação (Equação 2).

$$\Delta G_{iwi}^{TOT} = \Delta G_{iwi}^{LW} + \Delta G_{iwi}^{AB} \quad (\text{Equação 2})$$

A componente apolar é determinada pela equação 3 enquanto a componente polar é calculada pela equação 4.

$$\Delta G_{iwi}^{LW} = -2(\sqrt{\gamma_i^{LW} - \gamma_w^{LW}}) \quad (\text{Equação 3})$$

$$\Delta G_{iwi}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_i^-}\right) \quad (\text{Equação 4})$$

Os componentes da tensão interfacial dos líquidos utilizados no ensaio estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Componentes da tensão interfacial dos líquidos a 25°C utilizados no ensaio

Líquido	Componentes de tensão interfacial (mJ/m ²)			
	γ^{TOT}	γ^{LW}	γ^+	γ^-
α -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0	0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamida	58	39	2,28	39,6

γ^{TOT} , tensão interfacial total do líquido; γ^{LW} ; tensão interfacial das forças de interações apolares de Lifshitz-van der Waals; γ^+ , tensão interfacial do componente acceptor de elétrons; γ^- , tensão interfacial do componente doador de elétrons.

3.5 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ADESINA INTERCELULAR POLISSACARÍDICA E DA NATUREZA DA MATRIZ DO BIOFILME

3.5.1 Ensaio de Hemaglutinação

O ensaio de hemaglutinação foi realizado conforme protocolo descrito por Cerca et al. (2005), com algumas modificações. Os eritrócitos utilizados foram recuperados a partir de sangue humano coletado com EDTA. Para recuperação das células, 5 mL de sangue foram adicionados em 45 mL de solução salina e centrifugados duas vezes a 2500xg por 10 minutos para lavagem e remoção de componentes plasmáticos. 100 µL do pellet de células foram adicionados em 10 mL de solução salina, obtendo uma suspensão de eritrócitos a 1% para ser utilizada nos ensaios.

As amostras de *S. aureus* submetidas ao experimento foram cultivadas em 20 mL de caldo TSB a 37°C, durante 18 horas, sob agitação a 120 rpm. A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ($\sim 10^9$ células/mL) foi lavada duas vezes em solução salina estéril (20 mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos). Cinco diluições seriadas na razão 1:2 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) de cada suspensão bacteriana foram adicionadas em placas de 96 poços com fundo redondo. Então, 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% foram adicionados a cada poço e homogeneizados delicadamente com a pipeta. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas e a hemaglutinação avaliada macroscopicamente. Os resultados negativos para hemaglutinação foram também avaliados microscopicamente. Todos os ensaios foram feitos em duplicata em dois experimentos independentes.

3.5.2 Ensaio de estabilidade do biofilme frente ao tratamento com proteinase K e metaperiodato de sódio

O ensaio de estabilidade do biofilme foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Chaignon et al. (2007), com algumas modificações. Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços conforme descrito anteriormente. Após 24 horas de crescimento, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados duas vezes com solução salina estéril e, em seguida, preenchidos com 200 µL de uma solução de proteinase K (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) na concentração de 1 mg/mL em 20 mM de Tris (pH 7,5) e 100 mM de NaCl ou 200 µL de uma

solução de metaperiodato de sódio (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 10 mM preparado em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,5). As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C sem agitação. Após o tratamento, os biofilmes foram lavados com 200 µL de salina estéril, fixados com metanol por 15 minutos e então corados com cristal violeta 1%. A absorbância foi avaliada em leitor de placas a 570 nm com ácido acético 33% como branco. O ensaio foi realizado somente com as amostras fortemente produtoras de biofilme. Poços tratados apenas com tampão foram utilizados como controle. Pelo menos 8 poços foram avaliados para cada amostra e agente de tratamento, em dois ensaios independentes.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados usando o *GraphPad Prism*, versão 5.01. Os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (*One way ANOVA*) ou pelo teste de *Kruskal-Wallis*, utilizando como pós-testes os testes de comparação múltipla de *Holm-Sidak's*, *Bonferroni* ou *Dunn's*, quando apropriado. Todos os testes foram realizados com um nível de confiança de 95%, sendo os resultados considerados significantes quando $P < 0,05$.

3.7 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

As amostras utilizadas nesse estudo, foram recuperadas durante a vigência do projeto 218/06 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (ANEXO I).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS AMOSTRAS E PERFIL DE RESISTÊNCIA

As características epidemiológicas das amostras utilizadas no estudo são apresentadas na Tabela 1. As amostras foram recuperadas de sangue (66,7%), ferida operatória (26,7%) e pulmão (6,6%) de pacientes internados no HC-UFU no período de setembro de 2006 a setembro de 2008. Embora não tenha sido atribuída a mortalidade à infecção por MRSA neste estudo, 40% dos pacientes evoluíram para óbito, a maioria deles internados na unidade de clínica médica.

Os antibióticos testados pelo sistema automatizado Vitek[®]2 foram aqueles utilizados nos esquemas terapêuticos convencionais para casos de infecção por *S. aureus*. Baseado nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, quatro antibiotipos (R1-R4) foram identificados entre as amostras resistentes à metilina. Cinco cepas foram classificadas no antibiotipo R1 e seis no antibiotipo R2, ambos classificados como MRSA multirresistentes (mrMRSA). Os outros antibiotipos (R3 e R4) foram classificados como MRSA não multirresistentes (nmMRSA). Todas as amostras multirresistentes carregaram os SCCmec dos tipos II e III, exceto uma amostra de pulmão, também multirresistente, pertencente ao SCCmec do tipo IV. A maioria das amostras multirresistentes foi isolada do sangue (70%). A tabela 8 evidencia a relação entre o perfil de resistência aos antimicrobianos, o tipo de SCCmec e o sítio de isolamento das 15 amostras clínicas de MRSA usadas no estudo.

Tabela 8: Relação entre o perfil de resistência aos antimicrobianos, o tipo de SCCmec e o sítio de isolamento das 15 amostras clínicas de MRSA usadas no estudo

Antibiótipo	Perfil de Resistência	Número de amostras (%)	Sítio de Infecção (N)	Tipo de SCCmec (N)
R1	PEN, MET, GEN, CIP, ERI, CLI, TET, RIF, STX	5 (33,3)	Sangue (2) Ferida Operatória (3)	III (5)
R2	PEN, MET, CIP, ERI, CLI	6 (40)	Sangue (5) Pulmão (1)	II (5) IV (1)
R3	PEN, MET, ERI	3 (20)	Sangue (3)	IV (3)
R4	PEN, MET	1 (6,7)	Ferida Operatória (1)	IV (1)

PEN, Penicilina; MET, Meticilina; GEN, Gentamicina; CIP, Ciprofloxacino; ERI, Eritromicina; CLI, Clindamicina; TET, Tetraciclina; RIF, Rifampicina; STX, Sulfametoxazol/Trimetoprima

4.2 RELAÇÃO ENTRE HIDROFOBICIDADE E CAPACIDADE DE ADESÃO INICIAL DE CEPAS CLÍNICAS DE MRSA

Com o objetivo de avaliar a associação entre a hidrofobicidade e a capacidade de adesão inicial de células de MRSA a uma superfície de poliestireno, os parâmetros de tensão interfacial e hidrofobicidade foram medidos. Conforme demonstrado na tabela 9, as 15 amostras clínicas de MRSA estudadas apresentaram valores similares de ângulos de contato para água, todos menores do que 65° , variando de $16,6^\circ$ (SAIII29) a $29,6^\circ$ (SAIV70), o que é indicativo de uma superfície hidrofílica. Estes valores foram muito semelhantes aos obtidos para a formamida, que também é um solvente polar, com valores entre $16,3^\circ$ (SAII108) a $29,6^\circ$ (SAII483). Os ângulos de contato determinados usando o líquido apolar α -bromonaftaleno, evidenciaram variação entre as linhagens com valor mínimo de $48,5^\circ$ (SAII376) e máximo de $89,1^\circ$ (SAIV333). Além disso, todas as amostras apresentaram valores positivos ΔG_{Iwi} e, portanto, foram consideradas hidrofílicas. Em relação aos componentes de tensão interfacial, todas as células analisadas mostraram, predominantemente, capacidade de doação de elétrons, com valores maiores do parâmetro doador de elétrons (γ^-) em comparação com valores menores do parâmetro receptor de elétrons (γ^+). É também possível estimar o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de superfícies a

partir dos componentes da tensão interfacial. O componente polar de energia livre de superfície doador de elétrons (γ^-) pode ser um indicador semiquantitativo do grau de hidrofobicidade. Valores de $\gamma^- \leq 25,5 \text{ mJ/m}^2$ são indicativos de superfície hidrofóbica (AZEREDO; OLIVEIRA, 2000). Mais uma vez, de acordo com os resultados, todas as células testadas são hidrofílicas por apresentarem valores de γ^- superiores a esse limite.

Tabela 9: Média dos ângulos de contato (em graus) da água (θ_A), formamida (θ_F), e α -bromonaftaleno ($\theta_{\alpha-B}$), componentes de tensão interfacial e grau de hidrofobicidade (em mJ/m^2) da superfície celular de amostras clínicas de MRSA, diferenciadas individualmente e de acordo com o tipo de SCCmec

Amostras	Ângulos de Contato \pm SD ($^\circ$)			Componentes de tensão interfacial (mJ/m^2)			ΔG_{iwi}
	θ_A	θ_F	$\theta_{\alpha-B}$	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
SAII68	20,43 \pm 1,90	18,48 \pm 2,76	51,70 \pm 4,36	29,12	3,74	49,60	23,78
SAII207	25,39 \pm 4,91	19,95 \pm 2,34	48,49 \pm 2,15	30,69	3,29	46,07	20,97
SAII376	23,14 \pm 3,86	18,31 \pm 1,65	48,48 \pm 2,59	30,69	3,36	47,38	22,07
SAII397	21,47 \pm 2,81	22,19 \pm 3,07	52,88 \pm 2,86	28,54	3,49	50,59	25,36
SAII483	21,33 \pm 2,28	29,63 \pm 4,93	55,5 \pm 4,00	27,24	2,71	55,56	32,13
SAIII06	20,85 \pm 4,76	17,31 \pm 3,99	64,31 \pm 4,38	22,81	6,80	47,95	18,30
SAIII29	16,59 \pm 3,48	17,32 \pm 1,55	56,64 \pm 4,32	26,66	4,66	51,64	24,21
SAIII32	20,41 \pm 4,74	17,65 \pm 2,4	57,53 \pm 3,83	26,22	5,02	48,89	21,42
SAIII108	16,65 \pm 2,72	16,37 \pm 2,78	59,93 \pm 4,39	25,01	5,54	50,97	22,32
SAIII156	18,58 \pm 4,82	18,43 \pm 3,35	61,32 \pm 4,17	24,31	5,68	50,44	21,75
SAIV70	29,55 \pm 4,67	19,97 \pm 2,89	64,22 \pm 4,87	22,85	7,07	40,99	12,91
SAIV321	24,83 \pm 4,91	25,33 \pm 4,10	66,74 \pm 5,97	21,60	6,20	48,53	19,62
SAIV333	20,39 \pm 2,53	20,89 \pm 3,38	89,06 \pm 4,86	11,47	15,10	48,32	5,57
SAIV495	23,84 \pm 3,57	17,65 \pm 2,21	63,83 \pm 4,87	23,05	6,84	45,56	16,52
SAIV533	21,58 \pm 3,98	21,55 \pm 2,65	63,58 \pm 4,79	23,18	5,90	49,47	20,75
Tipo de SCCmec							
II	22,12 \pm 3,58	21,25 \pm 4,88	50,12 \pm 3,83	29,90	3,19	49,67	24,80
III	18,31 \pm 4,40	17,4 \pm 2,94	60,38 \pm 4,96	24,78	5,59	50,22	21,68
IV	23,77 \pm 5,04	20,92 \pm 3,99	66,58 \pm 7,88	21,67	7,01	47,00	17,35

