



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MONIKA MARIVO MARANHÃO

***Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA ISOLADOS DA
MICROBIOTA VAGINAL DE MULHERES COM E SEM CANDIDÍASE
VULVOVAGINAL**

Presidente Prudente - SP

2022

MONIKA MARIVO MARANHÃO

***Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA ISOLADOS DA
MICROBIOTA VAGINAL DE MULHERES COM E SEM CANDIDÍASE
VULVOVAGINAL**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:
Profa. Dra. Valéria Cataneli Pereira

Coorientadora:
Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelströter Eller

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

616.969 3 Maranhão, Monika Marivo
M311s *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina isolados da microbiota vaginal de mulheres com e sem candidíase vulvovaginal \ Monika Marivo Maranhão; orientadora Valéria Cataneli Pereira; coorientadora Lizziane Kretli Winkelströter Eller. -- Presidente Prudente, 2022.
45 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2023.
Bibliografia.

1. Candidíase vulvovaginal. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. MRSA. 4. Resistência antimicrobiana. 5. Enterotoxinas estafilocócicas. I. Pereira, Valéria Cataneli, orient. II. Eller, Lizziane Kretli Winkelströter, coorient. III. Título.

Bibliotecária: Jakeline Margaret de Queiroz Ortega – CRB 8/6246

MONIKA MARIVO MARANHÃO

***Staphylococcus aureus* resistentes a metilina isolados da microbiota vaginal
de mulheres com e sem Candidíase vulvovaginal**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 29 de setembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Cataneli Pereira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Thais Batista de Carvalho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Daniel de Araújo Brito Buttros
Claretiano Centro Universitário
Rio Claro - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este projeto de pesquisa ao meu esposo Wilson Bezerra Maranhão, por seu apoio incondicional oferecido em todos os aspectos.

Dedico também à minha orientadora Profa. Dra. Valéria Cataneli Pereira. Sua motivação, incentivo e assistência durante todo o processo foram essenciais para a conclusão do trabalho.

Sem o apoio de ambos este trabalho não teria sido realizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final.

Também quero agradecer à Universidade do Oeste Paulista (Unoeste) e a todos os professores do Mestrado em Ciências da Saúde pela elevada qualidade do ensino oferecido.

À professora e minha orientadora Dra. Valéria Cataneli Pereira pela sua postura impecável que manteve ao meu lado diante das adversidades da pesquisa em tempos de pandemia. Muito obrigada pela sua presença, sua dedicação, sua calma e sua paciência que serviram como pilares de sustentação para a conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelströter Eller pela germinação de ideias e sugestões valiosas. Sua participação foi fundamental em momentos críticos do meu Mestrado. Meu agradecimento especial à Letícia Suzano Leis Bellusci, que gentilmente me cedeu as suas amostras para a minha análise.

A todos os mestres da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp/ Universidade Estadual Paulista que contribuíram com a minha formação acadêmica e profissional e sempre me incentivaram a ter amor pela pesquisa.

Às alunas da graduação Gabriela Dundes Gomes e Kelma Ferreira Barnabé, e às técnicas Mayara Vidotto e Maria do Socorro Alves, meu muito obrigada pelo espírito de cooperação, disponibilidade, responsabilidade e proatividade. Vocês trataram com delicada atenção minhas demandas em um momento especialmente difícil desta jornada.

À minha banca de qualificação, Profa. Dra. Eliana Peresi Lordelo e Profa. Dra. Thais Batista de Carvalho que tanto contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Sou grata aos meus pais, especialmente à minha mãe, por sempre me guiar para os estudos, e não medir esforços para me manter neste caminho. Você me incentivou e acreditou que eu seria capaz de superar os obstáculos que a vida me apresentou. Obrigada, mãe!

Ao meu irmão Paulo Marivo pela amizade e atenção dedicadas quando sempre precisei, mesmo à distância.

À minha amiga Marina Ayabe Gomes de Moraes, que sempre me ajudou com sua experiência, conhecimento e conselhos preciosos, e me incentivou a iniciar e concluir o Mestrado. As incontáveis horas de troca de ideias valeram a pena!

Agradeço ao meu esposo Wilson Bezerra Maranhão por compreender as várias horas em que estive ausente e por suportar todos os meus momentos de estresse durante o processo. Sua presença foi essencial para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada por ter me ajudado a não desistir e pela sua presença em minha vida, meu amor.

E finalmente agradeço aos meus filhos João Paulo e Pedro Henrique, que me ensinaram que tomar sorvete, ir ao parquinho, jogar bola e brincar é tão importante quanto estudar e trabalhar, e que sim, eu consigo fazer um pouco de cada! Ao contrário do que muita gente pensa, filhos são um grande alívio para o stress. O abraço feliz e espontâneo de vocês foi e sempre será para mim simplesmente restaurador. Quero que um dia saibam que me deram muita força nesse projeto e que tenham orgulho deste resultado e da mamãe de vocês.

***“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.***

John F. Kennedy

LISTA DE SIGLAS

AMC	- Amoxicilina + ácido clavulânico
CFO	- Cefoxitina
CLI	- Clindamicina
CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
CVV	- Candidíase Vulvovaginal
EE	- Enterotoxina estafilocócica
ERI	- Eritromicina
MRSA	- <i>Stapylococcus aureus</i> resistente à meticilina
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PEN	- Penicilina
PVL	- Leucocidina Panton Valentine
SCCmec	- Cassete cromossômico estafilocócico mec
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSS	- Síndrome do choque tóxico
TSST-1	- Toxina 1 da síndrome do choque tóxico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma representativo sobre seleção das amostras.....	18
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para detecção dos genes de identificação de <i>S. aureus</i> , superantígenos, gene <i>mecA</i>	22
Tabela 2 -	Dados demográficos e sócio-epidemiológicos de 86 pacientes carreadoras e não carreadoras de <i>S. aureus</i> na mucosa vaginal.....	24
Tabela 3 -	Dados laboratoriais de 86 pacientes carreadoras e não carreadoras de <i>S. aureus</i> na mucosa vaginal.....	25
Tabela 4 -	Determinação da resistência antimicrobiana dos isolados de <i>S. aureus</i> provenientes de conteúdo vaginal.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3	RESULTADOS.....	23
4	DISCUSSÃO.....	26
5	CONCLUSÃO.....	29
6	REFERÊNCIAS.....	30
	ANEXO – Normas de Submissão <i>Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials</i>.....	39

***Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA ISOLADOS DA MICROBIOTA VAGINAL DE MULHERES COM E SEM CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Monika Marivo Maranhão ¹, Gabriela Dundes Gomes ², Kelma Ferreira Barnabé ²,
Letícia Suzano Lelis Bellusci ¹, Lizziane Kretli Winkelströter Eller ^{1,2}, Valéria Cataneli
Pereira ^{1,2}

¹Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE,
Presidente Prudente, SP, Brasil

²Faculdade de Ciências, Letras e Educação de Presidente Prudente (FACLEPP) -
Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente

Autor correspondente: Monika Marivo Maranhão

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)
Rua José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária,
Presidente Prudente - SP, Brasil CEP: 19050-920
Email: momarivo@yahoo.com.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico ao qual será submetido: *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*
Fator de impacto: 6.78 Qualis: A4.

