



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAQUEL SOARES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE  
INFECÇÕES INVASIVAS EM UM HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DO SUL DO BRASIL**

---

Londrina  
2021

RAQUEL SOARES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE  
INFECÇÕES INVASIVAS EM UM HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Márcia Regina Eches Perugini

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Raquel Soares da Silva.

CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE INFECÇÕES INVASIVAS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO SUL DO BRASIL / Raquel Soares da Silva. - Londrina, 2021.  
49 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada-Ogatta .

Coorientador: Márcia Regina Eches Perugini.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2021.

Inclui bibliografia.

1. *Staphylococcus aureus* - Tese. 2. Multiresistência - Tese. 3. Leucocidina de Panton-Valentine - Tese. 4. Toxina da Síndrome do Choque Tóxico - Tese. I. Fumie Yamada-Ogatta, Sueli. II. Regina Eches Perugini, Márcia. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 616-092

RAQUEL SOARES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE  
INFECÇÕES INVASIVAS EM UM HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado  
em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da  
Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucy Megumi Yamauchi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 13 de maio de 2021.

## *DEDICATÓRIA*

*A meus pais, por me apoiarem desde o princípio, com quem eu posso contar a todo momento, bom ou ruim, feliz ou triste.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, porque sem Ele não teria chegado aqui. Em todos os momentos foi meu socorro bem presente, quando a fé vacilava, Ele chegava e me pegava no colo e por Ele venci.

A minha família, meus pais e meus irmãos, que me apoiaram e estiveram comigo, quando eu queria desistir eles me incentivavam a continuar, em quem eu apoiava e por quem muitas vezes chorei sozinha e escondido para não perceberem que eu não estava tão bem quanto parecia. A minha avó, meus tios, meus primos que estavam comigo, sentiam saudade e mesmo indiretamente desejavam apenas coisas boas e quando me encontravam me perguntavam: “E aí fia? Como tá o mestrado?”; “Já é nossa mestra?”. Amo muito todos.

Às minhas professoras, Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Eches Perugini e Dr<sup>a</sup>. Sueli Fumie Ogatta que me aturaram e quando eu não conseguia mais, me pegaram pela mão e me fizeram concluir essa etapa da minha vida, doaram seu tempo, seu trabalho, seus conhecimentos. Não tenho palavras nem como agradecer à elas por tudo que fizeram. Agradeço aos demais professores que colaboraram diretamente e indiretamente com o trabalho e estavam sempre juntos em convivência.

Aos meus colegas de laboratório e mestrado que compartilharam tantos momentos e diversos sentimentos, discutíamos resultados, curiosidades, técnicas e essa a melhor parte. Ao Felipe, que foi o anjo que Deus colocou no meu caminho, foi meu companheiro, me ensinando as técnicas de biologia molecular, compartilhando todos seus conhecimentos, às vezes, me irritando mais do que deveria, mas foi o melhor companheiro de caminhada que alguém poderia ter. Ao Thiago, que mais me irritava do que ajudava, mas em momentos sérios soube me dar umas broncas, me ensinou a usar o Medley, me ensinou a ser um pouco mais meticolosa nas técnicas, um companheiro e tanto no laboratório e fora dele. À Carolzinha, minha parceirinha, companheira de faculdade, de mestrado, de vida, de laboratório, que me incentivava todos os dias a levantar e ir para o laboratório, foram seis anos de muito aprendizado e companheirismo. Ao Guilherme, à Daniela, à Giovana, à Gabi, à Ana, à Patrícia que compartilharam diversos momentos no laboratório, que me suportaram quando me bateu a “neura” da limpeza e da organização, e são responsáveis por diversas risadas e momentos muito felizes no laboratório.

Aos funcionários da universidade, todos foram essenciais. Aos funcionários dos laboratórios que sempre estavam dispostos a ajudar de alguma forma: à Sueli, ao Fábio, ao Sidney, à Jussevânia, à Gerusa e à Gê (esterilização).

*"A vitalidade é demonstrada não apenas pela persistência, mas pela capacidade de começar de novo."*

*F. Scott Fitzgerald*



ILVA, Raquel Soares; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie. **Caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados de infecções invasivas em um hospital universitário do sul do Brasil**. 2021. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

## RESUMO

**Introdução:** *Staphylococcus aureus* é um importante agente colonizador de mucosas em humanos e animais. Em condições predisponentes pode causar infecções leves e graves. A presença de alguns fatores de virulência colabora para que seja uma bactéria potencialmente letal. A Leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL) é um importante fator de virulência por causar a pneumonia necrotizante em infecções adquiridas na comunidade. Com a mistura de nichos, microrganismos de hospital e comunidade, não tem mais um perfil bem definido, portanto a troca genes de resistência e virulência tem tornado os microrganismos cada dia mais resistentes e mais virulentos. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi avaliar as características fenotípicas e genotípicas de *S. aureus* isolados de materiais clínicos provenientes de infecções invasivas. **Materiais e métodos:** Foram avaliados isolados de *S. aureus* provenientes de amostras clínicas de infecções invasivas. Por metodologia automatizada foi determinado o perfil de sensibilidade dos isolados. Por PCR foi determinada a presença dos genes *mecA*, *tst*, *LukS-PV* e *LukF-PV* além da tipagem SCCmec para isolados *mecA* positivos. **Resultados:** Pode-se observar resistência à penicilina (98,0%), eritromicina (72,4%), oxacilina (69,4%), clindamicina (69,4%), ciprofloxacina (57,1%), gentamicina (8,2%), sulfametoxazol+trimetoprim (6,1%) e rifampicina (5,1%). Todos isolados foram sensíveis à linezolida e à tigeciclina e um isolado foi susceptível a todos antimicrobianos. A presença do gene *mecA* foi observada em 64 isolados (65,3%), destes a prevalência de SCCmec foi: I (6,3%), II (62,5%), III (6,3%), IV (18,6%), V (3,1%), VI (1,6%) e Não Tipável (1,6%). A presença dos genes de virulência foi de 99% para *icaA*, 50% para *lukS-PV/lukF-PV* e 27,6% para *tst*. **Conclusão:** Este estudo encontrou uma alta prevalência de *S. aureus* multirresistente com a presença dos genes de virulência da Leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL) e da toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST).

**Palavras-chave:** multirresistência; leucocidina de *panton-valentine*; toxina da síndrome do choque tóxico.

SILVA, Raquel Soares; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie. **Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from invasive infections in a university hospital in southern Brazil**. 2021. 49 p. Dissertation (Masters in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Staphylococcus aureus* is an important mucosal colonizing agent in humans and animals. In predisposing conditions it can cause mild and severe infections. The presence of some virulence factors contributes to create a potentially lethal bacterium. Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) is an important virulence factor for causing necrotizing pneumonia in infections acquired in the community. With the mixture of niches, hospital and community microorganisms, it no longer has a well-defined profile, so the exchange of resistance and virulence genes has made microorganisms increasingly resistant and virulent. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the phenotypic and genotypic characteristics of *S. aureus* isolated from clinical materials from invasive infections. **Materials and methods:** *S. aureus* isolates from clinical samples of invasive infections were evaluated. The sensitivity profile of the isolates was determined by automated methodology. The presence of the *mecA*, *tst*, *lukS-PV* and *lukF-PV* genes was determined by PCR in addition to the SCC*mec* typing for positive *mecA* isolates. **Results:** Resistance to penicillin (98.0%), erythromycin (72.4%), oxacillin (69.4%), clindamycin (69.4%), ciprofloxacin (57.1%), gentamicin (8.2%), sulfamethoxazole + trimethoprim (6.1%) and rifampicin (5.1%). All isolates were sensitive to linezolid and tigecycline and one isolate was susceptible to all antimicrobials. The presence of the *mecA* gene was observed in 64 isolates (65.3%), of these the prevalence of SCC*mec* was: I (6.3%), II (62.5%), III (6.3%), IV (18.6%), V (3.1%), VI (1.6%) and Non-Typable (1.6%). The presence of virulence genes was 99% to *icaA*, 50%, to *lukS-PV* / *lukF-PV* and 27.6% to *tst*. **Conclusion:** This study found a high prevalence of multidrug-resistant *S. aureus* with the presence of the leukocidin virulence genes of Pantone-Valentine (PVL) and the toxin of the Toxic Shock Syndrome (TSST).

**Keywords:** multidrug-resistance; leukocidin from pantone-valentine; toxin from toxic shock syndrome.

## LISTA DE FIGURAS

### DISSERTAÇÃO

**Figura 1** – Representação esquemática da organização genética e estrutural dos cassetes cromossômicos estafilocócicos *mec* (SCC*mec*) I ao XIII..... 17

### ARTIGO

**Figure 1** – The banding pattern obtained by REP-PCR based on Dice similarity coefficient showing the genetic relatedness of MRSA harboring the *lukS-PV/lukF-PV* genes..... 34

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1</b> – Distribution of antimicrobial resistance profile of methicillin-susceptible and methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from patients with invasive infections admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.....	29
<b>Table 2</b> – Distribution of virulence encoding genes profile in methicillin-susceptible and methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from inpatients with invasive infections admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.....	31
<b>Table 3</b> – Relationship among the antimicrobial resistance profile, SCC <i>mec</i> types and virulence encoded genes profile of 65 <i>mecA</i> -harboring MRSA isolated from patients with invasive infections admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil .....	32
<b>Table 4</b> – Distribution of MRSA harboring the <i>lukS-PV/lukF-PV</i> and <i>tst</i> genes isolated from patients admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.....	33

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	AGENTE ETIOLÓGICO - <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
1.2	INFECÇÃO POR <i>S. aureus</i> .....	14
1.3	RESISTÊNCIA AOS B-LACTÂMICOS .....	15
1.4	<i>COMMUNITY – ACQUIRED</i> MRSA E <i>HOSPITAL-ACQUIRED</i> MRSA.....	18
1.5	FATORES DE VIRULÊNCIA .....	19
1.6	EPIDEMIOLOGIA .....	20
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	24
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AGENTE ETIOLÓGICO - *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

O gênero *Staphylococcus* foi inicialmente descrito por Ogston (1881) Alexander Ogston em 1881, que classificou o gênero ao grupo dos micrococos causadores de inflamação e supuração. Ele foi o primeiro a diferenciar *Staphylococcus* spp. de *Streptococcus* spp. Porém mais formalmente o gênero foi descrito por Rosenbach em 1884, que subdividiu o gênero em duas espécies: *Staphylococcus albus* e *Staphylococcus aureus*. Até que por volta dos anos 60, Silvestri e Hill (1965) investigaram a relação do conteúdo C+G do DNA de bactérias pertencentes a esses gêneros, reforçando a diferenciação entre ambos (GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006; OGSTON, 1881) Durante as décadas de 60, 70, 80 e 90 vários estudos foram feitos deixando mais evidentes as diferenças entre as espécies. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possuem 54 espécies e 28 subespécies(LPSN, 2019).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e as espécies caracterizam-se como células esféricas, chamadas cocos, com diâmetro entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$  e Gram-positivas. As células podem apresentar-se isoladas, aos pares, em tétrades, em cadeias curtas ou, mais comumente, aos cachos; são anaeróbias facultativas e catalase positivas (enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio) (BRADLEY, 2015; GAJDÁCS, 2019; LEE et al., 2018b). São microrganismos versáteis, pois conseguem sobreviver por um longo período de tempo, em superfícies bióticas e abióticas, cerca de 40 dias, e têm a capacidade de se desenvolver em condições adversas como ambientes de baixa umidade, locais de restrição nutricional e pressão osmótica elevada (ZARPELLON et al., 2015).

