

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Ana Carolina de Oliveira Luz

**Perfil de Virulência de Isolados Clínicos de
Staphylococcus aureus Relacionados a Diferentes
Clones Epidêmicos**

**Recife
2015**

Ana Carolina de Oliveira Luz

**Perfil de Virulência de Isolados Clínicos de
Staphylococcus aureus Relacionados a Diferentes
Clones Epidêmicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Co - orientadora: Dra. Mariana Andrade Figueiredo

Recife

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Luz, Ana Carolina de Oliveira

Perfil de virulência de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* relacionados a diferentes clones epidêmicos / Ana Carolina de Oliveira Luz. – Recife: O Autor, 2015.

87 f.: il.

Orientadores: Tereza Cristina Leal Balbino, Mariana Andrade Figueiredo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Bactérias 2. *Staphylococcus aureus* I. Balbino, Tereza Cristina Leal (orient.) II. Figueiredo, Mariana Andrade. (coorient.) III. Título.

579.353

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-241

Ana Carolina de Oliveira Luz

**Perfil de Virulência de Isolados Clínicos de *Staphylococcus aureus*
Relacionados a Diferentes Clones Epidêmicos**

Aprovado em 09/03/2015

Banca Examinadora:

Orientadora - Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/Fiocruz

Dr. Vladimir da Mota Silveira-Filho
Universidade de Pernambuco – UPE

Dra. Carina Lucena Mendes-Marques
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/Fiocruz

Recife
2015

Dedico este trabalho a todos aqueles que fazem
ciência no Brasil

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às minhas orientadora e co-orientadora, Cristina e Mariana, pela orientação e amizade durante todos estes anos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPE e aos órgãos de fomento envolvidos no trabalho.

Agradeço profundamente a todas as pessoas que auxiliaram na realização do trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica (Emanuelle e Henrique) que estiveram envolvidos.

Agradeço ao Professor Tercílio, Fabiana, e a todos que fazem parte do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP) pela imensa ajuda com toda a parte de proteômica desenvolvida neste trabalho.

Ao LGPP e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pelo uso da infraestrutura.

Agradeço à minha família, namorado e amigos, pelo apoio e incentivo.

Agradeço aos amigos de laboratório pela companhia, ajuda científica e momentos de descontração.

Agradeço aos amigos que conheci durante a pós-graduação pelas conversas e pelas muitas horas nas quais estudamos juntos.

“A ciência é a poesia da realidade”

(Richard Dawkins)

Resumo

Staphylococcus aureus é considerado o patógeno mais importante de seu gênero, responsável por diversas infecções, variando desde infecção de pele e tecidos moles, até pneumonia, endocardite e sepse. Uma das causas da diversidade patogênica desta bactéria é a grande variedade de fatores de virulência que podem ser produzidos. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de melhor compreender o perfil de virulência de *S. aureus*, e a possível relação destes com os clones epidêmicos circulantes na região estudada. Para tal, foram estudados 89 isolados clínicos de *S. aureus* provenientes de diferentes hospitais de Recife/PE, obtidos de diversas fontes de infecção e com diferentes perfis genéticos. Foram realizadas investigações dos genes *fnbA* e *fnbB* (ligação à fibronectina), *cna* (ligação ao colágeno), *clfA* e *clfB* (fatores *clumping*, ligação ao fibrinogênio), *icaA* e *icaD* (produção de biofilme), *lukF-PV* e *lukS-PV* (leucocidina Pantón Valentine), *cap5* e *cap8* (cápsula polissacarídica), genes do *cluster* gênico de enterotoxinas (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo*), e análise do proteoma e secretoma de dois clones amplamente distribuídos. Todos os isolados apresentaram no mínimo oito fatores de virulência. Foram estabelecidos 39 genótipos, dos quais nenhum se mostrou clone específico. Analisando-se o padrão protéico, diversas proteínas, em especial três fatores de virulência, mostraram-se diferencialmente expressos. Como conclusão, pode-se sugerir que os isolados clínicos estudados possuem alto potencial virulento, possuindo um arcabouço genético capaz de desenvolver quadros clínicos graves.

Palavras-chave: MSCRAMMs, PVL, enterotoxinas, MRSA, Clones.

Abstract

Staphylococcus aureus is considered the most important pathogen within its genre, responsible for a variety of infections, ranging from skin and soft tissue infections to pneumonia, endocarditis and sepsis. One of the causes for this bacterium's pathogenic diversity is the great variety of virulence factors that can be produced. The present study was developed aiming a better comprehension the virulence profile of *S. aureus*, and the possible relationship between them and current epidemic clones in the study area. To do so, we studied 89 clinical isolates of *S. aureus* from various sources of infection and with different genetic backgrounds. Investigations were conducted for the genes *fnbA* and *fnbB* (fibronectin binding proteins), *cna* (collagen binding protein), *clfA* and *clfB* (clumping factors, fibrinogen binding proteins), *icaA* and *icaD* (biofilm formation), *lukF*-PV and *lukS*-PV (leucocidin Panton Valentine), *cap5* and *cap8* (capsule polyssacharides), genes from the enterotoxin gene cluster (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* and *seo*), and proteome and secretome analysis of two widely spread epidemic clones. All isolates showed positive for, at least, eight virulence factors. Thirty-nine genotypes were stablished, none of which showed itself as clone specific. Analysing the proteic pattern, several proteins, in special three virulence factors, were differentially expressed. As conclusion, we can suggest that the clinical isolates studied have a high virulence potential, possessing a genetic background capable of developing severe clinical syndromes.

Key words: MSCRAMMs, PVL, enterotoxins, MRSA, Clones.

Lista de Figuras

Figura 1. Micrografia eletrônica colorida de <i>Staphylococcus aureus</i>	3
Figura 2. Etapas fundamentais para a formação do biofilme, onde é necessário adesão ao tecido, proliferação do microrganismo, e posterior maturação e dispersão do biofilme	8
Figura 3. Formação de poros nas células polimorfonucleadas pela leucocidina Pantón Valentine, demonstrando situações em alta ou baixa concentração deste completo protéico	9
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de A) cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> produtora de cápsula polissacarídica tipo 5; B) cepa não produtora	11
Figura 5. Prevalência de HA-MRSA (<i>Hospital-associated MRSA</i>) no mundo	17
Figura 6. Distribuição de clones MRSA na América Latina	19
Figura 7. Frequências dos fatores de virulência encontradas nos <i>S. aureus</i> estudados	32
Figura 8. Géis representativos dos produtos de PCR: A) <i>clfA</i> (292 pb) e <i>cna</i> (423 pb) do lado esquerdo da foto; <i>clfB</i> (205 pb) e <i>fnbB</i> (524 pb) do lado direito; B) <i>icaA</i> (936 pb) e <i>icaD</i> (381 pb); C) <i>fnbA</i> (702 pb); D) PVL (894 pb); E) <i>cap5</i> (881 pb); e F) <i>cap8</i> (834 pb). MM – Marcador de peso molecular; Colunas 1, 2, 3, 4 e 5 – Sa51, Sa52, Sa53, Sa54 e Sa55; Colunas 6, 7, 8, 9 e 10 – Sa41, Sa42, Sa43, Sa44 e Sa45; Colunas 11 e 12 – MRSA 4673 (controle positivo) e Sa66; Colunas 13 e 14 – Sa2 e Sa89; Colunas 15, 16 e 17 – Sa1, Sa58 e Sa79; Colunas 18, 19 e 20 – Sa66, Sa67 e Sa70.	33
Figura 9. Número de isolados MRSA e MSSA positivos para cada fator de virulência investigado	35
Figura 10. Alinhamento das sequências de DNA do gene <i>icaD</i> para as cepas de referência COL, Mu50, N315, Newman e BEC, e para os isolados Sa18, Sa19 e Sa20. Em destaque, polimorfismos de base única (SNPs) exclusivos dos isolados relacionados ao BEC. Imagem do alinhamento gerada pelo programa BioEdit.	39
Figura 11. Alinhamento das sequências de proteínas obtidas através de tradução <i>in silico</i> para as cepas de referência COL, Mu50, N315, Newman e BEC, e para os isolados Sa18, Sa19 e Sa20. Em destaque, aminoácidos alterados exclusivamente nos isolados relacionados ao BEC. Imagem do alinhamento gerada pelo programa BioEdit.	40

Figura 12. Proteínas totais de <i>Staphylococcus aureus</i> em gel SDS-PAGE (12,5% acrilamida). MM – Marcador de baixo peso molecular (em kDA); A) Colunas 1, 2 e 3 – triplicatas do proteoma de Sa36/BEC; Colunas 4, 5 e 6 – triplicatas do proteoma de Sa82/PC; B) Colunas 7, 8 e 9 – triplicatas do secretoma de Sa36/BEC; e Colunas 10, 11 e 12 – triplicatas do secretoma de Sa82/PC.	47
Figura 13. Esquema de corte das bandas de gel SDS-PAGE (12,5% acrilamida) de proteínas totais de <i>Staphylococcus aureus</i> . A) proteoma e B) secretoma totais de <i>S. aureus</i> em SDS-PAGE (12,5% acrilamida). MM – Marcador de baixo peso molecular em kDA; A) Colunas 1, 2 e 3 – triplicatas do proteoma de Sa36/BEC; Colunas 4, 5 e 6 – triplicatas do proteoma de Sa82/PC; B) Colunas 1, 2 e 3 – triplicatas do secretoma de Sa36/BEC; Colunas 4, 5 e 6 – triplicatas do secretoma de Sa82/PC.	48
Figura 14. Anotação ontológica dos peptídeos identificados no proteoma de <i>Staphylococcus aureus</i> . A) Proteoma de Sa36/BEC; B) Proteoma de Sa82/PC.	56
Figura 15. Anotação ontológica dos peptídeos identificados no secretoma de <i>Staphylococcus aureus</i> . A) Secretoma de Sa36/BEC; B) Secretoma de Sa82/PC.	57
Figura 16. Localização subcelular dos peptídeos identificados no proteoma e secretoma de <i>Staphylococcus aureus</i> . A) Proteoma de Sa36/BEC; B) Proteoma de Sa82/PC; C) Secretoma de Sa36/BEC; D) Secretoma de Sa82/PC.	58
Figura 17. Proteínas totais do secretoma de <i>Staphylococcus aureus</i> em gel bidimensional (12,5% acrilamida). MM – Marcador de baixo peso molecular GE (em kDA); A) secretoma de Sa36/BEC; B) secretoma de Sa82/PC. Em vermelho, os spots de <i>matches</i> com relevância estatística.	59

Lista de Quadros

Quadro 1. Exemplos de fatores de virulência em <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Quadro 2. Diferenças epidemiológicas e genéticas observadas entre HA-MRSA e CA-MRSA	16
Quadro 3. Exemplos de clones MRSA com suas características e dispersão geográfica	18

Lista de Tabelas

Tabela 1. Isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> estudados e suas características	22
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas PCRs para investigação dos fatores de virulência	26
Tabela 3. Genótipos de virulência encontrados nos <i>Staphylococcus aureus</i> estudados	34
Tabela 4. Investigação de fatores de virulência nos isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> estudados	41
Tabela 5. Características epidemiológicas e genéticas dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> Sa36 e Sa82	46
Tabela 6. Anotação presumível dos peptídeos obtidos a partir de bandas diferenciais do gel SDS-PAGE do proteoma e secretoma de <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Tabela 7. Anotação ontológica, correspondência gênica, e relação com a virulência dos peptídeos obtidos a partir de bandas diferenciais do gel SDS-PAGE do proteoma e secretoma de <i>Staphylococcus aureus</i>	53

Lista de Abreviaturas e Siglas

BC	Clone Berlin
BEC	Clone Epidêmico Brasileiro
BHI	Infusão de cérebro e coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina associado à comunidade
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CP	Cápsula polissacarídica
<i>egc</i>	<i>Cluster</i> gênico de enterotoxinas (<i>enterotoxin gene cluster</i>)
<i>FnbP</i>	Proteína de ligação a fibronectina
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina associado ao hospital
HC - UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HUOC - UPE	Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco
kDa	KiloDalton
LB	Meio de cultura Luria Bertani
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MLST	Tipagem de sequências multilocus (<i>multilocus sequence typing</i>)
MM	Marcador de peso molecular
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MSCRAMM	Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> susceptível a meticilina
NT	Não-tipável
NY/J	Clone Nova Iorque/Japão
OSPC	Clone Oceania Sudoeste do Pacífico

pb	Pares de bases
PBP	Proteína de ligação à penicilina (<i>penicillin binding protein</i>)
PC	Clone Pediátrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
pH	Potencial hidrogeniônico
PIA	Polissacarídeo de adesina intercelular
PNAG	Poli-N-acetil-glucosamina
PROCAPE	Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco
PVL	Leucocidina Panton Valentine
R	Resistente
rpm	Rotações por minuto
S	Susceptível
SCC <i>mec</i>	Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
SE	Enterotoxina estafilocócica
SNP	Polimorfismo de base única (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
ST	Perfil alélico
TSS	Síndrome do choque tóxico (<i>toxic shock syndrome</i>)
UTI	Unidade de tratamento intensivo

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.2 Virulência em <i>S. aureus</i>	4
2.2.1 Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva (MSCRAMMs)	6
2.2.2 Biofilme	7
2.2.3 Leucocidina Pantón Valentine (PVL)	9
2.2.4 Cápsula polissacarídica (CP)	10
2.2.5 Superantígenos	11
2.2.5.1 Enterotoxinas (SEs)	12
2.3 <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	13
2.4 MRSA Hospitalar e Comunitário	15
2.5 Clones epidêmicos de MRSA	17
3. Objetivos	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. Material e Métodos	21
4.1 Amostras de <i>S. aureus</i> estudadas	21
4.2 Extração de DNA e investigação dos fatores de virulência	25
4.3 Extração de proteínas totais de proteoma e secretoma	29
4.4 Construção de géis uni e bidimensionais	29
4.5 Análise dos géis, tripsinização e espectrometria de massas	30
5. Resultados	32
5.1 Investigação molecular de fatores de virulência	32

5.2 Análise do proteoma e secretoma de dois isolados de <i>S. aureus</i>	46
6. Discussão	60
7. Conclusões	72
8. Referências Bibliográficas	74
9. Anexos	82
Anexo 1 – Adaptação do protocolo do kit Instagene (Bio-Rad) de extração de DNA para <i>Staphylococcus aureus</i>	82
Anexo 2 – Extração de proteínas totais solúveis desenvolvida para <i>Staphylococcus aureus</i>	83
10. Currículo Lattes correspondente ao período do curso	86

1. Introdução

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram positiva e oportunista, sendo considerado um dos patógenos mais importantes do seu gênero. Entre as bactérias Gram positivas, *S. aureus* constitui uma das principais causas de infecções hospitalares no mundo, porém também é observada com frequência em infecções adquiridas no ambiente comunitário.

