

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Jaíne Bruschi Stypulkowski

**Produção de Biofilme por isolados
clínicos de *Staphylococcus aureus*,
detecção de MSCRAMMs, detecção de
genes do *icaADBC operon* e
susceptibilidade a antimicrobianos**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2014**

Jaíne Bruschi Stypulkowski

Produção de Biofilme por isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, detecção de MSCRAMMs, detecção de genes do *icaADBC operon* e susceptibilidade a antimicrobianos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Pedro Alves d'Azevedo
Co-orientadora: Dr^a. Juliana Caierão

**Porto Alegre
2014**

Catálogo na Publicação

Bruschi Stypulkowski, Jaíne

Produção de Biofilme por isolados clínicos de Staphylococcus aureus, detecção de MSCRAMMs, detecção de genes do icaADEC operon e susceptibilidade a antimicrobianos / Jaíne Bruschi Stypulkowski. -- 2015.
67 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

Orientador(a): Pedro Alves d'Azevedo ;
coorientador(a): Juliana Caierão.

1. Staphylococcus aureus . 2. Biofilme. 3. MSCRAMMs.
I. Título.

LISTA DE TABELAS

Manuscrito I

Table 1: Minimum inhibitory concentration – MIC ($\mu\text{g/ml}$) of four antimicrobials against 89 clinical isolates *S. aureus*.....32

Table 2: MBIC/ MIC relationship for 10 strongly biofilm-formers *S. aureus*.32

Manuscrito II

Table 1: PCR target genes and primers used in this paper.45

Table 2: Distribution of MSCRAMMs genes associated with biofilm formation among *S. aureus* strains.46

Table 3: Presence of operon *ica* genes associated with biofilm formation among *S. aureus* strains.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>aap</i>	<i>accumulation associated protein</i>
<i>bap</i>	<i>biofilm-associated protein</i>
<i>bbp</i>	gene que codifica a sialoproteína óssea
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
<i>cna</i>	gene que codifica a proteína ligadora de colágeno
CHSCMPA	Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre
<i>clfA</i>	gene que codifica <i>clumping factor A</i>
<i>clfB</i>	gene que codifica <i>clumping factor B</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
<i>ebpS</i>	gene que codifica a proteína ligadora de elastina
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (Matriz Extracelular)
<i>eno</i>	gene que codifica a proteína ligadora de laminina
<i>fib</i>	gene que codifica a proteína ligadora de fibrinogênio
<i>fnbA</i>	gene que codifica a proteína ligadora de fibronectina A
<i>fnbB</i>	gene que codifica a proteína ligadora de fibronectina B
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MBIC	<i>Minimum Biofilm Inhibitory Concentration</i>
MRSA	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina)
MSCRAMMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
PIA	<i>Polyssacharide Intercellular Adhesin</i> (Adesina Polissacarídica Intercelular)
PCR	<i>polimerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

RESUMO

Staphylococcus aureus é um dos microrganismos Gram-positivos mais frequentemente isolados de pacientes com infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS). Entre suas características de virulência está sua capacidade de formar biofilme e infecções causadas por isolados produtores de biofilme são frequentemente associadas a falhas terapêuticas. O envolvimento de biofilmes em infecções clínicas tem aumentado o interesse na caracterização de genes associados à sua formação. Além disso, torna-se necessário testar a atividade dos antimicrobianos mediante células bacterianas envoltas por biofilme, por serem essas células especialmente resistentes à ação da maioria dos antimicrobianos quando usados em concentrações padrão. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de produção de biofilme de isolados de *S. aureus*, detectar a presença de genes de virulência possivelmente envolvidos na formação do biofilme e testar a atividade de 04 antimicrobianos, comparando os resultados das atividades nas células de *S. aureus* em sua forma livre (MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*) e em células envoltas por biofilme (MBIC - *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*). Os isolados de *S. aureus* estudados foram obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes internados no Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (CHSCMPA), no período de janeiro a julho de 2012. A detecção dos genes foi realizada pela técnica de PCR sendo pesquisados 13 genes: 09 MSCRAMMs (*ebpS*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *cna*, *fib.bbp*, *clfA* e *clfB*) e 4 genes do operon *ica* (*icaADBC*). Os antimicrobianos testados foram a daptomicina, a linezolida, a tigeciclina e a vancomicina. Nenhum dos isolados apresentou resistência aos antimicrobianos quando avaliados pela técnica tradicional (MIC), realizada com as células no estado planctônico. Já a concentração necessária para inibir o crescimento das células em biofilme (MBIC) encontrada foi de 04 a 256 vezes maior do que a MIC dos mesmos isolados. Entre os antimicrobianos testados, a tigeciclina demonstrou melhor atividade no biofilme. Entre as MSCRAMMs pesquisadas as mais prevalentes foram *clfB* (92%), *clfA* (88%) e *eno* (85%), respectivamente, e entre os genes do operon, *icaA* e *icaD* foram detectados com maior frequência, ambos estiveram presentes em 87% dos isolados. Não houve correlação entre a distribuição dos genes pesquisados e a capacidade de formação de biofilme, indicando que somente um gene ou uma sequência de genes não pode ser usado como indicador para a formação de

biofilme por *S. aureus*, reiterando a complexidade do processo que envolve sua formação.

PALAVRAS CHAVES: *Staphylococcus aureus*. Biofilme. Operon *ica*. MBIC. MSCRAMMs.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most Gram-positive microorganisms frequently recovered from patients with healthcare-related infections. Among the virulence characteristics expressed by them is their ability to form biofilm. Biofilm-associated infections have a significant impact not only on the disease process itself but also on the ability of clinicians to effectively treat the infection. These infections have been increasing interest in the characterization of genes associated with their formation. Moreover, it is necessary to test the antimicrobial activity in bacterial cells surrounded by biofilm, being particularly those cells to the action of resilient most antimicrobial when used in standard concentrations. In this context, the aim of this study was to evaluate the ability to form biofilm of *Staphylococcus aureus* isolates, the presence of virulence genes possibly involved in biofilm formation, compare the in vitro activity of tigecycline, linezolid, daptomycin and vancomycin, against *S. aureus* in biofilms (MBIC - *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*) and as planktonic cells (MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*). *S. aureus* isolates were obtained from clinical specimens from patients hospitalized in the Hospital Santa Casa de Misericordia de Porto Alegre (CHSCMPA), from January to July 2012. The detection of genes was performed by PCR and were researched 13 genes: 09 MSCRAMMs (*ebps*, *ene*, *fnbA*, *fnbB*, *cna*, *fib.bbp*, *clfA* and *clfB*) and 04 genes of the *ica operon* (*icaADBC*). Were tested antibiotics daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. Isolates were fully susceptible to all antimicrobials evaluated. The MBIC results were considerably high, varying from 04 to at least 256 fold higher than MIC. Tigecycline showed better antibiofilm activity compared to the other antimicrobials, presenting the lowest MBIC / MIC ratio. Among the MSCRAMMs surveyed the most prevalent were *clfB*, *clfA* and *eno*, respectively, and between genes of the operon, *icaA* and *icaD* were detected more frequently, both were present in 87% of the isolates. There was no correlation between distribution of genes and biofilm-forming ability for this isolates, indicating that only one or more genes can not be used as indicators for biofilm formation by *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*. Biofilm. *ica operon*. MBIC. MSCRAMMs.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Biofilme	9
1.3 MSCRAMMs	11
1.4 Biofilme x antimicrobianos	12
2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
3 JUSTIFICATIVA	18
4 OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo geral	19
4.2 Objetivos específicos	19
5 DESENVOLVIMENTO	20
5.1 Manuscrito I.....	21
5.2 Manuscrito II.....	33
6 CONCLUSÃO.....	47
7 ANEXOS	49
7.1 Parecer Consubstanciado do CEP	49
7.2 Normas de publicação Revista 1.....	52
7.4 Normas de publicação Revista 2.....	59
7.5 Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais.....	67

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um microrganismo oportunista com elevado potencial patogênico devido à grande variedade de fatores de virulência que pode expressar. Ele pode causar uma série de infecções, variando de infecções superficiais da pele a doenças invasivas de alto risco como endocardite e bacteremia. É um dos patógenos Gram-positivos mais frequentemente isolados de pacientes com infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS), sendo um dos maiores causadores de pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções de sítio cirúrgico e bacteremias relacionadas a cateter (Smith *et al.*, 2009, Speziale *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2012). Além disso, a elevada capacidade de expressar mecanismos de resistência a virtualmente todas as classes de antimicrobianos, em especial a disseminação progressiva de isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA - *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), tem tido grande impacto na terapia das infecções estafilocócicas, sendo um desafio para o manejo terapêutico (Speziale *et al.*, 2009).

Entre os diversos fatores de virulência presentes em *S. aureus*, a capacidade de formar biofilme vem sendo foco de muitos estudos devido ao elevado impacto no tratamento do paciente. A formação de biofilmes não só facilita a colonização bacteriana de um hospedeiro, mas também proporciona resistência a antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro (Cue *et al.*, 2012). Tendo em vista que o biofilme oferece uma proteção à fatores danosos do ambiente, a sua formação muitas vezes ocorre em resposta a um stress do meio para possibilitar a sobrevivência bacteriana. De fato, o aumento da formação de biofilme na presença de concentrações sub-inibitórias de alguns antimicrobianos é um fenômeno comum entre as bactérias (Kaplan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013). Essas células em biofilme são altamente associadas à ineficácia dos esquemas terapêuticos (Cafiso *et al.*, 2010).

Estima-se que aproximadamente 80% das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) envolvem a formação de biofilmes (Boles & Horswill, 2008; Hook *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2012). A maioria delas são infecções associadas a dispositivos médicos implantados, como cateteres, válvulas cardíacas e próteses em ossos ou articulações (Otto, 2013). Os biofilmes também podem servir como focos de infecção para a disseminação de bactérias e liberação de

toxinas para a corrente sanguínea (Cue *et al.*, 2012). Os altos índices de morbidade e mortalidade desse tipo de infecções têm uma alta relação com a ineficácia dos esquemas terapêuticos, limitando as opções e levando ao estado crônico e persistente de muitas infecções por *S. aureus*, resultando em aumento de custo e tempo de hospitalização (Smith *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2012).

Os biofilmes são, efetivamente, um desafio no tratamento das doenças infecciosas: não existe realmente um método para a eliminação dos mesmos, exceto a remoção do dispositivo (Chauhan *et al.*, 2012). Esta é frequentemente uma estratégia indesejável especialmente em pacientes com necessidade de suporte nutricional, quimioterapia, diálise ou com acesso vascular limitado (Edmiston *et al.*, 2006).

1.1 Biofilme

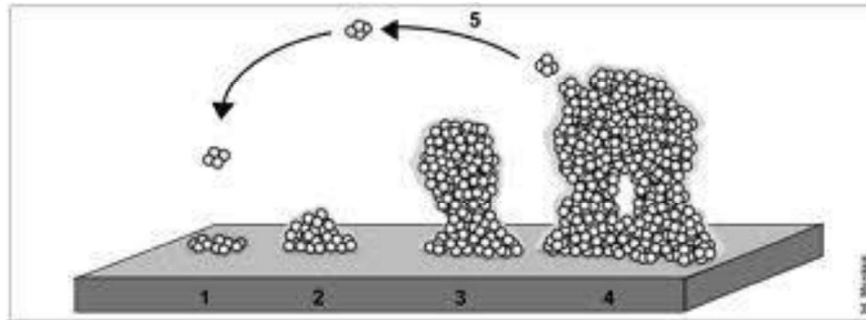
Os biofilmes são estruturas comunitárias de bactérias envolvidas em uma matriz polimérica produzida por elas mesmas e aderentes a uma superfície biótica ou abiótica (Haaber *et al.*, 2012). A matriz extracelular (ECM: *Extracelular Matrix*) é composta principalmente por lipídeos, proteínas polissacarídicas e DNA (Anderson *et al.*, 2012). A proporção destes componentes no interior da matriz do biofilme pode ser amplamente variável em resposta a fatores ambientais (Tang *et al.*, 2013).