A capacidade de produzir ou não coagulase (ativador de protrombina) classifica esse gênero de bactérias em estafilococos coagulase-negativa ou coagulase-positiva. *S. aureus* é a principal espécie representante dos estafilococos coagulase-positiva. Este microrganismo pode colonizar mucosas e pele sem necessariamente causar danos ao hospedeiro, porém em condições predisponentes pode causar infecções localizadas ou sistêmicas desde infecção de pele e mucosas até infecções invasivas como bacteremias, pneumonias, osteomielites e endocardites podendo levar o indivíduo ao óbito (WAN et al., 2017).

É um agente colonizador de 20 a 30% da população saudável e participa da microbiota normal por longos períodos de forma transitória, permanente ou intermitente (CHEN et al., 2017; DEN HEIJER et al., 2013; GORWITZ et al., 2008; OLUFUNMISO; TOLULOPE; ROGER, 2017; SAADATIAN-ELAHI et al., 2013). A adesão bacteriana ao epitélio do hospedeiro se dá por diversos fatores: associados à parede celular (ácido teicóico glicosilado e fator de aglomeração B); receptores das células epiteliais (citoqueratina-10 e loricina); evasão do sistema de defesa do

hospedeiro (inibidor estafilocócico do complemento (SCIN) e proteína ligadora de fibrinogênio extracelular (Fib)); e competição com outros microrganismos da microbiota local. ( FOSTER et al., 2014; MULCAHY et al., 2012; WALSH et al., 2004; WINSTEL et al., 2015). A adesão, associada a outros fatores de virulência bacteriana e fatores predisponentes do hospedeiro, tem um papel importante nas infecções causadas por *S. aureus*. (WAN et al., 2017).

O ácido teicóico presente na parede celular do *S. aureus*, é responsável pela adesão bacteriana ao epitélio escamoso das narinas anteriores (principal sítio de colonização do *S. aureus*) (BURIAN et al., 2010). Porém outras proteínas da parede celular podem desempenhar papel importante na adesão ao epitélio são chamadas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), tradução livre: componente da superfície microbiana que reconhece molécula de matriz adesiva. Entre elas o fator de aglutinação B que liga-se à loricrina e/ou à citoqueratina 10 (Componentes das células epiteliais nasais), o que favorece a colonização pelo *S. aureus* (FOSTER et al., 2014).

## 1.2 INFECÇÃO POR *S. AUREUS*

A infecção por *S. aureus* se dá pelo rompimento de diversas barreiras do organismo humano pelo agente etiológico. Essas barreiras são: mecânica (pele, cílios e muco nasal), química (enzimas presentes na saliva, lágrimas e secreções nasais), microbiológica (microbiota intestinal, genital, da pele, estomacal, etc.) e imunológica (anticorpos primários, células reconhecedoras de antígenos) (KWIECIEN et al., 2019). Após romper essas barreiras o *S. aureus* pode adentrar a corrente sanguínea, se replicar e disseminar para diversos locais do corpo, causando diversas manifestações, desde leves a graves (WALSH et al., 2004).

Infecções cutâneas são muito comuns devido presença de *S. aureus* na microbiota da pele, cerca de 70 a 80% das infecções cutâneas são causadas por esse microrganismo (TONG et al., 2015). Outros sítios anatômicos podem ser acometidos pela infecção de forma primária ou secundária, entre eles o tecido sanguíneo (bacteremia), pulmão (pneumonia), tecido cardíaco (endocardite), tecido ósseo (osteomielite), tecido articular (artrite séptica), meningite, infecção do trato urinário, infecção em tecidos periprotéticos, entre outras. Cada sítio de infecção possui sinais e sintomas característicos, porém os sintomas mais comuns são: febre, vermelhidão, secreções e dores: nas pneumonias o paciente pode apresentar tosse e dor no peito; na meningite dor de cabeça e nas infecções do trato urinário, dor ao urinar. (TONG et al., 2015).

Um dos principais fatores que contribuem para a infecções invasivas por *S. aureus* em ambiente hospitalar é o uso de dispositivos médicos invasivos, como próteses ortopédicas, dispositivos para ventilação mecânica, cateteres venosos centrais e periféricos, materiais implantados cirurgicamente, entre outros. Condições predisponentes do paciente também é muito

importante para determinar a infecção por *S. aureus*, pois pacientes com terapia imunossupressora, diabetes, hipertensão, câncer, entre outras comorbidades médicas estão mais susceptíveis à infecção invasiva por *S. aureus* (THOMER; SCHNEEWIND; MISSIAKAS, 2016).

Além dos fatores de risco já mencionados, idade avançada, longos períodos de internação hospitalar, alimentação enteral, dispositivos intravenosos, presença de lesões cutâneas, úlceras e terapia antimicrobiana, permanência em um quarto de hospital ocupado anteriormente por um paciente infectado, colonização prévia, hospitalização e/ou cirurgia prévia ou prolongada, internação em UTI, hemodiálise, também estão associados à infecção por *S. aureus* (HUANG; DATTA; PLATT, 2006; LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Os antimicrobianos mais utilizados no mundo são da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, chegando à 65% das prescrições de antimicrobianos nos Estados Unidos da América (BUSH; BRADFORD, 2016). Essa classe de antimicrobianos é a primeira escolha para tratamento de infecções comunitárias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas e para tratamentos empíricos de algumas infecções hospitalares. As subclasses pertencentes a esse grupo são as penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactams (FISHER; MOBASHERY, 2020)

*S. aureus* é um importante patógeno, com alta capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos e causar infecções graves com altas taxas de morbidade e mortalidade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou em 2017 uma lista de patógenos prioritários para Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), na qual foram classificados em Prioridade 1 (Crítico), Prioridade 2 (Alta) e Prioridade 3 (Média). Com incidência anual de 4.3 a 38.3 casos por 100.000 pessoas/ano nos Estados Unidos (HOLLAND; ARNOLD; FOWLER, 2014), *S. aureus* está listado como prioridade 2, que demonstra a preocupação das organizações de saúde com este patógeno (WHO, 2017a).

### **1.3 RESISTÊNCIA AOS B-LACTÂMICOS**

Antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos são agentes bactericidas que interrompem a formação da parede celular bacteriana inibindo a síntese de peptídeoglicano. Todas as subclasses possuem um anel  $\beta$ -lactâmico com um grupo amida ligado a outros diferentes anéis. A função do anel  $\beta$ -lactâmico é ligar-se à proteína ligadora de penicilina (PBP) e interromper, por acilação, a transpeptidase bacteriana (FISHER; MOBASHERY, 2020).

Em 1928 foi descoberto um dos antimicrobianos mais utilizados pela medicina, responsável por combater diversas infecções bacterianas, a penicilina. Em 1941, após a comercialização da penicilina, se tornou um marco para a segunda guerra mundial por



revolucionar o tratamento dos combatentes. Porém, por tem sido usada tão intensamente, dois anos após ser inserida no mercado, houve relatos de *S. aureus* resistentes à penicilina. (NOVICK; BOUANCHAUD, 1971; RAMMELKAMP; MAXON, 1942).

A resistência de *S. aureus* à penicilina (*Penicillin-resistant Staphylococcus aureus*, PRSA) se dá pela produção de penicilinasas, enzimas responsáveis por inativar o anel  $\beta$ -lactâmico. O gene *blaZ* que codifica a produção dessa enzima se encontra em um plasmídeo, elemento genético móvel, o que torna fácil a transferência desse gene de um microrganismo para outro (RAMMELKAMP; MAXON, 1942).

Com o surgimento do PRSA houve a necessidade de novas pesquisas e desenvolvimento de novos antimicrobianos. No final da década de 50 foi desenvolvida a meticilina (Celbenin), uma penicilina semissintética resistente à penicilinase pela adição de um radical no carbono  $\alpha$  do anel  $\beta$ -lactâmico (HARKINS et al., 2017).

Entretanto já em 1961, houve os primeiros relatos de *S. aureus* resistente à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) no Reino Unido (HARKINS et al., 2017; JEVONS, 1961; LOBANOVSKA; PILLA, 2017). O mecanismo de resistência à meticilina foi descrito pela primeira vez em 1978 por Spratt (1978) em *Escherichia coli*. Após três anos da sua primeira descrição, este foi descrito em *S. aureus* por HARTMAN & THOMASZ (1981) (SPRATT, 1978).

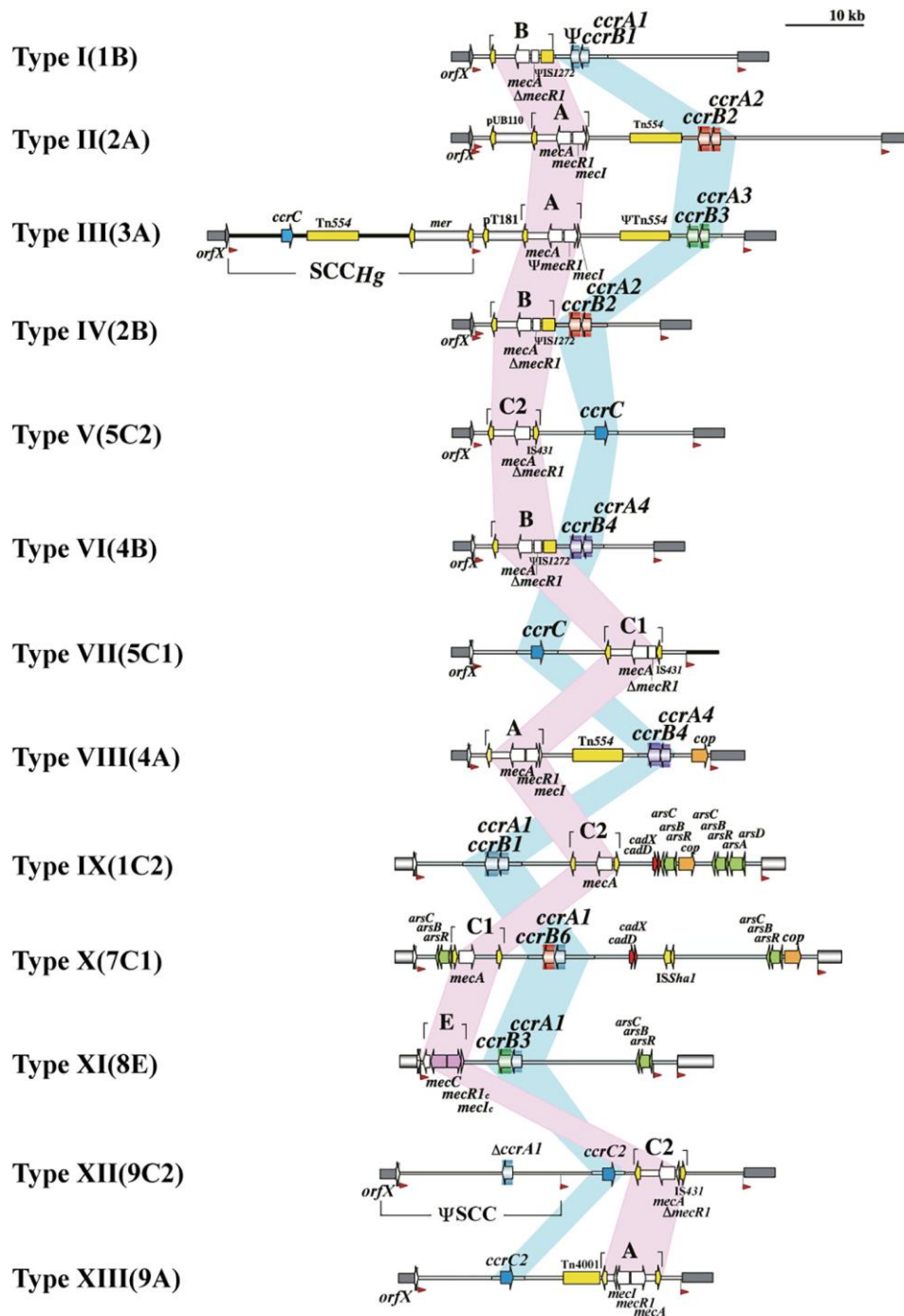
O mecanismo de resistência à meticilina se dá pela alteração da proteína do sítio de inserção do antimicrobiano, a *Penicillin-Binding Protein* (PBP). A PBP alterada se denomina PBP2a ou PBP2'. A alteração dessa proteína não apenas confere resistência à meticilina e oxacilina, mas também resistência cruzada a todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e a maioria das cefalosporinas (HARTMAN; TOMASZ, 1981; LEE et al., 2018a; SASSINE et al., 2017).