SD, desvio padrão; γ^{LW} , tensão interfacial das forças de interações apolares de Lifshitz-van der Waals; γ^+ , tensão interfacial do componente acceptor de elétrons; γ^- , tensão interfacial do componente doador de elétrons; ΔG_{iwi} , grau de hidrofobicidade

Todas as amostras de MRSA avaliadas foram capazes de aderir a uma superfície de poliestireno não modificada (Fig. 7A), no entanto, a análise estatística evidenciou que as cepas que carregam SCCmec II apresentam taxas mais baixas de adesão quando comparadas às aquelas carregando os SCCmec III e IV ($P < 0,001$). Embora diferenças tenham sido observadas entre as amostras SCCmec III e IV ($P < 0,001$), ambas mostraram melhor capacidade de adesão em relação as cepas com SCCmec II (Fig.6B). Quando a avaliação foi realizada de acordo com o tipo de SCCmec, foi observada associação entre o grau de hidrofobicidade (ΔG_{iwi}) e capacidade de adesão inicial, ou seja, amostras com SCCmec tipo II apresentaram um $\Delta G_{iwi} = 24,8$ portanto, foram mais hidrofílicas e menos aderentes quando comparadas com as amostras SCCmecIV que sendo menos hidrofílicas ($\Delta G_{iwi} = 17,35$) apresentaram maior capacidade de adesão ao poliestireno. Também sob esta perspectiva de análise, houve associação entre os valores da tensão interfacial do componente acceptor de elétrons (γ^+) e a capacidade de adesão inicial. Quanto maior os valores do componente γ^+ mais alto foi o número de células aderidas (Tabela 9, Figura 7B e Figura 8).

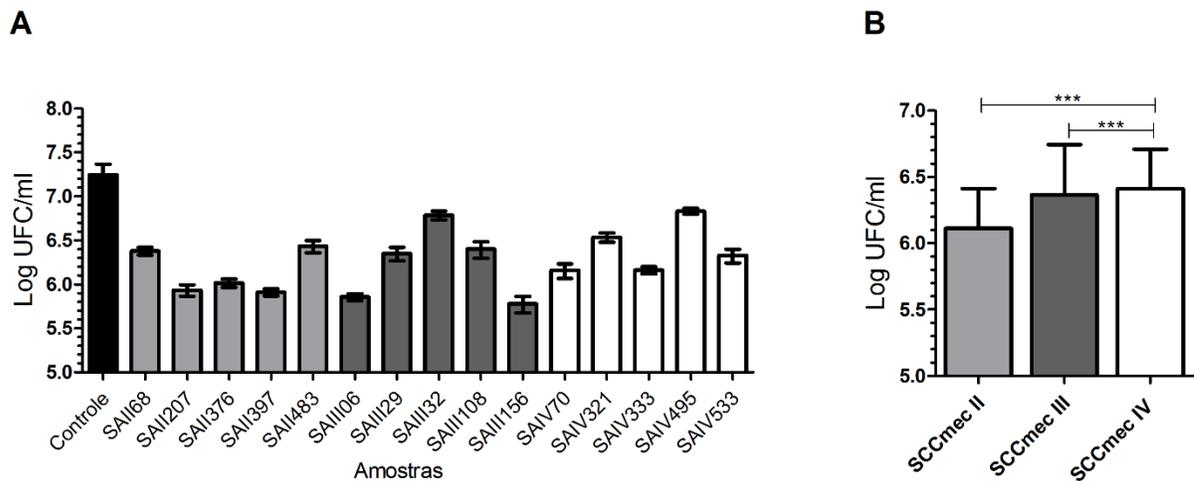


Figura 7: Número de células aderidas a uma superfície de poliestireno após 2 horas de adesão, expressas como Log UFC/ml para 15 amostras clínicas de MRSA (A) e de acordo com o tipo de SCCmec (B). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. *** $P < 0,001$, usando Kruskal-Wallis, Teste de comparação múltipla de Dunn. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle.

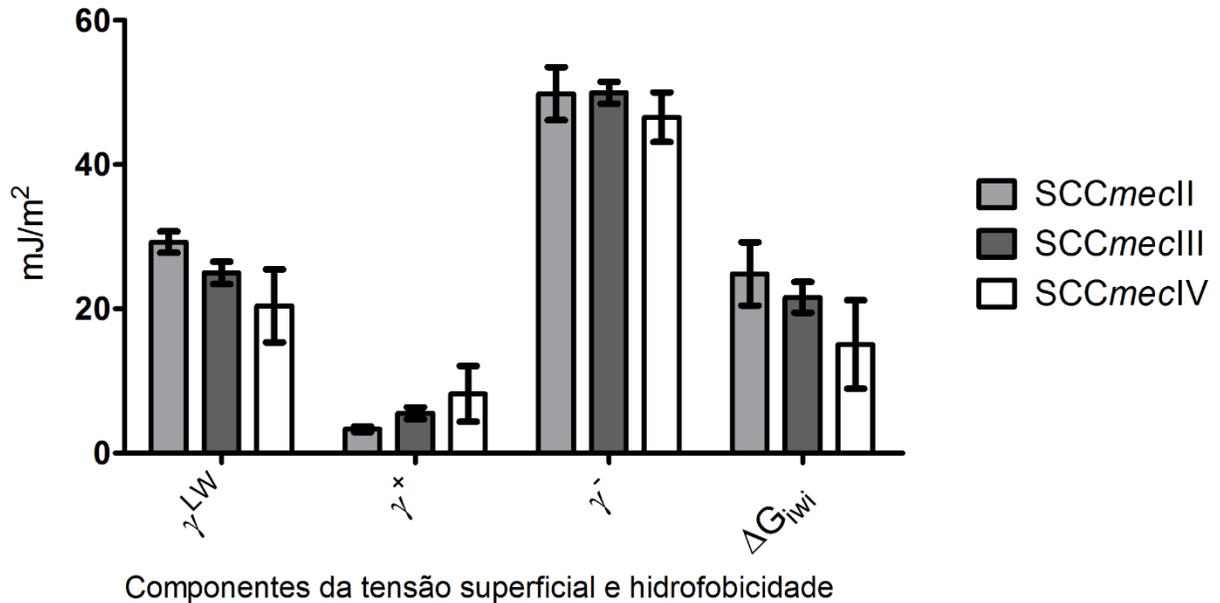


Figura 8: Componentes da tensão interfacial e hidrofobicidade da superfície celular de amostras clínicas de MRSA apresentadas de acordo com o tipo de *SCCmec*. γ^{LW} , tensão interfacial das forças de interações apolares de Lifshitz-van der Waals; γ^+ , tensão interfacial do componente aceptor de elétrons; γ^- , tensão interfacial do componente doador de elétrons; ΔG_{iwi} , grau de hidrofobicidade.

4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O TIPO DE *SCCmec* E PRODUÇÃO DE BIOFILME

Amostras de MRSA que carregam *SCCmec* III mostraram aumento significativo na capacidade de formação de biofilme em comparação com as amostras *SCCmec* II e IV que apresentaram valores de biomassa inferiores ao *cutoff* calculado de acordo com os critérios estabelecidos por Stepanovic et al. (2007) (Fig. 9A e B). Em relação ao número de células viáveis no biofilme (Log UFC/ml), as amostras carregando *SCCmec* III apresentaram também diferenças significativas com relação aos demais tipos de *SCCmec* (Fig. 9C e D).

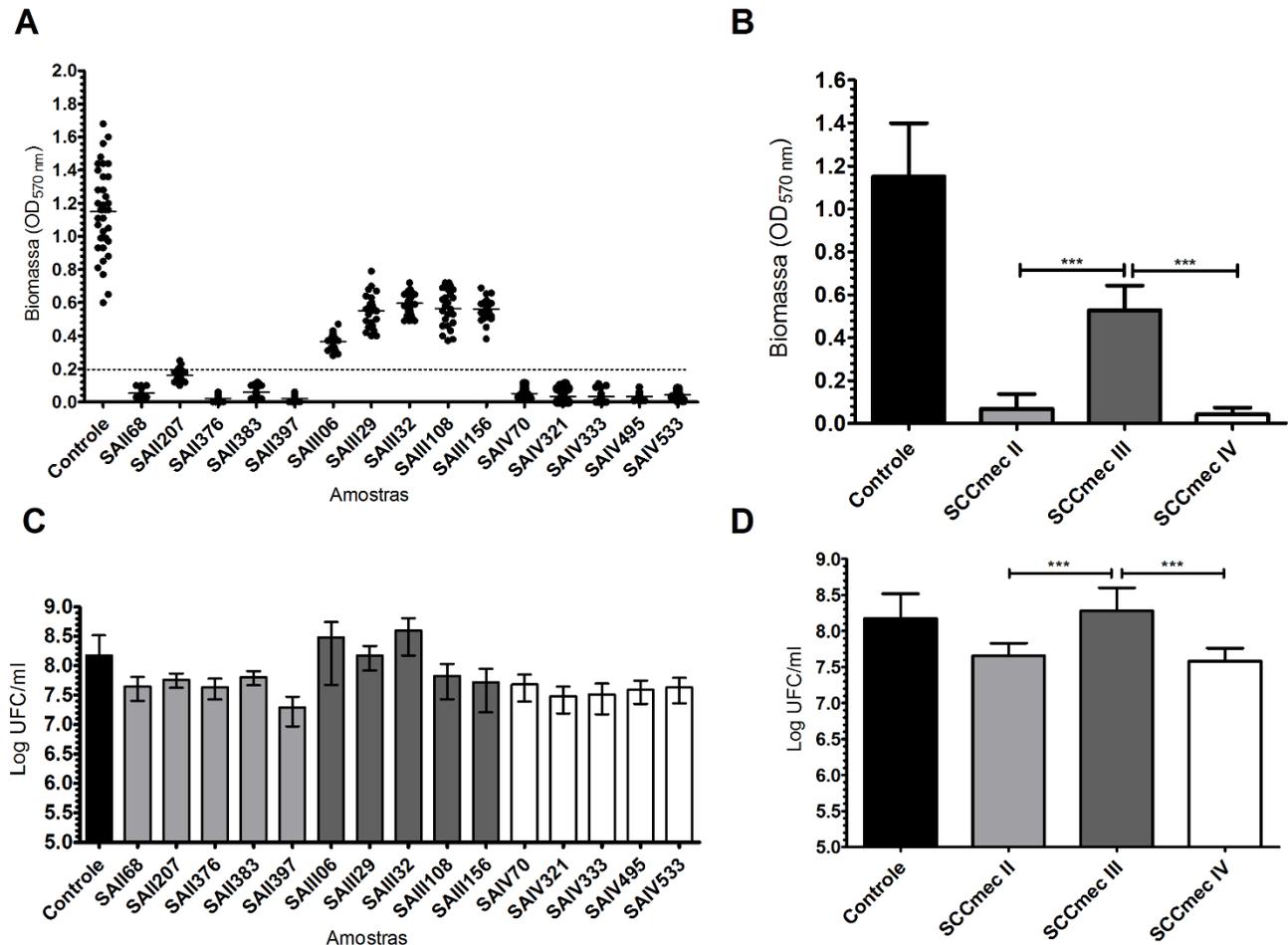


Figura 9: Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO_{570nm}) para 15 amostras clínicas de MRSA (A) e de acordo com o tipo de *SCCmec* (B). Concentração celular do biofilme expresso como Log UFC/ml para 15 amostras clínicas de MRSA (C) e de acordo com o tipo de *SCCmec* (D). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. A linha pontilhada na Fig. 3A representa o *cutoff* calculado de acordo com os critérios estabelecidos por Stepanovic et al (2007) *** $P < 0,001$, usando Kruskal-Wallis, Teste de comparação múltipla de Dunn. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle.