Essas estruturas são altamente organizadas e regulamentadas; uma comunicação química entre as células, ou *quorum sensing*, permite às bactérias coordenarem suas atividades e se agruparem em comunidades (Cafiso *et al.*, 2010). Dentro destas comunidades, elas são capazes de compartilhar nutrientes e são protegidas de fatores danosos do ambiente, como a dissecação, os antibióticos e o sistema imune do hospedeiro (Anderson *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013). Nessa comunidade, as células exibem um fenótipo alterado com respeito à fisiologia bacteriana, metabolismo e transcrição genética (Lin *et al.*, 2012). A partir do biofilme, as células bacterianas possuem a capacidade de se dispersarem aumentando o local da colonização e infecção (Sambanthamoorthy *et al.*, 2008).

A formação de biofilme ocorre através de etapas sequenciais (figura 1) em que a fixação inicial de bactérias na sua forma planctônicas a uma superfície sólida é seguida por subsequente proliferação e acúmulo em grupos de células de várias

camadas e, finalmente, amadurecimento da comunidade bacteriana do biofilme. Uma vez que a estrutura estiver concluída, algumas células são liberadas no meio, permitindo a disseminação bacteriana (Lasa *et al.*, 2006).

Figura 1 - Formação de biofilme dividida em 5 etapas: (1) adesão inicial das células na superfície, (2) produção da matriz extracelular, (3) desenvolvimento da arquitetura do biofilme (4) maturação da arquitetura do biofilme; (5) dispersão das células bacterianas.



Fonte: Lasa, 2006.

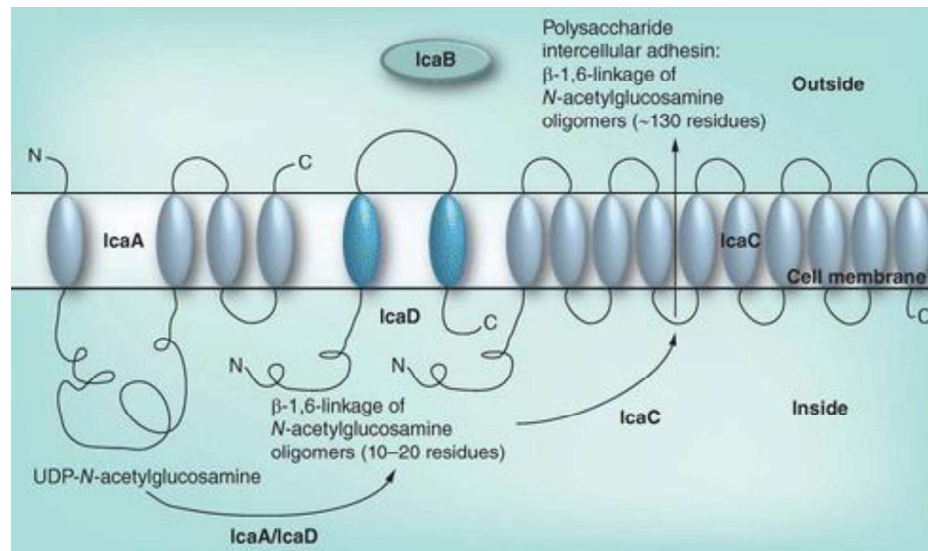
A formação do biofilme pelo *S. aureus* envolve um processo complexo, onde inicialmente ocorre uma aderência transitória das células à superfície mediada por diferentes tipos de enzimas. Um grupo de proteínas de superfície referidas como MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) parece ser o primeiro determinante responsável pela adesão inicial das células tanto nos tecidos nativos como em biomateriais. Em seguida, a principal proteína responsável pela fase de acumulação, durante a formação do biofilme de *Staphylococcus*, é a adesina polissacarídica intercelular (PIA – *Polyssacharide Intercellular Adhesin*), cuja produção é dependente dos genes do *operon icaADBC* (Beenken *et al.*, 2004). A expressão do *ica operon* e a subsequente formação do biofilme é amplamente influenciada por uma variedade de fatores externos, incluindo nutrientes fornecidos, osmolaridade, temperatura e concentração sub-inibitória de alguns antimicrobianos (Lin *et al.*, 2012).

1.2 Produção da PIA

O locus *icaADBC* codifica as enzimas responsáveis pela síntese e desacetilação de PIA, que ocorre em 3 passos: adição de N-acetilglicosamina pela

ação conjunta de *icaA* e *icaD*, transporte da nova cadeia pelo *icaC* e finalmente desacetilação da PIA pelo *icaB* (Cue *et al.*, 2012).

Figura 2: Modelo de síntese da PIA



Fonte: Speziale *et al.*, 2009

Por muito tempo foi discutida a influência do *operon ica* na produção de biofilme. De fato, em algumas cepas de *S. aureus* foi observado que a deleção do *operon* não impediu a formação do biofilme, mostrando que o biofilme pode ser produzido por uma via *ica*-independente (Arciola *et al.*, 2012). Na verdade, a matriz extracelular do biofilme também abriga 2 outras proteínas que parecem estar envolvidas na formação de biofilme, uma é a proteína associada ao biofilme (*bap* - *Biofilm-Associated Protein*), e a outra é a proteína associada a acumulação (*aap* - *Accumulation Associated Protein*). Este mecanismo alternativo de síntese do biofilme baseia-se na capacidade de *S. aureus* de expressar uma variedade de proteínas de adesão (MSCRAMMs) que permitem as células se fixar e colonizar um grande número de diferentes superfícies (Rohde *et al.*, 2010; Arciola *et al.*, 2012; Cue *et al.*, 2012).

1.3 MSCRAMMs

Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) são proteínas da superfície bacteriana que se ligam especificamente

a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro e compartilham uma estrutura de domínio semelhante, com atividade de ligação localizada no domínio N-terminal A, promovendo assim a fixação primária durante uma infecção (Ross *et al.*, 2012). Nessa interação as MSCRAMMs atuam como receptores e são capazes de reconhecer os componentes mais importantes do plasma sanguíneo ou da matriz extracelular do hospedeiro tendo um importante papel como fator de virulência (Speziale *et al.*, 2009).

O *S. aureus* pode expressar mais de 21 tipos diferentes dessas proteínas e entre elas estão a proteína ligadora de elastina (*ebpS*), proteína ligadora de laminina (*eno*), proteína ligadora de fibronectina A e B (*fnbA*, *fnbB*), proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), clumping factors A e B (*clfA* e *clfB*), e sialoproteína óssea (*bbp*) (Atshan *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012). Além de ser um passo fundamental na infecção, o processo de ligação com as proteínas séricas do hospedeiro também protege as células bacterianas da fagocitose e outros mecanismos de defesa, e, no caso específico das proteínas ligadoras de fibronectina, irão facilitar a internalização da bactéria em células epiteliais e endoteliais, onde poderá ocorrer replicação intracelular (Speziale *et al.*, 2009; Laverty *et al.*, 2013).

Em geral, as MSCRAMMs são vistas como elementos bacterianos de adesão tecidual e evasão imunológica. Inúmeras tentativas têm sido feitas para desenvolvimento de biomateriais implantáveis com superfícies que impeçam a colonização e adesão bacteriana. Entretanto, uma vez que essas superfícies são imediatamente recobertas por componentes celulares do hospedeiro pelos quais as bactérias apresentam alta afinidade, pouco progresso tem sido alcançado nesse sentido. No entanto, as MSCRAMMs têm sido alvo promissor no desenvolvimento de vacinas com intuito de impedir a colonização de implantes e tecidos do hospedeiro (Brady *et al.*, 2012; Laverty *et al.*, 2013).

1.4 Biofilme x antimicrobianos

A concentração de antimicrobianos necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilmes pode ser até 1000 vezes maior que a necessária para

eliminar as mesmas espécies em estado planctônico (Van Praagh *et al.*, 2011; Hook *et al.*, 2012).

Os mecanismos de resistência dos biofilmes ainda não estão totalmente claros, eles são usualmente multifatoriais e variam de um organismo para outro. A resistência antimicrobiana dos biofilmes pode ser considerada como um tipo de “resistência populacional” na qual o sequestro de drogas pode expor a bactéria a concentrações antimicrobianas abaixo da dose terapêutica dentro dos sítios de infecções. Além disso, outros fatores podem justificar tal resistência como o retardo da penetração dos antimicrobianos através da matriz do biofilme; crescimento lento ou ausência de crescimento das células dentro do biofilme; presença de heterogeneidade da população bacteriana dentro do biofilme em termos de presença de subpopulações com diferentes fenótipos de resistência; e a presença de células “persisters” (Cafiso *et al.*, 2010). Essas células comumente encontram-se na base estrutural dos biofilmes onde há limitada oferta de oxigênio apresentando reduzida taxa metabólica, e assim garantem a sua resistência ao tratamento com antimicrobianos, visto que os antimicrobianos geralmente agem na fase de crescimento bacteriano, como síntese protéica, síntese de ácidos nucléicos e de parede celular. Dessa forma, o tratamento pode conduzir à erradicação da maior parte da população do biofilme, mas a fração de células persistentes não é atingida e atua, portanto, como um núcleo para reinfecção, após a descontinuação terapêutica (Stewart, 2002).

A atividade dos antimicrobianos no biofilme depende do seu peso molecular, de cargas positivas, do coeficiente de permeabilidade e da atividade bactericida, por este ponto de vista, é obrigatório testar a atividade antibiofilme dos antimicrobianos potencialmente úteis para tratar nas infecções associadas a biofilme (Cafiso *et al.*, 2010; Reiter *et al.*, 2012). Os ensaios padronizados e parâmetros como Concentração Inibitória Mínima (MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*) e Concentração Bactericida Mínima (MBC: *Minimal Bactericidal Concentration*), determinadas normalmente com células em suspensão, são inadequados para avaliar a atividade antimicrobiana frente às células sésseis do biofilme. O ideal em situações onde há a possibilidade de formação de biofilme é a determinação da concentração do antimicrobiano necessária para inibir o crescimento das células no biofilme (MBIC - *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*), sendo assim, é de grande importância o desenvolvimento contínuo de estudos na avaliação da

atividade dos antimicrobianos frente a células de *S. aureus* envoltas por biofilmes em busca de novas alternativas para tratar essas infecções, sem que haja necessidade da remoção do dispositivo médico (Cafiso *et al.*, 2010).

2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Anderson MJ, Lin YC, Gillman AN, Parks PJ, Schlievert PM, Peterson ML. Alpha-Toxin Promotes *Staphylococcus aureus* Mucosal Biofilm Formation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 64(2): 1-10.
- 2) Arciola, C.R., Baldassarri, L. & Montanaro, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(6): 2151–6.
- 3) Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:976972. doi: 10.1155/2012/976972. PubMed PMID: 22701309; PubMed Central PMCID: PMC3372070.
- 4) Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 2004; 186(14): 4665-84.
- 5) Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008 Apr 25;4(4):e1000052. doi: 10.1371/journal.ppat.1000052. PubMed PMID: 18437240; PubMed Central PMCID: PMC2329812.
- 6) Brady RA, O'May GA, Leid JG, Prior ML, Costerton JW, Shirtliff ME. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infection and immunity.* 2011; 79(4):1797–803.
- 7) Bush K. Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Curr Opin Pharmacol.* 2012; 12(5): 527-34.
- 8) Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Stefani S. Tigecycline inhibition of a mature biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: comparison with other drugs. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59(3): 466-9.
- 9) Chauhan A, Lebeaux D, Decante B, Kriegel I, Escande MC, Ghigo JM, et al. A Rat Model of Central Venous Catheter to Study Establishment of Long-Term Bacterial Biofilm and Related Acute and Chronic Infections. *PLoS One.* 2012;7(5):e37281. doi: 10.1371/journal.pone.0037281. PubMed PMID: 22615964; PubMed Central PMCID: PMC3353920.
- 10) Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Mar 26;2:38. doi: 10.3389/fcimb.2012.00038. PubMed PMID: 23061050; PubMed Central PMCID: PMC3459252.
- 11) Edmiston Jr CE, Goheen MP, Seabrook GR, Johnson CP, Lewis BD, Brown KR, et al. Impact of selective antimicrobial agents on staphylococcal adherence to biomedical devices. *Am J Surg.* 2006; 192(3):344-54.