Este microrganismo é capaz de ocasionar uma ampla gama de infecções, que geralmente acometem pele ou tecidos moles, assim como também é capaz de provocar infecções mais graves, como pneumonia necrosante e bacteremia, além de possuir a capacidade de produzir toxinas, sendo responsável por diversos quadros de intoxicações.

Para tal, *S. aureus* possui um extenso arsenal de fatores de virulência que contribuem de diversas maneiras para o estabelecimento e manutenção da infecção. Entre estes fatores, destacam-se proteínas da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva (chamadas MSCRAMM, sigla derivada do inglês “*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*”); presença de biofilme e cápsula polissacarídica; proteínas responsáveis pela evasão do sistema imune do hospedeiro; e proteínas com atividade superantigênica, responsáveis por quadros de toxicidade sistêmica.

Além da presença desses fatores, outra característica que contribui para a instalação da doença e a patogenicidade da bactéria é a resistência antimicrobiana. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina é um dos principais patógenos de infecções hospitalares e comunitárias. Atualmente, diversos clones

de *S. aureus* são conhecidos e dispersos pelo mundo, como por exemplo, os clones; Epidêmico Brasileiro, Pediátrico e Nova Iorque/Japão.

Diante deste cenário, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de conhecer o arcabouço genético de fatores de virulência de isolados clínicos de *S. aureus* de Recife/PE, em comparação com clones epidêmicos internacionais, permitindo uma maior compreensão a respeito das diferenças genéticas entre os diferentes clones epidêmicos observados no Brasil e no mundo.

2. Revisão da Literatura

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (Figura 1) é uma bactéria pertencente à família *Staphylococcaceae* e um patógeno versátil, sendo considerada a espécie mais virulenta do gênero *Staphylococcus* (Koneman *et al.*, 2001; Bania *et al.*, 2006; NCBI, 2014).

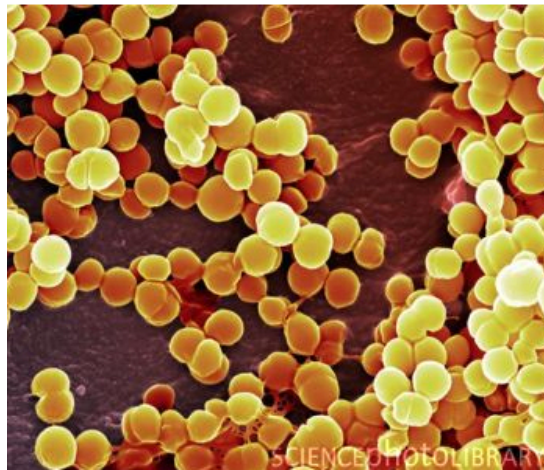


Figura 1. Micrografia eletrônica colorida de *Staphylococcus aureus*. Fonte: Science Photo Library, 2012.

São cocos Gram positivos, com 0,5 a 1 μm de diâmetro, com organização semelhante a cachos de uva, por não possuírem um plano regular de divisão (Koneman *et al.*, 2001; Ingraham e Ingraham, 2010). *Staphylococcus aureus* é anaeróbio facultativo, fermentador de açúcares, catalase e coagulase positivo. Este patógeno cresce bem sob alta pressão osmótica, baixa umidade e alta concentração de sal (Koneman *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2008; Ingraham e

Ingraham, 2010). Possui temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 37°C e pH ótimo entre 6,0 e 7,0, porém pode apresentar crescimento em uma faixa mais ampla de temperatura (entre 4°C e 46°C) e de pH (entre 4,0 e 9,8) (Franco e Landgraff, 2000).

Staphylococcus aureus é um microrganismo oportunista, de forma que se comporta tanto quanto comensal quanto como patógeno. Pode ser encontrado na região nasal de 20 a 30% da população saudável, em colonização persistente ou intermitente. Seus sítios de colonização mais comuns são o epitélio escamoso nasal, axilas, virilha e trato gastrointestinal (Bania *et al.*, 2006; Gordon e Lowy, 2008; Burke *et al.*, 2010). A colonização é um fator de risco para uma infecção posterior, visto que um estudo com isolados clínicos provenientes de bacteremia observou que tais isolados eram idênticos às cepas encontradas colonizando a região nasal em 82% dos pacientes (Von Eiff *et al.*, 2001; Gordon e Lowy, 2008).

A gama de infecções causadas por *S. aureus* varia desde infecções de pele e tecidos moles (como por exemplo, foliculite, furúnculo e impetigo) até infecções profundas e graves (como artrite séptica, endocardite e pneumonia necrosante) (Labandeira-Rey *et al.*, 2007; Burke *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2010).

2.2 Virulência em *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus possui um extenso arsenal de fatores de virulência, que podem ser secretados ou estruturais (Gordon e Lowy, 2008). Esse arsenal é composto por proteínas de parede celular, exoenzimas e exotoxinas, com diversas funções, como promover adesão ao tecido e superfície celular do hospedeiro; auxiliar na evasão ao sistema imune; ou promover a captação de ferro (Foster, 2005). Desta forma, as infecções estafilocócicas são multifatoriais (e

tais fatores podem ser multifuncionais, em especial as adesinas e exoproteínas, onde mais de uma proteína consegue se ligar à mesma molécula, ou uma mesma proteína é capaz de ligar-se a várias moléculas diferentes). Desta forma, é difícil determinar quais os principais determinantes de virulência no processo patogênico (Tristan *et al.*, 2003; O’Riordan e Lee, 2004; Foster, 2005).

Exemplos de fatores de virulência em *S. aureus* podem ser observados no Quadro 1.

Quadro 1. Exemplos de fatores de virulência em *S. aureus*. Fonte: adaptado de Gordon e Lowy (2008).

Tipo de Fatores de Virulência	Exemplos de Fatores	Genes	Aspectos Clínicos Associados
Envolvidos na adesão ao tecido	Fatores clumping, proteínas de ligação à fibronectina e colágeno	<i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> e <i>cna</i>	Endocardite, osteomielite, artrite séptica, e infecções relacionadas aos dispositivos médicos
Envolvidos com no persistência organismo	Biofilme e variantes de colônia	Loco <i>ica</i> e mutação do <i>hemB</i>	Infecções recorrentes ou associadas à fibrose cística, e aspectos citados acima para adesão ao tecido
Envolvidos com evasão ou destruição do sistema imune do hospedeiro	Leucocidinas, polissacarídeos capsulares e proteína A	<i>lukS</i> -PV, <i>lukF</i> -PV, <i>cap5</i> e <i>cap8</i> , e <i>spa</i>	Infecções invasivas de pele, pneumonia necrosante e abscessos
Envolvidos com invasão do tecido	Proteases, lípases e nucleases.	<i>V8</i> , <i>hla</i> e <i>plc</i>	Destruição do tecido
Toxinas	Enterotoxinas, toxina 1 da síndrome do choque tóxico e toxinas esfoliativas	<i>sea-seq</i> , <i>tst</i> , <i>eta</i> e <i>etb</i>	Intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada

2.2.1 Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva (MSCRAMMs)

Staphylococcus aureus é capaz de produzir diversas proteínas de superfície que reconhecem e se ligam a moléculas do epitélio nasal, importantes para uma colonização eficaz. Essas proteínas são coletivamente conhecidas como MSCRAMMs (do inglês “*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*”), e compreendem as adesinas, como os fatores *clumping* (ou fatores de aglomeração); proteínas de ligação à fibronectina e de ligação ao colágeno (Krishna e Miller, 2012).

Os fatores *clumping* ligam-se ao fibrinogênio e induzem agregação plaquetária (Foster, 2005; Scully *et al.*, 2014). São codificados pelos genes *clfA* e *clfB*, que produzem dois tipos de fatores *clumping*, com expressões diferenciadas durante o crescimento bacteriano (sendo ClfB mais abundante na fase exponencial, e ClfA, na fase estacionária) (Foster, 2005). As proteínas de ligação à fibronectina (chamadas FnbPA e B) são moléculas multifuncionais com potencial de ligar-se não só à fibronectina, mas também ao fibrinogênio e à elastina (Burke *et al.*, 2010). São codificadas pelos genes *fnbA* e *fnbB*. Diferentemente dos fatores *clumping*, estas proteínas são igualmente expressas em *S. aureus*. Mutantes para apenas um dos genes de ligação à fibronectina ainda assim conseguem se ligar a uma superfície coberta com esta molécula, enquanto células mutantes para os dois genes se mostraram incapazes de aderir (Saravia-Otten *et al.*, 1997).

O organismo do hospedeiro apresenta dificuldade em desenvolver anticorpos contra *S. aureus* devido à atividade imunossupressora de proteínas com atividade superantigênica, portanto, não existem obstáculos para

reincidência de uma infecção por *S. aureus*. Entretanto, certos componentes da superfície bacteriana são capazes de induzir uma alta produção de anticorpos, como por exemplo, Cna (proteína de ligação ao colágeno, codificada pelo gene *cna*) e ClfA, mostrando que essas proteínas podem ser futuros alvos para o desenvolvimento de uma vacina contra *S. aureus* (Foster, 2005).

2.2.2 Biofilme

Os biofilmes bacterianos são definidos como comunidades de células bacterianas cobertas por uma matriz polimérica extracelular (Watkins *et al.*, 2012). Tais biofilmes são conhecidos como fatores importantes em infecções crônicas, como endocardite e pneumonia, mas principalmente em infecções associadas ao uso de equipamentos ou dispositivos médicos (como, por exemplo, cateteres) ou implante de dispositivos (como válvulas cardíacas artificiais) (O’Gara, 2007). Bactérias em um biofilme tornam-se de difícil acesso para neutrófilos e macrófagos, além de serem difíceis de inibir com antimicrobianos (McCourt *et al.*, 2014).

Em *S. aureus*, a capacidade de produzir biofilme se dá, primariamente, pela presença do operon *ica*. Este loco, composto pelos genes *icaADBC*, codifica proteínas responsáveis pela formação do polissacarídeo de adesina intercelular (PIA), também conhecido como poli-N-acetil-glucosamina (PNAG) (O’Gara, 2007; Cue *et al.*, 2012).

As proteínas IcaD e IcaA produzem oligômeros de N-acetil-glucosamina com, no máximo, 20 resíduos por cadeia. Apenas quando IcaC é expresso, essas cadeias de oligômeros tornam-se maiores e são efetivamente transferidas para o meio extracelular. IcaB, por sua vez, é responsável por desacetilar a molécula de

PIA, tornando-a uma matriz carregada positivamente, o que proporciona a ligação com as superfícies negativamente carregadas das células bacterianas (O’Gara, 2007).

A formação do biofilme acontece primeiramente pela adesão da bactéria à superfície, seja de forma direta, ou através de proteínas de ligação às moléculas do tecido hospedeiro, como fatores *clumping* e proteínas de ligação à fibronectina. Após a adesão, é necessário que ocorra proliferação e produção de PIA/PNAG. Com o tempo, ocorrerá aumento da colônia (maturação do biofilme) e posterior dispersão para novos sítios (Watkins *et al.*, 2012). Uma representação esquemática deste processo pode ser observada na Figura 2.

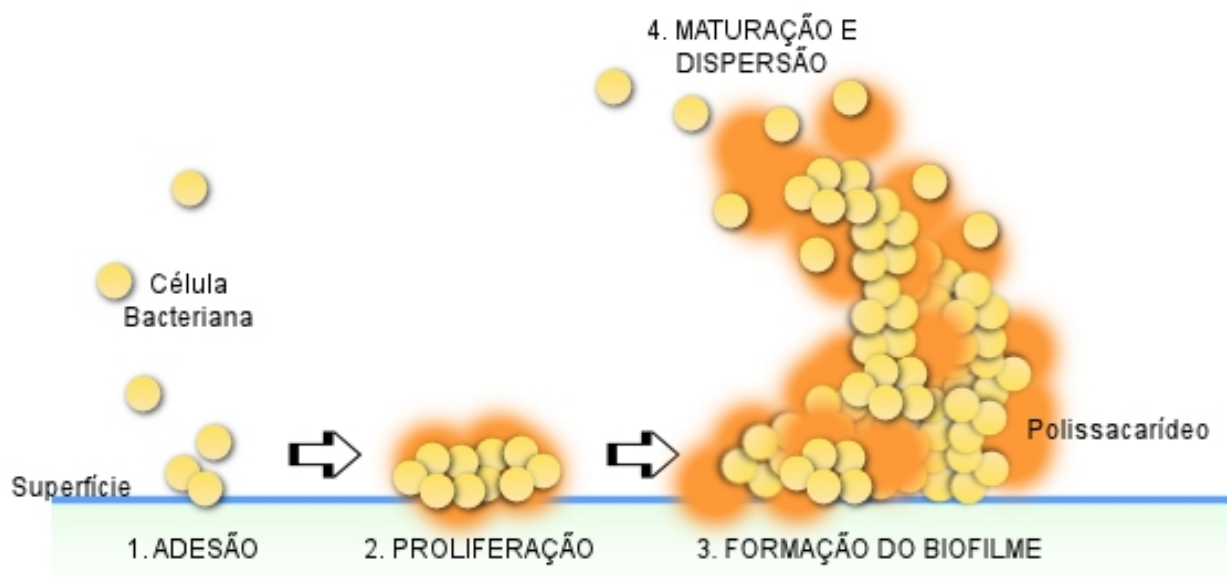


Figura 2. Etapas fundamentais para a formação do biofilme, onde é necessária adesão ao tecido, proliferação do microrganismo, e posterior maturação e dispersão do biofilme. Fonte: adaptado de Watkins *et al.*, 2012.