A resistência à meticilina é mediada pelo gene *mec*, que podem variar entre *mecA*, *mecB*, *mecC* e *mecD* alocados em uma região do genoma bacteriano conhecida como *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) e adquirida por transferência horizontal através de um elemento genético móvel que pode ser facilmente transferido entre *Staphylococcus* spp. O gene *mec* é acompanhado por genes reguladores (*mecR1* e *mecI*) e complexo *ccr* (*ccrA*, *ccrB* e *ccrC*) que codifica recombinases responsáveis pela mobilidade do cassete cromossômico. A combinação do gene *mec* e alótipo do gene *ccr* quanto à sua organização genética e estrutural classifica o cassete cromossômico SCC*mec* em 13 tipos (I a XIII) como demonstrado na Figura 1 (BAIG et al., 2018; HIRAMATSU et al., 2013; KAYA et al., 2018; LEE et al., 2018b; LIU et al., 2016).

O gene *mecD*, foi relatado em 2017 com 66% de identidade com o gene *mecB* em uma análise de sequência nucleotídica. Esse gene foi encontrado em *Macroccoccus caseolyticus* isolados de cães e bois e confere resistência a todas as classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos,

incluindo ceftobiprole e ceftarolina que foram desenvolvidos para tratar infecções por MRSA (SCHWENDENER; COTTING; PERRETEN, 2017).

**Figura 1** – Representação esquemática da organização genética e estrutural dos cassetes cromossômicos estafilocócicos *mec* (SCC*mec*) I ao XIII.



As estruturas globais dos 13 tipos SCC*mec* reconhecidos por IWG-SCC são ilustradas com base nas seguintes sequências nucleotídicas (tipo SCC*mec*), ID do isolado (número de acesso do *GenBank*): tipo I, NCTC10442 (AB033763); tipo II, N315 (D86934); tipo III, 85/2082 (AB037671); tipo IV, CA05 (AB063172); tipo V, WIS [WBG8318] (AB121219); tipo VI, HDE288 (AF411935); tipo VII, JCSC6082 (AB373032); tipo VIII, C10682 (FJ390057); tipo IX, JCSC6943 (AB505628); tipo X, JCSC6945 (AB505630); tipo XI, LGA251 (FR821779.1); tipo XII, BA01611 (KR187111); e tipo XIII, 55-99-44 (MG674089). As repetições diretas que compreendem sequências do sítio de integração do SCC estão localizadas em ambas as extremidades do SCC*mec* (setas vermelhas). Os complexos do gene *mec* e *ccr* são sombreados de rosa e azul, respectivamente. Sequências de inserção e transposons identificados são indicados em amarelo. Genes relacionados à resistência a metais pesados e plasmídeos integrados localizados nas regiões J também são indicados. Fonte: (BAIG et al., 2018).

#### 1.4 COMMUNITY – ACQUIRED MRSA E HOSPITAL-ACQUIRED MRSA

Entre os anos de 60 e 90 infecções por MRSA era geralmente associada a ambiente de saúde. Por volta da década de 90, surgiram casos de infecções por MRSA em indivíduos que não tiveram hospitalização prévia, sendo assim necessário uma definição para MRSA adquiridos em ambiente hospitalar (*Hospital-acquired Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, HA-MRSA) e MRSA adquirido na comunidade (*Community-acquired Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, CA-MRSA) (THOMER; SCHNEEWIND; MISSIAKAS, 2016).

Inicialmente, CA-MRSA era caracterizado por apresentar maior taxa de virulência, baixa taxa de resistência à clindamicina e eram predominantemente SCC*mec* tipos IV e V. Isolados HA-MRSA eram predominantemente SCC*mec* tipos I, II e III com altas taxas de resistência a antimicrobianos (TURNER et al., 2019).

Houve uma mudança na classificação desses microrganismos pelas características anteriormente aplicadas à diferenciação de CA e HA-MRSA não ser mais tão evidentes. Portanto, culturas positivas para MRSA de indivíduo oriundo da comunidade ou com 48 horas ou menos de hospitalização, classifica esse isolado como CA-MRSA, sendo que o indivíduo não deve ter histórico de hospitalização, cirurgia, diálise, cateter de demora e nenhuma cultura positiva de MRSA no último ano (BUCK et al., 2005).

Essas definições, no entanto, subestimam a epidemiologia de *S. aureus*, pois essas características começaram a homogeneizar-se, demonstrando que CA-MRSA e HA-MRSA pode invadir outros nichos epidemiológicos (LAKHUNDI; ZHANG, 2018; TURNER et al., 2019). Portanto, definições epidemiológicas moleculares são consideradas as mais confiáveis para rastreamento das cepas de MRSA (TURNER et al., 2019; WANG et al., 2010).

Uma nova terminologia tem sido utilizada, não se tratando apenas de *S. aureus*, e não apenas de hospital ou comunidade, mas uma terminologia que abrange a integralização de ambiente, saúde animal e saúde humana como uma só para adoção de políticas públicas de saúde para prevenção e controle de infecções, *One Health*, em tradução livre “Saúde Única” (ACHARYA; SUBRAMANYA; NEUPANE, 2021)

## 1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

A formação de biofilme por *S. aureus* é um fator que desempenha um papel fundamental na patogênese e resistência a antimicrobianos (LUTHER et al., 2018). A taxa de infecções por *S. aureus*, especialmente as cepas resistentes a antibióticos, aumentou drasticamente recentemente, o que está se tornando um problema sério em todo o mundo (GOULD et al., 2012).

O operon *ica* de *S. aureus* contém quatro genes (*ica* ABCD) organizados em uma estrutura denominada *operon-like*. Contudo, a do biofilme se dá, principalmente, pela presença do operon transportador do gene *icaA* (MOULAVI et al., 2019).

Grande parte dos microrganismos são capazes de formar biofilme, esse mecanismo de virulência confere um importante fator de proteção ao produzir uma barreira que contribui para fugir da resposta imune, favorece a troca gênica entre os indivíduos que fazem parte deste biofilme, fornece resistência química e mecânica contra agentes externos e maior resistência aos antimicrobianos (HALL; MAH, 2017; LUAN; CHI; LIU, 2019).

A TSST-1 é uma exotoxina codificada pelo gene *tst*, é responsável por causar uma reação muito extrema do organismo onde é secretada. O resultado dessa reação é chamada de síndrome do choque tóxico (*toxic shock syndrome* – SST) e é caracterizada por febre de início rápido, hipotensão, erupção eritematosa e hiperemia da mucosa, seguida de descamação e falência múltipla de órgãos (DURAND et al., 2006).

O mecanismo de patogenicidade se dá pela ativação direta dos linfócitos T pela TSST-1, que se liga ao receptor de antígeno com forte afinidade, causando a liberação descontrolada de citocinas pró-inflamatórias responsáveis por todo o quadro sintomatológico da SST. Em geral a SST apresenta uma taxa de mortalidade variando de 4 a 22% (NHAN; LECLERCQ; CATTOIR, 2011).

A leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL) é uma citotoxina bi-componente codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* carregados por um elemento genético móvel. A PVL é uma toxina citolítica, capaz de lisar neutrófilos, macrófagos e monócitos. A presença da PVL está associada a infecções de maior patogenicidade, como a pneumonia necrotizante, infecções cutâneas, abscessos, furúnculos e sítios cirúrgicos (SHAHINI et al., 2017)

Até pouco tempo, essa citotoxina era associada à infecções de pele provenientes da comunidade, porém o cenário tem mudado e novos relatos tem sido feito sobre a presença dessa toxina em isolados provenientes de infecções hospitalares e invasivas (BAMBERGER, 2017; GOUDARZI et al., 2019; SHRESTHA, 2013)

## **1.6 EPIDEMIOLOGIA**

A disseminação global de clones específicos de MRSA tem se tornado em grande problema de saúde pública e assim o entendimento da dinâmica de disseminação requer o conhecimento da frequência mundial deste patógeno. Comparações internacionais evidenciam variações importantes na prevalência de infecções por MRSA.

Em estudo recente realizado pelo *National Healthcare Safety Network* (NHSN), do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) nos Estados Unidos, com agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde, entre 2015 e 2017, em que foram avaliados patógenos de 5.626

serviços de saúde, *S. aureus* foi identificado como o segundo patógeno mais frequente (42.132 - 12 %), considerando todos os tipos de IRAS (WEINER-LASTINGER et al., 2020). No entanto, este percentual variou por categoria de infecção e com a unidade de saúde. Considerando todas as unidades de saúde incluídas, em infecções hospitalares associadas a dispositivos invasivos a frequência de 48,4% dos *S. aureus* eram resistentes a metilina. Quando analisado exclusivamente as infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter venoso por unidade de internação, os autores relataram em Unidades de Terapia Intensiva taxas de MRSA de 50%, em enfermarias de 53,8% e em unidades de longa permanência de 77,6%.

Dados reportados à Rede Europeia de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (EARS-Net) embora tenham evidenciado uma tendência decrescente entre 2015-2019, apontam que MRSA continua sendo um patógeno importante de infecções bacterianas graves. Entre os 30 países da União Europeia incluídos em 2019, foram reportados dados de 75.303 *S. aureus*, o segundo microrganismo mais relatado (20,6%). De acordo com a região geográfica, a resistência antimicrobiana de *S. aureus* apresentou grandes variações. Taxas mais baixas de *S. aureus* foram verificadas em países do norte da Europa, como na Noruega (1,1%), e maiores em países do sul e leste, como na Romênia (46,7%) (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC), 2020).