- 12) Haaber J, Cohn MT, Frees D, Andersen TJ, Ingmer H. Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics. *PloS One*. 2012; 7(7): e41075. doi: 10.1371/journal.pone.0041075. PubMed PMID: 22815921; PubMed Central PMCID: PMC3399816.
- 13) Hook AL, Chang CY, Yang J, Lockett J, Cockayne A, Atkinson S, et al. Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nat Biotechnol*. 2012; 30(9):868–75.
- 14) Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio*. 2012 Jul 31;3(4):e00198-12. doi:10.1128/mBio.00198-12. PubMed PMID: 22851659; PubMed Central PMCID: PMC3419523.
- 15) Kumar A, Ting YP. Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013; 111:747-54.
- 16) Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol*. 2006; 9(1):21-8.
- 17) Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future microbiol*. 2013; 8(4): 509-24.
- 18) Lin MH, Shu JC, Huang HY, Cheng YC. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *PloS One*. 2012; 7(3):e34388. doi: 10.1371/journal.pone.0034388. PubMed PMID: 22479621; PubMed Central PMCID: PMC3313993.
- 19) Otto M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm, Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu Rev Med*. 2013; 64:1–14.
- 20) Reiter KC, Sambrano GE, Villa B, Paim TG, Oliveira CF, d'Azevedo PA. Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012; 45(4): 471-4.
- 21) 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):103-11.
- 22) Ross CL, Liang X, Liu Q, Murray BE, Höök M, Ganesh VK. Targeted protein engineering provides insights into binding mechanism and affinities of bacterial collagen adhesins. *J Biol Chem*. 2012; 287(41): 34856-65.
- 23) Ruiz JP, Molina AB, Monje AP, Quero JH. Activity of linezolid and high-dose daptomycin, alone or in combination, in an in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(11): 2682-5.

- 24) Sambanthamoorthy K, Schwartz A, Nagarajan V, Elasri M. The Role of *msa* in *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *BMC Microbiol.* 2008 Dec 16; 8:221. doi: 10.1186/1471-2180-8-221. PubMed PMID: 19087289; PubMed Central PMCID: PMC2648981.
- 25) Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(4): 374-78.
- 26) Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A, et al. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.* 2009; 4(10):1337-52.
- 27) Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2002; 292(2): 107-13.
- 28) Tang J, Chen J, Li H, Zeng P, Li J. Characterization of Adhesin Genes, Staphylococcal Nuclease, Hemolysis, and Biofilm Formation Among *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Different Sources. *Foodborne Pathog Dis.* 2013; 10(9): 757-63.
- 29) Van Praagh ADG, Li T, Zhang S, Arya A, Chen L, Zhang XX, et al. Daptomycin antibiotic lock therapy in a rat model of staphylococcal central venous catheter biofilm infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(9): 4081-9.

3 JUSTIFICATIVA

Uma das características do *S. aureus* é sua capacidade de formar biofilme em substâncias bióticas ou abióticas. As infecções associadas a biofilmes tem significativo impacto, não só pelo próprio processo da doença, mas também pelas falhas no tratamento clínico, muitas vezes levando para um estado crônico e persistente de muitas infecções por *S. aureus*

A atividade dos antimicrobianos no biofilme depende de diferentes fatores, e por este ponto de vista, é importante testar a atividade antibiofilmes de diferentes drogas potencialmente úteis para tratar as infecções de *S. aureus* associadas a biofilme. Além disso, um melhor entendimento no mecanismo molecular do biofilme estafilocócico é de grande importância para possibilitar o desenvolvimento de estratégias de prevenção ou descobertas de novas opções terapêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Pesquisar a presença de genes envolvidos na formação do biofilme e avaliar a atividade antimicrobiana da daptomicina, linezolida, vancomicina e tigeciclina em isolados de *S. aureus* envoltos por biofilme.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar a MIC da daptomicina, linezolida, vancomicina e tigeciclina para células planctônicas de isolados clínicos de *S. aureus*.
- 2) Avaliar, *in vitro*, a capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de *S. aureus*.

5 DESENVOLVIMENTO

A seção de desenvolvimento será apresentada a seguir na forma de dois manuscritos. O primeiro manuscrito será submetido à publicação no periódico *Memórias do Instituto Osvaldo Cruz* e é intitulado **Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains Recovered From Bloodstream Infection in a Hospital of Southern Brazil**. O segundo manuscrito será submetido à publicação no periódico *Journal of Medical Microbiology*: **Biofilm formation and prevalence of MSCRAMMs and *icaADBC* genes in *Staphylococcus aureus* isolates of Southern Brazil**.

5.1 Manuscrito I

TITLE: Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains Recovered From Bloodstream Infection in a Hospital of Southern Brazil

RUNNING TITLE: Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *S. aureus*

AUTHORS: Jaíne Bruschi Stypulkowski¹, Juliana Caierão¹, Pedro Alves d'Azevedo¹

1- Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address to:

Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Laboratório de Cocos Gram-positivos /UFCSPA.

Rua Sarmiento Leite, 245 - sala 202. Porto Alegre, RS, Brasil.

CEP 90050-170

Phone: 55 51 3303-8742; **Fax:** 55 51 3303-8810

e-mail: jaine2212@gmail.com

Artigo formatado segundo as Normas da **Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**

ABSTRACT:

Introduction: *Staphylococcus aureus* is a major pathogen responsible for a wide range of both acute and chronic infections. It is well known that biofilms play a relevant role in the pathogenesis of *S. aureus* infections, causing difficulties in the eradication of many diseases. The purpose of our study was to evaluate the ability to form biofilm among *S. aureus* isolates recovered from bloodstream infection and to determine the activity of four antimicrobials against planktonic cells and in biofilms. **Methods:** Eighty nine strains were tested for daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin, for which Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), by broth microdilution method, and Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC), using a modified version of the Calgary Biofilm Device (BCD) method, were determined. Tigecycline showed better antibiofilm activity compared to the other antimicrobials, presenting the lowest MBIC / MIC ratio. **Results:** Altogether, 84% (79/89) of *S. aureus* formed biofilm. Isolates were fully susceptible to all antimicrobials evaluated. The MBIC results were considerably high, varying from 4 to 256 times the MIC value. **Conclusion:** Even though all antimicrobials tested presented excellent activity against planktonic cells, no drug proved to be effective against biofilm. Therefore, it could be interesting to consider tigecycline as a potentially useful option in the treatment of biofilm-related infections, although more studies are necessary to evaluate its actual role.

PALAVRAS CHAVES: *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Antimicrobial Susceptibility, Bloodstream Infection, MBIC.

FONTES DE FINANCIAMENTO: CNPq, FAPERGS, CAPES.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is a pathogen of major concern, causing diseases of variable severity in both community and nosocomial settings. This organism is one of the most frequently recovered pathogens from patients with severe hospital-acquired infections, such as ventilator-associated pneumonia, surgical site infections, and catheter-associated bloodstream infections. (Smith *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2012). It is well known that *S. aureus* has the ability to colonize and to form biofilms in both, damaged tissue and implanted biomaterials, causing many difficulties in the eradication of these infections and leading to a persistent and chronic state of many *S. aureus* diseases (Cafiso *et al.*, 2010, Ruiz *et al.*, 2012).

Cells in biofilm are protected from environmental factors such as dehydration and the host's immune defense mechanisms (Anderson *et al.*, 2012, Dosler & Mataraci, 2013). Furthermore, biofilm-associated bacteria are also much more resistant to antimicrobial agents, being 100 to 1000 fold higher than planktonic cells (Van Praagh *et al.*, 2011, Anderson *et al.*, 2012).

The activity of antimicrobials against biofilms depends on their molecular size, positive charges, permeability coefficient and bactericidal activity. From this point of view, it is mandatory to test the antibiofilm activity of new drugs, potentially useful in biofilm-associated infections (Cafiso *et al.*, 2010, Reiter *et al.*, 2012). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the ability to form biofilm of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bloodstream infection and to compare the *in vitro* activity of tigecycline, linezolid, daptomycin and vancomycin, against *S. aureus* in biofilms and planktonic cells.

METHODS

Bacterial Isolates

S. aureus recovered from catheter and blood of patients hospitalized at Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) between January and July 2012 were included in this study. Eighty-nine staphylococcal isolates were studied. Only isolates from different patients were evaluated and among these isolates, 15 (17%) were previously identified as MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). Species identification was performed using coagulase and DNase test (Becker e Von Eiff, 2011) and all the isolates were kept frozen in skim milk at -20°C until the experiments were performed.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Conventional MICs of daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin (Sigma-Aldrich) were determined for all isolates by broth microdilution method using Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines (CLSI, 2014). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was included as a quality control.

Biofilm formation

Biofilm formation was performed the assay described by Stepanovic and collaborators (2007). Biofilm quantification was done by measuring optical density at 492 nm using the Expert Plus microtitre plate reader (Asys Hitech). According to these values, isolates were classified as non-adherent, weakly or strongly adherent. *S. epidermidis* ATCC 35984 (biofilm producer) was used as positive control. For measuring optical density, a negative control (comprising all reagents but bacterial inoculums) was used.

Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)

Among isolates classified as strongly biofilm formers, ten (selected by convenience) with the higher optical density were selected for MBIC experimente, which was performed

using a modified version of the Calgary Biofilm Device (BCD) method (Ceri *et al.*, 1999). After induction of biofilm formation in accordance with the method described by above the non-adherent cells were removed by gentle washing three times with sterile saline solution (150 μ l 0.9 % NaCl). The plates were left to dry for 15 min at room temperature. Serial triplicate dilutions of each antimicrobial agent at different concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 and 32.0 μ g/mL) were added to the microplates followed by incubation at 35 °C for 24 h. MBIC was defined as the minimal antimicrobial concentration at which there was no observable bacterial growth in wells containing adherent microcolonies, i.e. the minimal concentration that inhibited the release of planktonic bacteria from biofilm.

RESULTS

During the study period, 89 *S.aureus* were recovered: 8 isolated from catheter-tip and 81 from blood culture. The ability to form biofilm was observed in 84% (n=75) of the isolates, 73% (n=55) were classified as strongly adherent and 27% (n=20) as weakly adherent. Among 75 isolates formed biofilm, 7 were from catheter and 68 from blood culture.

Table 1 shows the results of the antimicrobial susceptibility of *S. aureus*, including the MIC₅₀ and MIC₉₀ values. In this study, according to the CLSI (2014) breakpoints, all 89 clinical isolates of *S. aureus* showed 100% susceptibility of to the four antimicrobials tested to the tested antimicrobials by a MIC testing (Table 1).

Table 2 presents MBIC results for the strongly biofilm formers with the higher optical density. The results of the sessile cells were considerably high when compared to the MIC for planktonic cells of the same isolates. Among the antimicrobials tested tigecycline was the most effective among the cells in biofilm. Indeed, 70% of isolates presented tigecycline MBIC lesser than 8 μ g/ml.