2.2.3 Leucocidina Panton-Valentine (PVL)

A leucocidina Panton-Valentine (PVL) é uma exotoxina composta por um complexo protéico heptamérico formado por duas proteínas principais, codificadas pelos genes contíguos *lukS*-PV e *lukF*-PV, localizados em um profago (Boyle-Vavra e Daum, 2007; Marimón *et al.*, 2012; Watkins *et al.*, 2012).

Dependendo da concentração, PVL forma poros na membrana celular ou mitocondrial de neutrófilos e macrófagos. Quando em baixas concentrações, esta leucocidina liga-se e forma poros na membrana da mitocôndria de células polimorfonucleadas, provocando apoptose; porém quando em altas concentrações, PVL forma os poros na membrana citoplasmática dessas células, levando a lise celular e, consequentemente liberando moléculas pró-inflamatórias (Figura 3) (Kreienbuehl *et al.*, 2011).

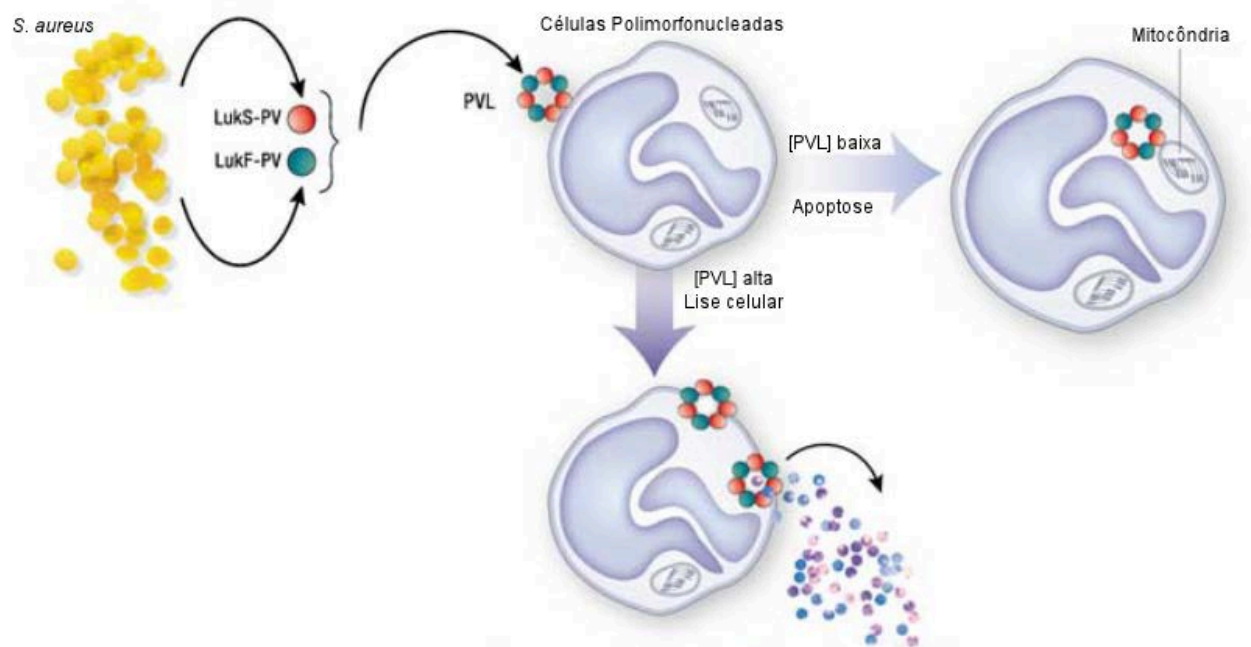


Figura 3. Formação de poros nas células polimorfonucleadas pela leucocidina Panton Valentine, demonstrando situações em alta ou baixa concentração deste complexo protéico. Fonte: adaptado de Boyle-Vavra e Daum, 2007.

Epidemiologicamente, cepas produtoras de PVL têm sido relacionadas a lesões necróticas e pneumonia necrosante severa (Schwartz e Nourse, 2011; Marimón *et al.*, 2011), porém o papel desta leucocidina na patogênese ainda é bastante controverso (Watkins *et al.*, 2012).

De maneira geral, PVL não parece ter função ou ter uma função limitada e transiente. Estudos utilizando ratos como modelo mostraram que a contribuição da PVL para promoção da doença pode estar limitada a determinados fatores pré-existentes ou a uma característica genética específica do hospedeiro (Lo e Wang, 2011). Entretanto, neutrófilos isolados de ratos são insensíveis à ação citotóxica da PVL, diferente do observado em humanos e coelhos, tornando este um modelo melhor para a análise da função da leucocidina (Lipinska *et al.*, 2011).

2.2.4 Cápsula polissacarídica (CP)

A cápsula polissacarídica é um componente da parede celular bacteriana responsável pela proteção da bactéria contra o sistema imune do hospedeiro (Verdier *et al.*, 2007), e confere uma maior virulência à cepa por contribuir para a resistência celular à fagocitose (O’Riordan e Lee, 2004). A presença da cápsula impede a opsonização, ou seja, a promoção da fagocitose por neutrófilos ou macrófagos através da ligação de anticorpos ou de proteínas do complemento. Fatores do sistema complemento do hospedeiro podem se ligar à parede celular da bactéria, mas a proteína de superfície que compõe a cápsula impede o acesso desses fatores aos receptores na membrana celular de neutrófilos (Foster, 2005).

Em geral, cepas que produzem cápsula crescem em meio de cultura sólido com colônias mucóides, como por exemplo, cepas pertencentes aos sorotipos 1 e

2, porém estes sorotipos são raramente observados em isolados clínicos. Aquelas cepas que são encapsuladas, mas não apresentam colônias mucóides em meio sólido são chamadas de microcapsuladas (O’Riordan e Lee, 2004). Grande parte dos isolados clínicos de *S. aureus* pertencentes aos sorotipos 5 e 8 produzem uma fina camada microcapsular (Figura 4), correspondendo a 25% e 50%, respectivamente (O’Riordan e Lee, 2004; Foster, 2005; Nanra et al, 2013).

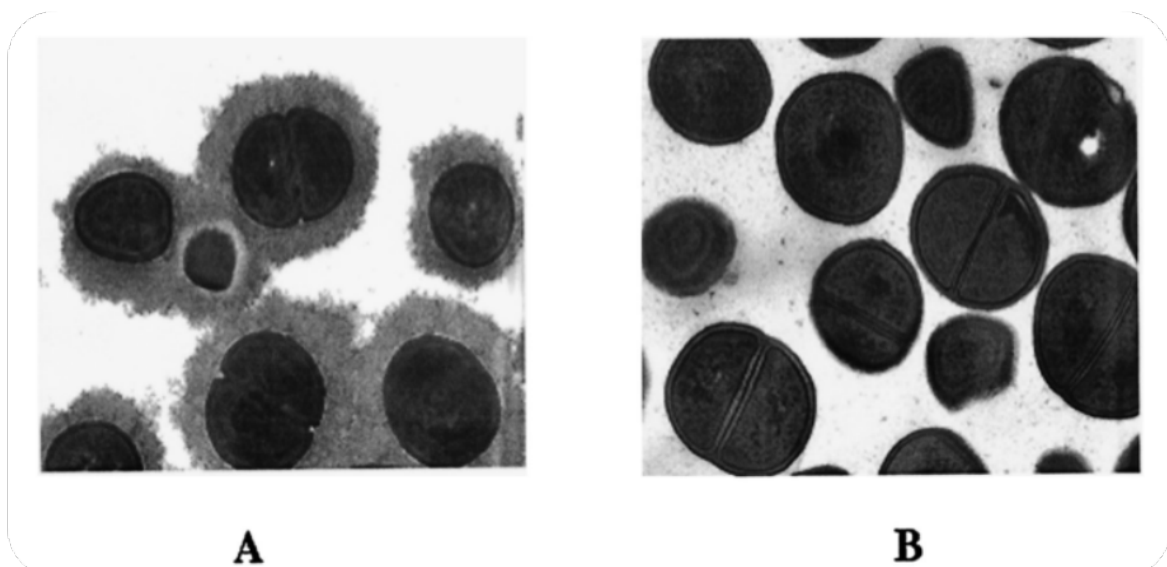


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de A) cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de cápsula polissacarídica tipo 5; B) cepa não produtora. Fonte: O’Riordan e Lee, 2004.

Assim como ClfA e Cna, CPs são alvos em potencial para o desenvolvimento de vacinas contra *S. aureus* (O’Riordan e Lee, 2004; Verdier et al., 2007; Nanra et al., 2013).

2.2.5 Superantígenos

Staphylococcus aureus é capaz de produzir uma gama de toxinas que contribuem para a virulência do microrganismo. Entre elas, destacam-se a toxina

1 da síndrome do choque tóxico, as toxinas esfoliativas, e as enterotoxinas, todas consideradas superantígenos (SAGs) (Dinges *et al.*, 2000).

Superantígenos são proteínas que se ligam simultaneamente às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e aos receptores de células T, independentemente de suas especificidades de ligação a peptídeos, formando um complexo trimolecular, que estimula uma resposta policlonal inespecífica de linfócitos T e a liberação aumentada de citocinas, causando toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa, os quais prolongam a infecção bacteriana às custas da saúde do hospedeiro humano (Parham, 2001; Baker e Acharya, 2004).

2.2.5.1 Enterotoxinas (SEs)

As enterotoxinas denominadas de clássicas foram classificadas em cinco tipos sorológicos: SEA, SEB, SEC, SED e SEE. Entretanto, outras SEs passaram a ser conhecidas posteriormente e, atualmente, existem vinte e uma enterotoxinas descritas na literatura (Schelin *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; Hennekinne *et al.*, 2011). Elas são nomeadas de SEA a SEV (entretanto, não existe SEF) e suas variantes (Dinges *et al.*, 2000; Jarraud *et al.*, 2001; Letertre *et al.*, 2003; Hennekinne *et al.*, 2011; Schelin *et al.*, 2011).

O envolvimento de várias enterotoxinas não-clássicas na intoxicação alimentar e outras doenças ainda não é bem compreendido, mas sabe-se que as enterotoxinas SEG, SEH e SEI possuem comprovada atividade emética e já foram associadas a surtos de intoxicação alimentar. Algumas enterotoxinas também já foram associadas com a Síndrome do Choque Tóxico), à patogênese das síndromes alérgicas crônicas (Varshney *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011) e à

ulceração da córnea quando presentes em infecções oculares (Fujishima *et al.*, 2012), como SEB (Rajagopalan *et al.*, 2007), SEA, SEC, SED (Vojtov *et al.*, 2002), SEG e SEI (Jarraud *et al.*, 1999).

Os genes das enterotoxinas estão, em geral, presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons ou ilhas de patogenicidade, o que permite a transferência horizontal desses determinantes de virulência (Xie *et al.*, 2011). O *cluster* gênico de enterotoxinas (*egc*) compreende os genes das enterotoxinas SEG, SEI, SEM, SEN e SEO, juntamente com dois pseudogenes (*φent1* e *φent2*), que se encontram no genoma do *S. aureus* (Collery *et al.*, 2009).

2.3 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

Pacientes infectados com bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos apresentam maior permanência no ambiente hospitalar e requerem tratamento com drogas de segunda ou terceira geração, que podem ser menos efetivas, mais caras, ou mais tóxicas ao organismo (Oliveira e Silva, 2008).

Diversas novas drogas derivadas de penicilina passaram a ser desenvolvidos na década de 1950, diante da crescente resistência dos microrganismos contra este antibiótico. Esta resistência acontece pela presença de penicilinases (ou β -lactamases), enzimas bacterianas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico desta classe de antimicrobianos. Cerca de 90% dos isolados do gênero *Staphylococcus* são resistentes à penicilina, independente do contexto clínico (Lowy, 2003; Fuda *et al.*, 2005; Calfee, 2011).

A meticilina, uma droga semi-sintética, derivada de penicilina, e resistente a penicilinases, foi introduzida na prática médica por volta de 1960, porém, já em 1961, houve o primeiro caso reportado de *S. aureus* resistente à meticilina

(Foster, 2005; Calfee, 2011). Desde então, *S. aureus* meticilina resistente (MRSA, do inglês “*meticillin-resistant S. aureus*”) tem se disseminado ao redor do mundo, não apenas em ambientes hospitalares, mas também na comunidade, em pacientes sem histórico prévio de hospitalização (Millar *et al.*, 2007; Gordon e Lowy, 2008).

A resistência a meticilina acontece pela aquisição e expressão do gene *mecA*, presente no Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), um elemento genético móvel do genoma de *S. aureus*, que além de promover a resistência à meticilina, pode também carrear outros determinantes de resistência a antibióticos ou metais pesados (Malachowa e DeLeo, 2010; Turlej *et al.*, 2011). O gene *mecA* codifica uma proteína de ligação a penicilina (PBP) alterada, chamada de PBP2a ou PBP2', com baixa afinidade a todos os antibióticos β -lactâmicos, tornando a bactéria resistente a todos os antimicrobianos desta classe (Deurenberg e Stobberingh, 2008; Turlej *et al.*, 2011; Stefani *et al.*, 2012).