Por outro lado, dados da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO) apontam taxas de MRSA maiores que 80% em alguns países da Ásia (WHO, 2017). No Brasil têm sido relatadas frequências de 34,1% a 85% (ANDRADE et al., 2020; ARIAS et al., 2017; DUARTE et al., 2018; LAKE et al., 2018; PERUGINI et al., 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

*S. aureus* é o principal patógeno causador de infecções adquiridas na comunidade ou no hospital, responsável por taxas de morbidade e mortalidade elevadas no mundo todo. Esse microrganismo pode produzir vários fatores de virulência, entre eles a *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL), responsável pela lise de leucócitos e necrose tecidual. PVL tem sido mais comumente associada a infecções de tecidos e partes moles por *S. aureus* adquiridos na comunidade ou no hospital resistentes ou não à metilina. Atualmente, estudos tem mostrado que esse fator de virulência não está necessariamente associado a infecções de tecidos e partes moles, mas também está associado a infecções invasivas. A prevalência da PVL em *S. aureus* é bastante variável no mundo todo e tem mostrado um aumento em diferentes países como Japão, Estados Unidos da América, China, Alemanha, entre outros. No entanto, há dados limitados sobre essas características na região geográfica do Paraná, mais especificamente na região norte. Portanto, verificou-se a necessidade de um estudo das características fenotípicas e genotípicas dos *S. aureus* causadores de infecções invasivas no Hospital Universitário de Londrina (HUL), para melhor elucidar as cepas presentes nesse meio e melhor manejo dos pacientes com essas infecções.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil de sensibilidade, características fenotípicas e genotípicas de *S. aureus* causadores de infecções invasivas (Aspirado de medula óssea, Fragmento Ósseo, Líquido Cefalorraquidiano, Líquidos intra-cavitários e Sangue).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Avaliar do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.
- b) Identificar a presença do gene de resistência *mecA*
- c) Identificar a presença de genes de virulência (*IcaA*, *tsst*, *pvl*)
- d) Realizar a tipagem molecular *SCCmec*;
- e) Identificar clonalidade dos isolados *mecA* e *pvl* positivos;



## 4 ARTIGO

High prevalence of Panton-Valentine Leukocidin-encoding genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from inpatients with invasive infections at a university hospital in southern Brazil.

Raquel Soares da Silva, Marcia Regina Eches Perugini, Sueli Fumie Yamada-Ogatta

Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

### ABSTRACT

**Background:** *Staphylococcus aureus* is a major cause of a wide diversity of infections in humans, and the expression of Panton Valentine Leukocidin has been associated with severe clinical syndromes.

**Objectives:** The primary aim of the present study was to investigate the prevalence of PVL encoded genes in *S. aureus* isolated from clinical samples of inpatients with invasive infections in a teaching hospital in Southern Brazil.

**Methods:** A total of 98 *S. aureus* isolates recovered from different body sites were characterized according to their antimicrobial susceptibility profile, methicillin-resistance and SCC*mec* typing, genetic relatedness and (co)occurrence of the virulence encoded genes *icaA* from the intercellular adhesion locus (encoding N-acetylglucosaminyl transferase) and *tst* (encoding toxic shock syndrome toxin).

**Results:** One *S. aureus* isolate was susceptible to all antimicrobial agents. Sixty eight (69.4%) isolates were classified as methicillin-resistant and among them, four (5.9%) did not harbor the *mecA* gene. The *mecA*-harboring MRSA isolates were distributed into SCC*mec* types I (6.3%), II (62.5%), III (6.3%), IV (18.6%), V (3.1%), and VI (1.6%). One isolate (1.6%) was classified as non-typeable (NT). Aside methicillin resistance, 69 isolates (70.4%, 9 MSSA and 58 MRSA isolates) displayed resistance to three or more antimicrobial classes and were classified as multidrug-resistant. One *S. aureus* isolate did not harbor any virulence encoding genes analyzed in this study. The other isolates presented at least one gene, and the overall

prevalence was as follows: *icaA*, 99.0%; *tst*, 27.5%; and *lukS-PV/lukF-PV*, 50.0%. The presence of *tst* gene was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in MSSA isolates compared to MRSA.

**Conclusion:** The present study reports a high prevalence of multidrug-resistant *S. aureus* harboring the *lukS-PV/lukF-PV* and *tst* genes in invasive infections. The continuous monitoring of the antimicrobial susceptibility profile and virulence of *S. aureus* is an important measure for the control of infections caused by this bacterium.

**Keywords:** Multidrug-resistance, SCC*mec* typing, REP-PCR fingerprinting, toxic shock syndrome toxin, intercellular adhesion *locus*.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* can be found as colonizer of the various human body sites (Krismer et al., 2017). Nevertheless, this bacterial species is the leading cause of a wide diversity of human infections, ranging from brand skin and soft tissue to life-threatening disseminated infections (Lowy, 1998). Importantly, *S. aureus* has been able to acquire resistance to nearly all antibiotics used to treat it. In fact, penicillin-resistant (Rammelkamp; Maxon 1942) and methicillin resistant (Jevons, 1961) *S. aureus* emerged soon after these beta-lactam agents were introduced into the clinical practice. Currently, a substantial proportion of staphylococcal infections is caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) with persistently high mortality rates (Lakhundi; Zhang 2018; Turner et al., 2019; Andrade et al., 2020).

MRSA was first associated with infections in healthcare settings, including the hospital environments (Healthcare-Associated MRSA, HA-MRSA). However, since the 1980s, it was also emerged as a major cause of staphylococcal infections in the community [(Community-associated MRSA, CA-MRSA), Saravolatz et al., 1982; Tenover; Goering 2009]. Historically, CA-MRSA strains were principally associated with infections in healthy individuals with no apparently identified risk for MRSA infection, and displayed particular features that differed from those of HA-MRSA strains. For instance, CA-MRSA was susceptible to various non-beta-lactam antimicrobials to which HA-MRSA was typically resistant; harbored predominantly the SCC*mec* types IV and V, while the types II and III were frequently detected in HA-MRSA; and expressed several virulence factors and toxins, especially the Pantone-Valentine leukocidin (PVL) that were not commonly observed in HA-MRSA (Vandenesch et al., 2003; Calfee, 2017; Saeed et al., 2018; Lakhund, Zhang 2018).

However, an exchange of ecological niches between these two independent populations has been observed in recent decades, with HA-MRSA isolated outside hospitals and CA-MRSA isolated in hospitals, and exhibiting miscellaneous features (Calfee, 2017; Lakhund, Zhang 2018; Tajik et al., 2020).

Among the *S. aureus* virulence arsenal, invasive infections caused by PVL-positive bacteria have been associated with poor outcome and high mortality rates, regardless of the methicillin-resistance (Sicot et al., 2013; Gillet et al., 2018; Yokomori et al., 2020). The prevalence of *S. aureus* harboring the PVL encoded genes is quite variable worldwide. Nevertheless, an increase in the prevalence of these strains has been reported in several countries (Amin et al., 2020; Iliya et al., 2020; Klein et al., 2020; McGuinness et al., 2021).

University Hospital of Londrina (UHL) is a teaching hospital and a major referral center in the north of Paraná state, Brazil for high complexity cases. The number of MRSA isolates detected in this hospital has increased over the years (Duarte et al., 2018). However, there are limited data on PVL-harboring *S. aureus* in our institution. Therefore, the aim of the present study was to investigate the prevalence of PVL encoded genes in *S. aureus* isolated from clinical samples of inpatients with invasive infections. The isolates were characterized according to their antimicrobial susceptibility profile, genetic relatedness and (co)occurrence of the virulence encoded genes *icaA* from the intercellular adhesion locus (encoding N-acetylglucosaminyl transferase) and *tst* (encoding toxic shock syndrome toxin).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Hospital and bacterial isolates**

The Hospital Universitário de Londrina (HU) of the Universidade Estadual de Londrina (UEL) is a tertiary hospital and a referral center for Sistema Único de Saúde (SUS – a Brazilian governmental healthcare assistance program) for high complexity cases in the north region of the Paraná state, Brazil. It serves patients from about 250 municipalities in Paraná and from more than 100 cities in other states. It has 313 beds distributed among inpatient units, emergency room and intensive care unit (ICU). A total of 98 non-duplicates *S. aureus* isolated from inpatients diagnosed with invasive infection between January 2015 and December 2019 were randomly taken from the bacterial collection of the Laboratory of Clinical Microbiology. The isolates were recovered from blood ( $n=68$ ), bone tissue ( $n=14$ ), bone marrow aspirate

( $n=1$ ), cerebrospinal fluid ( $n=4$ ) and general fluids ( $n=11$ ) and classified according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) definitions of healthcare associated infection (HAI) (Horan et al., 2008). The study protocol was approved by the Ethics Committee of UEL (CAAE number 79663417.2.0000.5231 and approval number 2.421.361). The identification of species was based on phenotypic profile generated by standard methods (Jorgensen et al., 2015). Species identification was confirmed by a multiplex-PCR targeting the *nuc* gene (encoding thermonuclease) according to Hirotaki et al. (2011). Bacteria were stored in Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid, Brazil) containing 30% glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Before the experiments, bacteria were grown in Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia, Brazil) agar at  $35^{\circ}\text{C}$  for 24 h.

### **Antibacterial susceptibility profile**

The isolates were tested for susceptibility to penicillin, oxacillin, clindamycin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, linezolid, rifampicin, sulfamethoxazole-trimethoprim and tigecycline by the automated method using the Vitek2® System ATS-P585 card (bioMérieux, USA). The susceptibility breakpoints were those recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019) except tigecycline that was interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2019). Oxacillin was used to define MRSA phenotypically. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *S. aureus* ATCC 25923 were used as quality controls.

### **Genotypic characterization**

#### ***DNA extraction***

One colony of each *S. aureus* isolate was inoculated into 3 mL TSB and incubated at  $35^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The cells were harvested by centrifugation ( $10,000 \times g$  for 5 min), washed once with sterile 0.15 M phosphate-buffered saline pH 7.2 and resuspended in 300  $\mu\text{L}$  sterile solution (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8.0, 1.0 mg/mL lysozyme). Genomic DNA was purified as described previously (Ausubel et al., 1999), and 2  $\mu\text{L}$  were used in all amplification reactions.

### ***Detection of virulence-encoding genes by PCR***

The genes *icaA* (encoding N-acetylglucosaminyltransferase of the intercellular adhesion locus), *lukS-PV/lukF-PV* (encoding Pantone-Valentine leukocidin-PVL) and *tst* (encoding toxic shock syndrome toxin-TSST-1) were detected as described by Campbell et al. (2008). *S. aureus* BEC 9393 (*mecA*<sup>+</sup>, *icaA*<sup>+</sup>, *tst*<sup>+</sup>) and *S. aureus* ATCC 25923 (*coa*<sup>+</sup>, *lukS-PV/lukF-PV*<sup>+</sup>) were used as controls.

### ***MRSA typing***

The presence of *mecA* gene and the SCC*mec* types of all MRSA isolates were determined by multiplex PCR assay as described by Milheiriço et al. (2007). Non-typeable isolates were designated as NT. The following *S. aureus* strains were used as controls: NCTC10442 (type I), N315 (type II), 85/2082 (type III), 81/108 (type IV), WIS [WBG8318] (type V) and HDE288 (type VI).

The genetic relatedness of all MRSA harboring the *lukS-PV/lukF-PV* genes was analyzed by repetitive element sequence based-PCR (REP-PCR) according to Del Vecchio et al. (1995). Fingerprintings that had more than one band differing in size were considered different REP-PCR types (van der Zee et al., 1999). Banding patterns were categorized using the Dice coefficient of Gel J software (Heras et al., 2015), with the band tolerance set at 3% and the threshold cutoff value set at 85% (de Oliveira et al., 2015).