DISCUSSION

Biofilm-related infections are a subject of major concern, especially in nosocomial setting. Several studies have demonstrated a high capacity for biofilm formation among isolates of *S. aureus* (Anderson *et al.*, 2012; Reiter *et al.*, 2011; Manso *et al.*, 2013; Mirani *et al.*, 2013). In Brazil most studies considering biofilm formation among *Staphylococcus* are performed with *S. epidermidis* or other coagulase-negative staphylococci (Leite *et al.*, 2011; Antunes *et al.*, 2011; Reiter *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013). In the present study, we evaluated the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains recovered from bloodstream infection in a hospital in Southern Brazil and the capacity of four different drugs to eradicate the biofilm *in vitro*. The most isolates were able to form biofilm (strongly adherent), highlighting the capacity of biofilm formation among *Staphylococcus aureus*.

Although all antimicrobials were effective, tigecycline and daptomycin had the lowest planktonic MIC range, followed by vancomycin and linezolid (**Table1**).

Standard MIC measurements for planktonic cells do not reflect the real antimicrobials susceptibilities of bacterial biofilms. (Cha *et al.*, 2011). The CBD has been suggested as a reliable method for biofilm antimicrobial susceptibility testing in several studies (Ruiz *et al.*, 2012; Dosler & Mataraci, 2013; Manso *et al.*, 2013; Reiter 2013). This method allows the production of equivalent biofilms in the same plate and to test several antimicrobials in a single assay (Manso *et al.*, 2013).

The lower activity of antimicrobials against sessile cells in biofilm is well-known (Cafiso *et al.*, 2010; Dosler & Mataraci, 2013; Manso *et al.*, 2013; Reiter *et al.*, 2013). The MBIC results were considerably high when compared to MIC, varied from 4 to 256 fold dilutions higher than MIC and cannot be considered susceptible according to the CLSI (2014) breakpoints for planktonic cells. Manso and co-workers (2013) evaluated the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) to nine antimicrobials against 34 biofilm-forming

staphylococci and none of them was effective for eradicating the biofilms with MBECs the MIC data (>1024 mg/l in most cases).

In general, the higher MBIC / MIC ratio was demonstrated for daptomycin (> 32 / 0.125), although in general this antimicrobial was the second more effective against biofilm. As also demonstrated by other studies (Raad *et al.*, 2007; Cafiso *et al.*, 2010) linezolid had the highest MBIC/ MIC. However, Ruiz and co-workers (2012) showed that combination therapy among linezolid and other antimicrobials such as daptomycin, for example, demonstrated greater activity than either of the two agents alone, significantly improved the bacterial killing effect of both agents against biofilms of *S. aureus*.

In conclusion, tigecycline presented the lower MBIC/MIC ratio, but none of the evaluated drugs were effective against sessile cells.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERENCES

Anderson MJ, Lin YC, Gillman AN, Parks PJ, Schlievert PM, Peterson ML 2012. Alpha-Toxin Promotes *Staphylococcus aureus* Mucosal Biofilm Formation. *Front Cell Infect Microbiol* 64: 01-10.

- Haaber J, Cohn MT, Frees D, Andersen TJ, Ingmer H 2012. Planktonic Aggregates of *Staphylococcus aureus* Protect against Common Antibiotics. PLoS ONE 7: e41075.
- Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira 2011. In vitro Activity of Daptomycin, Linezolid and Rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* Biofilm. *Curr Microbiol* 63: 313–317.
- Manso DM, del Prado G, Pérez AO, Cobo MM, Barrena EG, Ampuero JC, Esteban J 2013. In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Agents* 41: 521–523.
- Mirani ZA, Aziz M, Khan MN, Lal I, ul Hassan N, Khan SI 2013. Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. *Microb Pathog* 61-62: 66-72.
- Oksuz L & Gurler N 2013. Susceptibility of clinical methicillin-resistant Staphylococci isolates to new antibiotics. *LutfiyeJ Infect DevCtries* 7: 825-831.
- Raad I, Hanna H, Jiang Y, Dvorak T, Reitzel R, Chaiban G, Sherertz R, Hachem R 2007. Comparative Activities of Daptomycin, Linezolid, and Tigecycline against Catheter-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Bacteremic Isolates Embedded in Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1656–1660.
- Reiter KC, Paim TGS, de Oliveira CF, d’Azevedo PA 2011. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *APMIS* 119: 776–781.
- Reiter KC, Sambrano GE, Villa B, Paim TGS, de Oliveira CF, d’Azevedo PA 2012. Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 471-474.

- Reiter KC, Villa B, Paim TGS, de Oliveira CF, d'Azevedo PA 2013. Inhibition of biofilm maturation by linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: comparison with other drugs. *J Med Microbiol* 62: 394–399.
- Ruiz JP, Molina AB, Monje AP, Quero JH 2012. Activity of linezolid and high-dose daptomycin, alone or in combination, in an in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Antimicrob Chemother* 67: 2682-2685.
- Silva PV, Cruz RS, Keim LS, de Paula GR, Carvalho BTF, Coelho LR, Carvalho MCS, Rosa JMC, Figueiredo AMS, Teixeira LA, 2013. The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 812-816.
- Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S 2009. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents* 33: 374–378.
- Smith K, Gould KA, Ramage G, Gemmell CG, Hinds J, Lang S 2010. Influence of Tigecycline on Expression of Virulence Factors in Biofilm-Associated Cells of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 380-387.
- Stepanovic S, Vukovi D, Hola V, Di Bonaventura, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 115: 891–899.

Van Praagh ADG, Li T, Zhang S, Arya A, Chen L, Zhang XX, Bertolami S, Mortin LI 2011. Daptomycin antibiotic lock therapy in a rat model of staphylococcal central venous catheter biofilm infections. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4081–4089.

TABLES

Table 1: Minimum inhibitory concentration – MIC ($\mu\text{g/ml}$) of four antimicrobials against 89 *S. aureus* clinical isolates.

Antimicrobial	MIC - Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Daptomycin	0,125 – 0,5	0,25	0,5
Linezolid	2 - 4	4	4
Tigecycline	0,125 – 0,5	0,25	0,5
Vancomycin	1 - 2	2	2

MIC_{50/90}, MIC for 50% and 90% of the organisms, respectively.

Table 2: MBIC/ MIC ratio for 10 strongly biofilm-formers *S. aureus*.

Isolates	Daptomycin	Linezolid	Tigecycline	Vancomycin
SA10	64 (8/ 0,125)	16 (32/ 2)	8 (2/ 0,25)	32 (32 / 1)
SA13	>256 (>32/ 0,125)	>16 (>32/ 2)	32 (8/ 0,25)	32 (32 / 1)
SA22	32 (4/ 0,125)	>16 (>32/ 2)	8 (4/ 0,5)	8 (16 / 2)
SA27	128 (16/ 0,125)	8 (32/ 4)	8 (2/ 0,25)	>16 (>32 / 2)
SA31	32 (4/ 0,125)	>8 (>32/ 4)	32 (16/ 0,5)	>32 (>32 / 1)
SA34	64 (8/ 0,125)	>16 (>32/ 2)	4 (2/ 0,5)	16 (32 / 2)
SA38	128 (16/ 0,125)	16 (32/ 2)	4 (1/ 0,25)	16 (16 / 1)
SA39	>256 (>32/ 0,125)	4 (16/ 4)	8 (2/ 0,25)	>16 (>32 / 2)
SA48	64 (16/ 0,25)	>8 (>32/ 4)	32 (8/ 0,25)	16 (32 / 2)
SA74	64 (16/ 0,25)	>16 (>32/ 2)	16 (2/ 0,125)	4 (8 / 2)

MIC, Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$); MBIC, Minimum Biofilm Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/ml}$).

5.2 Manuscrito II

TITLE: Biofilm formation and prevalence of MSCRAMMs and *icaADBC* genes in *Staphylococcus aureus* recovered of Southern Brazil

RUNNING TITLE: Biofilm formation and prevalence of MSCRAMMs and *icaADBC* genes in *S. aureus*

CATEGORIE: Pathogenicity and virulence

AUTHORS: Jaíne Bruschi Stypulkowski¹, Carolina Mallmann Wallauer¹, Juliana Caierão¹, Pedro Alves d'Azevedo¹

1- Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address to:

Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Laboratório de Cocos Gram-positivos /UFCSPA.

Rua Sarmiento Leite, 245 - sala 202. Porto Alegre, RS, Brasil.

CEP 90050-170

Phone: 55 51 3303-8742; **Fax:** 55 51 3303-8810

e-mail: jaine2212@gmail.com

Artigo formatado segundo as Normas da Revista **Journal of Medical Microbiology (JMM)**

ABSTRACT:

The involvement of biofilms are a subject of major concern in clinical infections and the recognition and characterization of genes involved in the multifactorial process has received increasing interest. It is well known that biofilms play an important role in the pathogenesis of *S. aureus* infections, leading to difficulties in the eradication of bacterial population. The purpose of our study was to correlate the production of biofilm and to determine the frequency of nine MSCRAMMs, as well as the *icaADBC* genes among isolates. The current investigation was carried out for 89 isolates, using a microtiter plate assay to determine the biofilm production and the polymerase chain reaction (PCR) to detect the presence of referred genes. The ability to form biofilm was observed in 84% (n=75) of all isolates, 73% (n=55) were classified as strongly adherent and 27% (n=20) as weakly adherent. The *ica* genes were observed in distinct frequencies, as follows: 87%, 87%, 73% and 61%, for *icaA*, *icaD*, *icaB* and *icaC*, respectively. Among the MSCRAMMs the most prevalent were *clfB* (92%), *clfA* (88%) and *eno* (85%), while less prevalence were *fnbB* (9%) and *bbp* (11%). There was no significant difference ($p>0,05$) between distribution of genes and biofilm formation, which reinforces the complex and multifactorial procedure of biofilm formation in *S. aureus*.

INTRODUCTION

Due to its numerous virulence factors and its ability to readily acquire resistance to antimicrobials, *S. aureus* is a major human pathogen, often causing nosocomial infections (Namvar *et al.*, 2013; Nakakido *et al.*, 2014). The first step of staphylococcal infection is the attachment to surfaces of various materials, including medical devices and host tissues, which are attributed to a combination of extracellular factors such as adhesins and biofilm formation. (Atshan *et al.*, 2012).

The surface-exposed proteins collectively referred to as MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) seems to be the primary determinants responsible for the initial attachment to both native tissues and biomaterials (Beenken *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2006). *S. aureus* can express a variety of MSCRAMMs that interact with host extracellular ligands, such as elastin binding protein (*ebpS*), laminin binding protein (*eno*), collagen binding protein (*cna*), fibronectin binding proteins A and B (*finbA*, *finbB*), fibrinogen binding protein (*fib*), clumping factors A and B (*clfA*, *clfB*), and bone sialoprotein binding protein (*bbp*).

On the other hand, cell aggregation and biofilm accumulation are mediated by the products of a gene locus composing of the genes *icaADBC*, which encode the essential proteins for the production of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) and capsular polysaccharide/adhesion (PS/A) in *Staphylococcus* spp. It was demonstrated that *ica*-encoded genes are responsible for biosynthesis of the PIA, playing a crucial role in invasiveness of *S. aureus* (Gad *et al.*, 2009; Atshan *et al.*, 2012; Namvar *et al.*, 2013). However, PIA-negative strains are still capable of forming biofilms. In these cases, MSCRAMMs might contribute to biofilm formation (Namvar *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013).

As biofilm-related infections has become a subject of major concern in modern medicine, the understanding of the process of formation of biofilm, including the detection and

characterization of genes involved in those process has received increasing attention (Atshan *et al.*, 2012). Therefore, understanding the molecular mechanisms of *S. aureus* biofilm formation may enhance therapeutic strategies to treat chronic infections (Mootz *et al.*, 2013). The aim of this study was to correlate the production of biofilm and the genotypic characterizations of *S. aureus*, determining the frequency of MSCRAMMs and *icaADBC* genes among isolates from blood infection.