Dentre os elementos que fazem parte do SCC*mec*, destacam-se o complexo *mec* (o qual possui o gene *mecA* e seus genes reguladores) e o complexo *ccr* (constituído pelos genes *ccr*, codificantes de recombinases da classe invertase/resolvase, cuja função é integrar ou excisar o SCC*mec* do genoma bacteriano e as regiões que o cercam) (Deurenberg e Stobberingh, 2008; Turlej *et al.*, 2011). A combinação do tipo de complexo *mec* com o tipo de complexo *ccr* define o tipo de SCC*mec*. Atualmente existem 11 tipos deste cassete descritos na literatura, e esta classificação é muito utilizada para fins de tipagem molecular, epidemiologia e estudo de populações microbianas (Shore *et al.*, 2011; Turlej *et al.*, 2011; IWG-SCC, 2012).

2.4 MRSA Hospitalar e Comunitário

MRSA costumava ser um patógeno encontrado exclusivamente em infecções hospitalares ou relacionadas a hospitais, mas em meados dos anos 1990, começaram a surgir casos comunitários de MRSA. Ou seja, indivíduos saudáveis, sem qualquer histórico hospitalar ou fatores de risco para desenvolvimento de infecções por MRSA, estavam adquirindo doenças relacionadas a esse patógeno (Calfee, 2011).

Através de dados epidemiológicos e genéticos, é possível observar diferenças entre isolados causadores de doenças em hospitais e na comunidade (Quadro 2). Desta forma, foi estabelecido que isolados MRSA responsáveis por infecções no ambiente hospitalar são denominados HA-MRSA (*Hospital-associated MRSA*), enquanto os isolados comunitários são denominados CA-MRSA (*Community-associated MRSA*) (Millar *et al.*, 2007; Stefani *et al.*, 2012). Acredita-se que CA-MRSA possua mais fatores de virulência, enquanto HA-MRSA possua mais determinantes de resistência, visto que o primeiro necessita vencer barreiras naturais e o sistema imune de um hospedeiro saudável, enquanto o segundo encontra pacientes mais susceptíveis à infecção (como idosos e imunocomprometidos, por exemplo), mas sofre maior pressão pelas drogas utilizadas nos hospitais (Stefani e Goglio, 2010).

Quadro 2. Diferenças epidemiológicas e genéticas observadas entre HA-MRSA e CA-MRSA.

Fonte: Adaptado de Millar *et al.* (2007), Calfee (2011) e Stefani *et al.* (2012).

Características	HA-MRSA	CA-MRSA
Fatores de risco associados	Histórico de permanência em hospital, uso de antimicrobianos previamente, doença pré-existente, idade avançada e histórico de uso de equipamentos médicos invasivos	Atividades associadas com pouca higiene comunitária (por exemplo, dividir toalhas), lesões por abrasão, contato pele-a-pele e situações de superlotação
Sítio de infecção	Feridas infeccionadas, bacteremia, tratos respiratório e urinário	Principalmente pele e tecidos moles (por exemplo, abscessos e furúnculos), mas em casos graves, choque séptico, bacteremia e pneumonia necrosante
Susceptibilidade a antimicrobianos que não metilina	Raro	Comum
Presença de PVL	Raro	Comum
Tipo de SCCmec associado	I, II, III e VIII	IV, V, VI e VII

CA-MRSA pode ser caracterizado pela presença de SCCmec tipos IV, V, VI e VII e pela presença da PVL (Millar *et al.*, 2007; Stefani e Goglio, 2010). Os critérios para identificação de CA-MRSA pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) são: diagnóstico de infecção por MRSA em paciente ambulatorial sem histórico de internação prévia ou submetido a procedimentos médicos invasivos durante o ano vigente, assim como isolamento de cultura positiva de MRSA em até 48 horas após a admissão do paciente no hospital sem histórico prévio de infecção ou colonização por MRSA (Millar *et al.*, 2007).

HA-MRSA, por sua vez, causa infecções principalmente em idosos, bebês e pacientes imunocomprometidos presentes no ambiente hospitalar. Este patógeno pode ser transmitido de pessoa para pessoa através dos profissionais da saúde, visitantes dos pacientes ou através do uso de equipamentos médicos, como

cateteres, sondas e respiradores mecânicos. Caracteriza-se, principalmente, pela presença de SCCmec tipos I, II, III e VIII, ausência de PVL, e pela pouca ou nenhuma susceptibilidade a outros agentes antimicrobianos. No Brasil, a prevalência de HA-MRSA é de mais de 50% em relação às infecções por *S. aureus* no ambiente hospitalar (Figura 5) (Millar *et al.*, 2007; Stefani e Goglio, 2010; Stefani *et al.*, 2012).

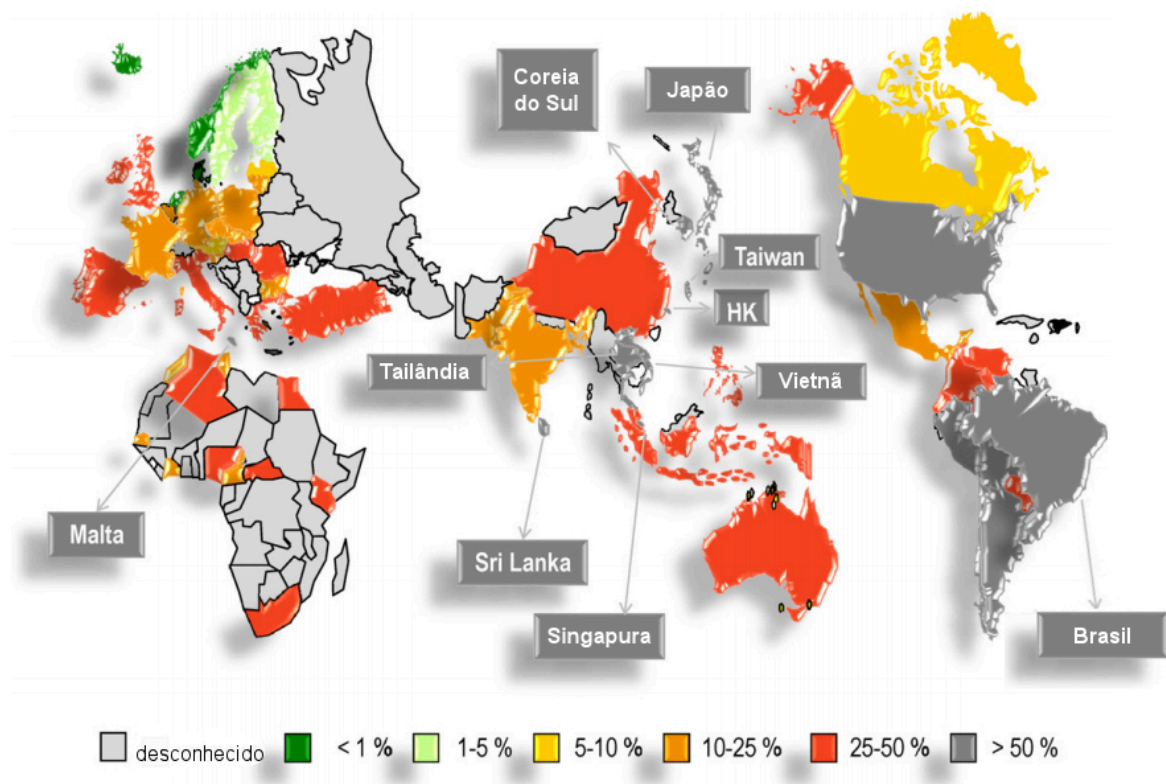


Figura 5. Prevalência de HA-MRSA (*Hospital-associated MRSA*) no mundo. HK = Hong Kong.

Fonte: Adaptado de Stefani *et al.* (2012).

2.5 Clones Epidêmicos de MRSA

Clones bacterianos são células geneticamente idênticas, descendentes de um único ancestral comum. Com o tempo, membros de um clone podem se

diferenciar através de recombinação, mutações ou aquisição e perda de elementos genéticos móveis (Rodríguez-Noriega e Seas, 2010).

Para diferenciação de tais clones, são necessárias ferramentas moleculares capazes de distinguir os isolados entre si, e a esse processo é dado o nome de tipagem molecular. Os métodos mais comumente utilizados são a tipagem do *SCCmec*, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), sequenciamento do gene *spa* e tipagem de sequências multilocus (MLST) (Mehndiratta e Bahlla, 2012; Andrade, 2013).

Existem diversos clones epidêmicos de MRSA (definidos pela combinação de técnicas de tipagem molecular) descritos na literatura, como, por exemplo, o Clone Epidêmico Brasileiro (BEC), Ibérico, Nova Iorque/Japão (NY/J), Pediátrico (PC ou USA800), entre outros (Gordon e Lowy, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Rodríguez-Noriega *et al.*, 2010). No quadro 3, podem ser observadas algumas características de clones MRSA mundialmente difundidos.

Quadro 3. Exemplos de clones MRSA com suas características e dispersão geográfica. Fonte: Adaptado de Enright *et al.* (2002).

Nome do clone	Perfil alélico (MLST)	Tipo de <i>SCCmec</i>	Dispersão geográfica
Nova Iorque/Japão (NY/J)	ST5	II	Finlândia, Irlanda, Reino Unido, Japão, Estados Unidos da América (EUA)
Pediátrico (PC)	ST5	IV	França, Portugal, Reino Unido, EUA
Irlandês	ST8	II	Irlanda, Reino Unido, EUA
EMRSA-15 ou Barnim	ST22	IV	Alemanha, Irlanda, Suécia, Reino Unido
Berlin	ST45	IV	Bélgica, Finlândia, Alemanha, Suécia
Brasileiro (BEC)	ST239	III	Alemanha, Grécia, Polônia, Portugal, Suécia, EUA, Brasil

O BEC é o clone mais observado no Brasil e encontra-se disseminado em vários países no ambiente hospitalar, como Portugal, Argentina, Uruguai, Chile e República Tcheca (Quadro 3) (Gordon e Lowy, 2008; Rodríguez-Noriega *et al.*, 2010). Contudo, diversos outros clones epidêmicos também são observados nos hospitais brasileiros (De Miranda *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2009; Silva-Carvalho *et al.*, 2009; Beltrame *et al.*, 2012; Schuenck *et al.*, 2012). Resultados observados em pesquisas anteriores descrevem a frequente ocorrência de determinados clones internacionais, tais como o BEC, Pediátrico, Nova Iorque/Japão, USA400 e Clone Oceania Sudoeste do Pacífico (OSPC ou SWP) em hospitais brasileiros (Andrade, 2013). A Figura 6 ilustra a distribuição de clones MRSA na América Latina.

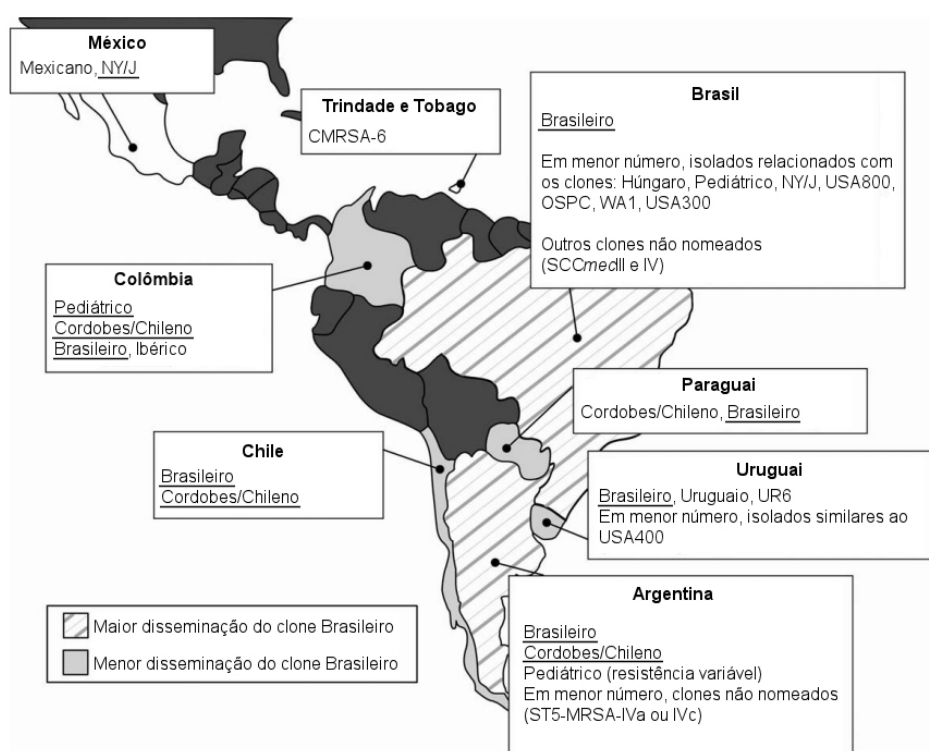


Figura 6. Distribuição de clones MRSA na América Latina. Fonte: Adaptado de Rodríguez-Noriega *et al.*, 2010.

3. Objetivos

3.1 Geral

Determinar o perfil genético de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* relacionados ou não a clones epidêmicos.

3.2 Específicos

- 1.** Investigar fatores de virulência nos *S. aureus* estudados;
- 2.** Estabelecer genótipos de virulência para os isolados de *S. aureus* investigados;
- 3.** Identificar possíveis relações entre o perfil genético de virulência dos isolados de *S. aureus* e suas características genéticas;
- 4.** Analisar, com ênfase nos fatores de virulência, o proteoma e secretoma de dois isolados de *S. aureus* relacionados a dois clones epidêmicos diferentes.

4. Material e Métodos

4.1 Amostras de *S. aureus* estudadas

Foram estudados 89 isolados clínicos de *S. aureus*, nomeados de Sa1 até Sa89, provenientes de diversas fontes de infecção e diferentes setores dos hospitais. Destes, 80 isolados foram cedidos pelo Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE); quatro pelo Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), e cinco pelo Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE). Todos se encontram estocados na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, em glicerol-BHI a 80°C.

Os isolados estudados foram previamente analisados por Andrade (2013), que realizou os seguintes testes de tipagem molecular: sequenciamento do gene *spa*, MLST, tipagem do *SCCmec* e PFGE (Tabela 1). A designação de MRSA foi atribuída aos isolados resistentes à cefoxitina/oxacilina, segundo preconiza o CLSI (2013), e MSSA, aos isolados sensíveis. As características dos *S. aureus* podem ser observadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* estudados e suas características.