RESUMO

Introdução: *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* são isolados concomitantemente com frequência na microbiota humana, porém em casos de candidíase vulvovaginal a presença de *S. aureus* é preocupante, pois a coinfeção *C. albicans*/*S. aureus* piora a doença invasiva se comparada à infecção de um dos dois organismos isoladamente. **Objetivos:** Determinar a frequência de *S. aureus* isolados de conteúdo vaginal de mulheres com e sem candidíase vulvovaginal (CVV), e caracterizar a virulência e resistência desses microrganismos. **Métodos:** Foram estudadas amostras bacterianas isoladas de conteúdo vaginal e dados clínicos de 86 pacientes com e sem CVV. Os 116 isolados bacterianos obtidos foram submetidos a PCR para identificação de *S. aureus* (gene *sau*) e MRSA (gene *mecA*), sendo o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) caracterizado por PCR multiplex. As amostras positivas para *S. aureus* foram submetidas ao teste de disco-difusão para determinar a resistência antimicrobiana. Os genes das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D e da Toxina 1 da síndrome do Choque tóxico (TSST-1) foram pesquisados por PCR. **Resultados:** Foram isolados 10 (8,6%) *S. aureus* de 9 pacientes, sendo uma paciente com CVV. Dos 10 isolados de *S. aureus*, 9 (90%) foram MRSA e destas 6 (66,6%) com SCC*mec* do tipo I e 3 (33,3%) com SCC*mec* IV. O gene da enterotoxina A (gene *sea*) foi detectado em 5 (50%) dos *S. aureus*, sendo em 4 MRSA com SCC*mec* I e 1 MRSA com SCC*mec* IV. **Conclusões:** O estudo não confirmou a associação de candidíase vulvovaginal com o carreamento por *S. aureus*, porém trouxe importantes informações sobre *S. aureus* em conteúdo vaginal de mulheres jovens saudáveis, ressaltando a alta frequência de MRSA e o elevado índice de resistência antimicrobiana, além da capacidade de produção da enterotoxina A que pode agravar as possíveis infecções estafilocócicas.

Palavras-chave: Candidíase vulvovaginal; *Staphylococcus aureus*; MRSA; resistência antimicrobiana; enterotoxinas estafilocócicas

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* are frequently isolated concomitantly in the human microbiota, but in cases of vulvovaginal candidiasis, the presence of *S. aureus* is worrisome. **Objectives:** To determine the frequency of *S. aureus* isolated from vaginal contents of women with and without vulvovaginal candidiasis (VVC), and to characterize the virulence and resistance of these microorganisms. **Methods:** Bacterial samples isolated from vaginal contents and clinical data from 86 patients with and without VVC were studied. The 116 bacterial isolates obtained were submitted to PCR to identify *S. aureus* (*sau* gene) and MRSA (*mecA* gene), and the staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) was characterized by multiplex PCR. Samples positive for *S. aureus* were subjected to disk-diffusion method to determine antimicrobial resistance. Staphylococcal enterotoxin A, B, C, D and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1) genes were screened by PCR. **Results:** Ten (8.6%) *S. aureus* were isolated from 9 patients, one of them a patient with VVC. Of the 10 *S. aureus* isolates, 9 (90%) were MRSA and 6 of these (66.6%) had SCC*mec* type I and 3 (33.3%) had SCC*mec* IV. The enterotoxin A gene (*sea* gene) was detected in 5 (50%) of *S. aureus*, in 4 MRSA with SCC*mec* I and 1 MRSA with SCC*mec* IV. **Conclusions:** The study did not confirm the association of vulvovaginal candidiasis with *S. aureus* vaginal carriage, but it provided important information about *S. aureus* in the vaginal contents of healthy young women, highlighting the high frequency of MRSA and the high rate of antimicrobial resistance, in addition to the ability to produce enterotoxin A which can aggravate possible staphylococcal infections.

Keywords: Vulvovaginal candidiasis; *Staphylococcus aureus*; MRSA; antimicrobial resistance; staphylococcal enterotoxins

1 INTRODUÇÃO

A microbiota vaginal de mulheres em idade reprodutiva é considerada saudável quando as espécies do gênero *Lactobacillus* são predominantes. Esses bacilos são Gram-positivos, anaeróbios facultativos ou microaeróbios e considerados protetores do trato genital inferior feminino, pois têm a capacidade de produzir ácido láctico e bacteriocinas, que impedem a degradação do muco e inibem o crescimento de patógenos. Alguns lactobacilos são produtores de peróxido de hidrogênio, que dificulta a permanência de microrganismos não produtores da enzima catalase e que podem causar infecções genitais [1].

Quando ocorre algum desequilíbrio na microbiota vaginal, há uma redução na concentração de *Lactobacillus* e os microrganismos patogênicos se aproveitam dessa condição para colonizar a mucosa e causar infecções [2]. Segundo a Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia [3], as vulvovaginites e as vaginoses são as causas mais comuns de corrimento vaginal patológico, responsáveis por mais de 10 milhões de consultas médicas por ano.

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica caracterizada por sinais e sintomas inflamatórios detectados na vulva e na mucosa vaginal, sendo os agentes etiológicos as espécies de *Candida*, principalmente *Candida albicans* [4,5]. Tanto a infecção primária quanto a recorrência da CVV estão associadas a alguns fatores, tais como: uso de antimicrobianos, níveis de estrogênios, terapia de reposição hormonal, comorbidades (diabetes tipo 1 e 2, fibrose cística, entre outras), uso de roupas não respiráveis, uso de duchas vaginais, atividade sexual, deficiência de ferro e uso de contraceptivos [6]. Esses fatores de risco associados a CVV pode favorecer a colonização da região genital por outros microrganismos patogênicos, tais como a bactéria *Staphylococcus aureus* [7].

Staphylococcus aureus é a principal bactéria do gênero *Staphylococcus* e aproximadamente 20% dos indivíduos são colonizados persistentemente nas narinas, e 30% intermitentemente colonizados [8,9]. No entanto, vários outros sítios podem ser colonizados, incluindo axilas, virilha, vagina e trato gastrointestinal. A taxa de colonização por *S. aureus* na região vulvovaginal é variável nos estudos, girando em torno de 9 a 15%, podendo chegar a até 22% nas mulheres grávidas [10–15].