### ***Statistical analyses***

The categorical variables were expressed as absolute number (*n*) and percentage (%) and were compared with the chi-square test or Fisher's exact test using IBM SPSS windows version 20. *p* values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### ***Staphylococcus aureus* isolated from inpatients with invasive infections exhibits multi-drug resistance phenotype**

*S. aureus* is a leading cause of bacteremia worldwide (Duarte et al., 2018; Lisowska-Łysiak et al., 2021) which may be complicated by metastatic infections such as septic arthritis, endocarditis, osteomyelitis and sepsis (Kuehl et al., 2020; Lisowska-Łysiak et al., 2021). Importantly, persistent *S. aureus* bacteremia has been associated with increased mortality rates (Kuehl et al., 2020; Wächter et al., 2021). In fact, due to the arsenal of virulence factors (Cheung et al., 2021) and the increasing rates of multidrug resistant strains isolation (Guo et al., 2020), the treatment of *S. aureus* infection has become more difficult.

Ninety eight non-duplicate *S. aureus* isolates recovered from inpatients of HU-UEL with invasive infections were included in the present study. One isolate was susceptible to all antimicrobial agents tested in this study, and all isolates were susceptible to linezolid and tigecycline. Conversely, resistance was observed for penicillin (96/98, 98.0%), erythromycin (71/98, 72.4%), oxacillin (68/98, 69.4%), clindamycin (68/98, 69.4%), ciprofloxacin (56/98, 57.1%), gentamicin (8/98, 8.2%), sulfamethoxazole-trimethoprim (6/98, 6.1%) and rifampicin (5/98, 5.1%). Thirteen antimicrobial resistance profile (antibiotypes) were observed among all isolates and the most prevalent was the co-resistance to penicillin, oxacillin, erythromycin, clindamycin and ciprofloxacin (46/98, 46.9%. Table 1). Sixty nine isolates (70.4%, 9 MSSA and 58 MRSA isolates) displayed resistance to three or more antimicrobial classes and were classified as multidrug-resistant according to Magiorakos et al. (2015) criteria.

A high proportion of *S. aureus* (68/98, 69.4%) was classified as methicillin-resistant according to the oxacillin resistance phenotype and among them, four (4/68, 5.9%) did not harbor the *mecA* gene. The *mecA*-harboring MRSA isolates ( $n = 64$ ), were distributed into six SCC*mec* types and the prevalence was as following: I (4/64, 6.3%), II (40/64, 62.5%), III (4/64, 6.3%), IV (12/64, 18.6%), V (2/64, 3.1%), and VI (1/64, 1.6%). One isolate (1/64, 1.6%) was classified as NT.

Previous studies of our research group have been reported the predominance of MRSA harboring SCC*mec* II elements isolated from different clinical sources in HU-UEL. The study of de Oliveira et al. (2015) and Bodnar et al. (2016) reported a prevalence of 53.7% (66 out of 123 MRSA isolates) and of 43.6% (24 out of 55 MRSA isolates) of SCC*mec* type II MRSA isolates, respectively. Recently, Duarte et al. (2019) also reported the prevalence of 65.4% (34

out of 59 MRSA isolates) of *SCCmec* type II among MRSA isolated from inpatients with bloodstream and respiratory tract infections.

Other studies also reported higher prevalence of *SCCmec* type II in MRSA isolated from patients of hospitals located in different regions of Brazil. Most of the MRSA isolates (26/27, 96.3%) from different clinical samples of inpatients of a hospital of São Carlos, São Paulo carried the *SCCmec* type II (Okado et al., 2018). Nascimento et al. (2018) reported a temporal change in the MRSA carrying the *SCCmec* types isolated from patients admitted to intensive care unit over a period of six years (2005-2010) in a teaching hospital of Juiz de Fora, Minas Gerais. During the first three years, the Brazilian Epidemic Clone (BEC, ST239/*SCCmec* III) was the most prevalent, while the USA 100 (CC5/*SCCmec* II) clone emerged in 2007 and remained the most prevalent in the last three years. Machado et al. (2021) analyzed MRSA isolated from inpatients with invasive infections in two hospital of Niterói, Rio de Janeiro. Among 62 isolates, 39 (62.9%), 14 (22.6%) and nine (14.5%) MRSA carried the *SCCmec* types II, IV and III, respectively. Furthermore, as observed in the present study, high rates of resistance were observed for erythromycin (74.2%), ciprofloxacin (64.5%) and clindamycin (46.1%) among those isolates.

**Table 1:** Distribution of antimicrobial resistance profile of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients with invasive infections admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.

Antibiotype	Resistance phenotype	Number of isolates		
		MSSA <i>n</i> =30 (%)	MRSA <i>n</i> =68 (%)	<i>n</i> =98 (%)*
A	P	16 (53.3)	-	16 (16.3)
B	P, E	2 (6.7)	-	2 (2.0)
C	P, E, DA	10 (33.3)	-	10 (10.2)
D	P, E, DA, SXT	1 (3.3)	-	1 (1.0)
E	P, OX	-	9 (13.2)	9 (9.2)
F	P, OX, E	-	1 (1.5)	1 (1.0)
G	P, OX, E, DA	-	1 (1.5)	1 (1.0)
H	P, OX, E, SXT	-	1 (1.5)	1 (1.0)
I	P, OX, DA, CIP	-	1 (1.5)	1 (1.0)
J	P, OX, E, DA, CIP	-	46 (67.6)	46 (46.9)
K	P, OX, E, DA, CIP, CN	-	4 (5.9)	4 (4.1)
L	P, OX, E, DA, CIP, RD	-	1 (1.5)	1 (1.0)
M	P, OX, E, DA, CIP, CN, SXT, RD	-	4 (5.9)	4 (4.1)
<b>Total</b>		29	68	97

Antimicrobial susceptibility was determined by the automated method using the Vitek2® System. The results were interpreted as recommended by CLSI (2019) except tigecycline that was interpreted according to the EUCAST (2019). One isolate was susceptible to all antimicrobial agents tested. -: not detected. P: penicillin; OX: oxacillin; CIP: ciprofloxacin; DA: clindamycin; E: erythromycin; CN: gentamicin; RD: rifampicin; STX: sulfamethoxazole/trimethoprim.

### High prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from inpatients with invasive infections harbors the *lukS-PV/lukF-PV* genes

One *S. aureus* isolate did not harbor any virulence encoding genes analyzed in the present study. Conversely, the other isolates presented at least one gene, and the overall prevalence was as follows: *icaA*, 99.0% (97/98); *tst*, 27.5% (27/98); and *lukS-PV/lukF-PV*, 50.0% (49/98). Only the presence of *tst* gene was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in MSSA isolates compared to MRSA. Most isolates (37/98, 37.8%) co-harbored the *icaA* and *lukS-PV/lukF-PV* genes; the other isolates harbored the following combination: *icaA* and *tst* (15/98, 15.3%); *icaA*, *lukS-PV/lukF-PV* and *tst* (12/98, 12.2%) (Table 2).

The *icaA* gene encodes the biosynthesis of the polysaccharide intercellular adhesin [PIA, Cramton et al., 1999] that participates in the biofilm maturation stage, promoting intercellular aggregation and adhesion to abiotic surfaces (Rohde et al., 2010). The ability to



form biofilm on biotic or abiotic surfaces (such as implanted medical devices) contributes to the success of *S. aureus* as a colonizer or pathogen. In fact, biofilms provide advantages to bacteria within these communities, such as tolerance to antimicrobial agents and protection against immune defense molecules. Therefore, infections associated with biofilm formation are persistent and difficult to treat (Otto, 2018), increasing both the treatment costs and the mortality rates (Yousif et al., 2015).

Besides the ability to form biofilm that contributes to the evasion of host immune defenses, *S. aureus* is able to produce several toxins that kill phagocytes, avoiding being eliminated by these cells. As we mentioned before, the *lukS-PV/lukF-PV* genes encode the bi-component  $\beta$ -pore-forming toxin Pantone Valentine Leukocidin (PVL), which participates in this process. PVL targets and lysis polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and macrophages (Kaneko; Kamio 2004), inducing the leakage of proteases and reactive oxygen species (ROS) into the surrounding environment, resulting in tissue damage of alveolar epithelial and endothelial barriers (Konig et al., 1995). This toxin has been associated with *S. aureus* skin and soft tissue infections, necrotizing pneumonia and septic shock (Spaan et al., 2017; Yokomori et al., 2020).

The *tst* gene is located into a pathogenicity island and encodes the toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), a potent exotoxin of the superantigens family associated with the toxic shock syndrome illness (Novick; Ram 2017). TSST-1 activates T lymphocytes and macrophages, inducing the overproduction of inflammatory cytokines that causes systemic inflammation and shock, leading to multi-organ dysfunction (Xu; McCormick 2012; Peng et al., 2021). Toxic shock syndrome was commonly associated with menstruation and absorbent tampons (Schlievert; Davis 2020); currently, this illness is more frequently triggered by other staphylococcal infections and is associated with higher mortality rates (Gillet et al., 2018; Kim et al., 2019).

**Table 2:** Distribution of virulence encoding genes profile in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from inpatients with invasive infections admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.

Virulence marker	Number of isolates			p value
	MSSA n = 30 (%)	MRSA n = 68 (%)	Total n = 98 (%)	
<i>icaA</i>	29 (96.7)	68 (100.0)	97 (99.0)	0,306
<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	13 (43.3)	36 (52.9)	49 (50.0)	0,381
<i>tst</i>	15 (50.0)*	12 (17.6)*	27 (27.6)	0,001
<b>Co-harboring</b>				
<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV</i>	5 (16.7)	32 (47.1)	37 (37.8)	0,381
<i>icaA, tst</i>	7 (23.3)	8 (11.8)	15 (15.3)	0,001
<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV, tst</i>	8 (26.7)	4 (5.9)	12 (12.2)	0,007

One MSSA isolate did not harbor any virulence marker tested. *icaA*: intercellular adhesion locus encoding N-acetylglucosaminyltransferase; *tst*: toxic shock syndrome toxin; *lukS-PV* and *lukF-PV*:  $\beta$ -pore-forming Pantone-Valentine leukocidin. \* $P < 0.001$

Table 3 shows the relationship among the antimicrobial resistance profile, SCC*mec* types and virulence encoded genes profile of 65 *mecA*-harboring MRSA. Although no statistical correlation was found, it was also observed that: a) the *lukS-PV/lukF-PV* genes were detected in MRSA isolates distributed into all SCC*mec* types and exhibiting different antimicrobial resistance profiles, including that classified as NT. b) most MRSA isolates harboring the combination of *icaA* and *lukS-PV/lukF-PV* genes presented SCC*mec* type II and antibiotype J (resistant to penicillin, oxacillin, erythromycin, clindamycin and ciprofloxacin); c) the *tst* gene was not detected in MRSA isolates harboring the SCC*mec* type IV (Table 3).

**Table 3:** Relationship among the antimicrobial resistance profile, SCC*mec* types and virulence encoded genes profile of 65 *mecA*-harboring MRSA isolated from patients with invasive infections admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.