S. aureus	Sítio de Infecção	Distribuição no ambiente hospitalar	Hospital	ST	Clone relacionado	CEF/OXA	mecA	ccr	mec	SCCmec
Sa1	Urina	Ambulatório	HC	ST2381	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa2	Secreção Uretral	Ambulatório	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	+	2	-	-
Sa3	Secreção Vaginal	Ambulatório	HC	ST5	NY/J (USA100)	S	+	-	-	-
Sa4	Urina	Ambulatório	HC	NT	-	S	+	2	-	-
Sa5	Urina	Ambulatório	HC	ST5	-	S	-	-	A	-
Sa6	Urina	Ambulatório	HC	ST333	-	S	+	2	-	-
Sa7	Urina	Ambulatório	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa8	Secreção Vaginal	Ambulatório	HC	ST45	-	S	-	-	-	-
Sa9	Esperma	Ambulatório	HC	NT	-	S	+	-	-	-
Sa10	Secreção Uretral	Ambulatório	HC	ST1	-	S	-	-	-	-
Sa11	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST5	-	S	-	-	-	-
Sa12	Urina	Ambulatório	HC	ST1635	PC (USA800)	S	+	2	-	-
Sa13	Urina	Ambulatório	HC	ST5	PC (USA800)	S	-	-	-	-
Sa14	Urina	Ambulatório	HC	ST120	-	S	+	-	-	-
Sa15	Urina	Enfermaria	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	-	-	-
Sa16	Urina	Ambulatório	HC	ST1	USA400	S	+	-	-	-
Sa17	Urina	Ambulatório	HC	ST333	-	S	+	-	-	-
Sa18	Urina	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa19	Urina	Ambulatório	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa20	Sangue	UTI	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa21	Urina	Enfermaria	HC	ST5	-	S	-	-	A	-
Sa22	Urina	Ambulatório	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa23	Urina	Ambulatório	HC	ST5	PC (USA800)	S	-	-	-	-
Sa24	Secreção de Prótese	Enfermaria	HC	ST6	-	S	+	-	-	-
Sa26	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST1	USA400	S	+	-	-	-
Sa27	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	HC	ST1	USA400	S	+	5	-	-
Sa28	Urina	Ambulatório	HC	ST5	PC (USA800)	S	-	-	-	-
Sa29	Urina	Enfermaria	HC	ST1635	PC (USA800)	S	+	-	-	-
Sa30	Fragmento de Tecido	Enfermaria	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV

Cont.

S. aureus	Sítio de Infecção	Distribuição no ambiente hospitalar	Hospital	ST	Clone relacionado	CEF/OXA	mecA	ccr	mec	SCCmec
Sa31	Fragmento Ósseo Tíbia	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa32	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST45	BC (USA600)	S	-	-	-	-
Sa33	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa34	Sangue	Ambulatório	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	+	5	-	-
Sa35	Secreção Ocular	Enfermaria	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	-	-	-
Sa36	Secreção Traqueal	UTI	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa37	Secreção de Úlcera	Enfermaria	HC	ST239	-	S	-	-	-	-
Sa38	Fragmento Ósseo	Enfermaria	HC	ST15	-	S	+	-	-	-
Sa39	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa40	Abscesso da Coxa	Enfermaria	HC	ST5	-	S	+	3	-	-
Sa41	Cultura de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa42	Cultura de Secreção de Cavidade de Tíbia	Enfermaria	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	-	-	-
Sa43	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa44	Cultura de Ferida Operatória	Enfermaria	HC	ST97	USA400	S	-	-	-	-
Sa45	Secreção de Dreno Torácico	Enfermaria	HC	ST398	-	S	+	2	-	-
Sa46	Cultura de Orofaringe	Ambulatório	HC	ST101	-	S	+	5	-	-
Sa47	Ponta de Cateter	UTI	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa48	Secreção de Úlcera	Ambulatório	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa49	Secreção de Orofaringe	Ambulatório	HC	ST97	USA400	S	+	-	-	-
Sa50	Secreção Nasal	Ambulatório	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	+	-	-	-
Sa51	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST1635	PC (USA800)	S	+	5	-	-

Cont.

S. aureus	Sítio de Infecção	Distribuição no ambiente hospitalar	Hospital	ST	Clone relacionado	CEF/OXA	mecA	ccr	mec	SCCmec
Sa52	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST239	-	S	+	-	-	-
Sa53	Fragmento de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa54	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa55	Secreção Traqueal	UTI	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa56	Ponta de Dreno	Enfermaria	HC	ST5	-	S	-	5	-	-
Sa57	Exsudado Purulento do Antebraço	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa58	Fragmento Ósseo de Quadril	Enfermaria	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa59	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa60	Secreção de Ferida (Transplante)	Enfermaria	HC	ST333	-	S	-	-	-	-
Sa61	Ponta de Dreno	Enfermaria	HC	ST2382	-	S	+	2	-	-
Sa62	Secreção de Abscesso Joelho	Enfermaria	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	-	-	-
Sa63	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa64	Coleção Abdominal	Enfermaria	HC	ST2382	-	S	+	5	-	-
Sa65	Orofaringe	Enfermaria	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	-	-	-
Sa66	Secreção Traqueal	UTI	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa67	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa68	Cultura de Secreção de Úlcera	Enfermaria	HC	ST25	-	S	-	-	-	-
Sa69	Tecido Superficial e Profundo	Enfermaria	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa70	Secreção de Axila	Ambulatório	HC	ST30	OSPC (USA1100)	S	+	2	-	-
Sa71	Secreção de Fístula Direita	Ambulatório	HC	ST5	PC (USA800)	S	-	-	-	-

Cont.

S. aureus	Sítio de Infecção	Distribuição no ambiente hospitalar	Hospital	ST	Clone relacionado	CEF/OXA	mecA	ccr	mec	SCCmec
Sa72	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	HC	ST669	USA400	S	-	-	-	-
Sa73	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa74	Secreção de Cateter	Enfermaria	HC	ST718	-	S	+	-	-	-
Sa75	Sangue	Enfermaria	HC	ST718	-	S	-	-	-	-
Sa76	Secreção de Lesão Frontal	Ambulatório	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa77	Secreção Ocular	Enfermaria	HC	ST333	-	S	+	-	-	-
Sa78	Nasoorofaringe	Ambulatório	HC	ST97	-	S	-	-	-	-
Sa79	Ponta de Cateter	Enfermaria	HC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa80	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	HC	ST5	-	S	+	3	-	-
Sa81	Hemocultura	Ambulatório	PROCAPE	ST105	NY/J (USA100)	R	+	2	A	II
Sa82	Secreção Ocular	Enfermaria	HUOC	ST5	PC (USA800)	R	+	2	B	IV
Sa83	Ferida Operatória	Ambulatório	PROCAPE	ST333	-	S	-	-	-	-
Sa84	Secreção Traqueal	Ambulatório	PROCAPE	ST45	-	S	-	-	-	-
Sa85	Hemocultura	Ambulatório	PROCAPE	ST2383	-	S	-	-	-	-
Sa86	Secreção	Enfermaria	HUOC	ST239	BEC	R	+	3	A	III
Sa87	Secreção Traqueal	UTI	HUOC	ST5	PC (USA800)	S	+	3	-	-
Sa88	Hemocultura	Ambulatório	PROCAPE	ST15	-	S	+	-	-	-
Sa89	Lesão	Ambulatório	HUOC	ST285	OSPC (USA1100)	S	-	-	-	-

Legenda: BEC = Clone Epidêmico Brasileiro; BC = Clone Berlim; ccr = tipo de complexo ccr presente no SCCmec; CEF/OXA = Cefoxitina/oxacilina; PC = Clone Pediátrico; HC = Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco; HUOC = Hospital Universitário Osvaldo Cruz da Universidade de Pernambuco; mec = tipo de complexo mec presente no SCCmec; NY/J = Clone Nova Iorque/Japão; OSPC = Clone Oceania Sudoeste do Pacífico; PROCAPE = Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco; R = Resistente; S = Susceptível; UTI = Unidade de Tratamento Intensivo.

4.2. Extração de DNA e investigação dos fatores de virulência

A extração do DNA de *S. aureus* foi realizada através do protocolo modificado do kit Instagene (Bio-Rad), onde a quebra da parede bacteriana foi

realizada através do uso das enzimas Lisozima (10 mg/mL) e Proteinase K (5 mg/mL); e após a utilização do kit citado, é feita uma precipitação do DNA obtido com Isopropanol. O protocolo completo, desenvolvido durante este trabalho, pode ser observado em Anexo 1.

Foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) para investigação de genes dos seguintes fatores de virulência: *clfA* e *clfB* (fatores clumping A e B); *fnbA* e *fnbB* (proteínas de ligação a fibronectina A e B); *cna* (proteína de ligação ao colágeno); *icaA* e *icaD* (proteínas do loco *ica*); *cap5* e *cap8* (polissacarídeos capsulares); *lukF*-PV e *lukS*-PV (leucocidina Panton-Valentine); *seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo* (enterotoxinas). As sequências dos *primers* e as referências bibliográficas correspondentes podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados nas PCRs para investigação dos fatores de virulência.

Gene	<i>Primers</i>	Sequência de <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho do amplicon esperado (pb)	Referência
<i>clfA</i>	CLFA-1	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292	Tristan <i>et al</i> (2003)
	CLFA-2	CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG		
<i>clfB</i>	CLFB-1	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC	205	Tristan <i>et al</i> (2003)
	CLFB-2	TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC		
<i>fnbA</i>	FNBA-F	CTCAATCATATAACGCAACAGT	702	Ote <i>et al</i> . (2011)
	FNBA-R	GTACAGTTTTAGGGTCAATA		
<i>fnbB</i>	FNBB-1	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	524	Tristan <i>et al</i> . (2003)
	FNBB-2	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC		
<i>cna</i>	CNA-1	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	534	Tristan <i>et al</i> (2003)
	CNA-2	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG		
<i>icaA</i>	icaAF	TCAGACACTTGCTGGCGCAGTC	423	Campbell <i>et al</i> (2008)
	icaAR	TCACGATTCTCTCCCTCTCTGCCATT		
<i>icaD</i>	icaDF	AAACGTAAGAGAGGTGG	936	Vasudevan <i>et al</i> (2003)
	icaDR	GGCAATATGATCAAGATAC		
<i>cap5</i>	cap5F	ATGACGATGAGGATAGCG	381	Moore e Lindsay (2001)
	cap5R	CTCGGATAACACCTGTTGC		
<i>cap8</i>	cap8H F	ATCGAAGAACATATCCAAGG	834	Ote <i>et al</i> . (2011)
	cap8H R	TTCATCACCAATACCTTTTA		
PVL	PVL-F	TGCCAGACAATGAATTACCCCATTT	894	Campbell <i>et al</i> (2008)
	PVL-R	TCTGCCATATGGTCCCCAACCA		
<i>seg</i>	SEG-1	ACGTCTCCACCTGTTGAAGG	400	Omoie <i>et al</i> (2002)
	SEG-2	TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG		
<i>sei</i>	SEI-1	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC	454	Rosec e Gigaud (2002)
	SEI-2	ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG		

Cont.

Gene	Primers	Sequência de <i>primers</i> (5'→ 3')	Tamanho do amplicon esperado (pb)	Referência
<i>sem</i>	SEM-1	CTTGTCCTGTTCCAGTATC	329	Chiang <i>et al</i> (2006)
	SEM-2	ATACGGTGGAGTTACATTAG		
<i>sen</i>	SEN-1	ATTGTTCTACATAGCTGCAA	682	Blaiotta <i>et al</i> (2004)
	SEN-2	TTGAAAAAACTCTGCTCCCA		
<i>seo</i>	SEO-1	AGTCAAGTGTAGACCTATT	534	Blaiotta <i>et al</i> (2004)
	SEO-2	TATGCTCCGAATGAGAATGA		

A identificação dos genes *lukS*-PV e *lukF*-PV ocorreu através de uma única PCR utilizando apenas um par de *primers*, o qual compreende uma região equivalente a partes dos genes *lukS*-PV e *lukF*-PV. Desta forma, o produto de PCR obtido nesta reação corresponde a ambos os genes.

Para a investigação dos genes *icaA* e *icaD*, foi desenvolvida uma PCR duplex, a qual apresenta duas etapas de anelamento com temperaturas diferentes (uma etapa a 50°C e outra a 60°C), a fim de anelar os dois pares de *primers* da reação. Foram, então, utilizados os seguintes parâmetros: desnaturação inicial de 95°C por dois minutos; 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, primeiro anelamento (para os primers de *icaD*) à 50°C por um minuto, segundo anelamento (para os primers de *icaA*) à 60°C por um minuto e 30 segundos, e extensão à 72°C por um minuto; seguidos por uma extensão final à 72°C por 10 minutos.

Os genes *clfA* e *cna*, bem como *clfB* e *fnbB*, foram investigados através de duas PCRs multiplex, segundo descrito por Tristan *et al.*, 2003. Foram utilizadas as seguintes condições de PCR: desnaturação inicial de 95°C por dois minutos; 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por um minuto, e extensão à 72°C por um minuto; e uma extensão final à 72°C por 10 minutos.

Para os demais genes investigados, foram realizadas PCRs uniplex. Para amplificação de *cap5*, foram utilizadas as mesmas condições de PCR já descritas para os genes *clfA*, *cna*, *clfB* e *fnbB*. O mesmo aconteceu para a amplificação de PVL, entretanto foi usada a temperatura de anelamento de 52°C. Para *cap8* e *fnbA* foram usadas as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por cinco minutos; 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos (48.4°C para *cap8*, 48.7°C para *fnbA*), extensão à 72°C (por um minuto e 30 segundos para *cap8*, e por um minuto para *fnbA*); extensão final à 72°C por sete minutos.