Embora possa colonizar vários sítios de forma assintomática, *S. aureus* pode apresentar comportamento oportunista e causar sérias infecções no hospedeiro. As

infecções mais comuns incluem: furúnculos, carbúnculos, impetigo, osteomielite, endocardites, bacteremias e sepses [16]. Em estudo que avaliou os microrganismos relacionados a vulvovaginites em meninas pré-puberes foi relatado que *S. aureus* foi o agente etiológico de 5,8% dos casos estudados [17].

O grande problema das infecções causadas por *S. aureus* estão relacionadas à expressão de fatores de virulência e à resistência aos antimicrobianos utilizados na terapia. *Staphylococcus aureus* são capazes de produzir toxinas, tais como superantígenos e as citotoxinas. As toxinas estafilocócicas são denominadas superantígenos e abrangem as enterotoxinas estafilocócicas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) [18]. Esses superantígenos são capazes de fazerem ligações simultâneas ao Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) de classe II das células apresentadoras de antígeno e aos receptores de células T, porém fora do sítio de ligação. Essa interação trimolecular MHC classe II:superantígenos estafilocócicos:receptores de células T leva a uma liberação exacerbada das principais citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN-gama, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, que causam inflamação aguda mediada, choque e toda a manifestação de efeitos sistêmicos das infecções estafilocócicas [19].

A Síndrome do Choque Tóxico (TSS) é uma doença sistêmica caracterizada por extensa proliferação de células T por todo o corpo. Isso leva à inflamação sistêmica e problemas de saúde concomitantes, incluindo a formação de erupções cutâneas, falência de múltiplos órgãos e, potencialmente, morte [20]. A TSS menstrual tem relação com a TSST-1, porém pode estar associada às outras enterotoxinas estafilocócicas, apresentando uma incidência de 0,03 a 0,50 casos por 100.000 pessoas, com mortalidade em torno de 8% [21]. No início da década de 80 essa síndrome foi relacionada com o uso de tampões em mulheres portadoras de *S. aureus* toxigênicos no período menstrual, porém atualmente os mecanismos imunológicos e as mudanças no ecossistema vaginal durante a menstruação complementam os fatores de risco para TSS [21].

Outro fator importante associado às infecções é a resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento. A presença de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) é um dos grandes obstáculos no tratamento das doenças estafilocócicas uma vez que estes microrganismos são resistentes a todos antimicrobianos β -lactâmicos [22].

A resistência à metilina em *Staphylococcus* é determinada pelo gene *mecA*, que codifica a proteína ligadora de penicilina suplementar (PBP2a), apresentando assim baixa afinidade às penicilinas semissintéticas [22]. O gene *mecA* é carregado em um elemento genético móvel identificado como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome, *SCCmec*). Até o momento foram descritos 13 tipos diferentes de *SCCmec* baseados em diferenças alotípicas nas regiões *ccr* e complexo *mec* do cassete cromossômico. Os tipos de *SCCmec* I, II e III estão presentes predominantemente nos isolados de MRSA em ambiente hospitalar, enquanto os outros tipos são encontrados na comunidade [23,24].

C. albicans e *S. aureus* são isolados concomitantemente com frequência na microbiota humana e a comunicação entre as espécies facilita a colonização estável e assintomática desses organismos no hospedeiro [7], mas sob certas circunstâncias também podem causar doença invasiva grave [25,26]. Estudos apontam que a coinfeção de *C. albicans* e *S. aureus* em diferentes sítios são preocupantes na clínica. São dois dos patógenos mais comumente co-isolados de infecções fúngicas-bacterianas mistas na corrente sanguínea, bem como de doenças associadas ao biofilme, como fibrose cística, periodontite e cateter [7,27–29]. A frequência da coinfeção *C. albicans*-*S. aureus* é em parte devido a locais de colonização compartilhados no corpo humano, bem como uma propensão para esses microrganismos interagirem e formarem biofilmes polimicrobianos [7,29,30].

Alguns dos primeiros estudos investigando *C. albicans*/*S. aureus* identificou que essa interação polimicrobiana está associada a maior mortalidade quando ambos os organismos são inoculados na cavidade peritoneal de camundongos simultaneamente [31–33]. A coinfeção *S. aureus* e *C. albicans* altera o metabolismo microbiano em relação à infecção com cada organismo isoladamente. As alterações metabólicas durante a coinfeção regulam a virulência, como o aumento da produção de toxinas em *S. aureus* ou a contribuição para a morfogênese e remodelação da parede celular em *C. albicans*, resultando em maior sobrevivência microbiana e evasão imune [33]. Assim a coinfeção *C. albicans*/*S. aureus* piora a doença invasiva se comparada à infecção de um dos dois organismos isoladamente.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar a frequência de *S. aureus* em fluidos vaginais de mulheres com e sem CVV, e caracterizar esses microrganismos em relação a virulência e resistência.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 População de estudo

Foram abordadas 303 mulheres em idade fértil, sendo estas o total de mulheres atendidas em consultas de rotina de um consultório ginecológico e obstétrico de rede particular no período de 01 de agosto de 2021 a 01 de fevereiro de 2022. Todas as pacientes aceitaram participar do estudo, entretanto 201 foram excluídas por não se adequarem aos critérios de inclusão. Portanto inicialmente foram incluídas no trabalho 102 pacientes. As amostras de fluido vaginal foram semeadas em ágar Baird Parker, sendo que em 86 pacientes houve crescimento bacteriano, perfazendo um total final de 116 amostras sugestivas para estafilococos (considerando que foram coletadas amostras do lado interno e externo da mucosa vaginal) (Figura 1).