A classificação das amostras como fortemente produtoras de biofilme ocorreu em 33,3% das cepas, todas carregando o *SCCmec* tipo III com valores de biomassa média de $0,53 \pm 0,12$ em comparação com $0,04 \pm 0,04$ naquelas classificadas como não-produtoras/fraco produtoras. A associação entre a produção de biofilme e a multirresistência em amostras clínicas de MRSA é mostrada na tabela 10.

Tabela 10: Associação entre a produção de biofilme e a multirresistência em amostras clínicas de MRSA

Amostras	D.O. ¹	Produção de biofilme	Fenótipo de resistência
Controle Negativo	0,05	Não produtor/Fraco produtor	--
SAII68	0,05	Não produtor/Fraco produtor	mrMRSA ²
SAII207	0,16	Moderado produtor	mrMRSA
SAII376	0,02	Não produtor/Fraco produtor	mrMRSA
SAII397	0,06	Não produtor/Fraco produtor	mrMRSA
SAII483	0,06	Não produtor/Fraco produtor	mrMRSA
SAIII06	0,37	Forte produtor	mrMRSA
SAIII29	0,55	Forte produtor	mrMRSA
SAIII32	0,60	Forte produtor	mrMRSA
SAIII108	0,56	Forte produtor	mrMRSA
SAIII156	0,53	Forte produtor	mrMRSA
SAIV70	0,05	Não produtor/Fraco produtor	mrMRSA
SAIV321	0,03	Não produtor/Fraco produtor	nmMRSA ³
SAIV333	0,03	Não produtor/Fraco produtor	nmMRSA
SAIV495	0,03	Não produtor/Fraco produtor	nmMRSA
SAIV533	0,04	Não produtor/Fraco produtor	nmMRSA

¹Média da densidade óptica; ²mrMRSA, MRSA multirresistente; ³nmMRSA, MRSA não multirresistente.

Nenhuma associação entre multirresistência e produção de biofilme foi observada considerando que amostras não produtoras/fraco produtoras de biofilme pertencentes ao SCC*mecII* e IV (SAIV70) também apresentaram perfil de multirresistência.

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DOS GENES *bbp*, *clfA*, *icaA*, *icaD*, *bap*, *fnbB*, *sasC*, A SEQUÊNCIA DE INSERÇÃO *IS256*, O GRUPO *agr* E A CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Para analisar as características genéticas associadas com a formação de biofilme em cepas clínicas de MRSA, foram avaliadas a presença de genes associados com as vias de produção de biofilme dependentes e independentes do operon *icaADBC*, além da relação com o grupo *agr* e a sequência de inserção *IS256*.

Tabela 11: Classificação das cepas clínicas de MRSA usadas no estudo quanto as características genótípicas relacionadas à virulência e produção de biofilme

Tipagem Molecular			Tipo de SCC _{mec}	Grupo agr	Genes associados à produção de biofilme							
Pulsotipo	Subtipo	Número de amostras			icaA	icaD	fnbB	IS256	clfA	bbp	sasC	bap
A	A	2	II	II	+	+	-	-	+	-	+	-
	A1	1	II	II	+	+	-	-	+	-	+	-
	A2	1	II	II	+	+	-	-	+	-	+	-
B	A3	1	IV	II	+	+	-	-	+	-	+	-
	B	1	II	II	+	+	-	-	+	-	+	-
C	C	1	III	I	+	+	+	+	+	-	+	-
	C1	1	III	I	+	+	+	+	+	-	+	-
	C2	1	III	I	+	+	+	+	+	-	+	-
	C3	1	III	I	+	+	+	+	+	-	+	-
D	C4	1	III	I	+	+	+	+	+	-	+	-
	D	3	IV	II	+	+	-	-	+	-	+	-
E	E	1	IV	II	-	+	-	-	+	-	+	-

Através da PCR, quatro determinantes genéticos foram encontrados exclusivamente em amostras classificadas como fortemente produtoras de biofilme: *fnbB*, *IS256*, *agrI* e *SCCmec III*. As demais amostras foram associadas ao grupo *agrII* e apresentaram resultados negativos para os genes testados. Todas as amostras, produtoras ou não produtoras/fraco produtoras de biofilme, foram positivas para os genes *clfA*, *sasC* e *icaD* e, apenas uma amostra (SAIV70) foi negativa para o gene *icaA*. Nenhuma das amostras testadas apresentou os genes *bbp* e *bap*. A presença de genes associados à virulência e a produção de biofilme entre as 15 cepas clínicas de MRSA estudadas é mostrada na Tabela 11 (ANEXO II).

Em nosso estudo, apesar do número pequeno de amostras avaliadas, observou-se que todas as cepas resistentes à gentamicina possuíam o elemento de inserção *IS256* e foram concomitantemente resistentes à ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina e sulfametoxazol/trimetoprima (Figura 10). Além desse perfil de resistência, todas estas cepas foram fortemente produtoras de biofilme.

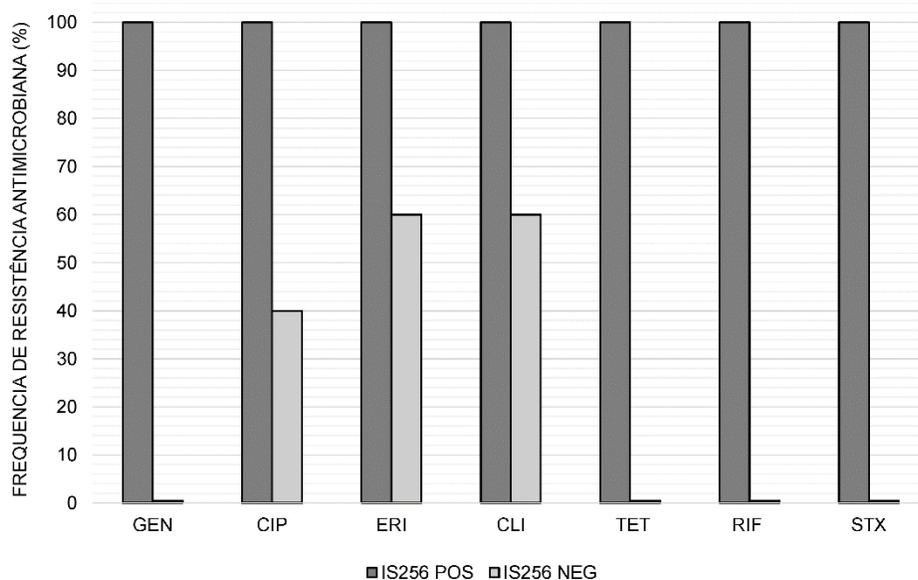
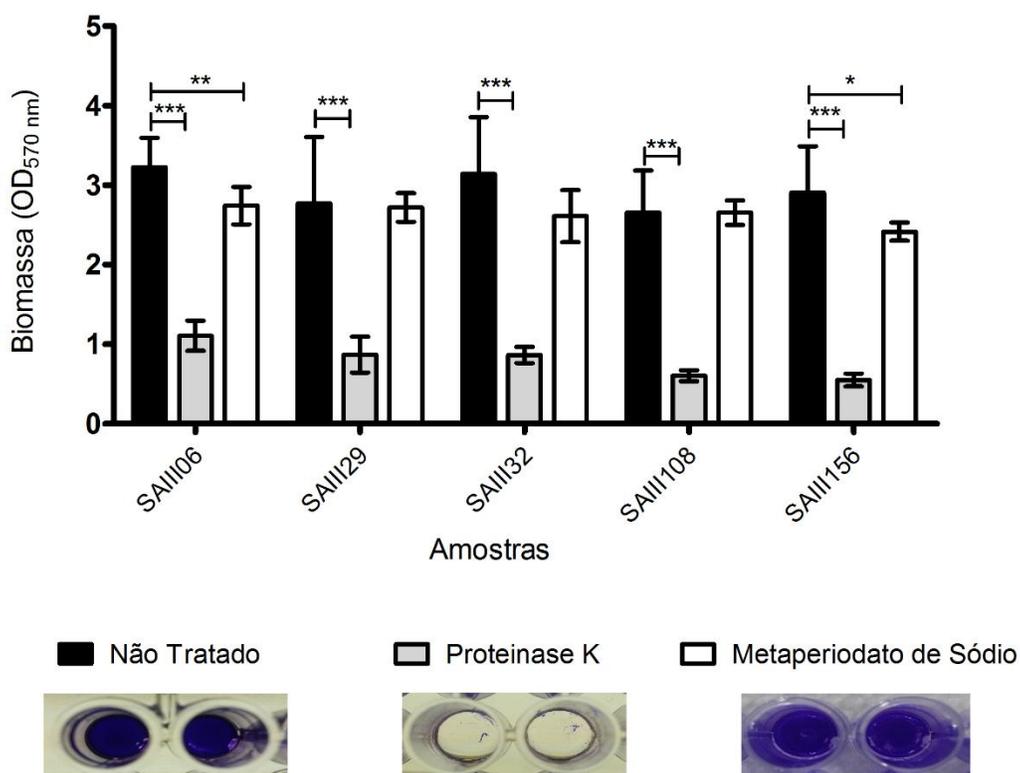


Figura 10: Frequência de resistência antimicrobiana entre amostras clínicas de MRSA positivas (*IS256 POS*) e negativas (*IS256 NEG*) para a sequência de inserção *IS256*. GEN, Gentamicina; CIP, Ciprofloxacino; ERI, Eritromicina; CLI, Clindamicina; TET, Tetraciclina; RIF, Rifampicina; STX, Sulfametoxazol/Trimetoprima.

4.5 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ADESINA INTERCELULAR POLISSACARÍDICA E DA NATUREZA DO BIOFILME

Com o objetivo de investigar a natureza dos biofilmes produzidos pelas amostras de MRSA, o ensaio de hemaglutinação foi utilizado para inferência indireta dos níveis de expressão da adesina intercelular polissacarídica. Nenhuma das amostras avaliadas foi capaz de causar hemaglutinação. Para validar os resultados obtidos no ensaio de hemaglutinação, o biofilme das amostras fortemente produtoras foi tratado com proteinase K e metaperiodato de sódio para degradação proteica e oxidação de carboidratos,



respectivamente. Os resultados são apresentados na Figura 11.