Para os genes das enterotoxinas, foram utilizados 50 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 30 segundos para anelamento e 72°C por um minuto para extensão, com desnaturação inicial de cinco minutos e extensão final de 10 minutos. Foram utilizadas diferentes temperaturas de anelamento para cada primer (55°C para *seg*, 60°C para *sei*, 52°C para *sen*, e 50°C para *sem* e *seo*).

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% (m/v) corado com SybrSafe (Life Technologies) e visualizados e fotografados em transiluminador ultravioleta. Amostras representativas dos produtos de PCR para cada gene foram purificadas com enzima ExoSAP-IT (Affymetrix) e sequenciados em sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) utilizando o BigDye Kit (Applied Biosystems), no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (NPT/CPqAM), para confirmação dos amplicons obtidos.

4.3. Extração de proteínas totais de proteoma e secretoma

Dois isolados foram selecionados para este estudo (Sa36 e Sa82), relacionados aos clones epidêmicos internacionais (BEC e PC, respectivamente), por apresentarem características genéticas e epidemiológicas distintas.

O protocolo de extração do proteoma e secretoma de *S. aureus* foi desenvolvido para o atual trabalho, e pode ser observado de forma completa no Anexo 2.

Em triplicata, foi realizado pré-inóculo em 5 mL de meio LB dos isolados Sa36 (relacionado ao BEC) e Sa82 (relacionado ao PC). Após o crescimento, foi acrescentado 200 mL do mesmo meio, e este inóculo foi então submetido à agitação 150 rpm por 18 horas.

Para o proteoma, a célula bacteriana foi rompida utilizando *glass beads* (gramatura de 0,1 mm³), evitando-se a utilização de qualquer enzima neste processo. Para o secretoma, entretanto, as proteínas foram obtidas dos 200 mL de meio de cultura.

As proteínas das duas porções protéicas foram precipitadas com ácido tricloroacético e posterior utilização de tampão de SDS saturado com sacarose; fenol; e metanol com acetato de amônio, para limpeza e purificação destas. A ressuspensão foi feita em tampão de reidratação (uréia, tiouréia, chaps, azul de bromofenol). As amostras foram quantificadas pelo 2-D *Quant* kit (GE Healthcare), de acordo com recomendações do fabricante.

4.4 Construção de géis uni e bidimensionais

Os procedimentos para construção dos géis uni e bidimensionais foram realizados no Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP).

As amostras referentes ao proteoma e secretoma foram aplicadas em gel unidimensional (SDS-PAGE - poliacrilamida 12,5%) para verificação da integridade das duas frações protéicas e identificação de peptídeos via espectrometria de massas, utilizando 30 µg de cada amostra.

Os secretomas extraídos foram utilizados para eletroforese bidimensional. Foi realizada focalização isoeletrica de 150 µg de proteínas destes secretomas em sistema de focalização Multiphor II (GE Healthcare), utilizando fitas de gradiente de pH (GE Healthcare) de 11 cm, variando do pH 3 ao 11 não-linear. A segunda dimensão da eletroforese foi conduzida em gel vertical de poliacrilamida 12,5%.

Todos os géis de poliacrilamida (unidimensional e bidimensional) foram corados em *Coomassie Brilliant Blue* coloidal R250.

4.5 Análise dos géis, tripsinização e espectrometria de massas

Os géis bidimensionais foram digitalizados no ImageScanner III (GE Healthcare) com uso do programa LabScan 6.0 (GE Healthcare), e as imagens foram analisadas com o auxílio do software Image Master Platinum v7.05 (GE Healthcare), no LGPP. Para confiabilidade estatística, foram consideradas apenas as correspondências (*matches*) cuja ANOVA foi menor ou igual a 0,05.

Foram selecionadas 32 bandas diferenciais do gel unidimensional para análise por espectrometria de massas. Para tal, foi realizada digestão com tripsina, onde as amostras foram desidratadas em acetonitrila 100%, reduzidas com ditiotretol 10 mM, alquiladas com iodoacetamida 50 mM, lavados com bicarbonato de amônio 100 mM, e novamente desidratadas em acetonitrila 100%, sendo esses últimos dois passos repetidos duas vezes. Com as amostras

desidratadas, as bandas foram incubadas *overnight* em tripsina (20 ng/ μ L) e bicarbonato de amônio 50 mM a 37°C. Em seguida, os peptídeos tripsinizados foram extraídos do gel com tampão TFA (ácido trifluoroacético 5%, acetonitrila 50%) duas vezes, e por fim, secos em centrífuga a vácuo e armazenados a -20°C.

Os peptídeos obtidos foram analisados via espectrometria de massas para identificação presumível em analisador AutoFlex III ToF/ToF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) localizado no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Os espectros de massa dos peptídeos foram submetidos à identificação presumível pelo *software online* MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) utilizando o NCBI como base de dados. A ontologia gênica foi realizada através do *software online* QuickGO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>), com base de dados UniProt, e a relação dos peptídios obtidos com os genes presentes no genoma de *S. aureus* foi realizada utilizando a ferramenta online *tblastn* do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. Resultados

5.1 Investigação molecular de fatores de virulência

Todos os *S. aureus* estudados apresentaram no mínimo 08 e no máximo 15 dos genes investigados, sendo que os mais frequentes foram *icaA*, *icaD* e *clfA* (89 isolados, correspondente a 100%), seguidos por *seg* (88/89, 98,8%); *clfB* e *fnbA* (86/89, 96,6%); *sem* (81/89, 91%); *seo* (80/89, 89,8%); *sen* (78/89, 87,6%); *sei* (73/89, 82%); *cap8* (65/89, 73%); *fnbB* (57/89, 64%); PVL (55/89, 61,8%); *cap5* (44/89, 49,4%); e por fim, *cna* (41/89, 47,1%) (Figuras 7 e 8).

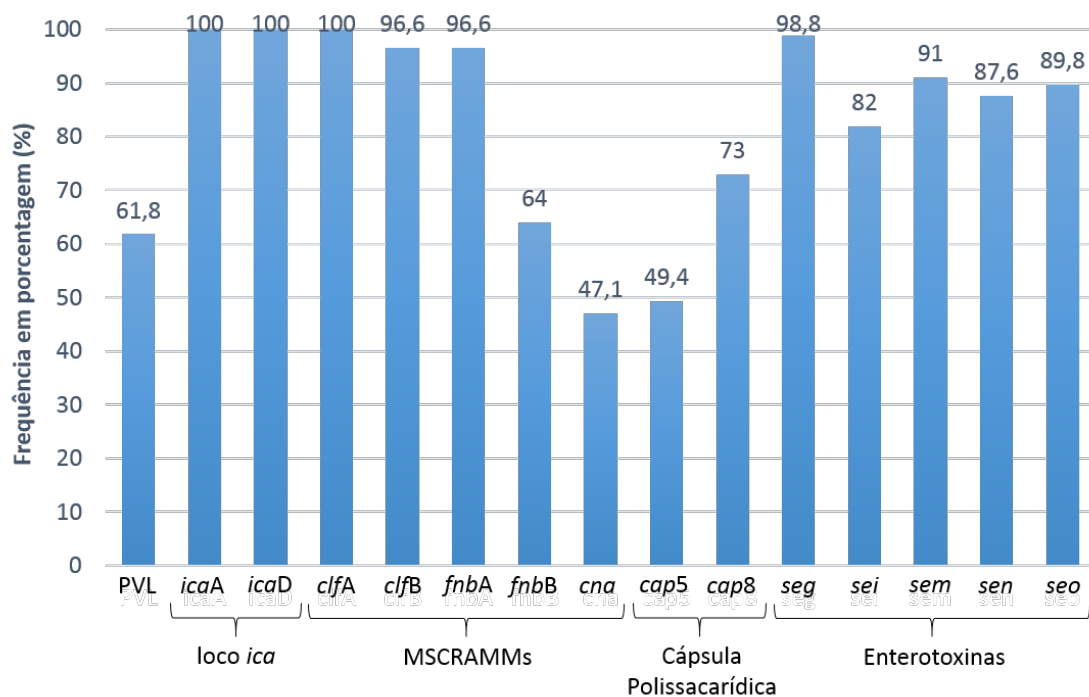


Figura 7. Frequências dos fatores de virulência encontradas nos *S. aureus* estudados.

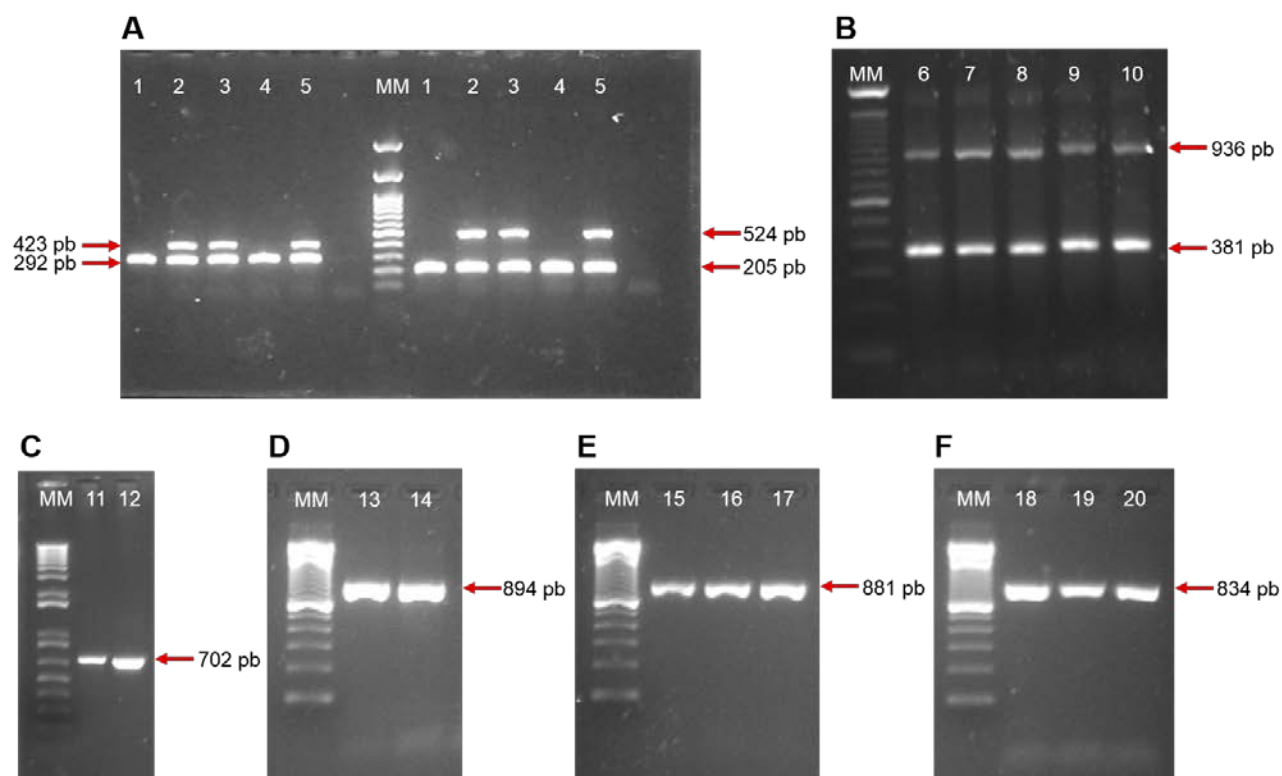


Figura 8. Géis representativos dos produtos de PCR: A) *clfA* (292 pb) e *cna* (423 pb) do lado esquerdo da foto; *clfB* (205 pb) e *fnbB* (524 pb) do lado direito; B) *icaA* (936 pb) e *icaD* (381 pb); C) *fnbA* (702 pb); D) PVL (894 pb); E) *cap5* (881 pb); e F) *cap8* (834 pb). MM – Marcador de peso molecular; Colunas 1, 2, 3, 4 e 5 – Sa51, Sa52, Sa53, Sa54 e Sa55; Colunas 6, 7, 8, 9 e 10 – Sa41, Sa42, Sa43, Sa44 e Sa45; Colunas 11 e 12 – MRSA 4673 (controle positivo) e Sa66; Colunas 13 e 14 – Sa2 e Sa89; Colunas 15, 16 e 17 – Sa1, Sa58 e Sa79; Colunas 18, 19 e 20 – Sa66, Sa67 e Sa70.

Agrupando-se os genes investigados, puderam ser observados 39 genótipos distintos (Tabela 3).

Tabela 3. Genótipos de virulência encontrados nos *Staphylococcus aureus* estudados.

Genótipos	Quantidade de Isolados	Frequência (%)
1. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	10	11,24
2. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	9	10,11
3. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	4	4,49
4. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	4	4,49
5. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i> incompleto	4	4,49
6. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cna</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	4	4,49
7. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	4	4,49
8. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i>	3	3,37
9. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i> incompleto	3	3,37
10. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cna</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i> incompleto	3	3,37
11. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	3	3,37
12. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i>	2	2,25
13. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cna</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	2	2,25
14. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i> incompleto	2	2,25
15. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i> incompleto	2	2,25
16. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	2	2,25
17. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i> incompleto	2	2,25
18. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i> incompleto	2	2,25
19. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	2	2,25
20. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfA</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	2	2,25
21. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i>	2	2,25
22. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>egc</i>	1	1,12
23. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i>	1	1,12
24. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	1	1,12
25. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	1	1,12
26. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i> incompleto	1	1,12
27. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i> incompleto	1	1,12
28. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>egc</i> incompleto	1	1,12
29. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i> incompleto	1	1,12
30. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i> incompleto	1	1,12
31. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbB</i> + <i>egc</i> incompleto	1	1,12
32. <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i> incompleto	1	1,12
33. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>egc</i>	1	1,12
34. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>egc</i>	1	1,12
35. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbA</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i>	1	1,12
36. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>egc</i> incompleto	1	1,12
37. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i>	1	1,12
38. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfAB</i> + <i>fnbB</i> + <i>cna</i> + <i>cap5</i> + <i>egc</i>	1	1,12
39. PVL + <i>icaAD</i> + <i>clfA</i> + <i>fnbAB</i> + <i>cna</i> + <i>cap5</i> + <i>cap8</i> + <i>egc</i>	1	1,12

Legenda: *egc*, aos cinco genes que compõem este *cluster* em conjunto; *egc* incompleto, quando no mínimo um dos genes do *cluster* está presente.