SCC <i>mec</i> <sup>a</sup>	Antibiotype	Virulence encoded gene profile <sup>b</sup>	n (%)
I	H	<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV</i>	1 (1.54)
	K	<i>icaA, tst</i>	3 (4.62)
II	E	<i>icaA</i>	1 (1.54)
	F	<i>icaA</i>	1 (1.54)
	J	<i>icaA</i>	15 (23.08)
		<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV</i>	17 (26.15)
		<i>icaA, tst</i>	4 (6.15)
		<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV, tst</i>	2 (3.08)
III	L	<i>icaA</i>	1 (1.54)
	M	<i>icaA</i>	1 (1.54)
		<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV</i>	2 (3.08)
IV		<i>icaA, tst</i>	1 (1.54)
	E	<i>icaA</i>	1 (1.54)
		<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV</i>	6 (9.23)
	J	<i>icaA</i>	4 (6.15)
V		<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV</i>	1 (1.54)
		<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV</i>	1 (1.54)
	K	<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV, tst</i>	1 (1.54)
VI	G	<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV, tst</i>	1 (1.54)
NT	J	<i>icaA, lukS-PV/lukF-PV</i>	1 (1.54)

<sup>a</sup>SCC*mec* typing was carried out according to described by Milheiriço et al. (2007). <sup>b</sup>*coa*: coagulase; *icaA*: intercellular adhesion locus encoding N-acetylglucosaminyltransferase; *tst*: toxic shock syndrome toxin; *lukS-PV* and *lukF-PV*: β-pore-forming Panton-Valentine leukocidin. -: not detected.

MRSA harboring the SCC*mec* type II isolated from inpatients of our hospital remained relatively stable over the ten years period studied. However, the prevalence of the *lukS-PV/lukF-PV* and *tst* genes varied in the different samples, although the previous studies were carried out with MRSA isolated from different clinical sources. de Oliveira et al. (2015) identified a occurrence of 2.4% of MRSA isolates carrying the *lukS-PV/lukF-PV* genes (one and two out of 123 isolates recovered from blood and general swab, respectively); and these isolates presented the SCC*mec* type IV structure. The *tst* gene was detected in 34.1% of MRSA harboring the SCC*mec* types I, II, IV and non-typeable SCC*mec* structure. The study of Duarte et al. (2019) identified the presence of the *lukS-PV/lukF-PV* genes in seven MRSA SCC*mec*

type II (20.6%, five and two out of 34 isolates recovered from tracheal secretion and blood, respectively); and none SCC*mec* type II MRSA was positive for *tst* gene. Table 4 shows the evolution of MRSA isolates harboring the *lukS-PV/lukF-PV* and *tst* genes in our hospital.

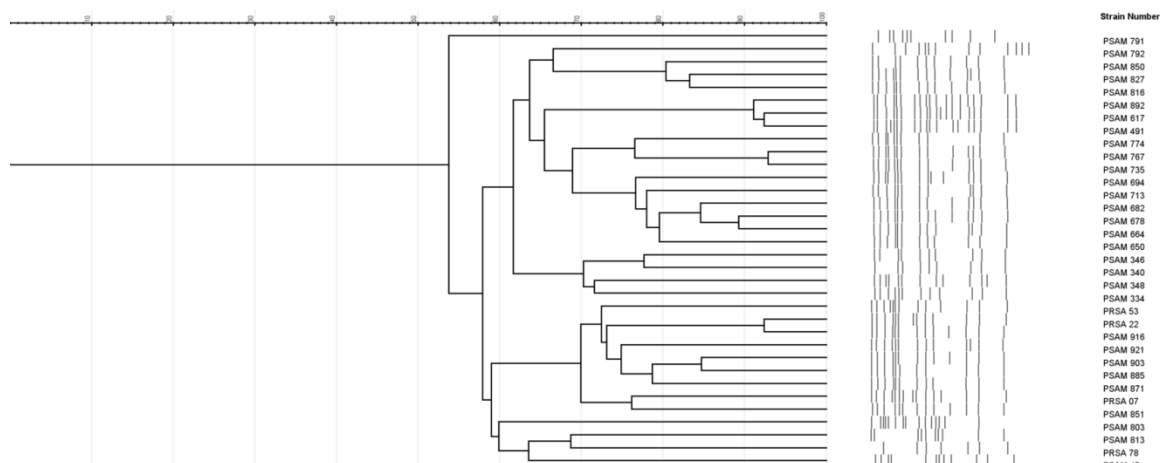
**Table 4:** Distribution of MRSA harboring the *lukS-PV/lukF-PV* and *tst* genes isolated from patients admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.

Years	Specimen	<i>lukS-PV/lukF-PV</i> (%)	<i>tst</i> (%)	Reference
2010-2013	Blood, tissue fragment, tracheal aspirate, urine, general discharge and general swab	SCC <i>mec</i> type IV (2.4)	SCC <i>mec</i> types I (22.0) II (5.7) IV (4.1) NT (2.4)	de Oliveira et al., 2015
2015-2016	Blood and tracheal aspirates	SCC <i>mec</i> type <sup>a</sup> II (20.6)	-	Duarte et al., 2018
2015-2019	Blood, bone tissue, bone marrow aspirate, cerebrospinal fluid and general fluids	SCC <i>mec</i> types I (1.5) II (29.2) III (3.1) IV (10.8) V (3.1) VI (1.5) NT (1.5)	SCC <i>mec</i> types I (4.6) II (9.2) III (1.5) V (1.5) VI (1.5)	This study

SCC*mec* typing was performed according to Milheiriço et al., (2007). Percentage was calculated considering the total number of *mecA* positive MRSA isolates. <sup>a</sup>The genes were screened only in SCC*mec* type II MRSA isolates. – Not detected. NT: non-typeable.

### **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring the *lukS-PV/lukF-PV* genes displayed low genetic relatedness**

Visual observation of bands generated by REP-PCR typing showed a total of 27 banding patterns (named 1 to 27), indicating a relatively high genetic diversity among MRSA isolates harboring the *lukS-PV/lukF-PV* genes. Clusters analysis, by using a cutoff value of 85% (de Oliveira et al., 2015), revealed that the majority of MRSA exhibited unique fingerprinting patterns. Five clusters (named A to E) were identified. Clusters A and C harbored three isolates each, and clusters B, D and E harbored three isolates each (Figure 1).



**Figure 1:** The banding pattern obtained by REP-PCR based on Dice similarity coefficient showing the genetic relatedness of MRSA harboring the *lukS-PV/lukF-PV* genes

Globally, the prevalence of *S. aureus* carrying the *lukS-PV/lukF-PV* genes is highly variable and can be related to bacterial strain types. In fact, the presence of these genes has been primarily associated with community-acquired MRSA (CA-MRSA) (Saeed et al., 2018), which typically harbors the SCC $mec$  type IV and displays low rate of resistance to non-beta-lactam antimicrobials (Otter; French, 2012). The present study reports a high prevalence of multidrug-resistant *S. aureus* harboring the *lukS-PV/lukF-PV* and *tst* genes in invasive infections. Furthermore, an increasing burden and changes in the molecular epidemiology of *S. aureus* both genes have been observed in our hospital in the past decade. Therefore, the continuous surveillance is crucial to identify changes in the antimicrobial susceptibility profile and virulence of *S. aureus* and thus, update measures to control infections caused by this bacterium.

## REFERENCES

- Amin DHM, Guler E, Baddal B. Prevalence of Panton-Valentine leukocidin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates at a university hospital in Northern Cyprus: a pilot study. *BMC Res Notes*. 2020;13(1):490. doi: 10.1186/s13104-020-05339-0.
- Andrade MM, Luiz WB, Oliveira Souza RS, Amorim JH. The history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2020;2020:1721936. doi: 10.1155/2020/1721936.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl

K eds. *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley-Blackwell, 4th ed. 1104p. 1999.

Bodnar GC, Martins HM, de Oliveira CF, Morey AT, Tavares ER, Cardoso JD, Perugini MRE, Lioni LMY, Yamada-Ogatta SF, Kobayashi RKT, Nakazato G. Comparison of HRM analysis and three REP-PCR genomic fingerprint methods for rapid typing of MRSA at a Brazilian hospital. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(12): 1306-1317. doi: 10.3855/jidc.7887.

Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*. 1999;67(10):5427-5433. doi: 10.1128/IAI.67.10.5427-5433.1999.

Del Vecchio VG, Petroziello JM, Gress MJ, McCleskey FK, Melcher GP, Crouch HK, Lupski JR. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(8):2141-2144. doi: 10.1128/JCM.33.8.2141-2144.1995.

Crepaldi FD, Danelli T, Ribeiro MAG, Perugini LF, Vespero EC, Carrara-Marroni FE, Pelisson M, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Perugini MRE. Bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a fifteen-year analysis of antimicrobial susceptibility in a tertiary hospital in Brazil. *J Epidemiol Infect Control*. 2018a;8(3): 232-238.

Duarte FC, Tavares ER, Danelli T, Ribeiro MAG, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Perugini MRE. Disseminated Clonal Complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec type II in a tertiary hospital of Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60:e32. doi: 10.1590/S1678-9946201860032.

Calfee DP. Trends in community versus health care-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19(12):48. doi: 10.1007/s11908-017-0605-6.

Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae IG, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthat GT, Rude TH, Barriere SL, Corey R, Fowler VG Jr. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):678-684. doi: 10.1128/JCM.01822-07.

Cheung GYC, Baes JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021;12(1):547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2019.

De Oliveira CF, Morey AT, Santos JP, Gomes LV, Cardoso JD, Pinge-Filho P, Perugini MRE, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(7):743-751. doi: 10.3855/jidc.5868.

Duarte FC, Danelli T, Ribeiro MAG, Perugini LF, Vespero EC, Carrara-Marroni FE, Pelisson M, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Perugini MRE. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. *Rev Epidemiol Control Infec*. 2018;8(3):232-238.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2019 <http://www.eucast.org>.

Gillet Y, T. Henry T, Vandenesch F. Fulminant staphylococcal infections. *Microbiol Spectr*. 2018;6(5). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0036-2018.

Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:107. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107.

Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:270. doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0.

Hirota S, Sasaki T, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2011;49(10):3627-3631. doi: 10.1128/JCM.00488-11.

Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHS surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008;36(5):309-332. doi: 10.1016/j.ajic.2008.03.002.

Iliya S, Mwangi J, Maathai R, Muriuki M, Wainaina C. Molecular detection of Pantone-Valentine leukocidin toxin in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from Kiambu County, Kenya. *Int J Microbiol*. 2020;2020:3106747. doi: 10.1155/2020/3106747.

Konig B, Prevost G, Piemont Y, Konig W. (1995). Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J Infect Dis*. 1995;171:607-613. doi: 10.1093/infdis/171.3.607.

Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. *Br Med J*. 1961;1:124-125.

Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW eds. Manual of Clinical Microbiology, Wiley, 11th ed. 2015.

Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68(5):981-1003. doi: 10.1271/bbb.68.981.

Kim D, Hong JS, Yoon EJ, Lee H, Kim YA, Shin KS, Shin JH, Uh Y, Shin JH, Park YS, Jeong SH. Toxic Shock Syndrome Toxin 1-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Clonal Complex 5, the New York/Japan Epidemic Clone, Causing a High Early-Mortality Rate in Patients with Bloodstream Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(11):e01362-19. doi: 10.1128/AAC.01362-19.

Klein S, Hannesen J, Zanger P, Heeg K, Boutin S, Nurjadi D. Entry of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital: prevalence and population structure in Heidelberg, Germany 2015-2018. *Sci Rep*. 2020;10(1): 13243. doi: 10.1038/s41598-020-70112-z.

Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(11):675-687. doi: 10.1038/nrmicro.2017.104.