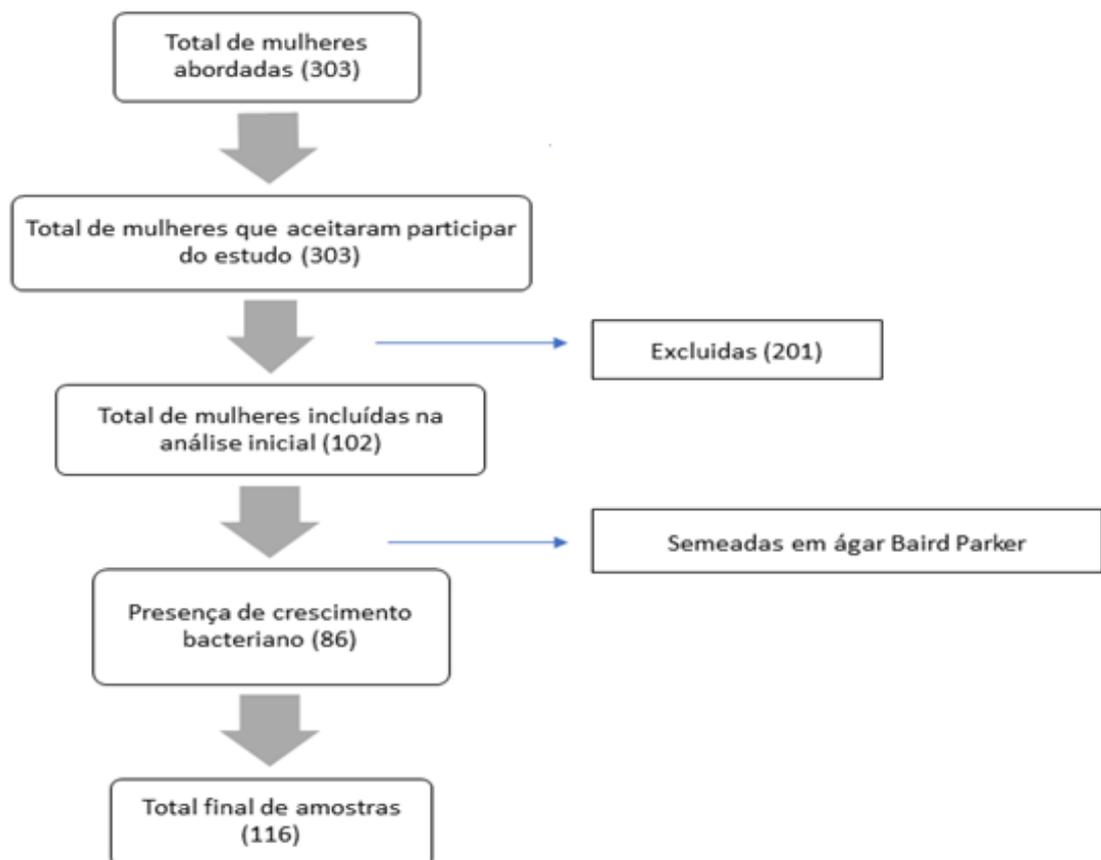


Figura 1. Fluxograma representativo sobre seleção das amostras

2.2 Aspectos éticos e tipo de estudo

Trata-se de um estudo transversal, analítico, e observacional, aprovado pelo aprovado no Comitê de Ética (CEP) com o protocolo CAAE 39638620.8.0000.5515 da Plataforma Brasil.

A coleta das amostras de fluido vaginal foi realizada em todas as pacientes atendidas em consultas de rotina de um consultório ginecológico e obstétrico de rede particular no período de 01 de agosto de 2021 a 01 de fevereiro de 2022, que aceitaram participar do trabalho, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os microrganismos foram isolados e congelados a -80°C em ágar nutriente suplementado com 10% de glicerol e estão armazenados no Laboratório de Microbiologia da UNOESTE e a utilização desses microrganismos em projetos futuros foi autorizada pelo CEP.

Foram incluídas amostras de 102 pacientes entre 18 a 51 anos, assintomáticas e sintomáticas para candidíase que concordaram participar durante o período. Foram excluídas aquelas pacientes que fizeram uso de antimicrobianos, probióticos, imunossupressores ou corticoides nos 30 dias antecedentes à coleta, realizado ducha vaginal no dia do exame, estiveram menstruadas, ou que não estiveram em abstinência sexual por pelo menos 24 horas.

2.3 Coleta de amostra

A coleta das informações clínicas e laboratoriais, bem como das amostras de fluido vaginal foi realizada em pacientes atendidas em consultas de rotina de um consultório ginecológico de rede particular na cidade de Presidente Prudente/ SP.

Da anamnese, foram extraídos dados sociodemográficos, estado clínico e histórico do paciente por meio de um questionário, que incluiu informações sobre idade, estado civil, doenças crônicas, uso de anticoncepcionais, atividade sexual, início da atividade sexual, gestação, profissão entre outras.

A seguir, a paciente foi submetida ao exame físico, no qual foi realizado o exame ginecológico. Para análise microbiológica, a amostra de secreção vaginal foi coletada das paredes vaginais laterais durante o exame físico das pacientes, com o auxílio de duas zaragatoas flexíveis esterilizadas e imediatamente imersas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) em tubos de ensaio lacrados com rolhas de algodão hidrofóbico. O material foi enviado no mesmo dia ao Laboratório de

Microbiologia da Universidade do Oeste Paulista, onde os microrganismos foram isolados e congelados a -80°C em agar nutriente suplementado com 10% de glicerol.

2.4 Identificação fenotípica de *S. aureus*

As amostras de conteúdo vaginal semeados em ágar Baird Parker foram coradas pelo método de Gram objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas à prova de catalase. Desta forma, o gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base na prova de oxidação e fermentação da glicose e pela resistência à bacitracina (0,04 U) indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm e pela sensibilidade à furazolidona (100 μg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro. Para diferenciação da espécie *S. aureus* dos estafilococos coagulase-negativa foi realizada a prova da coagulase [34].

2.5 Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit Illustra (GE healthcare) que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir 500 μl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada a 10.000 x g por 4 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 μl de solução de extração adicionada novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 μl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 μl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição [35].

2.6 Identificação genotípica de *S. aureus*

Para a detecção genotípica de *S. aureus* foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do gene *sau*, específico da espécie. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1 e as reações foram realizadas segundo os parâmetros estabelecidos por Riffon *et al* [36]. A eficiência das amplificações foi

monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1% e corado com Brometo de Etídeo.

2.7 Detecção do gene das enterotoxinas estafilocócicas e da TSST-1

A detecção do gene das enterotoxinas estafilocócicas (EEA, EEB, EEC e EED) e da TSST-1 foi realizada pela técnica de PCR utilizando os primers descritos na Tabela 1. As reações foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Johnson et al [37] e Cunha e tal.[38]. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1% e corado com Brometo de Etídeo. Linhagens de *S. aureus* toxigênicas de referência internacional foram utilizadas como controle positivo, incluindo, ATCC 13565 (EEA), ATCC 14458 (EEB), ATCC 19095 (EEC), ATCC 23235 (EED) e ATCC 51651 (*tst*).