Considerando-se apenas os 31 isolados clínicos MRSA no presente estudo, pode-se observar que 21 (67,7%) foram positivos para PVL; 31 (100%) para genes do loco *ica* e *clfA*; 29 (93,5%) para *clfB*; 30 (96,7%) para *fnbA*; 23 (74,1%); para *fnbB*; 19 (61,3%) para *cna*, 18 (58%) para *cap5*; 23 (74,1%) para *cap8*; 30 (96,7%) para *seg*; 24 (77,4%) para *sei*; 29 (93,5%) para *sem*; 28 (90,3%) para *sen* e *seo* (Figura 9).

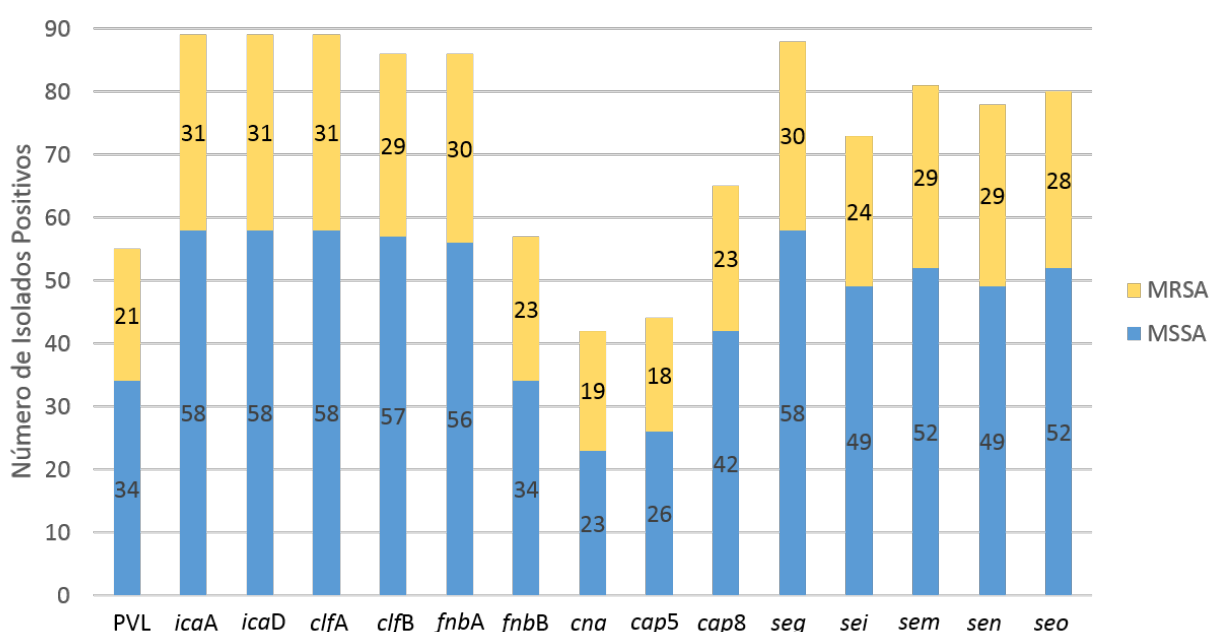


Figura 9. Número de isolados MRSA e MSSA positivos para cada fator de virulência investigado.

De maneira geral, todos os isolados clínicos estudados mostraram um perfil de virulência bastante diverso, sejam eles sensíveis ou resistentes (Tabela 4). Nenhum dos isolados MSSA ou MRSA relacionados a algum clone epidêmico apresentou um genótipo específico.

Entre os 19 resistentes que apresentavam SCCmec do tipo III e foram relacionados ao Clone Epidêmico Brasileiro (BEC), 13 foram positivos para a

leucocidina Pantón-Valentine, enquanto que entre os 11 *S. aureus* relacionados ao clone pediátrico (PC) que possuíam SCCmec tipo IV, sete foram positivos para PVL. Todos os isolados MSSA relacionados ao Clone Oceania Sudoeste do Pacífico (OSPC), que não possuíam o gene *mec*, mostraram-se positivos para PVL (Tabela 4).

Em relação aos MSCRAMMs, entre os MSSA, apenas Sa32 (BC/Clone Berlim) mostrou-se negativo para *clfB*, e Sa29 (PC/Clone Pediátrico) e Sa77 não comportaram o gene *fnbA*. Foi observado que todos os MRSA deste estudo apresentaram-se positivos para *clfA*, *clfB* e *fnbA* (com exceção de Sa31 e Sa36, ambos BEC, negativos para *clfB*, e Sa63, também BEC e negativo para *fnbA*). Todos os MRSA relacionados ao BEC, também comportaram o fator *fnbB*. Entretanto, dos 11 MRSA relacionados ao PC, apenas quatro comportaram este gene. O único MRSA relacionado ao clone Nova Iorque/Japão também não apresentou *fnbB*.

Apenas 23 de 58 MSSA (39,6% destes) foram positivos para *cna*, incluindo seis de 10 relacionados ao OSPC e três de seis relacionados ao USA400. Entre os 19 MRSA relacionados ao BEC, 15 foram positivos para *cna*; e entre os 11 relacionados ao PC, apenas quatro. O MRSA relacionado ao Clone Nova Iorque/Japão mostrou-se negativo para *fnbB* e *cna* (Tabela 4).

Em relação à cápsula polissacarídica, foram observados quatro genótipos diferentes: 18 isolados (20,2%) foram positivos para *cap5*; 39 (43,8%), positivos para *cap8*; 6 (6,7%) apresentaram-se negativos para ambos os genes; e 26 (29,5%) mostraram-se positivos para os dois tipos de cápsula. Mais uma vez restringindo os resultados aos isolados MRSA, 9 dos 19 (47,4%) isolados relacionados ao BEC mostraram-se positivos para *cap5* e 17 (89,5%), para *cap8*,

sendo que 7 (36,8%) isolados apresentam os dois genes concomitantemente. Por sua vez, 9 dos 11 (81,8%) isolados MRSA relacionados ao PC possuem *cap5*, 5 (45,4%) possuem *cap8*, e 4 (36,4%) mostraram-se positivos para os dois genes. O isolado relacionado ao NY/J apresentou-se positivo apenas para *cap8*. Quanto aos isolados sensíveis, 26 (44,8% dos MSSA) mostraram-se positivos para *cap5*, 42 (72,4%) para *cap8*, porém 15 (25,8%) apresentaram ambos os alelos.

Dos 41 isolados que carregam o gene *cna*, todos foram encontrados concomitantes a um ou mais alelos da cápsula polissacarídica, sendo que 16 (39%) *S. aureus* entre os 41 apresentavam os dois alelos; 21 (51,2%), apenas *cap8*; e 4 (9,7%), apenas a *cap5* (Tabela 4).

O *cluster egc* é geralmente constituído pelos cinco genes aqui investigados mais dois pseudogenes nomeados ϕ ent1 e ϕ ent2. Visto que estes pseudogenes não foram investigados, o termo “*cluster egc* completo” será utilizado para designar o *cluster egc* composto pelos cinco principais genes que o compõem. Dos 89 isolados de *S. aureus* estudados, 63 (70,9%) isolados, sendo 41 MSSA e 22 MRSA, comportam o *egc* completo. Todos os 10 MSSA relacionados ao OSPC, três dos seis relacionados ao USA400 (os mesmos três acima citados como positivos para *cna*) e o único isolado relacionado ao BC estão entre os MSSA que possuem o *egc* completo.

Os 19 *S. aureus* relacionados ao BEC possuíram no mínimo dois genes enterotoxigênicos, e 12 isolados possuíram os cinco genes. Dos isolados relacionados com o Clone Pediátrico (USA800), nove comportaram todos os genes do *cluster egc*, exceto os isolados Sa1 (positivo para os genes *seg* e *seo*) e Sa76 (negativo apenas para o gene *seo*). O isolado MRSA relacionado ao clone Nova Iorque/Japão também comporta o *cluster* completo (Tabela 4).

Vários produtos de PCR de alguns dos genes foram sequenciados para confirmação das amplificações ou utilização como controle positivo nas reações, e todos foram corretamente identificados, quando comparadas às sequências do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLAST. Ao total, foram sequenciados 16 isolados para PVL, seis para *icaA*, 13 para *icaD*, um para *fnbA*, 13 para *fnbB* e 14 para *cna*.

Interessantemente, os três isolados relacionados ao BEC (Sa18, Sa19 e Sa20) que foram sequenciados para o gene *icaD*, apresentavam quatro polimorfismos iguais, quando alinhados, utilizando o software MEGA (v. 6.06), frente às sequências das cepas de referência COL, Mu50, N315 e Newman (obtidas no banco de dados NCBI), e um polimorfismo que diferenciava apenas as cepas COL e Newman. Quando uma cepa sequenciada BEC foi adicionada ao alinhamento, para verificar se tais polimorfismos poderiam ser artefatos do sequenciamento, os mesmos foram encontrados. Foram eles: sítio 51 (T → C); sítio 55 (G → A); sítio 84 (T → G, polimorfismo também presente nas cepas COL e Newman); sítio 252 (A → T); e sítio 290 (G → A) (Figura 10).

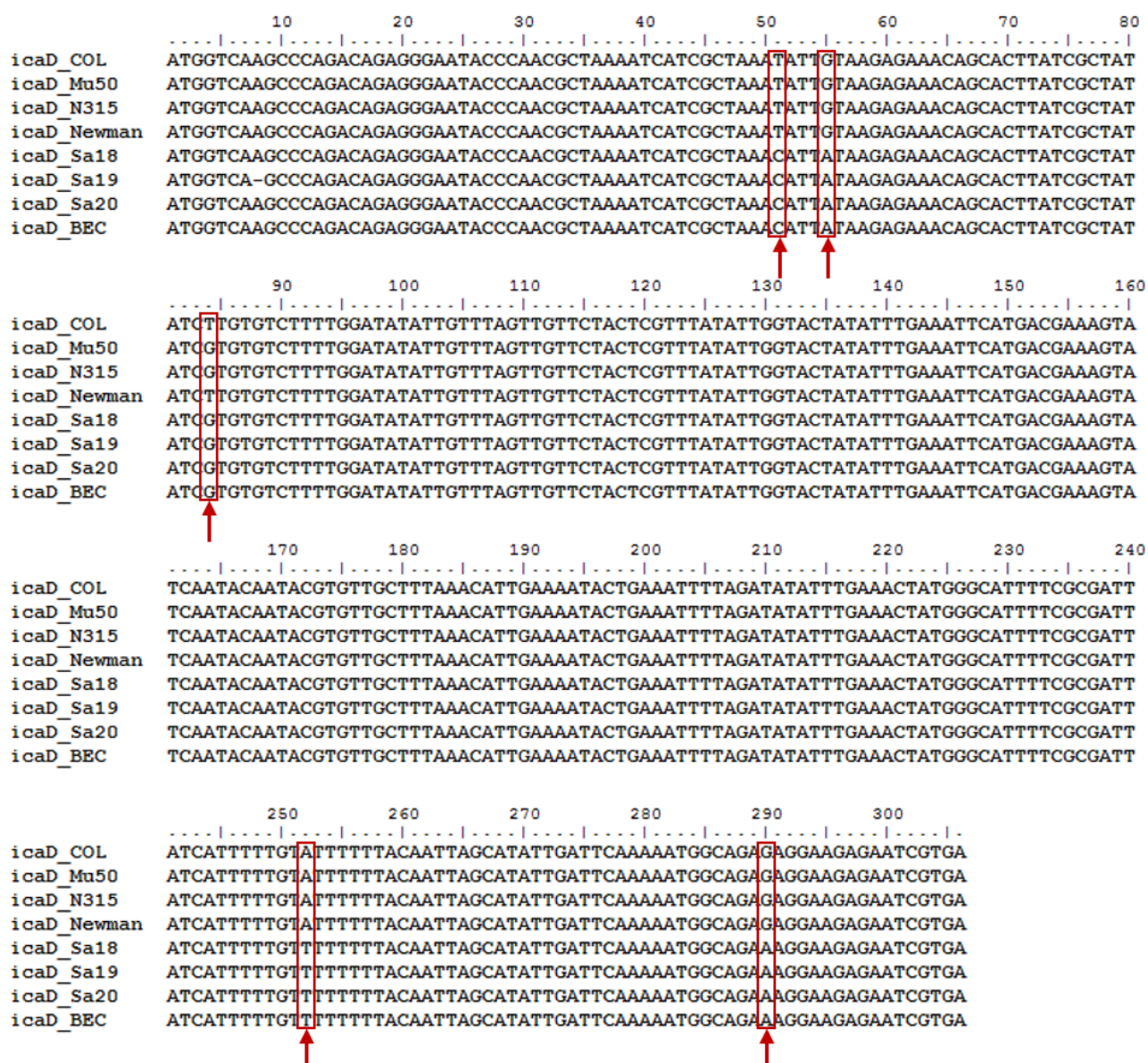


Figura 10. Alinhamento das sequências de DNA do gene *icaD* para as cepas de referência COL, Mu50, N315, Newman e BEC, e para os isolados Sa18, Sa19 e Sa20. Em destaque, polimorfismos de base única (SNPs) exclusivos dos isolados relacionados ao BEC. Imagem do alinhamento gerada pelo programa BioEdit.

A PCR realizada para *icaD* gerou um produto de PCR que compreende o ATG inicial e um TGA final. Realizando uma tradução *in silico*, também através do programa MEGA (v. 6.06), foi possível observar que os três isolados clínicos relacionados ao BEC e a sequência de referência do BEC possuíam duas trocas

de aminoácidos, ambas para aminoácidos com as mesmas propriedades, uma na posição 19 (valina → isoleucina) e outra na posição 97 (arginina → lisina) (Figura 11).