Kuehl R, Morata L, Boeing C, Subirana I, Seifert H, Rieg S, Kern WV, Kim HB, Kim ES, Liao C-H, Tilley R, Lopez-Cortés LE, Llewelyn MJ, Fowler VG, Thwaites G, Cisneros JM, Scarborough M, Nsutebu E, Ferrer MG, Pérez JL, Barlow G, Hopkins S, Ternavasio-de la Vega HG, Török ME, Wilson P, Kaasch AJ, ASoriano A, International *Staphylococcus aureus* collaboration study group and the ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis. Defining persistent *Staphylococcus aureus* bacteraemia: secondary analysis of a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(12):1409-1417. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30447-3.

Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00020-18. doi: 10.1128/CMR.00020-18.

Lisowska-Łysiak K, Lauterbach R, Międzobrodzki J, Maja Kosecka-Strojek M. Epidemiology and Pathogenesis of *Staphylococcus* Bloodstream Infections in Humans: a Review. *Pol J Microbiol*. 2021;70(1):13-23. doi: 10.33073/pjm-2021-005.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998;339(8):520-532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806.

Machado TS, Pinheiro FR, Andre LSP, Pereira RFA, Correa RF, de Mello GC, Ribeiro TAN, Penna B, Sachs D, Aguiar-Alves F. Virulence Factors Found in Nasal Colonization and Infection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates and Their Ability to Form a Biofilm. *Toxins* (Basel). 2020;13(1):14. doi: 10.3390/toxins13010014.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

McGuinness SL, Holt DC, Harris TM, Wright C, Baird R, Giffard PM, Bowen AC, Tong SYC. Clinical and molecular epidemiology of an emerging Panton-Valentine leukocidin-positive ST5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Northern Australia. *mSphere*. 2021;6(1): e00651-20. doi: 10.1128/mSphere.00651-20.

Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3374-3377. doi: 10.1128/AAC.00275-07.

Nascimento TC, Diniz CG, Silva VL, Ferreira-Machado A, Fajardo MO, de Oliveira TLR, Ferreira DC, Cavalcante FS, dos Santos KRN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. *Braz J Infect Dis*. 2018;22(1):55-59. doi: 10.1016/j.bjid.2017.10.004.

Novick RP, Ram G. Staphylococcal pathogenicity islands-movers and shakers in the genomic firmament. *Curr Opin Microbiol*. 2017;38:197-204. doi: 10.1016/j.mib.2017.08.001.



- Okado JB, Avaca-Crusca JS, Oliveira AL, Dabul ANG, Camargo ILBDC. Daptomycin and vancomycin heteroresistance revealed among CC5-SCC*mecII* MRSA clone and in vitro evaluation of treatment alternatives. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;14:209-216. doi: 10.1016/j.jgar.2018.05.001.
- Otter JA, French GL. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the case for a genotypic definition. *J Hosp Infect*. 2012;81(3):143-8. doi: 10.1016/j.jhin.2012.04.009.
- Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr*. 2018;6(4):10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.
- Peng L, Jiang J, Chen T, Xu D, Hou F, Huang Q, Peng Y, Ye C, Hu DL, Fang R. Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Induces Immune Response via the Activation of NLRP3 Inflammasome. *Toxins* (Basel). 2021;13(1):68. doi: 10.3390/toxins13010068.
- Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1942;51(3):386-389. doi:10.3181/00379727-51-13986.
- Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol*. 2010;89(1):103-111. doi: 10.1016/j.ejcb.2009.10.005.
- Saeed K, Gould I, Esposito S, Ahmad-Saeed N, Ahmed SS, Alp E, Bal AM, Bassetti M, Bonnet E, Chan M, Coombs G, Dancer SJ, David MZ, De Simone G, Dryden M, Guardabassi L, Hanitsch LG, Hijazi K, Krüger R, Lee A, Leistner R, Pagliano P, Righi E, Schneider-Burrus S, Skov RL, Tattevin P, Van Wamel W, Vos MC, Voss A, International Society of Chemotherapy. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*: a position statement from the International Society of Chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(1):16-25. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.11.002.
- Saravolatz LD, Markowitz N, Arking L, Pohlod D, Fisher E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. *Ann Intern Med*. 1982;96(1):11-16. doi: 10.7326/0003-4819-96-1-11.
- Schlievert PM, Davis CC. Device-Associated Menstrual Toxic Shock Syndrome. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3):e00032-19. doi: 10.1128/CMR.00032-19.
- Sicot N, Khanafer N, Meyssonier V, Dumitrescu O, Tristan A, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, Etienne J, Gillet Y. Methicillin resistance is not a predictor of severity in community-acquired *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia - results of a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*; 2013;19(3):E142-E148. doi: 10.1111/1469-0691.12022.
- Spaan NA, van Strijp JA, Torres VJ. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(7):435-447. doi: 10.1038/nrmicro.2017.27.
- Tajik S, Najar-Peerayeh S, Bakhshi B. Hospital clones of Panton-Valentine leukocidin-positive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Tehran. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:177-181. doi: 10.1016/j.jgar.2019.12.010.

Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(3):441-446. doi: 10.1093/jac/dkp241.

Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, Holland TL, Fowler Jr VG. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(4):203-218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy M-E, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8):978-984. doi: 10.3201/eid0908.030089.

van der Zee A, Verbakel H, van Zon JC, Frenay I, van Belkum A, Peeters M, Buiting A, Bergmans A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J Clin Microbiol.* 1999;37(2):342-349. doi: 10.1128/JCM.37.2.342-349.

Wächter H, Yörük E, Becker K, Görlich D, Barbara C Kahl Correlations of Host and Bacterial Characteristics with Clinical Parameters and Survival in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *J Clin Med.* 2021;10(7):1371. doi: 10.3390/jcm10071371.

Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:52. doi: 10.3389/fcimb.2012.00052.

Yokomori R, Tsurukiri J, Moriya M, Yamanaka H, Kobayashi T, Nakaminami H, Takadama S, Noguchi N, Matsumoto T, Arai T. First report of fatal infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in a collegiate athlete. *JMA J.* 2020;3(1):78-82. doi: 10.31662/jmaj.2019-0054.

Yousif A, Jamal MA, Raad I. Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv Exp Med Biol.* 2015;830:157-79. doi: 10.1007/978-3-319-11038-7\_10.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. P.; SUBRAMANYA, S. H.; NEUPANE, D. Emerging pandemics: Lesson for one-health approach. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 1, p. 273–275, 8 jan. 2021.
- AMIN, D.H.M.; GULER, E.; BADDAL B. Prevalence of Panton-Valentine leukocidin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates at a university hospital in Northern Cyprus: a pilot study. **BMC Res Notes**, 2020;13(1):490. doi: 10.1186/s13104-020-05339-0.
- Andrade MM, Luiz WB, Oliveira Souza RS, Amorim JH. The history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2020;2020:1721936. doi: 10.1155/2020/1721936.
- ARIAS, C. A. et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. e00816-17, out. 2017.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K eds. *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley-Blackwell, 4th ed. 1104p. 1999.
- BAIG, S. et al. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 74–76, jul. 2018.
- BAMBERGER, D. M. The Role of Panton-Valentine Leukocidin : The Pendulum Swings. v. 215, p. 1346–1348, 2017.
- Bodnar GC, Martins HM, de Oliveira CF, Morey AT, Tavares ER, Cardoso JD, Perugini MRE, Lioni LMY, Yamada-Ogatta SF, Kobayashi RKT, Nakazato G. Comparison of HRM analysis and three REP-PCR genomic fingerprint methods for rapid typing of MRSA at a Brazilian hospital. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(12): 1306-1317. doi: 10.3855/jidc.7887.
- BUCK, J. M. et al. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000–2003. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1532–1538, out. 2005.
- BURIAN, M. et al. Temporal Expression of Adhesion Factors and Activity of Global Regulators during Establishment of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1414–1421, maio 2010.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Bush and Bradford - 2016 -  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors An Overview.pdf. n. Table 1, 2016.
- Calfee DP. Trends in community versus health care-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19(12):48. doi: 10.1007/s11908-017-0605-6.
- Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae IG, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthat GT, Rude TH, Barriere SL, Corey R, Fowler VG Jr. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):678-684. doi: 10.1128/JCM.01822-07.

CHEN, B. J. et al. Factors associated with *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among the general population at a Medical College Campus in Guangzhou, South China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 28, dez. 2017.

Cheung GYC, Baes JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021;12(1):547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2019.

Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*. 1999;67(10):5427-5433. doi: 10.1128/IAI.67.10.5427-5433.1999.

Crepaldi FD, Danelli T, Ribeiro MAG, Perugini LF, Vespero EC, Carrara-Marroni FE, Pelisson M, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Perugini MRE. Bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a fifteen-year analysis of antimicrobial susceptibility in a tertiary hospital in Brazil. *J Epidemiol Infect Control*. 2018a;8(3): 232-238.

Del Vecchio VG, Petroziello JM, Gress MJ, McCleskey FK, Melcher GP, Crouch HK, Lupski JR. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(8):2141-2144. doi: 10.1128/JCM.33.8.2141-2144.1995.

DEN HEIJER, C. D. J. et al. Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 409–415, maio 2013.

De Oliveira CF, Morey AT, Santos JP, Gomes LV, Cardoso JD, Pinge-Filho P, Perugini MRE, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(7):743-751. doi: 10.3855/jidc.5868.

Duarte FC, Danelli T, Ribeiro MAG, Perugini LF, Vespero EC, Carrara-Marroni FE, Pelisson M, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Perugini MRE. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. *Rev Epidemiol Control Infec*. 2018;8(3):232-238.

Duarte FC, Tavares ER, Danelli T, Ribeiro MAG, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Perugini MRE. Disseminated Clonal Complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec type II in a tertiary hospital of Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60:e32. doi: 10.1590/S1678-9946201860032.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2019 <http://www.eucast.org>.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019. **European Centre for Disease Prevention and Control**, v. 174, n. 14, p. 1–28, 2020.

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall.

**Protein Science**, v. 29, n. 3, p. 629–646, 2020.

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, 2014.

GAJDÁCS, M. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 52, 2 maio 2019.

Gillet Y, T. Henry T, Vandenesch F. Fulminant staphylococcal infections. *Microbiol Spectr.* 2018;6(5). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0036-2018.

GORWITZ, R. J. J. et al. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 9, p. 1226–1234, maio 2008.

GÖTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.-H. **The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus***. [s.l.: s.n.].

GOUDARZI, M. et al. Clonal dissemination of *Staphylococcus aureus* isolates causing nosocomial infections , Tehran , Iran. n. 1, [s.d.].

Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:107. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107.

HALL, C. W.; MAH, T. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, maio 2017.

HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 130, dez. 2017.

HARTMAN, B.; TOMASZ, A. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, n. 5, p. 726–735, maio 1981.

Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:270. doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0.

HIRAMATSU, K. et al. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Infection & Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 117, 2013.

Hirota S, Sasaki T, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2011;49(10):3627-3631. doi: 10.1128/JCM.00488-11.

HOLLAND, T. L.; ARNOLD, C.; FOWLER, V. G. Clinical Management of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **JAMA**, v. 312, n. 13, p. 1330, out. 2014.

Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSH surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008;36(5):309-332. doi: 10.1016/j.ajic.2008.03.002.

HUANG, S. S.; DATTA, R.; PLATT, R. Risk of Acquiring Antibiotic-Resistant Bacteria From Prior Room Occupants. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 18, p. 1945, out. 2006.

Iliya S, Mwangi J, Maathai R, Muriuki M, Wainaina C. Molecular detection of Pantone-Valentine leukocidin toxin in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from Kiambu County, Kenya. *Int J Microbiol*. 2020;2020:3106747. doi: 10.1155/2020/3106747.