2.8 Detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas segundo protocolo descrito por Murakami et al [39] com os primers descritos na Tabela 1. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1% e corado com Brometo de Etídeo.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para detecção dos genes de identificação de *S. aureus*, superantígenos, gene *mecA*

Primer	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	pb	Alvo
<i>sau327</i>	GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA	1250	Sau
<i>sau1645</i>	CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT		
<i>sea1</i>	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	123	Enterotoxina A
<i>sea2</i>	GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>seb1</i>	TCGCATCAAACCTGACAAACG	478	Enterotoxina B
<i>seb2</i>	GCAGGTACTCTATAAGTGCC		
<i>sec1-1</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	Enterotoxina C
<i>sec1-2</i>	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed1</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	Enterotoxina D
<i>sed2</i>	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>tsst1</i>	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	TSST-1
<i>tsst2</i>	TTTCCAATAACCACCCGTTT		
<i>mecA1</i>	AAAATCGATGGTAAAGGTTGG	533	PBP2a
<i>mecA2</i>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTG		

Fonte: Riffon et al[36]; Johnson et al [37] e Cunha et al.[38]; Murakami et al [39]

2.9 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pela técnica da difusão da droga em Ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI [40]. Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da escala 0.5 de McFarland.

Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a semeadura foi realizada através de swab estéril na superfície de Ágar Mueller Hinton, e a seguir aplicados os discos impregnados com as drogas. Os discos utilizados foram: Cefoxitina (CFO), Penicilina (PEN), Clindamicina (CLI), Eritromicina (ERI) e Amoxicilina+Ácido Clavulânico (AMC).

As placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI [40].

2.10 Análise dos resultados

Para análise estatística foram utilizadas análises uni e multivariadas, teste do *qui-quadrado*, regressão logística e *Teste T de Student*, considerando nível de significância de 0,05. O *software* utilizado foi o *Rstudio*.

3 RESULTADOS

Foram estudadas amostras bacterianas e dados clínicos e laboratoriais obtidos de 86 pacientes. A idade variou entre 21 a 48 anos, sendo a média de idade= 29,9 ± 6,2. Das 86 pacientes avaliadas, 25 (29,0%) pacientes apresentavam candidíase vulvovaginal e em 9 (10,46%) pacientes foi detectada a presença de *S. aureus*.

Apenas uma paciente com candidíase vulvovaginal foi confirmada carreadora de *S. aureus* sendo que os demais isolados de *S. aureus* foram provenientes de mulheres que não apresentavam a candidíase.

As características demográficas e sócio-epidemiológicas foram avaliadas, porém nenhuma variável foi significativa como preditora da presença de *S. aureus* (Tabela 2). A correlação dos exames laboratoriais com a presença de *S. aureus* não mostrou diferença significativa entre as variáveis analisadas (Tabela 3).

Tabela 2. Dados demográficos e sócio-epidemiológicos de 86 pacientes carreadoras e não carreadoras de *S. aureus* na mucosa vaginal.

Dados	Pacientes (n=86)	<i>S. aureus</i>		P-valor	
		Presença n=9 (8,6%)	Ausência n=77 (91,4%)		
Idade	Média ± DP	30,1 ± 6,1	29,4 ± 4,7	30,2 ± 6,3	0,926
	20 † 30 anos	47 (55,3)	6 (66,7%)	41 (53,9%)	
	30 † 40 anos	30 (35,3)	3 (33,3%)	27 (35,5%)	0,363
	40 † 49 anos	8 (9,4)	0 (0,0%)	8 (10,5%)	
Idade coitarca	Média ± DP	17,4 ± 2,6	17 ± 1,2	17,5 ± 2,6	0,988
	14 † 19 anos	62 (77,5%)	8 (88,9%)	54 (76,1%)	
	19 † 24 anos	15 (18,7%)	1 (11,1%)	14 (19,7%)	0,537
	24 † 29 anos	3 (3,7%)	0 (0,0%)	3 (4,2%)	
Uso de ACO	Sim	27 (31,8%)	2 (22,2%)	25 (32,9%)	0,408
	Não	58 (68,2%)	7 (77,8%)	51 (67,1%)	
Menarca precoce	Sim	5 (5,8%)	0 (0,0%)	5 (6,5%)	0,567
	Não	81 (94,2%)	9 (100,0%)	72 (93,5%)	
Alimentação balanceada	Sim	67 (77,9%)	7 (77,8%)	60 (78,9%)	0,593
	Não	18 (20,9%)	2 (22,2%)	16 (21,1%)	
Depilação	Sim	71 (82,6%)	9 (100,0%)	62 (81,6%)	0,181
	Não	14 (16,3%)	0 (0,0%)	14 (18,4%)	
Gestação prévia	Sim	40 (46,5%)	6 (66,7%)	34 (44,2%)	0,177
	Não	46 (53,5%)	3 (33,3%)	43 (55,8%)	
Candidíase recorrente	Sim	22 (25,9%)	1 (11,1%)	21 (27,3%)	0,264
	Não	63 (74,1%)	8 (88,9%)	55 (71,4%)	

Tabela 3. Dados laboratoriais de 86 pacientes carreadoras e não carreadoras de *S. aureus* na mucosa vaginal.

Exames Laboratoriais		Pacientes (n=86)	<i>S. aureus</i>		P-valor
			Presença n=9 (8,6%)	Ausência n=77 (91,4%)	
Glicemia	Média ± DP	87,1 ± 10,8	81,8 ± 4,8	87,6 ± 11,1	0,092
Colesterol total	Média ± DP	176,4 ± 36,2	159,3 ± 29,5	178,3 ± 36,6	0,270
HDL	Média ± DP	61,7 ± 17,1	61,1 ± 9,4	61,8 ± 17,8	0,735
LDL	Média ± DP	98,6 ± 27,3	102,8 ± 10,4	98,2 ± 28,4	0,497
Triglicérides	Média ± DP	91,2 ± 69,8	64,6 ± 31,0	94,2 ± 72,4	0,210
Vitamina D	Média ± DP	28,7 ± 9,9	29,5 ± 9,6	28,6 ± 10,1	0,856
TSH alterado	Sim	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	0,880
	Não	74 (98,7%)	9 (100,0%)	65 (98,5%)	

A identificação de *S. aureus* em amostras de conteúdo vaginal foi confirmada através de técnicas moleculares em 10 (8,62%) das 116 amostras, estando essa bactéria presente em 9 (8,82%) pacientes. Dos 10 isolados positivos para *S. aureus*, 9 foram MRSA (90%), sendo 6 (66,6%) com *SCCmec* do tipo I e 3 (33,3%) com *SCCmec* do tipo IV.

Em relação a resistência aos antimicrobianos, 100% dos isolados de *S. aureus* foram resistente à penicilina, 90% à cefoxitina, 80% à eritromicina, 70% à amoxicilina + ácido clavulânico e 50% à clindamicina (Tabela 4). O índice MAR foi maior que 0,2 em todos os isolados, confirmando a multirresistência aos antimicrobianos.