METHODS

Bacterial Isolates

Were evaluated *S. aureus* consecutively recovered from catheter and blood sample of patients attending at Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericordia de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) between January and July, 2012. Eighty-nine staphylococcal isolates were studied and species identification was performed using coagulase and DNase test (Becker e Von Eiff, 2011) and all isolates were cultured and kept frozen in skim milk at -20°C .

Biofilm formation

Biofilm formation was performed the modified assay described by Stepanovic and collaborators (2007), on polystyrene microplates stained with crystal violet. To quantify biofilm, optical density was measured at 492 nm using the Expert Plus microtitre plate reader (Asys Hitech). According to the optical density the isolates were classified as non-adherent, weakly or strongly adherent. *S. epidermidis* ATCC 35984 (biofilm producer) was included as positive control. For measuring optical density, a negative control (comprising all reagents but bacterial inoculums) was used.

DNA extraction and PCR assay

Genomic DNA was extracted by boiling as described previously by **Eftekhar & Dadaei** (2011). Quality of DNA preparation was assessed by determining the ratio of OD_{260nm}/OD_{280nm}.

The distribution of 9 MSCRAMMs and *icaADBC operon* genes in different *S. aureus* isolates was examined by simplex PCR method. The primers used for detection and PCR sets, as well as the expected amplicon sizes, are listed in Table I. This study evaluated the presence of 9 MSCRAMMS most frequently studied among *S. aureus* isolates (Nemati *et al.*, 2009; Atshan *et al.*, 2012; Szczuka *et al.*, 2013). All primers used were previously published (Nemati *et al.*, 2009; Atshan *et al.*, 2012).

The reaction mixture of PCR was 25µl in total volume following concentrations: 0,2µM of each oligonucleotide primer, 200µM deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 2 mM MgCl₂, enzyme buffer 1X, 10-25 ng of bacterial DNA and 2U Taq DNA polymerase. DNA amplification was carried out in a thermocycler with the following thermal cycling program: initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 30 cycles of amplification (denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 54 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min) ending with a final extension at 72 °C for 10 min.

The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and ethidiumbromide staining. The DNA bands were observed under a UV transilluminator. The Gene Ruler 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec) was used as a DNA size marke.

Statistical analysis

IBM SPSS Statistics 22.0 was used for statistical analysis. Comparison of the presence of the *icaADBC* genes was performed firstly with the Fisher's exact test between slime production and non-slime producing isolates. Chi-squared (χ^2) test was used to analyze frequencies of

MSCRAMMs genes and the ones involved in biofilm formation: non-adherent, weakly or strongly adherent. A probability value $p < 0.05$ was considered different significantly.

RESULTS AND DISCUSSION

The present study investigated the frequency of 9 MSCRAMMs and *icaADBC* genes in *S. aureus* isolates, and correlated with the ability of biofilm formation. Eighty-nine isolates were recovered during the study period. The ability to form biofilm was observed in 84% (n= 75) of all isolates, 73% (n= 55) were classified as strongly adherent and 27% (n= 20) as weakly adherent.

The prevalence of MSCRAMMs and *ica operon* genes, and correlation with biofilm formation is shown in Table 2 and Table 3, respectively. The *icaA* and *icaD* genes were the most prevalent, both being detected in 77 (87%) among all isolates (n=89). The *icaB* and *icaC* genes were detected with frequency 73% and 61% respectively. Among the adhesion genes (MSCRAMMs), *clfB* and *clfA* were most prevalent genes among *S. aureus*, being detected in 92% and 89% respectively. On the other hand, *fnbB* (9%) and *bbp* (11%) presented the lowest prevalence.

S. aureus possesses numerous proteins on its cell surface that are thought to be important in infection, the functions and the molecular mechanisms involving in these proteins are largely unknown (Nakakido *et al.*, 2014). Our results indicated that the majority of *S. aureus* isolates had the ability to produce biofilm in vitro. This ability enables these organisms to withstand the host immune response and is considered to be the cause of chronic or persistent infections (Namvar *et al.*, 2013). Understanding the molecular mechanisms of *S. aureus* biofilm formation and dispersal may enhance therapeutic strategies to treat chronic infections (Mootz *et al.*, 2013).

According to Götz (2002), biofilm accumulation relies on cell-cell adhesion mediated by the polysaccharide intercellular adhesin (PIA), which is produced by the *icaADBC operon*, and it was shown that it plays a major role in biofilm accumulation. Others studies, however, have indicated that *icaADBC operon* is not essential for biofilm formation in some strains (Beenken *et al.*, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2005; Sambanthamoorthy *et al.*, 2008).

Furthermore, *S. aureus* expresses many surface proteins of the MSCRAMMs family, which specifically recognize and bind to the extracellular matrix components of the host and appear to be the primary determinants responsible for the initial attachment of cells biofilm (Machuca *et al.*, 2013) According to Tang *et al.* (2013) the PIA belongs to nonproteinaceous adhesins and the MSCRAMMs family belongs to proteinaceous adhesins, thus the biofilm formation might belong to the proteinaceous adhesins pattern, in which secreted proteins and extracellular DNA appear to substitute for PIA.

Similarly to Gotz (2002), some studies have shown that formation of biofilm in *S. aureus* is associated with the presence of *icaA* and *icaD* genes (Arciola *et al.*, 2001; Namvar *et al.*, 2013). Indeed, in the present study, the *icaA* and *icaD* genes were the most prevalent (Table 2). However, there was no significant difference ($p > 0,05$) between the presence of the *icaAD* genes and the ability of biofilm formation among *S. aureus* isolates. The *icaB* and *icaC* genes were less frequently detected among the isolates but similarly there were no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the presence of those genes and biofilm formation. These results are coincident with the findings reported by Vancraeynest *et al.* (2004), Szczuka *et al.* (2013) and Tang *et al.* (2013), reinforcing the idea that these genes are not essential for biofilm formation.

Genes of *ica* operon are related qualitatively to the biofilme formation. On the other hand MSCRAMMS may affect the intensity of biofilm formation, as stronger biofilm formers may present (an dexpress) higher number of MSCRAMMS.

Among the nine MSCRAMMs evaluated in this work (Table 2), *clfA*, *clfB* and *eno* were the most prevalent. Our findings were similar to the observations by Vancraeynest *et al.* (2004) and Scukuza *et al.* (2013). The high percentage observed in our study is consistent with the fact that these genes are ubiquitously carried by different *S. aureus* lineages and that these genes have been reported to play a determinant role in bacterial virulence (Machuca *et al.*, 2013). However the presence of MSCRAMMs genes does not seem to be essential ($p > 0,05$) neither for biofilm formation or the consistency of biofilm (weakly or strongly adherent).

As the *ica* operon genes, none MSCRAMMs was detected in 100% of isolates, and those with less frequency were *fnbB* (8%), *bbp* (11%) e *cna* (32%). All other genes appeared in over 60% of the isolates and no significant difference ($p > 0.05$) between the presence of these genes and the formation or consistency of the biofilm.

Presence and quantity of the genes studied has a similar variation among biofilm formers (weak or strong) and the isolates unable to produce biofilm. Among the 89 isolates studied, 4 were strongly biofilm formers, even though they have not any *ica* gene. Moreover, among these four isolates, only one presented 3 genes MSCRAMMs (*eno*, *fib* and *clfA*) and only *eno* was detected in the 4 isolates. We also observed some *S. aureus* that did not formed biofilm carrying all genes from the *ica* operon (*icaADBC*). Indeed, the presence of the gene does not define its expression. Therefore, as future prospects, we aim to perform studies evaluating the expression of the referred genes.

It is well-known that biofilm formation usually occurs in response to an environmental stress. We observed 14 isolates that were not able to form biofilm *in vitro*. One could expect these isolates may be able to form biofilm *in vivo*. Indeed, experiments with animal models should be used to effectively determine this *in vivo* capacity to produce biofilme. Another point of concern is that different materials have a great impact on biofilm formation and adhesion. It is therefore very important that more studies be undertaken to elucidate not only the genes

involved, but also the necessary environmental conditions for bacteria to develop this capacity.

The results presented here suggest that the biofilm formation process in *S. aureus* isolates is complex and independent of the presence of MSCRAMMs and *icaADBC* genes, indicating that only one gene or subset of genes that can not be used as an indicator of biofilm formation capacity among strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERENCES

Arciola, C.R., Baldassarri, L. & Montanaro, L. (2001). Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 39, 2151–2156.

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

Becker, K. & Von Eiff, C. (2001). *Staphylococcus, Micrococcus*, and others catalase-positive cocci. In: Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Warnock, D. W. editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington, DC. ASM PRESS; 308-330.

Beenken, K. E., Dunman, P. M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., Blevins, J. S. & Smeltzer, M. S. (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186, 4665-4684.

Eftekhari, F. & Dadaei, T. (2011). Biofilm Formation and Detection of *IcaAB* Genes in Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Iran J Basic Med Sci* 14, 132-136.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H. & O'Gara, J. P. (2005). The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect* 11, 967-973.

Gad, G. F. M., El-Feky, M. A., El-Rehewy, M. S., Hassan, M. A., Abolella, H. & Abd El-Baky, R. M. (2009). Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 3, 342–351.

Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43, 1367– 1378.

Kong, K. F., Vuong, C. & Otto, M. (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* 296, 133–139.

Machuca, M. A., Sosa, L. M. & Gonza, C. I. (2013). Molecular Typing and Virulence Characteristic of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Pediatric Patients in Bucaramanga, Colombia. *PLOS ONE* 8, Issue 8 | e73434.

Mootz, J. M., Malone, C. L., Shaw, L. N. & Horswill, A. R. (2013). Staphopains Modulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Integrity. *Infect Immun* 81, 3227–3238.

- Nakakido, M., Aikawa, C., Nakagawa, I. & Tsumoto, K. (2014).** The staphylococcal elastin-binding protein regulates zinc-dependent growth/biofilm formation. *J Biochem* 156, 155-162.
- Namvar, A. E., Asghari, B., Ezzatifar, F., Azizi, G. & Lari, A. R. (2013).** Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg Infect Control* 8, ISSN 2196-5226.
- Nemati, M., Hermans, K., Devriese, L. A., Maes, D. & Haesebrouck, F. (2009).** Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry. *Avian Pathol* 38, 513-517.
- Sambanthamoorthy, K., Schwartz, A., Nagarajan, V. & Elasri, M. (2008).** The Role of msa in *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *BMC Microbiol*, doi: 10.1186/1471-2180-8-221.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. & Ruzicka, F. (2007).** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 115, 891-899.
- Szczuka, E., Urbanska, K., Pietryka, M. & Kaznowski, A. (2012).** Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia microbiologica*, 58, 47-52.
- Tang, J., Chen, J., Li, H., Zeng, P. & Li J. (2013).** Characterization of Adhesin Genes, Staphylococcal Nuclease, Hemolysis, and Biofilm Formation Among *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Different Sources. *Foodborne Pathog Dis* 10, 757-763.

Vancraeynest, D., Hermans, K. & Haesebrouck, F. (2004). Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol* 103, 241-247.

TABLES

Table 1. PCR target genes and primers used in this paper.