Figura 11. Efeito do tratamento com proteinase K (1mg/mL em solução com 20 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl 10 mM) e metaperiodato de sódio (10 mM em solução com 50 mM tampão acetato de sódio [pH 4,5]) sobre o biofilme de amostras clínicas de MRSA SCCmecIII fortemente produtoras de biofilme. Os poços evidenciam o efeito desses agentes sobre os biofilmes pré-formados sobre placas de poliestireno. Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. *** $P < 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$ usando Análise de Variância simples (One way

ANOVA)/Teste de comparação múltipla de Bonferroni ou Kruskal-Wallis/Teste de comparação múltipla de Dunn quando apropriado.

O tratamento com proteinase K removeu quase completamente os biofilmes pré-formados pelas amostras de MRSA *SCCmecIII* testadas. No entanto, o oxidante de carboidratos, metaperiodato de sódio, apresentou pouco ou nenhum efeito sobre o biofilme produzido por esses isolados.

4.6 TIPAGEM MOLECULAR

A relação genética entre as amostras e sua possível associação com a capacidade de formação de biofilme foi investigada por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). As características genéticas de 15 amostras clínicas de MRSA analisadas por PFGE estão resumidas na Tabela 11.

Foram identificados cinco pulsotipos (A-E) usando a técnica de PFGE. As amostras *SCCmec II* pertenceram aos pulsotipos A e B, com os subtipos A, com dois isolados, A1 e A2 e B, com um isolado de cada. As amostras *SCCmec III* foram classificadas como do pulsotipo C, com cinco subtipos (C-C4) com um isolado de cada. As amostras *SCCmec IV* pertenceram a três pulsotipos (A, D e E); o subtipo D foi o mais frequente nessas cepas com três amostras. Uma das amostras (SAIV333) apresentou maior similaridade com aquelas carreando o *SCCmecII* sendo classificada como do pulsotipo A, subtipo A3. O pulsotipo E foi representado por apenas uma amostra (SAIV70) (Tabela 11, Figura 12, ANEXO III).

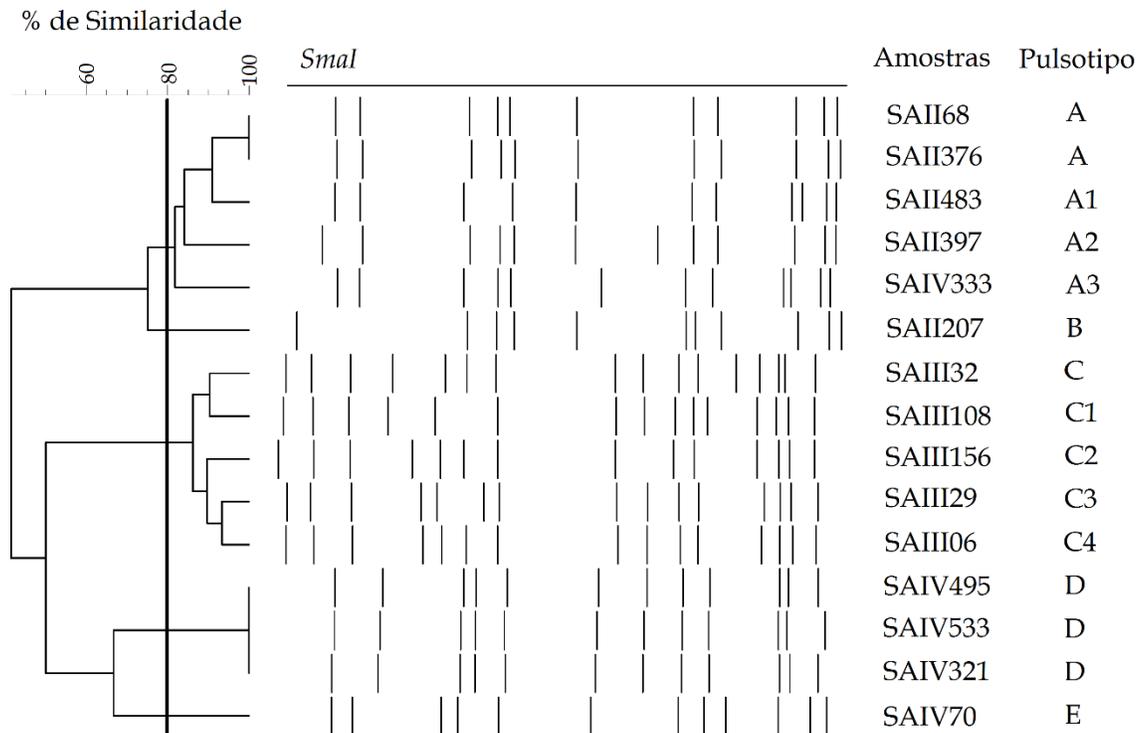


Figura 12. Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de 15 amostras clínicas de MRSA baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (parâmetro de tolerância de 1,25%, otimização 0,5%, similaridade $\geq 80\%$).

5 DISCUSSÃO

Pesquisas recentes têm mostrado que a resistência aos antibióticos, a produção de enzimas e toxinas, a capacidade de formação de biofilme e a evasão do sistema imunológico são fatores que, juntos, contribuíram para o surgimento e disseminação global de *Staphylococcus aureus*, particularmente no ambiente hospitalar (FOSTER, 2005; GORDON; LOWY, 2008; CHAMBERS; DELEO, 2009; VELDKAMP; VAN STRIJP, 2009; SCHILIEVERT et al., 2010; FOSTER et al., 2014).

Amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), principalmente aquelas de origem hospitalar, possuem diversos elementos genéticos, móveis ou não, que conferem resistência a várias classes de antimicrobianos e, nessas cepas, esses elementos estão principalmente associados com o SCC $_{mec}$ (CHAMBERS; DELEO, 2009; HIRAMATSU et al., 2013).

A maioria dos estudos sobre formação de biofilmes em amostras clínicas são limitados e controversos quando se trata da associação entre a produção de biofilme e a presença de elementos genéticos associados com a resistência, como o SCC $_{mec}$ (ATSHAN et al., 2012; MIRANI et al., 2013; PULCRANO et al., 2013). Com o objetivo de elucidar essa questão, nosso trabalho avaliou a capacidade de amostras clínicas de MRSA, recuperadas de uma coleção previamente caracterizada para o tipo de SCC $_{mec}$, de produzir biofilmes utilizando os testes fenotípicos de quantificação de biomassa total por coloração com cristal violeta e avaliação do número de células viáveis no biofilme.

Quinze amostras de MRSA carreando SCC $_{mec}$ dos tipos II (n = 5), III (n = 5) ou IV (n = 5) foram selecionadas para este estudo. Todas as cepas caracterizadas como fortemente produtoras de biofilme carregaram SCC $_{mec}$ do tipo III e apresentaram valores de biomassa média de $0,53 \pm 0,12$ em comparação com $0,04 \pm 0,04$ daquelas não-produtores/fraco produtores. Estes resultados são consistentes com os de Lim et al (2013), que encontraram o SCC $_{mec}$ III como marcador genético para forte produção de biofilme em *S. aureus*. Além disso, a literatura mostra que a capacidade de formar biofilme tem sido frequentemente observada em cepas multirresistentes (KWON et al., 2008), o que difere do nosso estudo uma vez que cepas de MRSA carreando SCC $_{mec}$ tipo II e IV (SAV70), também caracterizadas como multirresistentes, não apresentaram a formação de biofilme como uma

característica marcante, entretanto experimentos com um número maior de amostras são necessários para comprovar esses resultados.

Até recentemente, a formação de biofilme em espécies do gênero *Staphylococcus*, especialmente *Staphylococcus epidermidis*, era essencialmente atribuída à produção da adesina intercelular polissacarídica (PIA) codificada pelo operon *icaADBC*. Essa adesina medeia a adesão intercelular e o acúmulo em multicamadas no biofilme (OTTO, 2008; 2009; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013). Uma vez que todas as cepas em nosso estudo foram positivas para os genes *icaA* e/ou *icaD*, uma avaliação adicional da capacidade de hemaglutinação foi usada para inferir indiretamente o nível de expressão da PIA entre as amostras, entretanto nenhuma das cepas testadas foi capaz de causar hemaglutinação. Para comprovar os resultados obtidos nesse ensaio, os biofilmes das amostras fortemente produtoras foram tratados com proteinase K ou metaperiodato de sódio com o objetivo de promover a degradação de proteínas ou da adesina intercelular polissacarídica, respectivamente. Apenas a proteinase K apresentou efeito sobre os biofilmes testados. Estes resultados corroboram a ideia de que embora as cepas apresentem o operon *icaADBC* os produtos codificados por esses genes não estão sendo expressos nas condições experimentais avaliadas e o biofilme produzido é essencialmente proteico e portanto, independente da PIA.

É amplamente conhecido que o biofilme pode desempenhar papel significativo na patogênese de infecções associadas a dispositivos médicos invasivos, principalmente em cateteres recobertos por proteínas do plasma e, portanto, em infecções da corrente sanguínea relacionadas ao uso desses dispositivos (DONELLI; VUOTTO, 2014). Alternativamente à PIA, inúmeras proteínas podem promover a adesão à matriz celular do hospedeiro e/ou o acúmulo de células no biofilme, tais como: o fator clumping A (ClfA), a proteína de ligação ao ácido siálico ósseo (Bbp) (FOSTER et al., 2014), a proteína ligadora de fibronectina do tipo A e B (O'NEILL et al., 2008; VERGARA-IRIGARAY et al., 2009; MCCOURT et al., 2014); a proteína associada ao biofilme (Bap) (CUCARELLA et al. 2001); a proteína C de superfície de *Staphylococcus aureus* (SCHROEDER et al., 2009); a proteína A (MERINO et al., 2009) e a proteína G de superfície de *Staphylococcus aureus* (SasG) (GEOGHEGAN et al., 2010).

As proteínas ligadoras de fibronectina (FnBPs) podem mediar a adesão a diferentes componentes da matriz extracelular do hospedeiro tais como fibronectina, fibrinogênio e elastina e, além disso, também podem promover a agregação intercelular e desenvolvimento de biofilme em *S. aureus* (WANN et al., 2000; ROCHE et al., 2004; KEANE et al., 2007; VERGARA-IRIGARAY et al., 2009). Os nossos resultados reforçam a importância da formação de biofilme por via independente de *ica* em amostras clínicas de MRSA carreando o SCC*mec* tipo III, uma vez que somente estas cepas foram fortemente produtoras de biofilme e positivas para gene *fnbB*. Isso ressalta a importância dos diferentes genes associados à virulência dessas amostras em infecções graves no ambiente hospitalar.

No nosso estudo, todas as cepas avaliadas apresentaram os genes para o fator clumping A e para a proteína C de superfície de *Staphylococcus aureus*. Com relação à proteína associada ao biofilme (Bap), os resultados apresentados são consistentes com a literatura, uma vez que este gene ainda não foi descrito em *S. aureus* de origem humana (CUCARELLA et al., 2004; DARWISH; ASFOUR, 2013).