Tabela 4. Determinação da resistência antimicrobiana dos isolados de *S. aureus* provenientes de conteúdo vaginal

Antimicrobiano	MSSA (n=1)	MRSA	
		<i>SCCmec</i> I (n=6)	<i>SCCmec</i> IV (n=3)
Cefoxitina	1 (100%)	5 (83,3%)	3 (100%)
Penicilina	1 (100%)	6 (100%)	3 (100%)
Amoxicilina + clavulanato	0 (0%)	4 (66,6%)	3 (100%)
Clindamicina	0 (0%)	4 (66,6%)	1 (33,3)
Eritromicina	0 (0%)	5 (83,3%)	3 (100%)

MSSA: *S. aureus* sensível à meticilina; MRSA: *S. aureus* resistente à meticilina

Entre os superantígenos pesquisados, o gene da enterotoxina A (gene *sea*) foi detectado em 5 (50%) dos *S. aureus*, sendo em 4 MRSA com SCCmec I e 1 MRSA com SCCmec IV. As demais enterotoxinas (B, C, e D), TSST-1 e PVL também foram pesquisadas e não detectadas nas amostras estudadas.

O isolado de *S. aureus* da paciente com CVV era MRSA com SCCmec tipo IV e positivo para o gene da enterotoxina A, além de resistente a todos os antimicrobianos testados com exceção da amoxicilina + ácido clavulânico.

4 DISCUSSÃO

S. aureus é um importante patógeno humano capaz de causar uma ampla gama de infecções clínicas como endocardite infecciosa, infecções osteoarticulares, de pele e tecidos moles, pleuropulmonares e relacionadas a dispositivos, tanto na comunidade quanto em ambientes hospitalares [41].

A colonização por MRSA da pele e mucosas, assim como das narinas e do trato vaginal, eleva o risco de desenvolvimento de infecção por este patógeno [13,42,43]. Embora muitos estudos tenham investigado a colonização da pele e das narinas por *S. aureus*, bem como a infecção subsequente, há poucos trabalhos sobre os fatores específicos que influenciam o estabelecimento e a persistência de *S. aureus* e MRSA na microbiota vaginal, e as infecções iniciadas por esta via. Assim, o presente estudo determinou o carreamento vaginal de *S. aureus* em mulheres jovens com e sem candidíase vulvovaginal. A taxa de carreamento vaginal por *S. aureus* entre as mulheres foi de 10,46%, semelhante a taxas entre 9-15% já reportadas [10–15].

Há poucos trabalhos na literatura sobre colonização vaginal por *S. aureus* em mulheres jovens, não grávidas e saudáveis e os existentes não são atuais [10, 14, 45]. Tais trabalhos foram ainda baseados em culturas vaginais, faltando a confirmação genotípica, o que dificulta a comparação com o presente estudo, pois a detecção somente pela cultura do conteúdo vaginal pode subestimar a real taxa de carreamento vaginal pelo *S. aureus*. Estudos recentes [11, 12, 13] relataram as taxas de colonização vaginal por *S. aureus* em mulheres no período gestacional, que alcançam até 22%, porém são de difícil comparação com o nosso trabalho que não contou com nenhuma mulher gestante.

A suspeita de que a presença de candidíase vulvovaginal poderia favorecer o carreamento por *S. aureus* não foi confirmada no estudo, assim como características sócioepidemiológicas e laboratoriais como níveis de glicemia, colesterol e vitamina D

também não influenciaram na presença de *S. aureus* no conteúdo vaginal. Linnemann et al. também investigaram aspectos epidemiológicos para carreamento vaginal para *S. aureus* e também não encontraram relações estatisticamente significativas entre a colonização genital por *S. aureus* e aspectos clínicos e comorbidades [45].

Por outro lado, dados sobre a epidemiologia da colonização nasal por *S. aureus* não são limitados. Um estudo americano [44] sobre colonização estafilocócica nasal e MRSA na comunidade mostrou que pessoas com menos de 65 anos de idade, homens, pessoas com menor escolaridade e pessoas com asma foram mais propensas a adquirir *S. aureus*. Já pessoas com 65 anos de idade ou mais, mulheres, pessoas com diabetes e aqueles que estavam em cuidados de longa duração no ano anterior eram mais propensos a ter colonização nasal por MRSA.

Um estudo brasileiro encontrou associação inversa entre idade e colonização nasal por *S. aureus* [16]. No presente estudo, a maioria das pacientes (66,6%) com *S. aureus* também estavam na faixa etária mais baixa, entre 20-30 anos, embora este dado não tenha sido significativo. Porém faltam trabalhos na literatura que correlacionem os aspectos clínicos com o carreamento vaginal de *S. aureus*.

Há relatos de que o uso de anticoncepcional oral protegeria a mulher da ocorrência da Síndrome do Choque Tóxico, podendo também ser protetor para presença de *S. aureus* no conteúdo vaginal, o que não foi confirmado no nosso trabalho e em outros trabalhos anteriores [45,46], muito embora a literatura careça de trabalhos mais recentes sobre esta possível associação negativa.

Embora nossa população tenha sido basicamente de mulheres jovens e no geral saudáveis, a alta prevalência de MRSA (90%) entre as pacientes portadoras de *S. aureus* é preocupante. Até o momento, não há evidências convincentes de que o MRSA, em geral, seja mais virulento do que o MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina), porém MRSA é associado a infecções mais invasivas, com custos maiores e opções de tratamentos mais limitadas [47–49]. Conhecer esta prevalência é importante pois apesar de as narinas anteriores serem o reservatório clássico para infecções por *S. aureus*, dados sugerem que a colonização genital e outros modos de transmissão desempenham um papel importante e subestimado no desenvolvimento de infecções por MRSA, mesmo sem a colonização nasal [50,51].

A importância da colonização por *S. aureus* como marcador para infecção do sítio cirúrgico está bem documentada. Acredita-se que o *S. aureus* seja o agente causador em cerca de 25-50% das infecções em ferida cirúrgica de cesarianas e

também de mastite puerperal [11]. Com as taxas cada vez maiores de partos cesarianas, o reconhecimento de fatores de risco potencialmente modificáveis como a presença de *S. aureus* vaginal, em especial MRSA, torna-se imperativa.

MRSA é uma causa de doença invasiva em lactentes em unidades de terapia intensiva neonatal. A existência da colonização vaginal por MRSA em mulheres grávidas têm implicações potencialmente graves para os recém-nascidos, como sepse e morte [11]. O presente trabalho não contou com mulheres gestantes, mas com mulheres predominantemente jovens e em idade reprodutiva, que podem passar por gestações e partos futuros, com risco aumentado de desfechos desfavoráveis tanto maternos quanto fetais.