JEVONS, M. P. "Celbenin" - resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5219, p. 124-125, jan. 1961.

Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW eds. *Manual of Clinical Microbiology*, Wiley, 11th ed. 2015.

KAYA, H. et al. SCCmecFinder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. **mSphere**, v. 3, n. 1, p. e00612-17, fev. 2018.

Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68(5):981-1003. doi: 10.1271/bbb.68.981.

Kim D, Hong JS, Yoon EJ, Lee H, Kim YA, Shin KS, Shin JH, Uh Y, Shin JH, Park YS, Jeong SH. Toxic Shock Syndrome Toxin 1-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Clonal Complex 5, the New York/Japan Epidemic Clone, Causing a High Early-Mortality Rate in Patients with Bloodstream Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(11):e01362-19. doi: 10.1128/AAC.01362-19.

Klein S, Hannesen J, Zanger P, Heeg K, Boutin S, Nurjadi D. Entry of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital: prevalence and population structure in Heidelberg, Germany 2015-2018. *Sci Rep*. 2020;10(1): 13243. doi: 10.1038/s41598-020-70112-z.

Konig B, Prevost G, Piemont Y, Konig W. (1995). Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J Infect Dis*. 1995;171:607-613. doi: 10.1093/infdis/171.3.607.

Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(11):675-687. doi: 10.1038/nrmicro.2017.104.

Kuehl R, Morata L, Boeing C, Subirana I, Seifert H, Rieg S, Kern WV, Kim HB, Kim ES, Liao C-H, Tilley R, Lopez-Cortés ILE, Llewelyn MJ, Fowler VG, Thwaites G, Cisneros JM, Scarborough M, Nsutebu E, Ferrer MG, Pérez JL, Barlow G, Hopkins S, Ternavasio-de la Vega HG, Török ME, Wilson P, Kaasch AJ, ASoriano A, International *Staphylococcus aureus* collaboration study group and the ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis. Defining persistent *Staphylococcus aureus* bacteraemia: secondary analysis of a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(12):1409-1417. doi:

10.1016/S1473-3099(20)30447-3.

KWIECIEN, K. et al. Architecture of antimicrobial skin defense. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 49, n. August, p. 70–84, 2019.

LAKE, J. G. et al. Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance Among Pediatric Healthcare-Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 1, p. 1–11, jan. 2018.

Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):e00020-18. doi: 10.1128/CMR.00020-18.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 18033, p. 18033, maio 2018.

Lisowska-Łysiak K, Lauterbach R, Międzobrodzki J, Maja Kosecka-Strojek M. Epidemiology and Pathogenesis of *Staphylococcus* Bloodstream Infections in Humans: a Review. *Pol J Microbiol.* 2021;70(1):13-23. doi: 10.33073/pjm-2021-005.

LIU, J. et al. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 56–67, 2016.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 1, p. 135–145, mar. 2017.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998;339(8):520-532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806.

**LPSN. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.**

LUAN, L.; CHI, Z.; LIU, C. Chinese White Wax Solid Lipid Nanoparticles as a Novel Nanocarrier of Curcumin for Inhibiting the Formation of *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Nanomaterials**, v. 9, n. 5, p. 763, maio 2019.

Machado TS, Pinheiro FR, Andre LSP, Pereira RFA, Correa RF, de Mello GC, Ribeiro TAN, Penna B, Sachs D, Aguiar-Alves F. Virulence Factors Found in Nasal Colonization and Infection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates and Their Ability to Form a Biofilm. *Toxins* (Basel). 2020;13(1):14. doi: 10.3390/toxins13010014.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

McGuinness SL, Holt DC, Harris TM, Wright C, Baird R, Giffard PM, Bowen AC, Tong SYC. Clinical and molecular epidemiology of an emerging Panton-Valentine leukocidin-positive ST5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Northern Australia.

*mSphere*. 2021;6(1): e00651-20. doi: 10.1128/mSphere.00651-20.

Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3374-3377. doi: 10.1128/AAC.00275-07.

MOULAVI, P. et al. *Antibiofilm effect of green engineered silver nanoparticles fabricated from Artemisia scoporia extract on the expression of icaA and icaR genes against multidrug-resistant Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 701–712, jul. 2019.

MULCAHY, M. E. et al. Nasal Colonisation by *Staphylococcus aureus* Depends upon Clumping Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 12, 2012.

Nascimento TC, Diniz CG, Silva VL, Ferreira-Machado A, Fajardo MO, de Oliveira TLR, Ferreira DC, Cavalcante FS, dos Santos KRN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. *Braz J Infect Dis*. 2018;22(1):55-59. doi: 10.1016/j.bjid.2017.10.004.

Novick RP, Ram G. Staphylococcal pathogenicity islands-movers and shakers in the genomic firmament. *Curr Opin Microbiol*. 2017;38:197-204. doi: 10.1016/j.mib.2017.08.001.

OGSTON, A. Report upon micro-organisms in surgical diseases. **British Medical Journal**, v. 1, n. 1054, p. 369–377, 1881.

Okado JB, Avaca-Crusca JS, Oliveira AL, Dabul ANG, Camargo ILBDC. Daptomycin and vancomycin heteroresistance revealed among CC5-SCCmecII MRSA clone and in vitro evaluation of treatment alternatives. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;14:209-216. doi: 10.1016/j.jgar.2018.05.001.

OLUFUNMISO, O.; TOLULOPE, I.; ROGER, C. Multidrug and vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from different teaching hospitals in Nigeria. **African Health Sciences**, v. 17, n. 3, p. 797, 18 set. 2017.

Otter JA, French GL. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the case for a genotypic definition. *J Hosp Infect*. 2012;81(3):143-8. doi: 10.1016/j.jhin.2012.04.009.

Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr*. 2018;6(4):10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.

Peng L, Jiang J, Chen T, Xu D, Hou F, Huang Q, Peng Y, Ye C, Hu DL, Fang R. Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Induces Immune Response via the Activation of NLRP3 Inflammasome. *Toxins* (Basel). 2021;13(1):68. doi: 10.3390/toxins13010068.

PERUGINI, M. R. E. et al. Tendência de resistência entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em um hospital universitário do norte do Paraná de 2002 a 2011. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1Supl, p. 275, mar. 2015.

Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1942;51(3):386-389. doi:10.3181/00379727-51-13986.



Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol.* 2010;89(1):103-111. doi: 10.1016/j.ejcb.2009.10.005.

SAADATIAN-ELAHI, M. et al. Basic Rules of Hygiene Protect Health Care and Lab Workers from Nasal Colonization by *Staphylococcus aureus*: An International Cross-Sectional Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82851, dez. 2013.

SADER, H. S. et al. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from patients hospitalized with bloodstream infections in United States medical centers (2015–2017). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 3, p. 114850, 2019.

Saeed K, Gould I, Esposito S, Ahmad-Saeed N, Ahmed SS, Alp E, Bal AM, Bassetti M, Bonnet E, Chan M, Coombs G, Dancer SJ, David MZ, De Simone G, Dryden M, Guardabassi L, Hanitsch LG, Hijazi K, Krüger R, Lee A, Leistner R, Pagliano P, Righi E, Schneider-Burrus S, Skov RL, Tattevin P, Van Wamel W, Vos MC, Voss A, International Society of Chemotherapy. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*: a position statement from the International Society of Chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(1):16-25. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.11.002.

Saravolatz LD, Markowitz N, Arking L, Pohlod D, Fisher E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. *Ann Intern Med.* 1982;96(1):11-16. doi: 10.7326/0003-4819-96-1-11.

SASSINE, J. et al. Functional redundancy of division specific penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 304–318, out. 2017.

Schlievert PM, Davis CC. Device-Associated Menstrual Toxic Shock Syndrome. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(3):e00032-19. doi: 10.1128/CMR.00032-19.

SCHWENDENER, S.; COTTING, K.; PERRETEN, V. Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Micrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43797, dez. 2017.

SHAHINI, M. et al. Epidemiology of Panton-Valentine Leukocidin harbouring *Staphylococcus aureus* in cutaneous infections from Iran : a systematic review and meta-analysis. p. 217–223, 2017.

SHRESTHA, B. Review on Panton Valentine Leukocidin Toxin Carriage among *Staphylococcus aureus*. v. 11, n. 3, p. 305–312, 2013.

Sicot N, Khanafer N, Meyssonier V, Dumitrescu O, Tristan A, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, Etienne J, Gillet Y. Methicillin resistance is not a predictor of severity in community-acquired *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia - results of a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect;* 2013;19(3):E142-E148. doi: 10.1111/1469-0691.12022.

Spaan NA, van Strijp JA, Torres VJ. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(7):435-447. doi: 10.1038/nrmicro.2017.27.

SPRATT, B. G. **Escherichia coli resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics through a decrease in the affinity of a target for lethality [28]** *Nature*, 1978.

Tajik S, Najar-Peerayeh S, Bakhshi B. Hospital clones of Pantone-Valentine leukocidin-positive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Tehran. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:177-181. doi: 10.1016/j.jgar.2019.12.010.

Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(3):441-446. doi: 10.1093/jac/dkp241.

THOMER, L.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. **Annual Review of Pathology**, v. 11, n. 1, p. 343–364, maio 2016.

TONG, S. Y. C. et al. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 27 jul. 2015.

Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, Holland TL, Fowler Jr VG. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(4):203-218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy M-E, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(8):978-984. doi: 10.3201/eid0908.030089.

van der Zee A, Verbakel H, van Zon JC, Frenay I, van Belkum A, Peeters M, Buiting A, Bergmans A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J Clin Microbiol*. 1999;37(2):342-349. doi: 10.1128/JCM.37.2.342-349.

Wächter H, Yörük E, Becker K, Görlich D, Barbara C Kahl Correlations of Host and Bacterial Characteristics with Clinical Parameters and Survival in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *J Clin Med*. 2021;10(7):1371. doi: 10.3390/jcm10071371.

WALSH, E. J. et al. Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of *Staphylococcus aureus*, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 50691–50699, 2004.

WAN, T.-W. et al. Genomic comparison between *Staphylococcus aureus* GN strains clinically isolated from a familial infection case: IS1272 transposition through a novel inverted repeat-replacing mechanism. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187288, 8 nov. 2017.

WANG, J.-L. et al. Distribution of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types and Correlation with Comorbidity and Infection Type in Patients with MRSA Bacteremia. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9489, mar. 2010.

WEINER-LASTINGER, L. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with pediatric healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41,

n. 1, p. 19–30, jan. 2020.

WHO. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System**. [s.l: s.n.].

WHO. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report**. Geneva, World Health Organization. [s.l: s.n.].

WINSTEL, V. et al. Wall teichoic acid glycosylation governs *Staphylococcus aureus* nasal colonization. **mBio**, v. 6, n. 4, p. 1–8, 2015.

Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:52. doi: 10.3389/fcimb.2012.00052.

Yokomori R, Tsurukiri J, Moriya M, Yamanaka H, Kobayashi T, Nakaminami H, Takadama S, Noguchi N, Matsumoto T, Arai T. First report of fatal infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in a collegiate athlete. *JMA J*. 2020;3(1):78-82. doi: 10.31662/jmaj.2019-0054.

Yousif A, Jamal MA, Raad I. Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv Exp Med Biol*. 2015;830:157-79. doi: 10.1007/978-3-319-11038-7\_10.

ZARPELLON, M. N. et al. Survival of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* on hospital surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 90, n. 4, p. 347–350, ago. 2015.