<i>Genes</i>	Nucleotide sequence of primers	Amplicon size (bp)
<i>icaA</i>	5-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3 5-TCTGGAACCAACATCCAACA-3	188
<i>icaD</i>	5-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3 5-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-3	198
<i>icaB</i>	5-AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT-3 5-TCTAATCTTTTTTCATGGAATCCGT-3	900
<i>icaC</i>	5-ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA-3 5-TAATAAGCATTAAATGTTCAATT-3	1100
<i>eno</i>	5-ACGTGCAGCAGCTGACT-3 5-CAACAGCATCTTCAGTACCTTC-3	301
<i>ebps</i>	5-CATCCAGAACCAATCGAAGAC-3 5-AGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG-3	180
<i>fnbA</i>	5-CATAAATTGGGAGCAGCATCA-3 5-ATCAGCAGCTGAATTCCCATT-3	128
<i>fnbB</i>	5-GTAACAGCTAATGGTTCGAATTGATACT-3 5-CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC-3	523
<i>fib</i>	5-CTACAACACTACAATTGCGTCAACAG-3 5-GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC-3	405
<i>clfA</i>	5-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT-3 5-CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG-3	288
<i>clfB</i>	5-ACATCAGTAATAGTAGGGGCAAC-3 5-TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC-3	203
<i>bbp</i>	5-AACTACATCTAGTACTCAACAACAG-3 5-ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT-3	574
<i>cna</i>	5-AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA-3 5-AGTGCCTTCCCAAACCTTTT-3	192

Table 2. Distribution of MSCRAMMs genes associated with biofilm formation among *S. aureus* strains.

<i>Genes</i>	Total 89 (100%)	Biofilm			<i>P-value</i>
		Strong N= 55	Weak N=20	No-producing N=14	
<i>eno</i>	76 (85%)	44 (80%)	19 (95%)	13 (93%)	0,184
<i>Ebps</i>	57 (64%)	34 (62%)	14 (70%)	9 (64%)	0,808
<i>fnbA</i>	73 (82%)	47 (85%)	15 (75%)	11 (79%)	0,543
<i>fnbB</i>	8 (9%)	5 (9%)	3 (15%)	0 (0%)	0,322
<i>fib</i>	66 (74%)	38 (69%)	17 (85%)	11 (77%)	0,349
<i>clfA</i>	79 (88%)	50 (91%)	17 (85%)	12 (86%)	0,716
<i>clfB</i>	82 (92%)	51 (93%)	19 (95%)	12 (86%)	0,592
<i>bbp</i>	10 (11%)	8 (15%)	1 (5%)	1 (7%)	0,445
<i>cna</i>	28 (32%)	16 (29%)	8 (40%)	4 (29%)	0,646

Chi-squared (χ^2) test. Not significant ($P>0.05$)

Table 3. Presence of operon *ica* genes associated with biofilm formation among *S. aureus* strains.

<i>Operon genes</i>	Total 89 (100%)	Biofilm		<i>P-value</i>
		Form N= 75	No-producing N= 14	
<i>icaA</i>	77(87%)	66 (88%)	11 (79%)	0,393
<i>icaD</i>	77(87%)	66 (88%)	11 (79%)	0,393
<i>icaB</i>	65(73%)	53 (71%)	12 (86%)	0,335
<i>icaC</i>	54(61%)	44 (59%)	10 (71%)	0,553

Fisher's exact test. Not significant ($P>0.05$).

6 CONCLUSÃO

Os nossos resultados evidenciaram que a grande maioria dos isolados de *S. aureus* tem a capacidade de produzir biofilme, o que pode contribuir para o estabelecimento de infecções crônicas e persistentes.

Os antimicrobianos avaliados neste estudo foram daptomicina, linezolida, tigeciclina e vancomicina. Todos os isolados se apresentaram susceptíveis a estes agentes quando avaliados pela técnica tradicional da microdiluição em caldo para avaliação da MIC, realizada com as células no estado planctônico. As menores concentrações para inibição do crescimento bacteriano foram obtidas com a tigeciclina e daptomicina, respectivamente.

Estes resultados, porém, não refletem a real susceptibilidade dos isolados em biofilme bacteriano, onde já é bem conhecido que os antimicrobianos têm uma atividade reduzida. As concentrações inibitórias em células dentro do biofilme foram consideravelmente elevadas quando comparadas com as mesmas nas células planctônicas, variando até 256 diluições acima. Entre os antimicrobianos testados, a tigeciclina mostrou a melhor atividade anti-biofilme, apresentando menor relação MBIC/MIC para inibir o crescimento de células em biofilmes, sugerindo que pode ser considerada potencialmente útil no tratamento dessas infecções, embora mais estudos sejam necessários para avaliar o seu real desempenho. Já a linezolida foi o antimicrobiano que apresentou menor poder de inibição entre esses isolados.


O nosso estudo mostra que diversos isolados de *S. aureus* são capazes de formar biofilme mesmo na ausência dos genes produtores de PIA. Embora os genes *icaA* e *icaD* tenham apresentado grande prevalência entre os isolados estudados, a análise estatística não demonstrou diferença significativa da presença destes genes entre isolados formadores e não formadores de biofilme. O mesmo ocorreu com os genes *icaB* e *icaC*, embora a prevalência destes tenha sido menor entre os isolados. Além destes genes, os isolados de *S. aureus* também expressam muitas proteínas de superfície da família MSCRAMMs, que parecem ser importantes na fixação inicial das células em biofilme. Entre as nove MSCRAMMs avaliadas neste trabalho, *clfA*, *clfB* e *eno* foram, respectivamente, as mais prevalentes, enquanto que *fnbB*, *bbp* e *cna* respectivamente foram detectadas com menor frequência,. Todos os outros genes de MSCRAMMs foram detectados em mais de 60% dos isolados. No entanto

não houve diferença significativa entre a presença de MSCRAMMs e a formação ou a consistência do biofilme

Os resultados aqui apresentados sugerem que o processo de formação de biofilmes em isolados de *S. aureus* é complexo e independe da presença de genes *icaADBC* e MSCRAMMs. Isso mostra que apenas um gene ou um subconjunto de genes não pode ser usado como um indicador da capacidade de formação de biofilme entre os isolados. Observou-se variação genética considerável entre os diferentes isolados testados e que a formação de biofilme em estafilococos pode ser influenciada por vários fatores e condições ambientais. Além disso, bactérias associadas ao biofilme não são afetadas por concentrações terapêuticamente administráveis de agentes antimicrobianos, o que torna indispensável a busca de novas alternativas para o tratamento de infecções envolvendo este mecanismo de virulência. A compreensão dos mecanismos moleculares de formação e dispersão de biofilme por *S. aureus* podem contribuir para desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes em infecções associadas a biofilme trazendo novos desafios para o tratamento e prevenção destas infecções.

7 ANEXOS

7.1 Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AÇÃO DE NOVOS ANTIMICROBIANOS FRENTE A ISOLADOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS PRODUTORES DE BIOFILME E DETERMINAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À SUA FORMAÇÃO

Pesquisador: Pedro Alves d'Azevedo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 20607513.2.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 511.695

Data da Relatoria: 16/01/2014

Apresentação do Projeto:

Staphylococcus aureus é um patógeno que frequentemente causa infecções associadas à formação de biofilmes e desta forma tem se mostrado resistentes à antibióticos em concentrações suficientes para eliminar as mesmas células na forma planctônica. O estudo visa investigar a eficácia de antimicrobianos de última geração em cepas de S. aureus produtores de biofilmes e a expressão dos genes associados à sua formação. Será realizado um estudo transversal utilizando isolados consecutivos de S. aureus no ano de 2012 e para testar a atividade dos antimicrobianos, nas cepas produtoras de biofilme, será utilizado o método das microplacas com diluição seriada seguida de recuperação bacteriana em biofilme após exposição antimicrobiana. Os genes associados à formação do biofilme serão pesquisados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Propõem dispensa de TCLE pois as amostras de bactérias já foram coletadas em estudos prévios aprovados pelos CEP responsáveis.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana da daptomicina, linezolid, vancomicina e tigeciclina frente a células de S. aureus em biofilme.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245	CEP: 90.050-170
Bairro:	
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)303-8804	E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 511.695

Objetivos específicos

- 1) Determinar a MIC da daptomicina, linezolida, vancomicina e tigeciclina para células plânctônicas de isolados clínicos de *S. aureus*.
- 2) Avaliar, in vitro a capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de *S. aureus*.
- 3) Determinar a MBIC da daptomicina, linezolida, vancomicina e tigeciclina em copas de *S. aureus* produtoras de biofilme.
- 4) Pesquisar a presença dos genes envolvidos na formação do biofilme, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem riscos, análise laboratorias de isolados de bactérias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória adequados. Dispensa de TCLE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As modificações solicitadas foram atendidas. Adequado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Execução jan/2014-fev/2015

De acordo com o Parecer do Relator.

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro:

UF: RS

Telefone: (513)303-8804

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 90.050-170

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 511.695

PORTO ALEGRE, 17 de Janeiro de 2014

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro: CEP: 90.050-170

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

7.2 Normas de publicação Revista 1



MEMÓRIAS DO
INSTITUTO
OSWALDO
CRUZ

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Produtos naturais](#)

ISSN 0074-0276 versão
impressa
ISSN 1678-8060 versão on-
line

Escopo e política

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz é uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão somente através de convite. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos em inglês. Inglês de baixa qualidade é a principal causa de atraso na publicação; então, sugerimos aos autores que tenham inglês como língua estrangeira submeterem seus manuscritos à verificação de alguém com o inglês como língua nativa e, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às *Memórias* requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação do material.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos no seguinte

link: <http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

Com este serviço, você poderá submeter manuscritos e verificar o conteúdo de sua submissão. Os arquivos eletrônicos serão usados para avaliação editorial e arbitragem online. Além disso, a decisão editorial do manuscrito será comunicada diretamente a você.

Usando o serviço de submissão eletrônica, você vai garantir rapidez e segurança no envio de seu manuscrito e agilizar o processo de avaliação.

Produtos naturais

Enfatizamos que artigos sobre [Produtos Naturais](#) e Investigações farmacológicas devem satisfazer os seguintes requisitos.

1. Qualquer extrato natural, fração ou composto deve ser totalmente caracterizado e a informação relacionada a origem, localização e período/ano que foi coletado, deve ser fornecida. Especialmente, o extrato em estudo, deve ser fracionado e as substâncias ativas deste produto natural devem ser identificadas.
2. Técnicas de isolamento e purificação devem ser descritas em detalhes.
3. Autores devem declarar em seus artigos que o material em estudo é livre de endotoxinas.
4. Ensaio de Citotoxicidade com células normais devem ser apresentados
5. Materiais de plantas (assim como de outros organismos) devem ser devidamente identificados. O nome científico deve aparecer (em itálico), o autor deste nome e o nome de família devem ser fornecidos; mencionar quem identificou o material. O manuscrito deve incluir referências aos espécimes da planta (depositada em herbário regional) ou ao material examinado;
6. Artigos que tratam de vigilância biológica de séries de extratos descaracterizados de plantas ou outros organismos não serão considerados para publicação nas Memórias.
7. Investigações farmacológicas de extratos requerem detalhamento na caracterização do extrato. O perfil cromatográfico (e.g., HPLC com de sinais identificados) deve ser realizado, ou a informação qualitativa e quantitativa em componentes ativos e típicos deve ser fornecida;
8. Artigos meramente descritivos não serão aceitos. As Memórias só consideram manuscritos em que conclusões são baseadas em estatísticas adequadas. Em cada caso os controles positivos (substâncias ativas de referência) devem ser utilizados e a dependência da dose/atividade devem ser demonstrada;
9. Qualquer estudo envolvendo indivíduos deve ser apresentado Aprovação do Conselho de Ética Institucional. Número de protocolo deve ser informado;
10. Trabalhos experimentais com animais, referências devem ser feitas aos princípios de cuidados com os animais de laboratório ou regulamentos semelhantes e a aprovação do comitê de ética local;
11. Estudos que envolvem plantas da Biodiversidade brasileira devem ter autorização para acesso a recursos genéticos, e se for o caso, acesso também a associação de conhecimento tradicional. O número da autorização deve ser informado.

Submissão de Sequencias

Informações sobre sequencias genéticas relatadas no manuscrito, devem ter seu

número de acesso GeneBank mencionadas no manuscrito.

O manuscrito deve ser preparado de acordo com as instruções aos autores.