Quando foi relatado pela primeira vez em 1961, o MRSA foi considerado um patógeno nosocomial e que raramente causava infecções em indivíduos sem exposição prévia a ambientes hospitalares [52]. Porém a epidemiologia do MRSA está mudando em todo o mundo nos últimos 20 anos, com crescente preocupação em relação às cepas de MRSA que estão surgindo em indivíduos saudáveis na comunidade [53,54]. A pesquisa do *SCCmec* no presente trabalho mostrou 66,5% de *SCCmec* tipo I, evidenciando que, mesmo este subtipo tradicionalmente associado a ambientes hospitalares, também pode ser encontrado em ambientes comunitários e em pessoas sem fatores de risco. Esta sobreposição entre clones hospitalares e comunitários também foi demonstrada em outros estudos [55,56].

Entre os genes de fatores de virulência pesquisados, apenas o gene *sea*, codificante da enterotoxina A, foi detectado entre os MRSA. Vale ressaltar que a enterotoxina A foi previamente identificada como a Toxina Pirogênica A, por estar associada a maioria das cepas produtoras de TSST-1 [57]. Embora a enterotoxina A seja relacionada a intoxicações alimentares, estudos apontam que os casos de Síndrome do Choque tóxico (TSS) em que os pacientes apresentaram vômitos estavam associados ao gene *sea*, pois a TSST-1 não apresenta propriedades eméticas [58].

Estudos apontam que a TSS estafilocócica ocorre geralmente no período menstrual, correlacionada ao uso de tampões menstruais e a colonização vaginal por *S. aureus* produtor de TSST-1. Embora os isolados do presente estudo não sejam carreadores do gene *tst*, o gene da enterotoxina A pode ser um fator agravante de possíveis infecções causadas por essas bactérias, principalmente no período menstrual em que essas bactérias podem se proliferar mais rapidamente [57].

As limitações do estudo estão relacionadas ao baixo número de isolados de *S. aureus* que não permitiram a realização de análises estatísticas significativas. Apenas uma paciente infectada por *C. albicans* estava colonizada por *S. aureus*, porém esse dado é importante devido a multirresistência desse isolado e a capacidade de produção da enterotoxina A, que no caso de uma co-infecção poderá ser de difícil tratamento.

5 CONCLUSÃO

O estudo não confirmou a associação de candidíase vulvovaginal com o carreamento por *S. aureus*, porém trouxe importantes informações sobre *S. aureus* em conteúdo vaginal de mulheres jovens saudáveis, ressaltando a alta frequência de MRSA e o elevado índice de resistência antimicrobiana, além da capacidade de produção da enterotoxina A que pode agravar as possíveis infecções estafilocócicas. Assim, como os dados de colonização vaginal por *S. aureus* e MRSA na comunidade ainda são escassos, esse estudo ressalta a importância de pesquisas futuras sobre o assunto, para melhores estratégias de tratamentos de possíveis infecções estafilocócicas.

REFERÊNCIAS

1. Soper DE. Bacterial vaginosis and surgical site infections. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2020;222:219–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293781931107X>
2. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2016;29:223–38. Available from: <https://cmr.asm.org/content/29/2/223>
3. Especializadas CN, Obstetrícia G e. Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia -FEBRASGO. 2010.
4. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* [Internet]. 2007;369:1961–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607609179>
5. Lines A, Vardi-Flynn I, Searle C. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *BMJ*. 2020;369:m1995.
6. Rosati D, Bruno M, Jaeger M, Ten Oever J, Netea MG. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: An Immunological Perspective. *Microorganisms* [Internet]. 2020;8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31972980>
7. Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial–fungal interactions. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8:340–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2313>
8. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2005;5:751–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309905702954>
9. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol*

Rev [Internet]. 1997;10:505–20. Available from:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.10.3.505>

10. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang R-Y, Algire MA, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010;329:52–6.

11. Beigi R, Hanrahan J. *Staphylococcus aureus* and MRSA Colonization Rates among Gravidas Admitted to Labor and Delivery: A Pilot Study. *Infect Dis Obstet Gynecol* [Internet]. 2007;2007:1–4. Available from:

<http://www.hindawi.com/journals/idog/2007/070876/abs/>

12. Chen KT, Huard RC, Della-Latta P, Saiman L. Prevalence of Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pregnant Women. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2006;108:482–7. Available from:

<http://journals.lww.com/00006250-200609000-00003>

13. Creech CB, Litzner B, Talbot TR, Schaffner W. Frequency of detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from rectovaginal swabs in pregnant women. *Am J Infect Control* [Internet]. 2010;38:72–4. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196655309007561>

14. Dancer SJ, Noble WC. Nasal, axillary, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* among women: identification of strains producing epidermolytic toxin. *J Clin Pathol* [Internet]. 1991;44:681–4. Available from:

<http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.44.8.681>

15. Reiss-Mandel A, Rubin C, Maayan-Mezger A, Novikov I, Jaber H, Dolitzky M, et al. Patterns and Predictors of *Staphylococcus aureus* Carriage during the First Year of Life: a Longitudinal Study. Diekema DJ, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019;57.

Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00282-19>

16. Pires FV, da Cunha M de LR de S, Abraão LM, Martins PYF, Camargo CH, Fortaleza CMCB. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A Population-Based Survey. Rohde H, editor. PLoS One [Internet]. 2014;9:e92537. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092537>
17. Hu BF, Hua CZ, Sun LY, Chao-Fang, Zhou MM. Microbiological Findings of Symptomatic Vulvovaginitis in Chinese Prepubertal Girls. J Pediatr Adolesc Gynecol [Internet]. Elsevier Inc.; 2021;34:799–804. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2021.05.012>
18. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM, Dinges MM, Orwin PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. 2000;13:16–34.
19. Pinchuk I V., Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal Enterotoxins. Toxins (Basel). 2010;2:2177–97.
20. MacPhee RA, Miller WL, Gloor GB, McCormick JK, Hammond J-A, Burton JP, et al. Influence of the Vaginal Microbiota on Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Production by *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2013;79:1835–42. Available from: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02908-12>
21. Berger S, Kunerl A, Wasmuth S, Tierno P, Wagner K, Brügger J. Menstrual toxic shock syndrome: case report and systematic review of the literature. Lancet Infect Dis [Internet]. 2019;19:e313–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309919300416>
22. Archer GL, Niemeyer DM. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. Trends Microbiol [Internet]. 1994;2:343–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0966842X94906084>
23. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Entire mec DNA of Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus*

aureus N315 Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Entire mec DNA of Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* N315. 1999;43:1449–58.