Um outro aspecto a ser considerado na avaliação da formação de biofilme é a adesão inicial do micro-organismo à superfície. Esta etapa é considerada essencial e crítica na patogênese de infecções associadas aos dispositivos médicos invasivos tais como cateteres venosos centrais, tubo endotraqueal e cateter urinário, estando envolvidas forças não específicas, tais como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, permitindo a adesão de células diretamente à superfície, levando à formação de um ambiente ideal para a instalação do biofilme propriamente dito (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987; KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; SOUSA, 2009; ARMENTANO et al. 2014).

Todas as amostras clínicas de MRSA estudadas foram caracterizadas como hidrofílicas ($\gamma^- > 25,5 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{\text{Iwi}} > 0$) e, em diferentes níveis, aderiram à superfície de poliestireno não modificada (Figura 1A). Além disso, a superfície celular de todas as células analisadas predominantemente mostrou capacidade de doação de elétrons, com maiores valores de parâmetro doador de elétrons (γ^-) em comparação com os baixos valores do parâmetro aceptor de elétrons (γ^+). O γ^- tem papel importante entre os parâmetros termodinâmicos da superfície. Trabalhos têm demonstrado que γ^- é sempre superior ao parâmetro aceptor de elétrons na maioria dos micro-organismos. Isso reforça a teoria

segundo a qual superfícies biológicas tem predominantemente caráter doador de elétrons em consequência da presença do oxigênio na atmosfera e da hidratação da superfície celular microbiana (VAN DER MEI; BOS; BUSSCHER, 1998; STREVETT; CHEN, 2003; BERNARDES, 2008; SOUSA et al., 2009).

Quando analisadas individualmente, não foi possível estabelecer qualquer relação entre o grau de hidrofobicidade e capacidade de adesão inicial. Não foi observada diferença na capacidade de adesão entre o MRSA mais hidrofílico (SAII483) e o menos hidrofílico (SAIV333). Este fato é confirmado por estudos anteriores (CERCA et al. 2005; OLIVEIRA et al., 2007; SOUSA et al., 2009) e sugere que outros fatores de superfície celular, tais como adesinas bacterianas, contribuam para o processo de adesão inicial, como mencionado anteriormente.

No entanto, quando a avaliação foi realizada de acordo com o tipo de *SCCmec*, uma associação entre o grau de hidrofobicidade e a capacidade de adesão foi observada uma vez que as cepas carreando *SCCmec* dos tipos III e IV foram menos hidrofílicas e aderiram melhor do que as amostras *SCCmec* II, mais hidrofílicas. Uma associação semelhante foi observada entre a tensão interfacial do componente acceptor de elétrons (γ^+) e a capacidade de adesão inicial. Esta diferença pode ter sido observada porque a análise das amostras de acordo com o tipo de *SCCmec* aumentou o número de réplicas, o que pode ter melhorado a sensibilidade da técnica, torna-se mais evidente a diferença na capacidade de adesão entre os grupos. De fato, um micro-organismo pode aderir a um substrato por meio do efeito hidrofóbico quando áreas apolares numa superfície bacteriana interagem com sítios hidrofóbicos dos substratos, entretanto, a adesão estável a superfície depende de interações específicas entre as adesinas bacterianas e seus receptores presentes nas moléculas na superfície do substrato. A associação entre valores mais altos da tensão interfacial do componente acceptor de elétrons (γ^+) e a maior capacidade de adesão inicial pode ser justificado pelo aumento das interações entre os grupos doadores de elétrons do substrato e grupos aceptores na superfície celular, o que favoreceria a interação entre a célula bacteriana e o suporte de adesão (SOUSA et al., 2009).

A capacidade de adesão inicial também não foi relacionada a disseminação de um clone específico. Apesar do nosso estudo demonstrar uma associação entre o tipo de *SCCmec*, maiores valores da tensão interfacial do componente acceptor de elétrons e o grau

de hidrofobicidade da superfície celular não conseguimos atribuir essa característica exclusivamente ao cassete cromossômico, por essa razão mais estudos precisam ser realizados com o objetivo de elucidar essa questão.

A complexidade da disseminação e persistência do MRSA no ambiente hospitalar também envolve a aquisição de elementos genéticos móveis de resistência tais como sequências de inserção, transposons e ilhas genômicas que dão ao micro-organismo uma vantagem seletiva sobre outros patógenos hospitalares (MALACHOWA; DELEO, 2010). Alguns transposons, como o *Tn4001* que confere resistência à gentamicina, tobramicina e canamicina, são flanqueados por sequências de inserção, tais como *IS256* (LYON et al, 1987; BYRNE et al, 1989). Essa sequência de inserção pode estar presente como única ou múltiplas cópias no cromossomo bacteriano de isolados clínicos de MRSA pertencentes ao ST228 (1 cópia), ST239 (8 a 21 cópias) e ST247 (pelo menos 14 cópias) (SCHREIBER et al., 2013). Em nosso estudo, observou-se que todas as cepas resistentes à gentamicina possuíram o elemento de inserção *IS256* e também foram resistentes à ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina e sulfametoxazol/trimetoprima o que não foi observado para as amostras negativas para *IS256*.

A associação entre a produção de biofilme e a presença do elemento de inserção *IS256* é claramente demonstrada em estudos como os de Kown et al (2008) e Lim et al (2013), que relataram uma alta frequência deste gene em cepas produtoras de biofilme. Outros estudos têm associado mutações causadas pela presença da sequência de inserção *IS256* e a ocorrência de um sistema *agr* quorum sensing não funcional (KWON et al., 2008; MCEVOY et al., 2013). Como resultado, as cepas com *agr* disfuncional têm uma maior capacidade de formar biofilmes *in vitro*, o que tem sido atribuído, entre outros fatores, a diminuição da produção de proteases extracelulares responsáveis pela digestão da matriz extracelular do biofilme, a superexpressão da proteína A e o aumento da produção de FnBPs (VERGARA-IRIGARAY, 2009). Embora não tenhamos avaliado a inserção da *IS256* nos genes do locus *agr*, todas as amostras fortemente produtoras de biofilme foram positivas para esse gene e classificadas como do grupo *agrI*.

Poucos estudos investigaram a associação entre o tipo de *agr*, sua funcionalidade e a capacidade de formação de biofilmes em amostras clínicas (VUONG et al., 2000; VUONG et al., 2003; CAFISO et al., 2007; FERREIRA et al., 2013; INDRAWATTANA et al.,

2013; LIM et al., 2013). Em nosso estudo, todas as amostras fortemente produtoras de biofilme foram classificadas como do grupo *agrI* enquanto os isolados não produtores/fracamente produtores pertenceram ao grupo *agrII*.

Epidemiologicamente, as infecções causadas por cepas de MRSA capazes de formar biofilme são de natureza hospitalar. Portanto, torna-se essencial investigar a propagação de clones de MRSA nesse ambiente. No Brasil, o complexo clonal epidêmico brasileiro (BECC, do inglês *Brazilian epidemic clonal complex*) está disseminado na maioria dos hospitais o que pode ser justificado, em parte, por sua maior capacidade de adesão e produção de biofilmes (AMARAL et al., 2005; RODRIGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010). A comparação dos resultados obtidos no nosso estudo com outros descritos na literatura, nos leva a considerar que o clone C do PFGE (SCC*mecIII*, *agrI*, *icaA*⁺, *icaD*⁺, *sasC*⁺, *fnbB*⁺, *IS256*⁺), está intimamente relacionado ao BECC e está amplamente disseminado a nível local. Estudos complementares com essas amostras podem fornecer informações valiosas sobre a presença e disseminação de clones bem adaptados e capazes de persistir no ambiente hospitalar.

Em resumo, nós mostramos que o MRSA pertencente ao clone C do PFGE apresenta perfis de genes de virulência específicos o que poderia indicar a capacidade que determinadas linhagens apresentam em adquirir uma vantagem seletiva que permitiria a sua disseminação global. Essas características podem contribuir para disseminação e manutenção dessa linhagem nos hospitais brasileiros.

7 CONCLUSÕES

- Todas as amostras de MRSA avaliadas foram capazes de aderir a uma superfície de poliestireno não modificada com taxas de adesão estatisticamente mais baixas naquelas que apresentaram SCC mec II (cepas mais hidrofílicas e menos aderentes).
- Apesar de não observar diferenças individuais na adesão inicial entre as cepas foi observada associação entre o grau de hidrofobicidade e a capacidade de adesão inicial quando analisadas por tipo de SCC mec .
- Nossos resultados sugerem que SCC mec tipo III, *agr*I, *fnb*B e *IS256* são possíveis marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme por uma via independente de *ica* em amostras clínicas de MRSA.
- As amostras não produtoras/fracamente produtoras de biofilme carregando os SCC mec dos tipos II e IV, foram caracterizadas como *agr*II e negativas para *fnb*B e *IS256*.
- Todas as amostras testadas foram positivas para o gene da Proteína C de superfície de *Staphylococcus aureus* e para o fator clumping A. Nenhuma das amostras foi positiva para os genes da proteína associadas ao biofilme (Bap), para a proteína G de superfície de *S. aureus* e para proteína de ligação ao ácido siálico ósseo (Bbp).
- Todas as amostras, independentemente da produção de biofilme, foram positivas para os genes *ica*D, e apenas uma amostra (SAIV70) negativa para o *ica*A, entretanto os resultados dos ensaios de hemaglutinação e o tratamento dos biofilmes com proteinase K ou metaperiodato de sódio evidenciaram que a adesina intercelular polissacarídica parece não estar sendo expressa nessas cepas nas condições experimentais avaliadas.
- A produção de biofilme está relacionada a disseminação de um clone específico (Clone C do PFGE).

- A multirresistência não foi associada a forte produção de biofilme neste estudo.
- Nosso estudo contribui para a compreensão da produção de biofilme como um fator de virulência, potencialmente envolvido na severidade e persistência de infecções causadas por *S. aureus* que pertencem a este genótipo. No entanto, mais trabalhos experimentais são necessários para elucidar a formação de biofilme em mais detalhes nas cepas clínicas de MRSA.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. et al. Thermodynamic Prediction of Growth Temperature Dependence in the Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to Stainless Steel and Polycarbonate. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 7, p. 1116-26, Jul 2014.

AL-RAWAJFAH, O. M.; STETZER, F.; HEWITT, J. B. Incidence of and risk factors for nosocomial bloodstream infections in adults in the United States, 2003. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 11, p. 1036-44, Nov 2009.

AMARAL, M. M. et al. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 5, p. 801-10, Set 2005.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2151-6, Jun 2001.

ARMENTANO, I. et al. The Interaction of Bacteria with Engineered Nanostructured Polymeric Materials: A Review. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 410423, 2014.

ATSHAN, S. S. et al. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 417247, 2012.

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. The role of exopolymers in the attachment of *Sphingomonas paucimobilis*. **Biofouling**, v.16, p.59-67, 2000.

AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes**: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria. 1 ed. Porto: Publindústria Edições Técnicas: 2012. 396p.

BERNARDES, P.C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão.** 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.

BYRNE, M. E.; ROUCH, D. A.; SKURRAY, R. A. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. **Gene**, v. 81, n. 2, p. 361-7, Set 1989. I

CAFISO, V. et al. agr-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 220-7, Out 2007.