Os autores que submetem um manuscrito à apreciação compreendem que, se aceito para publicação, transferem o direito exclusivo do manuscrito às Memórias, incluindo o de reprodução em todas as formas e meios de comunicação. A revista não recusará aos autores solicitação razoável de permissão para reproduzir qualquer contribuição.

1. No caso de ensaios clínicos a obrigatoriedade de informar o número do registro na Plataforma REBEC.
2. Informamos que os trabalhos submetidos às Memórias são encaminhados a uma triagem para detecção de Plágio através do uso de um software. Ferramenta utilizada na prevenção de plágio profissional e outras formas de má conduta acadêmica.
3. Todos os autores devem assegurar e garantir que as pesquisas relatadas não são resultados de má conduta tais como dados produzidos, falsificação, plágio ou duplicidade. No caso de confirmação de má conduta na pesquisa, emitiremos uma notificação de retratação para corrigir o registro científico. Favor consultar o Singapore Statement em: <http://www.singaporestatement.org/statement.html>.
4. Todos os estudos que envolvem seres humanos de ter a aprovação do Conselho de Ética Institucional. Número do Protocolo deve ser fornecido.
5. Trabalhos que envolvem animais experimentais devem fazer referência aos princípios de cuidados com animais de laboratório, ou regulamentos semelhantes e aprovação do comitê de ética local.
6. Manuscritos submetidos as Memórias serão submetidos a revisão de Inglês "Premium Editing" pela empresa American Journal Experts que propõem sugestões.
7. Declaração de que os dados/resultados do manuscrito não são plágio e não foram publicados em qualquer outro meio previamente.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou consultar a home-page (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/>) ou entrar em contato com a Editoria Científica pelos telefones (+55-21-2562.1222), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)

Formato e estilo

O manuscrito deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado, figuras legendadas e referências. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e legendas de figuras devem ser submetidas juntas em único arquivo. Somente figuras deverão ser encaminhadas como arquivo suplementar.

O MANUSCRITO DEVE SER ORGANIZADO NA SEGUINTE ORDEM:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: nome do autor, seção, departamento, laboratório, instituição e localização geográfica (cidade, estado e país); endereço completo somente do autor correspondente.

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Fonte de financiamento: Indicar as fontes de apoio financeiro e a mudança de

endereço.

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, além de especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética, de acordo com o **sobrenome do primeiro autor**.

NO TEXTO USE O SOBRENOME DOS AUTORES E A DATA:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910)

Com dois autores, é:

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912)

Quando há mais de dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus.

Consultar: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

Ao final do trabalho, use os seguintes estilos de referências:

REVISTAS

1. Artigo de periódico padrão

1.1. Impresso

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: 284-287.

1.2. On line

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: e12140307.

1.3. DOI

Zhang M, Holman CD, Price SD, Sanfilippo FM, Preen DB, Bulsara MK 2009. Comorbidity and repeat admission to hospital for adverse drug reactions in older adults: retrospective cohort study. *BMJ* doi: 10.1136/bmj.a2752.

2. Organização como autor

Diabetes Prevention Program Research Group 2002. Hypertension, insulin and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 40: 679-686.

3. Autores pessoais e organização como autor

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ, Alf-One Study Group 2003. Sexual dysfunction in 1,274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 169: 2257-2261.

4. Volume com suplemento

Geraud G, Spierings EL, Keywood C 2002. Tolerability and safety of frovatriptan with short and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 42 (Suppl. 2): S93-S99.

5. Artigo com errata publicada

Malinowski JM, Bolesta S 2000. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* 22: 1151-1168. Erratum in *Clin Ther* 2001 23: 309.

6. Artigo publicado eletronicamente antes da versão impressa

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK 2002. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood* Nov 15 100: 3828-3831. Epub 2002 Jul 5.

LIVROS E OUTRAS MONOGRAFIAS

1. Autor pessoal

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA 2002. *Medical microbiology*, 4th ed., Mosby, St. Louis, 255 pp.

2. Capítulo em um livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM 2002. Chromosome alterations in human solid tumors. In B Vogelstein, KW Kinzler (eds.), *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, p. 93-113.

3. Anais de Conferências

Harnden P, Joffe JK, Jones WG 2002. Germ cell tumours. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference, 2001 Sep 13-15, Leeds, UK, Springer, New York, 102 pp.

4. Dissertação e Tese

Borkowski MM 2002. *Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans*, PhD Thesis, Central Michigan University, Michigan, 78 pp.

MATERIAIS NÃO PUBLICADOS

1. No prelo

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M 2002. Signature of balancing selection in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.

2. CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB 2002. Anderson's electronic atlas of haematology [CD-ROM]. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

3. Artigo de periódico na Internet

Abood S 2002. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [Internet] [cited 2002 Aug 12] 102. Available from: nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle.

ILUSTRAÇÕES

figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) como na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Como uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de *Memórias*, os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

Tabelas devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

OUTROS FORMATOS E ESTILOS DE ARTIGOS

Notas Técnicas: Notas Técnicas devem comunicar sucintamente novas técnicas individuais ou avanços técnicos originais. A nota inteira deve ocupar no máximo três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas (que significa em torno de 10 laudas em espaço duplo). O texto não deve ser dividido em seções. Assim, o estado da arte deve ser muito brevemente apresentado e resultados devem ser ligeiramente apresentados e discutidos ao mesmo tempo. Tabelas e figuras complementares poderão ser publicadas como dados complementares. Referências devem ser limitadas às essenciais e citadas no final da nota, com o mesmo formato, como em artigos completos. Devem ser apresentados um resumo breve e três palavras-chave.

Comunicações breves: devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, com o mesmo formato usado em artigos completos. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

Formato alternativo: os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (*Annals of Internal Medicine* 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>), sendo responsáveis

por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

No caso de ensaios clínicos, é obrigatório informar o número de inscrição da plataforma REBEC.

Os autores também devem fornecer uma declaração de que os dados/resultados do manuscrito não são plágio e não foram publicados anteriormente.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

1. uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista e assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração;
2. uma declaração de **copyright** fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor correspondente;
3. **Taxas:** a revista não cobra taxas para publicação;

4. **Provas:** serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

**Av. Brasil, 4365
21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil
Tel.: +55 21 2598-4335**



memorias@fiocruz.br

7.4 Normas de publicação Revista 2

JMM Information for Authors – Page 2

Last updated 3rd September 2014

Information that has changed substantially since the previous version is highlighted

<u>1. Scope and Editorial Policy</u>	2. Preparing and Submitting a Paper	<u>3. Style, Nomenclature and Units</u>	<u>4. Peer Review and Publication</u>
--------------------------------------	--	---	---------------------------------------

2. Preparing and Submitting a Paper – Contents

1. 2.1 General information
2. 2.2 Pre-submission checklist
3. 2.3 Preparing files for submission
4. 2.4 Pre-submission language editing
5. 2.5 General style and layout
 1. 2.5.1 Layout
 2. 2.5.2 Title
 3. 2.5.3 Abstract
 4. 2.5.4 Introduction
 5. 2.5.5 Methods
 6. 2.5.6 Results
 7. 2.5.7 Discussion
 8. 2.5.8 Acknowledgements
 9. 2.5.9 References
 10. 2.5.10 Tables
 11. 2.5.11 Figures
 12. 2.5.12 Colour figures
 13. 2.5.13 Supplementary material

2.1 General information

All papers must be submitted online, via the [Editorial Manager system](#). Submissions are not accepted in hard copy or by email. Authors should read these guidelines before going to the Editorial Manager site to submit a paper. Further details and help pages are available on the Editorial Manager site.

[Back to top](#)

2.2 Pre-submission checklist

Authors must:

- i. read the Information for Authors and ensure that their paper complies with this before submission;

- ii. all agree to the submission and agree that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process;
- iii. provide the names and contact details of at least three (and not more than five) potential reviewers;
- iv. obtain permission for any citations of personal communications or unpublished results; this should be confirmed in a covering message;
- v. indicate the Contents Category for the paper on the title page (it should also be entered in the Contents Category field of the online submission form in [Editorial Manager](#));
- vi. use continuous line numbering throughout the manuscript, to facilitate online reviewing;
- vii. ensure that citations of references in the text and references list conform to journal style;
- viii. upload any supplementary material associated with the paper as a supplementary file(s) for peer review with the paper;
- ix. upload any cited papers that have been accepted for publication but are not yet published as a supplementary file(s);
- x. include an accession number from one of the public databases (GenBank, EMBL, DDBJ or PIR) if the paper reports new sequence data; the relevant deposition criteria for the database must be adhered to.

[Back to top](#)

2.3 Preparing files for submission

Papers can be submitted initially either as a single PDF file or as separate word-processor and image files, which will be compiled into a PDF by the system. Supplementary material should be submitted as a separate file(s), rather than being incorporated within the single PDF or word-processor file. When submitting the revised version of a paper, authors should supply the source files for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

Submission as a single PDF. Please refer to the [Help pages](#) on the submission site for guidelines on preparing PDFs for submission, including advice on reducing the size of image files (the submitted PDF should preferably not be much larger than 1 MB).

Submission as separate word-processor and image files. Most standard word-processor files (including .docx files produced in Word 2007 or 2010) will convert successfully to PDF. Times, Times New Roman, Courier, Helvetica and Arial, and the Symbol font for special characters, are the recommended fonts. Other fonts are not guaranteed to convert successfully convert to PDF. Tables for the main paper must be prepared as part of the word-processor file; they must not be supplied as images or Excel files. (Excel files are, however, acceptable for supplementary data). Word-processor files including inserted image files will normally be converted successfully to PDF by the system, but please note that files using OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embedded files are not supported. If the conversion is not satisfactory, either convert the file to PDF yourself, and submit that, or submit the image files separately.

The file types that are supported for submission as separate image files for conversion to PDF are PDF, GIF, TIFF, EPS, JPEG and PPT. A resolution of 300 d.p.i. at a reasonable size of reproduction is recommended; in other words, an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. The following file types are not supported at the initial submission stage as they cannot be converted to PDF by the system: bitmap (.bmp), PICT (.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Image files will be converted to PDF and added to the end of the manuscript PDF produced by the system. If any of the image files are very large, it is advisable to reduce their size before submission if possible: refer to the [Help with Online Submission pages](#) for guidelines on how to do this.

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the Editorial Manager system as part of an initial submission, as set out in the [Files for Publication](#) section of these instructions. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

Cover Letter. When submitting your cover letter, please consider and answer the following:

1. *What is the current knowledge of the subject?*
2. *What are the new findings being reported here?*
3. *What impact will your findings have on scientific/clinical practice or policy in the foreseeable future?*

[Back to top](#)

2.4 Pre-submission language editing

Prior to submitting your manuscript, you may wish to have it edited for correct use of English, particularly if English is not your first language. This step is not compulsory but it may assist the journal editors and reviewers to fully understand the content of your paper. **Language editing does not guarantee that your manuscript will be sent out for peer review or accepted for publication.**

A large number of language-editing services are available. If you would like information on the language editing facility offered by Editage, an independent editorial service, please [go here](#). SGM authors will receive a 10% discount off their language editing services (either follow the link above or [go here](#) and enter this code: SGM4614680). Other companies also offer a language editing service and you would be free to use any of these. Note that authors are liable for all costs associated with language editing and SGM does not accept any responsibility for the level of service provided.

2.5 General style and layout

2.5.1 Layout

The paper must be written in clear and concise English, normally in the past tense. All papers should normally include: [Title page](#); [Summary \(Abstract\)](#) (not required for Editorials and Correspondence); [Acknowledgements](#); [References](#); [Tables](#); and [Figures](#), with legends. The body of Full papers should be divided into [Introduction](#); [Methods](#); [Results](#); and [Discussion](#). It is often appropriate to combine the Results and Discussion. Figures and tables should only be used to illustrate points that cannot easily be described in the text.