24. Baig S, Johannesen TB, Overballe-Petersen S, Larsen J, Larsen AR, Stegger M. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier; 2018;61:74–6.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.013>

25. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2012;10:112–22. Available from:

<http://www.nature.com/articles/nrmicro2711>

26. Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2017;15:675–87. Available from:

<http://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.104>

27. Carolus H, Van Dyck K, Van Dijck P. *Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome. Front Microbiol [Internet]. 2019;10. Available from:

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02162/full>

28. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2007;59:401–6. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889307002982>

29. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2009;299:1–8. Available from:

[https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-](https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x)

[6968.2009.01668.x](https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x)

30. Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. Trends Microbiol [Internet]. 2003;11:30–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X02000021>
31. Carlson E. Effect of strain of *Staphylococcus aureus* on synergism with *Candida albicans* resulting in mouse mortality and morbidity. Infect Immun [Internet]. 1983;42:285–92. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.42.1.285-292.1983>
32. Carlson E. Synergistic effect of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* on mouse mortality. Infect Immun [Internet]. 1982;38:921–4. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.38.3.921-924.1982>
33. Carlson E, Johnson G. Protection by *Candida albicans* of *Staphylococcus aureus* in the establishment of dual infection in mice. Infect Immun [Internet]. 1985;50:655–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.50.3.655-659.1985>
34. E W, Koneman; S D, Allen; W M, Janda; P C, Schreckenberger; W C W. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
35. Pereira VC, Martins A, Suppo de Souza Rugolo LM, de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunh M. Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from the Neonatal and Pediatric Units of a Brazilian Teaching Hospital. Clin Med Pediatr [Internet]. 2009;3:CMPed.S2085. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3676290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J Clin Microbiol. 2001;39:2584–9.
37. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection

of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29:426–30.

38. Cunha MLRS, Calsolari R a O. Toxigenicity in *Staphylococcus* with emphasis on coagulase- negative staphylococci. Appl Microbiol. 2007;778–82.

39. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol [Internet]. 1991;29:2240–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1939577>

40. Clinical and Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, document M100-S23. 2016.

41. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2015;28:603–61. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00134-14>

42. Top KA, Huard RC, Fox Z, Wu F, Whittier S, Della-Latta P, et al. Trends in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Anovaginal Colonization in Pregnant Women in 2005 versus 2009. J Clin Microbiol [Internet]. 2010;48:3675–80. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01129-10>

43. Andrews JI, Fleener DK, Messer SA, Kroeger JS, Diekema DJ. Screening for *Staphylococcus aureus* carriage in pregnancy: usefulness of novel sampling and culture strategies. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 2009;201:396.e1-396.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937809007327>

44. Graham PL, Lin SX, Larson EL. A U.S. Population-Based Survey of *Staphylococcus aureus* Colonization. Ann Intern Med [Internet]. 2006;144:318.

Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-144-5-200603070-00006>

45. LINNEMANN CC. The Epidemiology of Genital Colonization with *Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med [Internet]. 1982;96:940. Available from:

<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-96-6-940>

46. Reingold AL, Broome C V., Gaventa S, Hightower AW. Risk Factors for Menstrual Toxic Shock Syndrome: Results of a Multistate Case-Control Study. Clin Infect Dis [Internet]. 1989;11:S35–42. Available from:

https://academic.oup.com/cid/article/11/Supplement_1/S35/306648

47. Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL, et al. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. Clin Infect Dis. 2003;36:592–8.

48. Reed SD, Friedman JY, Engemann JJ, Griffiths RI, Anstrom KJ, Kaye KS, et al. Costs and Outcomes Among Hemodialysis-Dependent Patients With Methicillin-Resistant or Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2005;26:175–83. Available from:

https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0899823X00197624/type/journal_article

49. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The Impact of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Bacteremia on Patient Outcomes: Mortality, Length of Stay, and Hospital Charges. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2005;26:166–74. Available from:

https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0899823X00197612/type/journal_article

50. Cook HA, Furuya EY, Larson E, Vasquez G, Lowy FD. Heterosexual Transmission of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis [Internet]. 2007;44:410–3. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/510681>
51. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis [Internet]. 2008;46:S350–9. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/533591>
52. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2002;99:7687–92. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.122108599>
53. Aires de Sousa M, de Lencastre H. Evolution of Sporadic Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Hospitals and Their Similarities to Isolates of Community-Acquired MRSA. J Clin Microbiol [Internet]. 2003;41:3806–15. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.41.8.3806-3815.2003>
54. Akpaka PE, Kisooson S, Rutherford C, Swanston WH, Jayaratne P. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from regional hospitals in Trinidad and Tobago. Int J Infect Dis [Internet]. 2007;11:544–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971207000665>
55. Seybold U, Kourbatova E V., Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, et al. Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Genotype as a Major Cause of Health Care--Associated Blood Stream Infections. Clin Infect Dis [Internet]. 2006;42:647–56. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/499815>
56. Gonzalez BE, Rueda AM, Shelburne SA, Musher DM, Hamill RJ, Hultén KG.

Community-Associated Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as the Cause of Healthcare-Associated Infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2006;27:1051–6. Available from:

https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0899823X00196552/type/journal_article

57. Schlievert PM, Davis CC. Device-Associated Menstrual Toxic Shock Syndrome. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2020;33. Available from:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00032-19>

58. Schlievert PM, Jablonski LM, Roggiani M, Sadler I, Callantine S, Mitchell DT, et al. Pyrogenic Toxin Superantigen Site Specificity in Toxic Shock Syndrome and Food Poisoning in Animals. Clements JD, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2000;68:3630–4.

Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.68.6.3630-3634.2000>

ANEXO

Normas de Submissão *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*

<https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research-article>

Research article

Criteria

If you wish to make a presubmission enquiry about the suitability of your manuscript, please email the [editors](#) who will respond to your enquiry as soon as possible.

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's [information on recommended repositories](#). Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. A list of data where deposition is required, with the appropriate repositories, can be found on the [Editorial Policies Page](#).

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
 - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
 - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names and institutional addresses for all authors
 - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the [CONSORT](#) extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study

- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be in stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our [editorial policies](#) for more information on trial registration

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and materials
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval and for experimental studies involving client-owned animals, authors must also include a statement on informed consent from the client or owner.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state "Not applicable" in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Authors are also encouraged to preserve search strings on searchRxiv <https://searchrxiv.org/>, an archive to support researchers to report, store and share their searches consistently and to enable them to review and re-use existing searches. searchRxiv enables researchers to obtain a digital object identifier (DOI) for their search, allowing it to be cited.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

If you wish to co-submit a data note describing your data to be published in [BMC Research Notes](#), you can do so by visiting our [submission portal](#). Data notes support [open data](#) and help authors to comply with funder policies on data sharing. Co-published data notes will be linked to the research article the data support ([example](#)).

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

References

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci*. 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine*. 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. p. 251-306.

Online first chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem*. 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document. Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. *US Pharmacopeia*, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.