CARVALHO, K. S.; MAMIZUKA, E. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 71-6, Jan-Fev 2010.

CASSAT, J. E.; SMELTZER, M. S.; LEE, C. Y. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1085, p. 195-211, 2014.

CEGELSKI, L. et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 17-27, Jan 2008.

CERCA, N. et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 4, p. 506-14, Mai 2005.

CHAIGNON, P. et al. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 125-32, Mai 2007.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-41, Set 2009.

CHATTERJEE, S. et al. Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v. 4, n. 1, p. 100-4, Jan 2014.

COSTA, M. O. et al. Complete Genome Sequence of a Variant of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST239 Lineage, Strain BMB9393, Displaying Superior Ability To Accumulate ica-Independent Biofilm. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, 2013.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2888-96, Mai 2001.

CUCARELLA, C. et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2177-85, Abr 2004.

DABUL, A. N.; CAMARGO, I. L. Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: all mixed and together. **FEMS Microbiology Letters**, Dez 2013.

DAMASCO, P. V. et al. Infective endocarditis in Rio de Janeiro, Brazil: a 5-year experience at two teaching hospitals. **Infection**, Jun 2014.

DARWISH, S. F.; ASFOUR, H. A. Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 378492, 2013.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Review Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-22, Fev 2003.

DONELLI, G.; VUOTTO, C. Biofilm-based infections in long-term care facilities. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 175-88, Fev 2014.

DOYLE, R. J. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 4, p. 391-400, Abr 2000.

EDWARDS, A. M.; MASSEY, R. C. How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 184-90, Abr 2011.

ENRIGHT, M. C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1008-15, Mar 2000.

FEIL, E. J. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1518-30, Mar 2004.

FERREIRA, F. A. et al. Impact of agr dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) variant of the lineage ST1-SCCmec IV. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 93, 2013.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948-58, Dez 2005.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49-62, Jan 2014.

GARZONI, C.; KELLEY, W. L. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 59-65, Fev 2009.

_____. Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphylococcus aureus*. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, n. 3, p. 115-7, Mar 2011.

GEOGHEGAN, J. A. et al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 21, p. 5663-73, Nov 2010.

GEORGE, E. A.; MUIR, T. W. Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent staphylococci. **ChemBiochem**, v. 8, n. 8, p. 847-55, Mai 2007.

GIRARD, L. P. et al. MIC versus MBEC to determine the antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* in peritoneal dialysis peritonitis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 30, n. 6, p. 652-6, Nov-Dez 2010.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866-75, Out 2010.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46 Suppl 5, p. S350-9, Jun 2008.

GRUSZKA, D. T. et al. Staphylococcal biofilm-forming protein has a contiguous rod-like structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 17, p. E1011-8, Abr 2012.

GU, J. et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, n. 4, p. 342-8, Dez 2005.

HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 158, n. 2, p. 513-6, Mai 1984.

HEILMANN, C. Adhesion mechanisms of staphylococci. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 715, p. 105-23, 2011.

HENGZHUANG, W. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4469-74, Set 2011.

HIRAMATSU, K. et al. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 117-36, Jun 2013.

HOGT, A. H.; DANKERT, J.; FEIJEN, J. Encapsulation, slime production and surface hydrophobicity of coagulase-negative staphylococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 18, p. 211-215, 1983.

INDRAWATTANA, N. et al. *Staphylococcus aureus* clinical isolates: antibiotic susceptibility, molecular characteristics, and ability to form biofilm. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 314654, 2013.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1449-58, Jun 1999.

JORGE, L. S.; CHUEIRE, A. G.; ROSSIT, A. R. Osteomyelitis: a current challenge. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 310-5, Mai-Jun 2010.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549-55, Jun 2000.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European cells & materials**, v. 8, p. 37-57, Dez 2004.

KEANE, F. M. et al. The N-terminal A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A binds to tropoelastin. **Biochemistry**, v. 46, n. 24, p. 7226-32, Jun 2007.

KONDO, Y. et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 264-74, Jan 2007.

KWON, A. S. et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 1, p. 68-72, Jul 2008.

LAABEI, M. et al. Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. **Genome Research**, v. 24, n. 5, p. 839-49, Mai 2014.

LASA, I.; PENADES, J. R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 99-107, Mar 2006.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 509-24, Abr 2013.

LI, Y. et al. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* T0131, an ST239-MRSA-SCCmec type III clone isolated in China. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, p. 3411-2, Jul 2011.

LIM, Y. et al. Predictive genetic risk markers for strong biofilm-forming *Staphylococcus aureus*: fnbB gene and SCCmec type III. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 539-41, Ago 2013.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-32, Ago 1998.

LYON, B. R.; GILLESPIE, M. T.; SKURRAY, R. A. Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 11, p. 3031-8, Nov 1987.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-9, Jan 2001.

MALACARNE, P. et al. Epidemiology of nosocomial infection in 125 Italian intensive care units. **Minerva Anestesiologica**, v. 76, n. 1, p. 13-23, Jan 2010.

MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 3057-71, Set 2010.

MARTIN-LOPEZ, J. V. et al. Simultaneous PCR detection of ica cluster and methicillin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. **International Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 63-6, Mar 2004.

MARHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v. 68, p. 337-348, 1971.

MATSUHASHI, M. et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 167, n. 3, p. 975-80, Set 1986.

MCCOURT, J. et al. Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. **FEMS Microbiology Letters**, v. 353, n. 2, p. 157-64, Abr 2014.

MCDUGAL, L. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113-20, Nov 2003.

MCEVOY, C. R. et al. Decreased vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* caused by IS256 tempering of WalKR expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3240-9, Jul 2013.

MERINO, N. et al. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 832-43, Fev 2009.

MEYER, H. G.; GATERMANN, S. Surface properties of *Staphylococcus saprophyticus*: hydrophobicity, haemagglutination and *Staphylococcus saprophyticus* surface-associated protein (Ssp) represent distinct entities. **APMIS**, v. 102, n. 7, p. 538-44, Jul 1994.

MIRANI, Z. A. et al. Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. **Microbial Pathogenesis**, v. 61-62, p. 66-72, Ago-Set 2013.

NAVES, K. S. C.; **Ocorrência de SCCmec tipo IV de *Staphylococcus aureus* em infecções comunitárias e hospitalares em um hospital universitário de Minas Gerais.** 2011. 95 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

O'GARA, J. P. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, n. 2, p. 179-88, Mai 2007.

O'NEILL, E.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Carriage of both the *fnbA* and *fnbB* genes and growth at 37 degrees C promote FnBP-mediated biofilm development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. Pt 4, p. 399-402, Abr 2009.

O'NEILL, E. et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 3835-50, Jun 2008.

OLIVEIRA, G. A. et al. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 163-70, Ago 2001.

OLIVEIRA, K. et al. Adhesion of *Salmonella Enteritidis* to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 318-323, Jun 2007.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207-28, 2008.

_____. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555-67, Ago 2009.

_____. Community-associated MRSA: what makes them special? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 324-30, Ago 2013a.

_____. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175-88, 2013b.

PRATTEN, J. et al. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 8, p. 633-7, Jul 2001.

PULCRANO, G. et al. Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surgical site infections. **Surgical Infection Society (Larchmont)**, v. 14, n. 2, p. 196-202, Abr 2013.

REYNOLDS, P. E.; BROWN, D. F. Penicillin-binding proteins of beta-lactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Effect of growth conditions. **FEBS Letters**, v. 192, n. 1, p. 28-32, Nov 1985.

ROCHE, F. M. et al. The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38433-40, Set 2004.

RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14 Suppl 2, p. S87-96, Dez 2010.

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 5, p. 396-407, Jun 2012.

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 2, p. 95-104 e2, Mar 2010.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-43, Mai 2011.

SADER, H. S. et al. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 15, n. 5, p. 320-3, Mai 1994.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 1, p. 39-49, Jan 2010.

SCHREIBER, F. et al. Antibiotic-induced autoactivation of IS256 in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 6381-4, Dez 2013.

SCHROEDER, K. et al. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7567, 2009.

SEYBOLD, U. et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 5, p. 647-56, Mar 1 2006.

SHENKMAN, B. et al. Role of agr (RNAIII) in *Staphylococcus aureus* adherence to fibrinogen, fibronectin, platelets and endothelial cells under static and flow conditions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 747-54, Set 2002.

SHOPSIN, B. et al. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 456-9, Jan 2003.

SONG, M. D. et al. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. **FEBS Letters**, v. 221, n. 1, p. 167-71, Ago 1987.

SOUSA, C.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Acrylic and Silicone. **International Journal of Biomaterials**, v. 2009, p. 718017, 2009.

SOUSA, C. ***Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation onto biomaterials**. 2009. 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2009.

SOUZA, R. R. et al. Biofilm formation and prevalence of lukF-pv, seb, sec and tst genes among hospital- and community-acquired isolates of some international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 203-7, Fev 2009.

SOWASH, M. G.; UHLEMANN, A. C. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* case studies. **Methods in Molecular Biology**, v. 1085, p. 25-69, 2014.

STEFANI, S.; GOGLIO, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14 Suppl 4, p. S19-22, Out 2010.

STEPANOVIC, 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. 891-9, Ago 2007.

STREVETT, K. A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 329-35, Jun 2003.

TRISTAN, A. et al. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4465-7, Set 2003.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 3, p. 397-403, Set 1985.

VALLE, J. et al. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 1075-87, Mai 2003.

VELDKAMP, K. E.; VAN STRIJP, J. A. Innate immune evasion by staphylococci. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 666, p. 19-31, 2009.

VAN DER MEI, H. C.; BOS, R.; BUSSCHER, H.J. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. **Colloids and Surfaces**, v.11, p. 213-211, 1998.

VAN OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v.2, p. 503-512, 1995.

VAN OSS, C. J. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.2, n.5, p. 503-512, Out 1997.

VERGARA-IRIGARAY, M. et al. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3978-91, Set 2009.

VUONG, C. et al. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. **J Infect Dis**, v. 188, n. 5, p. 706-18, Set 2003.

VUONG, C. et al. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 6, p. 1688-93, Dez 2000.

WANN, E. R.; GURUSIDDAPPA, S.; HOOK, M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 18, p. 13863-71, Mai 2000.

YARWOOD, J. M. et al. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 6, p. 1838-50, Mar 2004.

ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 218/06

Registro CEP: 014/06

Projeto Pesquisa: *"Incidência de SCCmec TIPO IV DE staphylococcus aureus em infecções de pele e tecidos moles, corrente sanguínea e pneumônicas, comunitárias e hospitalares em um hospital universitário de Minas Gerais. ."*

Pesquisador Responsável: Paulo Pinto Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

Data para entrega do Relatório Parcial: dezembro/2006

Data para entrega do Relatório Parcial: dezembro/2007

Data para entrega do Relatório Parcial: dezembro/2008

Data para entrega do Relatório Final: março/2009

Uberlândia, 09 de agosto de 2006.