Authors should consult a recent issue of the journal for the layout of headings, tables, etc. Guidance on the presentation of individual sections is given below.

2.5.2 Title page

This should carry the following information.

- The title of the paper. The title should provide a concise statement of the contents of the paper.
- A short 'running title', of not more than 55 characters (including spaces), for use as a headline.
- The [Contents Category](#) for the paper.
- The names of the authors. Author names should be given in upper- and lower-case, not in all capitals, to avoid ambiguities such as 'van' and 'Van'. The author for correspondence must be clearly indicated. It is permissible to include the names of more than one author as corresponding author, but a single author must act as the point of communication during the peer review process.
- The name and address of the laboratory or laboratories where the work was done, and present addresses of authors who have since moved.
- An email address and telephone and fax numbers for the corresponding author.
- A footnote 'The GenBank[EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/*gyrA*, etc.] sequence of XXXXX is XX00000', where a new sequence(s) has been determined.

- If appropriate, a footnote defining any non-standard abbreviations. Guidance on abbreviations not requiring definition is given in the [Abbreviations](#) section.
-

2.5.3 Summary (Abstract)

This section is likely to be read by more people than the full paper, and many abstracting services use authors' summaries without modification. It is therefore important that this section is clear and comprehensible in its own right. References should not be cited, and any non-standard abbreviations used must be defined.

2.5.4 Introduction

This should state the objectives of the work, but should not contain a detailed summary of the results. Authors should not assume that all readers will know why an area is worth studying; they should briefly make this clear. Previous relevant work should be sufficiently cited but this should not constitute a full review.

2.5.5 Methods

Sufficient detail should be provided to allow the work to be repeated. The suppliers of chemicals and equipment should be indicated if this may affect the results. Suppliers' addresses should not be given unless this is considered essential for a particular reason.

2.5.6 Results

There should be sufficient subheadings to make clear how the work was organized, what the key questions being addressed were, how one experiment led to another, and perhaps what conclusions were reached. A reader should gain a clear picture of the work from the subheadings.

Reproducibility of results should be indicated. It should be stated how many times an experiment was repeated and whether means or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible; when error terms are given, the measure of dispersion and the number of observations should be stated. Statistical techniques used must be specified, and where necessary they should be described fully or a reference given. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% should be stated.

2.5.7 Discussion

This should not recapitulate the results, and should not be too long. Excessive discussion of few facts often gives an impression of poor science. Subheadings should be used where appropriate, to highlight the points under discussion. It may be helpful to list the main conclusions at the end. A combined Results and Discussion section is encouraged where appropriate.

2.5.8 Acknowledgements

An Acknowledgements section is not compulsory but may be included. If required, please state the names of funding bodies and grant numbers in this section. Authors may also wish to acknowledge

individuals who have contributed materials, expertise or time to the study who are not named as authors.

2.5.9 References

References in the text should be cited as follows: two authors, Smith & Jones (1996) or (Smith & Jones, 1996); three or more authors, Smith *et al.* (1996) or (Smith *et al.*, 1996). References to papers by the same author(s) in the same year should be distinguished in the text and the reference list by the letters a, b, etc. (e.g. 1996a or 1996a, b).

For references with ten or fewer authors, give the names of all authors in the form "Surname, Initials". For references with more than ten authors, list the first nine followed by "& other authors".

Sample journal references:

Cerdà-Cuellar, M., Rosselló-Mora, R. A., Lalucat, J., Jofre, J. & Blanch, A. (1997). *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int J Syst Bacteriol* **47**, 58–61.

Pasta, F. & Sicard, M. A. (1996). Exclusion of long heterologous insertions and deletions from the pairing synapsis in pneumococcal transformation. *Microbiology* **142**, 695–705.

Sample journal reference for more than ten authors:

Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H.-P., Gill, S. & other authors (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539–547.

Sample reference to a whole book:

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sample reference to a book chapter or section:

Romano, A. H. & Saier, M. H., Jr (1992). Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In *The Evolution of Metabolic Function*, pp. 171–204. Edited by R. P. Mortlock. Boca Raton, FL: CRC Press.

References to websites

It is not practical to provide a generic example of a reference to a website. Essential items that must be provided are:

- an author(s) (which may be a company name or organization);
- a year of 'publication' (which may be the year that the site was last updated);
- the URL (web address) of the page;
- a page title (which will hopefully allow the page to be found using a search engine if the URL subsequently changes)

For a website that is frequently updated, it may be useful to provide the date that the site was accessed, particularly if specific information is quoted that may have changed when the article is read.>

Authors who use **EndNote** or **Reference Manager** can download the style for JMM by clicking on the links below:

[EndNote](#)

[Reference Manager](#)

Please note the following style points:

- References in the list must be given in alphabetical order, except for papers with three or more authors, which should be listed in chronological order after any other papers by the first author.
- References must include the title of the paper as well as both initial and final page numbers.

- Titles of journals should be abbreviated according to the system used by [MEDLINE](#); no stops should be used after abbreviated words.
- References to books should include year of publication, title (in full), edition, editor(s) (if any), town of publication and publisher, in that order. When the reference is to a particular part of a book, the inclusive page numbers of the chapter or section and, if appropriate, chapter title must be given.
- Only papers accepted for publication but not yet published may be cited as 'in press' in the reference list, and the reference must include the name of the journal. Relevant papers cited as 'in press' should be included as supplementary files with the online submission. References to papers not yet accepted should be cited in the text as unpublished results, giving the surname(s) and initials of all the author(s). Such papers should not appear in the list of references.
- Permission must be obtained for any personal communications or citations of other workers' unpublished results.

2.5.10 Tables

These should be broadly comprehensible without reference to the text, but it is not necessary to repeat detailed descriptions of methods, etc. The symbols * † ‡ § || ¶ # should be used for footnotes, rather than superscript letters or numbers. When results are expressed as percentages, the absolute value(s) corresponding to 100% must be stated. Statements of reproducibility should be included (see above). Tables should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text.

2.5.11 Figures

This section outlines journal policy on figures. See these links for advice on preparing figures for inclusion as a PDF for [submission](#) and on the [source files](#) needed for publication.

Figures should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text. The points outlined above for tables regarding comprehensibility, relative values and reproducibility also apply to figures and their legends. The inclusion of large amounts of tabular data in figures is discouraged and authors may be asked to move such data to the text or a separate table. Authors should be aware that after publication, tabulated data within figures are not accessible via online text searching. Where possible, please also supply line drawings, bar diagrams and sequence data in the original file format in which they were generated and/or as EPS (Encapsulated PostScript), PowerPoint or CorelDraw files. Do *not* supply as PostScript files as these cannot be used.

Figures must be referred to in the text as Fig. 1(a) **not** Fig. 1A or Figure 1(A) or as (Fig. 1a) **not** (Figure 1A). Multipart figures should be labelled (a), (b), etc., **not** (A), (B), etc.

Line drawings. These should be of a quality suitable for direct reproduction. The maximum printed size, including lettering and legends, is 176 x 235 mm. Line thicknesses and symbol sizes should be sufficient to allow for reduction. The preferred symbols for graphs are filled and open circles, squares, triangles or diamonds. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures.

Bar diagrams. Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with 'three-dimensional' bars unless there is a specific justification for their use.

Sequence data. Figures showing full gene sequences are not published, but selected sequence data, with appropriate annotation, may be published where there is justification. The layout of sequence figures should be designed to fit either the full width of the page (176 mm) or a single column (84 mm). For adequate legibility, the height of the characters should be not less than 1.5–2 mm (or 6–8 point). For printing at full page width with this size of type, a layout with 80–100 nucleotides per line is appropriate (or 60–70 if there are spaces between the codons). For a single-column layout, 50–60 nucleotides per line is about right. The spacing between the lines of sequence should be as close as is consistent with clarity. Note that sequence data must be submitted to GenBank, EMBL or DDBJ.

JMM does not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular

interest. Limited sequence alignments of nucleic acids and proteins are acceptable provided they make a significant point. See above for guidance on presentation of sequence figures. Sequence data that are not suitable for print publication can, where appropriate, be published as online-only supplementary data.

Photographs (halftones). Authors are advised to supply halftones intended for publication as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

2.5.12 Colour figures

These are published at no cost to the author, if the Editors believe that colour is essential to show the results. Colour figures should preferably be supplied as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). The files should preferably be generated as CMYK (4-colour) images, not RGB, as these reproduce better in print.

2.5.13 Supplementary material

Material associated with a paper but not suitable for print publication (e.g. large datasets, sequence alignments, 3D structures or movie files) can be included as online-only supplementary data. Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. All supplementary data files will be reviewed along with the main paper; these will not be published unless they significantly enhance the paper. The Editors may suggest that figures or tables included within a paper should be converted into supplementary data.

Supplementary data files must not include methods for results that are included in the main paper, nor should they introduce different results or new discussion points.

Submission

- Supplementary data should be uploaded at the time of submission; please indicate the contents of the file in the 'File label' field.
- Supply all supplementary material in the file formats given below.
- Very large files or those requiring specialist software are not suitable as they will be difficult for the reader to download or view.

Presentation

- Supplementary figures and tables should be named Fig. S1, Table S1, etc., and must be cited accordingly in the main paper.
- Provide a heading and, if appropriate, a short legend or text description with each supplementary data item.
- In each file, please include the following information: article title, author names, journal name, affiliation and email address of the corresponding author.

File types

- Material should be submitted in PDF format; .doc(x) or .ppt(x) files are not suitable.
- Multiple figures, tables or text items should be supplied as a single PDF.
- Large datasets can be supplied in Excel format if you wish readers to be able to manipulate the data. If not, please convert to PDF.
- Audio, video and animations can be supplied as .mov, .avi or .mpeg files.
- The preferred file type is PDF; however, please check the [full list](#) for other acceptable file types.

Processing of supplementary files

- Supplementary data files will be uploaded alongside the main paper exactly as supplied by the author. It is the authors' responsibility to ensure that all files are presented clearly.

[Back to top](#)

[Previous](#)

This Month's Issue



- [ABOUT JMM](#)
- [EDITORIAL BOARD & STAFF](#)
- [SUBMIT A MANUSCRIPT](#)
- [INFORMATION FOR AUTHORS](#)
- [INFORMATION FOR REVIEWERS](#)
- [INFORMATION FOR LIBRARIANS](#)
- [PERMISSIONS AND REPRINTS](#)
- [SUBSCRIPTIONS](#)
- [ADVERTISING](#)
- [ALERTS & FEEDS](#)

- [FEEDBACK](#)

- [MICROBIOLOGY](#)
- [J GEN VIROL](#)
- [INT J SYST EVOL MICROBIOL](#)
- [JMM CASE REPORTS](#)

- [ALL SGM JOURNALS](#)



The [Society for General Microbiology](#) publishes online with the assistance of [HighWire Press®](#).

Most

	• Viewed
	• Cited
•	
1.	Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects
2.	Mycobacterium abscessus infection in cystic fibrosis: molecular typing and clinical outcomes
3.	Microbiological investigation in male infertility: a practical overview
4.	Pathophysiology of neonatal acute bacterial meningitis
5.	Detection of potential microbial antigens by immuno-PCR (PCR-amplified immunoassay)
» View all Most Viewed articles	

7.5 Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais

- **27º Congresso Brasileiro de Microbiologia**

Natal/RN – Brasil

Resumo: Produção de biofilme em isolados *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à metilina provenientes de amostras de sangue e ponta de cateter em um Hospital de Porto Alegre

Jaíne B. Stypulkowski, Juliana Caierão, Pedro A. d’Azevedo

- **4º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica - SIMC**

João Pessoa/PB – Brasil

Resumo: Formação de biofilme e detecção de genes de adesão em *Staphylococcus aureus* isolados de hemoculturas

Jaíne B. Stypulkowski, Bruna Batista, Juliana Caierão, Pedro A. d’Azevedo