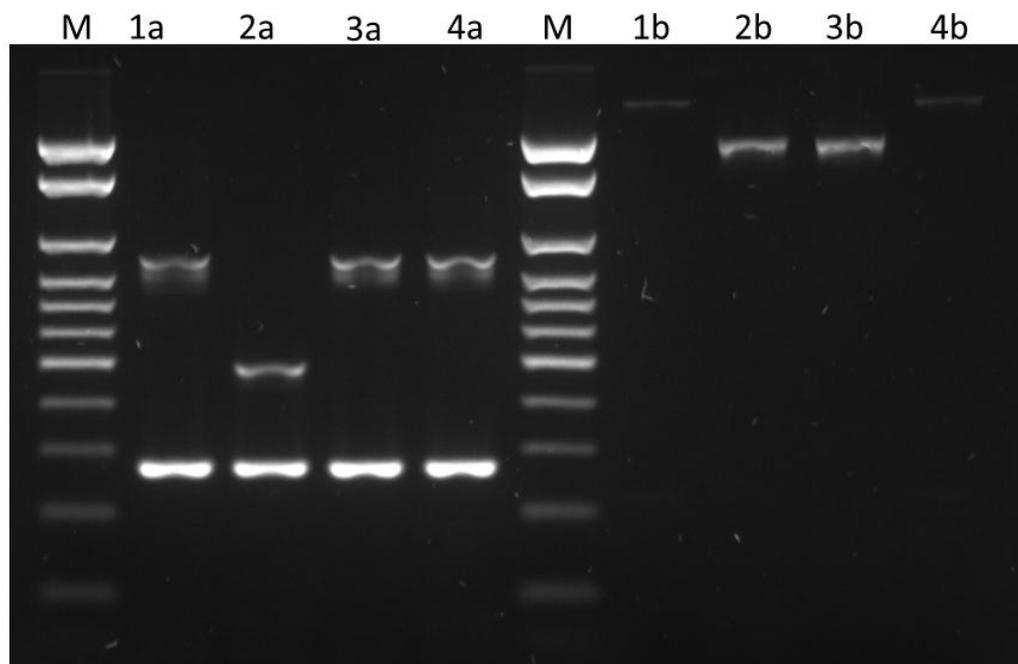
Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

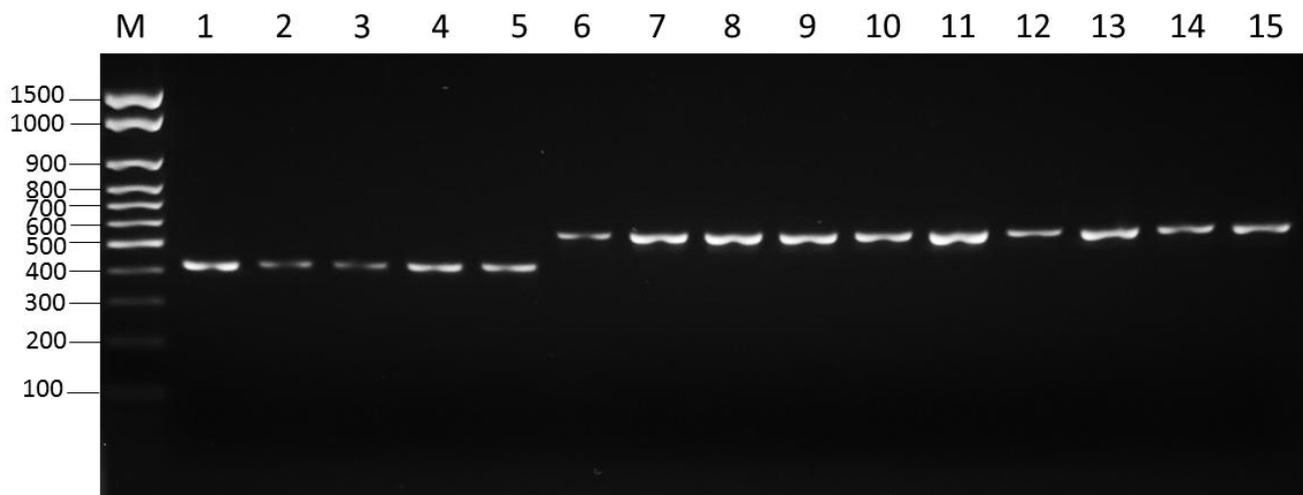
(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do

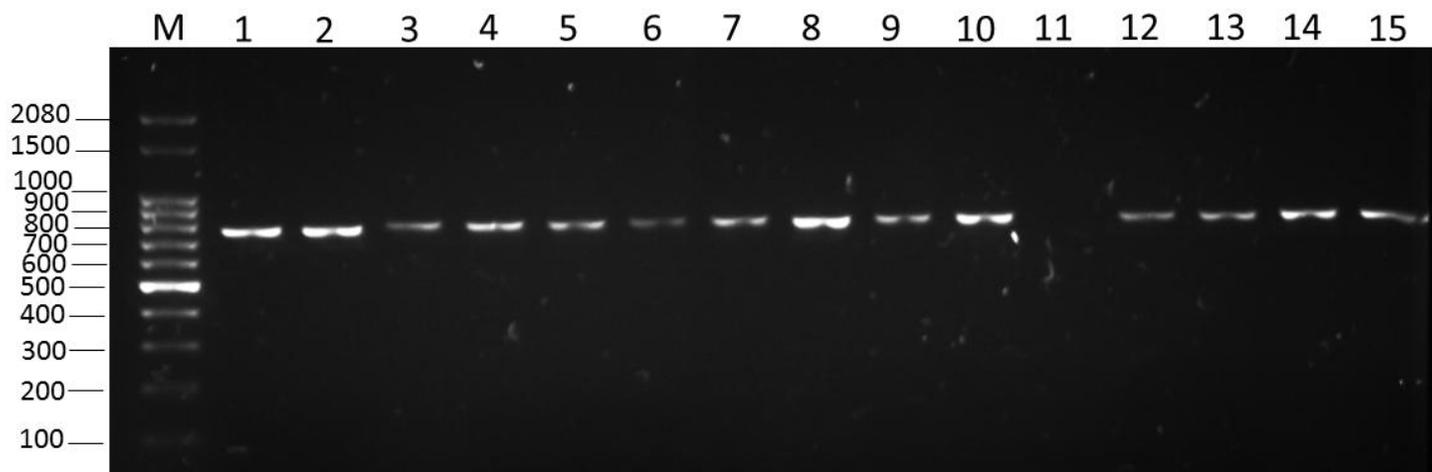
ANEXO II – Géis de PCR para genes de virulência e associados a produção de biofilme



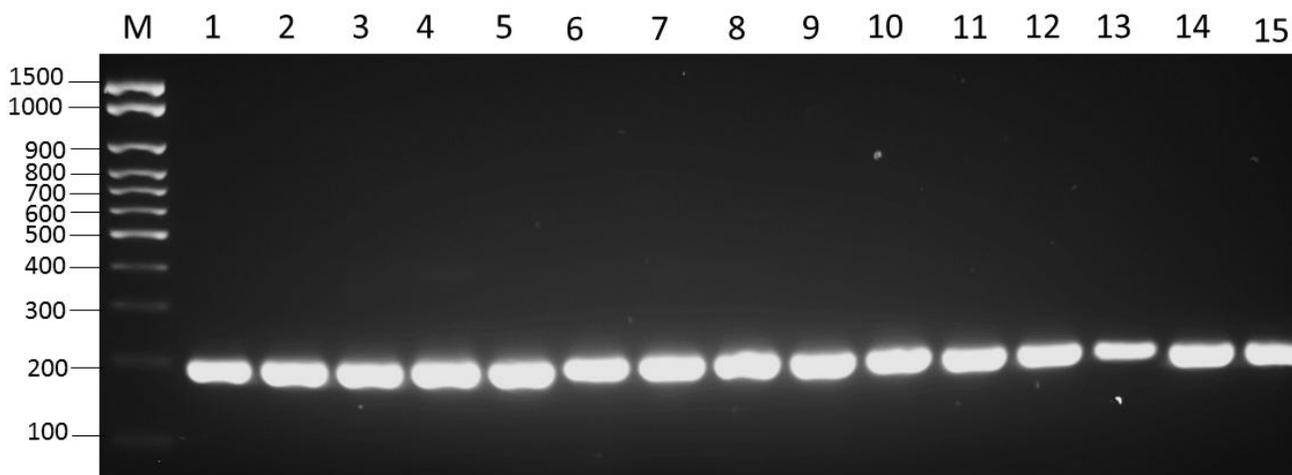
Resultados representativos das reações em cadeia da polimerase M-PCR1 (a) e MPCR-2 (b) para detecção do tipo de *SSCmec*. A coluna M contém o marcador de peso molecular (tamanho em pb). Coluna 1a/2b, SAIV70; coluna 2a/2b, SAIII156; coluna 3a/3b, SAII207; coluna 4a/4b, SAIV495.



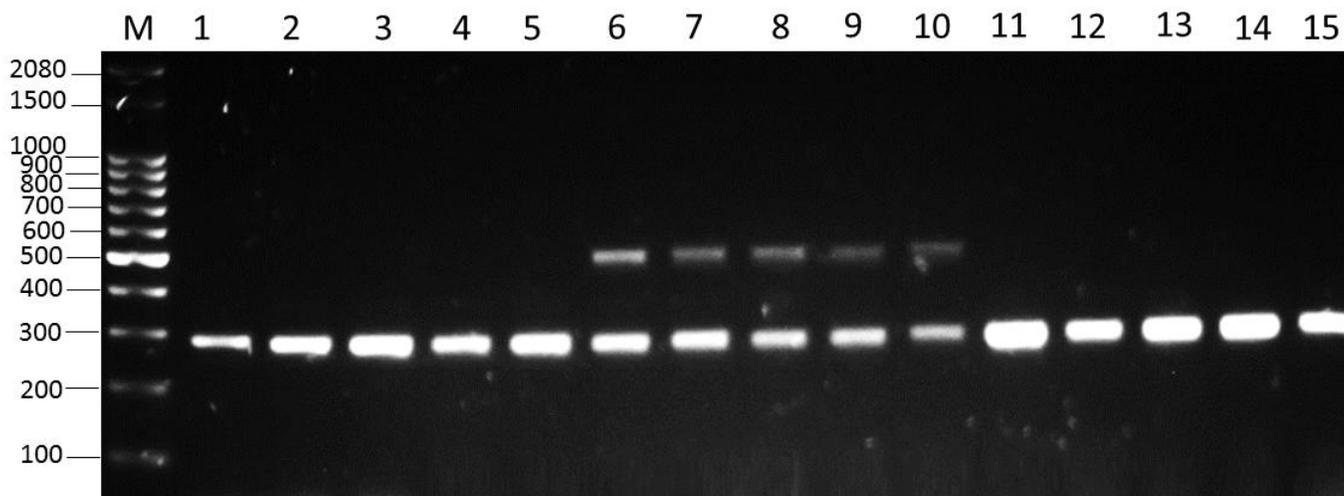
Multiplex PCR para detecção do grupo *agr*. Para distinguir produtos amplificados de tamanho similar, duas reações duplex foram realizadas para cada isolado. A coluna M contém o marcador de peso molecular (tamanho em pb). Colunas 1 a 15, produtos amplificados utilizando os primers *agrI* e *agrII* (440 pb para grupo *agr I* e 572 pb para grupo *agr II*), coluna 1, SAIII06; coluna 2, SAIII29; coluna 3, SAIII32; coluna 4, SAIII108; coluna 5, SAIII156, coluna 6, SAII68; coluna 7, SAII207; coluna 8, SAII376; coluna 9, SAII397; coluna 10, SAII483; coluna 11, SAIVU70; coluna 12, SAIV321; coluna 13, SAIV333; coluna 14, SAIV495; coluna 15, SAIV533.



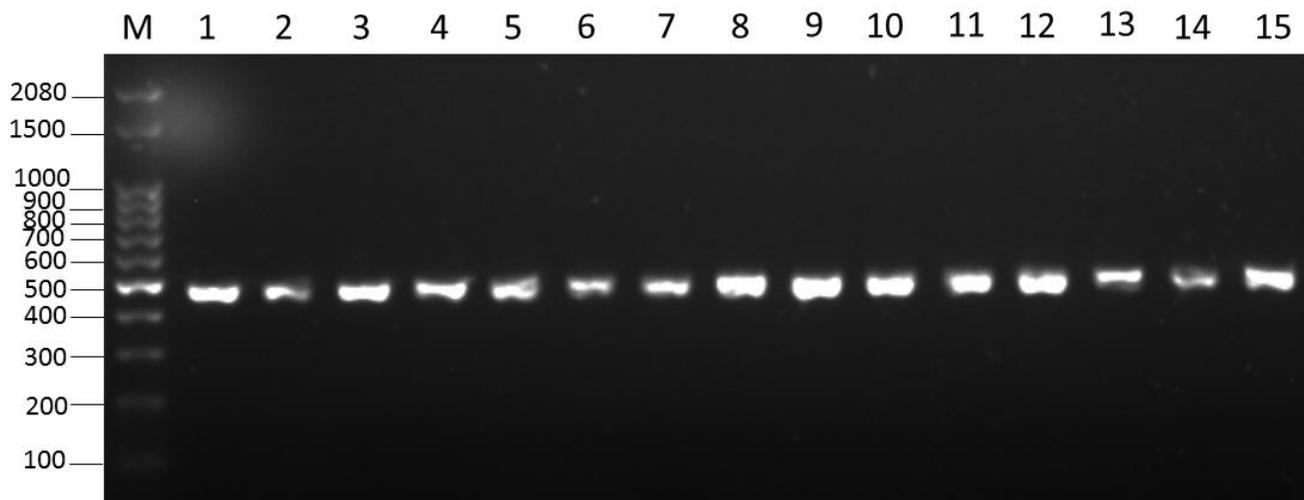
Ensaio de PCR para detecção do gene *icaA* (752 pb) . A coluna M contem o marcador de peso molecular (tamanho em pb). Coluna 1, SAIII06; coluna 2, SAIII29; coluna 3, SAIII32; coluna 4, SAIII108; coluna 5, SAIII156, coluna 6, SAII68; coluna 7, SAII207; coluna 8, SAII376; coluna 9, SAII397; coluna 10, SAII483; coluna 11, SAIVU70; coluna 12, SAIV321; coluna 13, SAIV333; coluna 14, SAIV495; coluna 15, SAIV533.



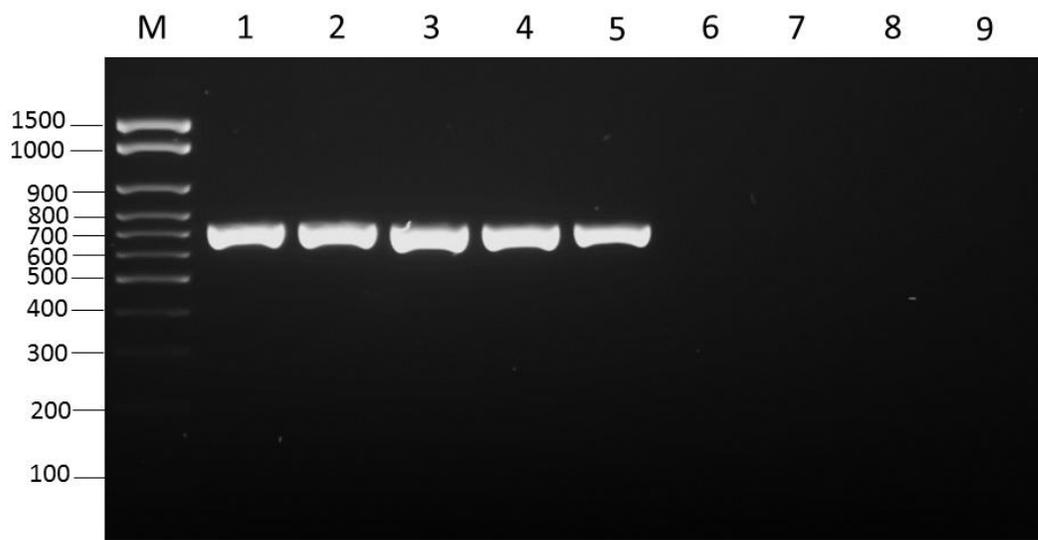
Ensaio de PCR para detecção do gene *icaD* (198 pb). A coluna M contem o marcador de peso molecular (tamanho em pb). Coluna 1, SAIII06; coluna 2, SAIII29; coluna 3, SAIII32; coluna 4, SAIII108; coluna 5, SAIII156, coluna 6, SAII68; coluna 7, SAII207; coluna 8, SAII376; coluna 9, SAII397; coluna 10, SAII483; coluna 11, SAIVU70; coluna 12, SAIV321; coluna 13, SAIV333; coluna 14, SAIV495; coluna 15, SAIV533.



Ensaio de PCR para detecção do gene *fnbB* (524 pb) e *clfA* (292 pb). A coluna M contém o marcador de peso molecular (tamanho em pb). Coluna 1, SAI168; coluna 2, SAI207; coluna 3, SAI376; coluna 4, SAI397; coluna 5, SAI483, coluna 6, SAII06; coluna 7, SAII29; coluna 8, SAII32; coluna 9, SAII108; coluna 10, SAII156; coluna 11, SAIVU70; coluna 12, SAIV321; coluna 13, SAIV333; coluna 14, SAIV495; coluna 15, SAIV533.

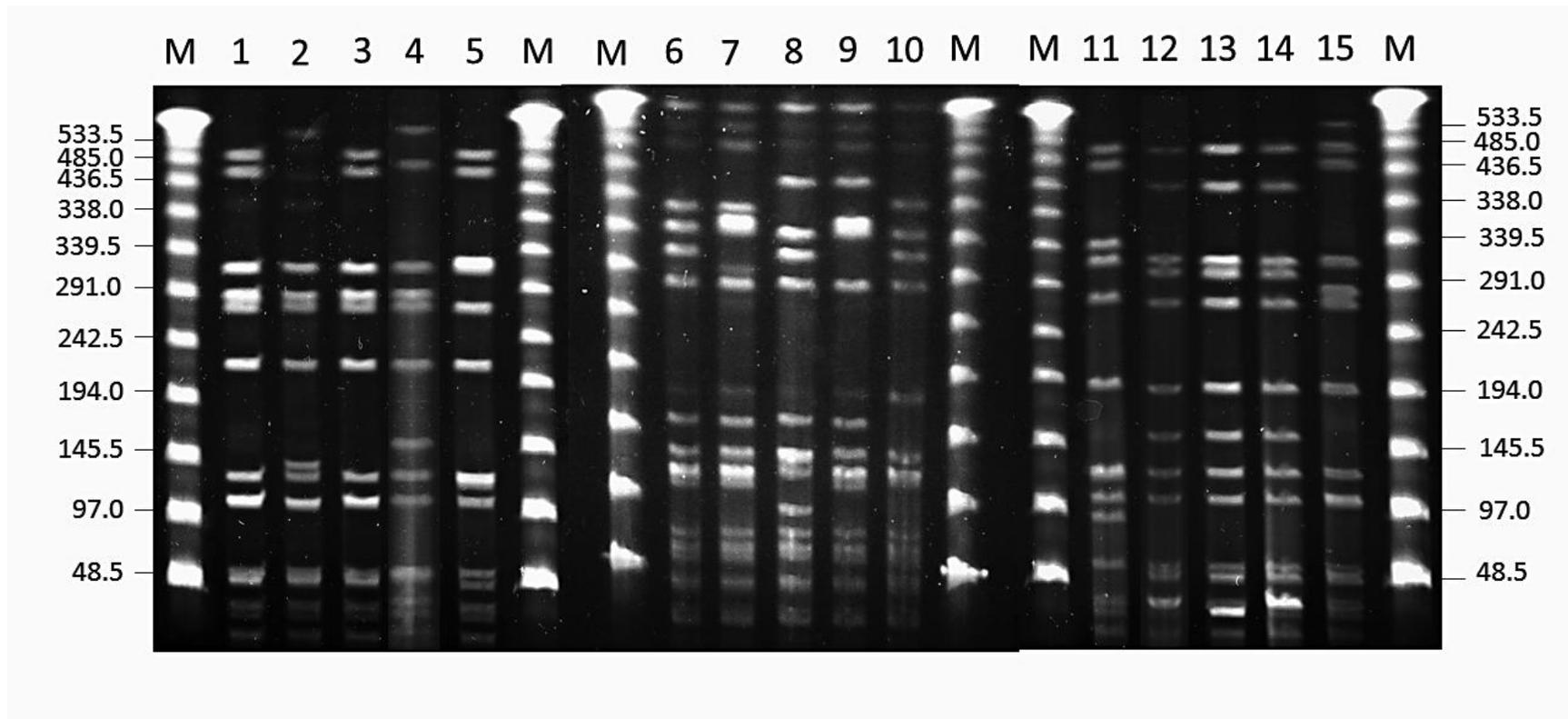


Ensaio de PCR para detecção do gene *sasC* (489 pb). A coluna M contém o marcador de peso molecular (tamanho em pb). Coluna 1, SAI168; coluna 2, SAI207; coluna 3, SAI376; coluna 4, SAI397; coluna 5, SAI483, coluna 6, SAII06; coluna 7, SAII29; coluna 8, SAII32; coluna 9, SAII108; coluna 10, SAII156; coluna 11, SAIVU70; coluna 12, SAIV321; coluna 13, SAIV333; coluna 14, SAIV495; coluna 15, SAIV533.



Resultados representativos da reação em cadeia da polimerase para detecção da sequência de inserção *IS256* (*IS256*, 762 pb). A coluna M contém o marcador de peso molecular (tamanho em pb). Coluna 1, SAI106; coluna 2, SAI129; coluna 3, III32; coluna 4, SAI1108; coluna 5, SAI1156, coluna 6, SAI168; coluna 7, SAI1207; coluna 8, SAI1VU70; coluna 9, SAI1V495.

ANEXO III



Perfis clonais de DNA de 15 amostras clínicas de MRSA baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE). As colunas M contêm o marcador de peso molecular (tamanho em kb). Coluna 1, SAI68; coluna 2, SAI207; coluna 3, SAI376; coluna 4, SAI397; coluna 5, SAI483, coluna 6, SAIII06; coluna 7, SAIII29; coluna 8, SAIII32; coluna 9, SAIII108; coluna 10, SAIII156; coluna 11, SAIVU70; coluna 12, SAIV321; coluna 13, SAIV533; coluna 14, SAIV495; coluna 15, SAIV333.