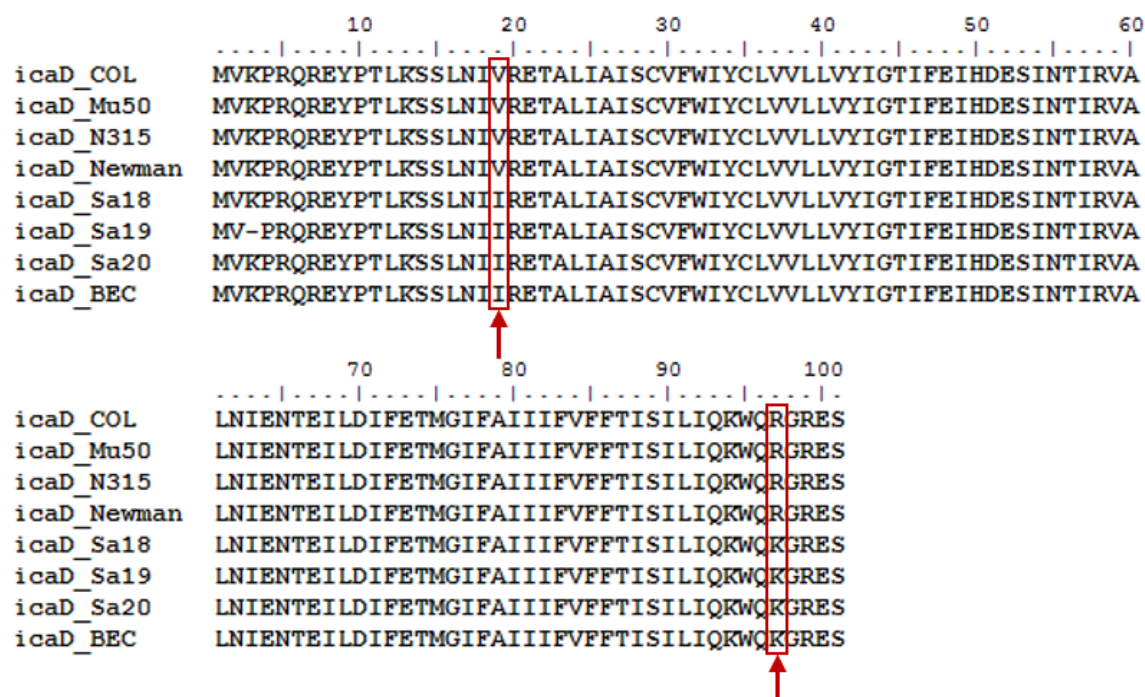


Figura 11. Alinhamento das sequências de proteínas obtidas através de tradução *in silico* para as cepas de referência COL, Mu50, N315, Newman e BEC, e para os isolados Sa18, Sa19 e Sa20. Em destaque, aminoácidos alterados exclusivamente nos isolados relacionados ao BEC. Imagem do alinhamento gerada pelo programa BioEdit.

As principais características dos *S. aureus* estudados e os resultados obtidos para presença ou ausência dos fatores de virulência pesquisados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Investigação de fatores de virulência nos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* estudados.

S. aureus	Distribuição no ambiente hospitalar	MLST	clone relacionado	CEF/OXA	SCCmec	PVL	icaA	icaD	clfA	clfB	fnbA	fnbB	cna	cap5	cap8	egc
Sa1	Ambulatório	ST2381	PC (USA800)	R	IV	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>seg + seo</i>
Sa2	Ambulatório	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>egc</i>
Sa3	Ambulatório	ST5	NY/J (USA100)	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>seg + seo</i>
Sa4	Ambulatório	NT	-	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>seg + seo</i>
Sa5	Ambulatório	ST5	-	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>egc</i>
Sa6	Ambulatório	ST333	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>egc</i>
Sa7	Ambulatório	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>egc</i>
Sa8	Ambulatório	ST45	-	S	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>egc</i>
Sa9	Ambulatório	NT	-	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>seg + sei + sem + seo</i>
Sa10	Ambulatório	ST1	-	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>egc</i>
Sa11	Enfermaria	ST5	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>egc</i>
Sa12	Ambulatório	ST1635	PC (USA800)	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>egc</i>
Sa13	Ambulatório	ST5	PC (USA800)	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>egc</i>
Sa14	Ambulatório	ST120	-	S	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>egc</i>
Sa15	Enfermaria	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>egc</i>
Sa16	Ambulatório	ST1	USA400	S	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>egc</i>
Sa17	Ambulatório	ST333	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>egc</i>
Sa18	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>egc</i>
Sa19	Ambulatório	ST239	BEC	R	III	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>seg + sem + sen + seo</i>
Sa20	UTI	ST239	BEC	R	III	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>sem + sen + seo</i>

Cont.

S. aureus	Distribuição no ambiente hospitalar	MLST	clone relacionado	CEF/OXA	SCCmec	PVL	icaA	icaD	clfA	clfB	fnbA	fnbB	cna	cap5	cap8	egc
Sa21	Enfermaria	ST5	-	S	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	egc
Sa22	Ambulatório	ST239	BEC	R	III	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	seg + sem + sen + seo
Sa23	Ambulatório	ST5	PC (USA800)	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	egc
Sa24	Enfermaria	ST6	-	S	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	egc
Sa25	Ambulatório	ST1	-	S	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	egc
Sa26	Enfermaria	ST1	USA400	S	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	seg + sem + sen + seo
Sa27	Ambulatório	ST1	USA400	S	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	seg + sem + sen + seo
Sa28	Ambulatório	ST5	PC (USA800)	S	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	seg + sei + sen
Sa29	Enfermaria	ST1635	PC (USA800)	S	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	egc
Sa30	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	egc
Sa31	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	egc
Sa32	Enfermaria	ST45	BC (USA600)	S	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	egc
Sa33	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	egc
Sa34	Ambulatório	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	egc
Sa35	Enfermaria	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	egc
Sa36	UTI	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	egc
Sa37	Enfermaria	ST239	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa38	Enfermaria	ST15	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	seg + sem + sen + seo
Sa39	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa40	Enfermaria	ST5	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa41	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	egc

Cont.

S. aureus	Distribuição no ambiente hospitalar	MLST	clone relacionado	CEF/OXA	SCCmec	PVL	icaA	icaD	clfA	clfB	fnbA	fnbB	cna	cap5	cap8	egc
Sa42	Enfermaria	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc
Sa43	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa44	Enfermaria	ST97	USA400	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa45	Enfermaria	ST398	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa46	Ambulatório	ST101	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	egc
Sa47	UTI	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc
Sa48	Ambulatório	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc
Sa49	Ambulatório	ST97	USA400	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa50	Ambulatório	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc
Sa51	Enfermaria	ST1635	PC (USA800)	S	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	seg + sei + sem + sen
Sa52	Enfermaria	ST239	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	seg + sei + sem + sen
Sa53	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc
Sa54	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	egc
Sa55	UTI	ST239	BEC	R	III	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	seg + sei + sem + sen
Sa56	Enfermaria	ST5	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	egc
Sa57	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	seg + sem + sen
Sa58	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	egc
Sa59	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	egc
Sa60	Enfermaria	ST333	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	seg + sei + sem + seo
Sa61	Enfermaria	ST2382	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	seg + sen + seo
Sa62	Enfermaria	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc

Cont.

S. aureus	Distribuição no ambiente hospitalar	MLST	clone relacionado	CEF/OXA	SCCmec	PVL	icaA	icaD	clfA	clfB	fnbA	fnbB	cna	cap5	cap8	egc
Sa63	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	egc
Sa64	Enfermaria	ST2382	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc
Sa65	Enfermaria	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc
Sa66	UTI	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	egc
Sa67	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa68	Enfermaria	ST25	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa69	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	egc
Sa70	Ambulatório	ST30	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	egc
Sa71	Ambulatório	ST5	PC (USA800)	S	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	egc
Sa72	Enfermaria	ST669	USA400	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	seg + sem + seo
Sa73	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	seg + seo
Sa74	Enfermaria	ST718	-	S	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	seg + seo
Sa75	Enfermaria	ST718	-	S	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	seg + seo
Sa76	Ambulatório	ST5	PC (USA800)	R	IV	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	seg + sei + sem + sen
Sa77	Enfermaria	ST333	-	S	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	seg + sei + sem
Sa78	Ambulatório	ST97	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	seg + sei + sem
Sa79	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	egc
Sa80	Ambulatório	ST5	-	S	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	seg + sei + sem + sen
Sa81	Ambulatório	ST105	NY/J (USA100)	R	II	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	egc
Sa82	Enfermaria	ST5	PC (USA800)	R	IV	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	egc
Sa83	Ambulatório	ST333	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	egc

Cont.

S. <i>aureus</i>	Distribuição no ambiente hospitalar	MLST	clone relacionado	CEF/OXA	SCCmec	PVL	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>cna</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>egc</i>
Sa84	Ambulatório	ST45	-	S	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>egc</i>
Sa85	Ambulatório	ST2383	-	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>egc</i>
Sa86	Enfermaria	ST239	BEC	R	III	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>seg + sem + sen + seo</i>
Sa87	UTI	ST5	PC (USA800)	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>egc</i>
Sa88	Ambulatório	ST15	-	S	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>egc</i>
Sa89	Ambulatório	ST285	OSPC (USA1100)	S	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>egc</i>

Legenda: + = positivo para o gene; - = negativo para o gene; BEC = Clone Epidêmico Brasileiro; BC = Clone Berlim; CEF/OXA = Cefoxitina/oxacilina; *egc* = *cluster* gênico de enterotoxinas; MLST = Tipagem de sequências multilocus; NT = não-tipável; NY/J = Clone Nova Iorque/Japão; OSPC = Clone Oceania Sudoeste do Pacífico; PC = Clone Pediátrico; R = Resistente; S = Susceptível; SCCmec = cassete cromossômico estafilocócico *mec*; UTI = Unidade de Tratamento Intensivo.

5.2 Análise do proteoma e secretoma de dois isolados de *Staphylococcus aureus*

Foram analisadas proteínas solúveis de *S. aureus*, com o intuito de observar o padrão de expressão protéica de dois isolados relacionados a clones diferentes. Para tal, foram utilizados os isolados Sa36 e Sa82 (Tabela 5).

Tabela 5. Características epidemiológicas e genéticas dos isolados de *Staphylococcus aureus* Sa36 e Sa82.

<i>S. aureus</i>	Sítio de Infecção	Distribuição no ambiente hospitalar	Clone relacionado	Tipo de SCCmec	Genes encontrados em estudos anteriores	Genes encontrados no presente estudo
Sa36	Secreção Traqueal	UTI	BEC	III	-	PVL, <i>icaAD</i> , <i>clfA</i> , <i>fnbAB</i> , <i>cna</i> , <i>cap5</i> , <i>cap8</i> e <i>egc</i> completo
Sa82	Secreção ocular	Enfermaria	PC	IV	<i>tst</i>	PVL, <i>icaAD</i> , <i>clfAB</i> , <i>fnbA</i> , <i>cna</i> , <i>cap8</i> e <i>egc</i> completo

A Figura 12 mostra o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (12,5%), realizado para análise da integridade protéica e visualização de possíveis bandas diferenciais.

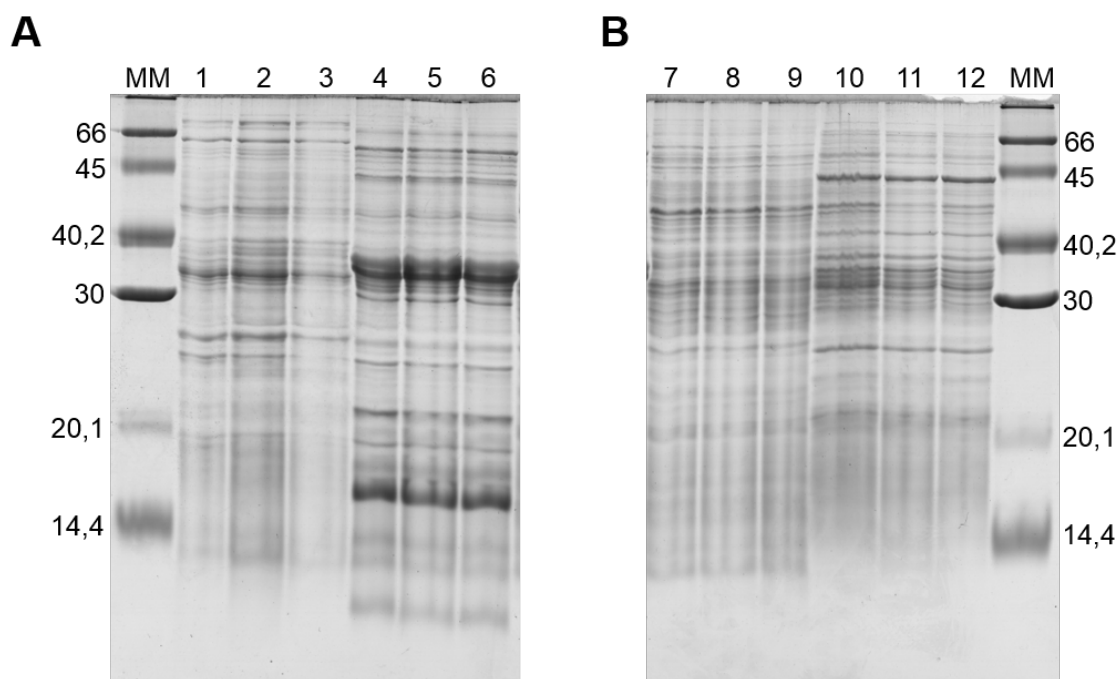


Figura 12. Proteínas totais de *Staphylococcus aureus* em gel SDS-PAGE (12,5% acrilamida). MM – Marcador de baixo peso molecular (em kDa); A) Colunas 1, 2 e 3 – triplicatas do proteoma de Sa36/BEC; Colunas 4, 5 e 6 – triplicatas do proteoma de Sa82/PC; B) Colunas 7, 8 e 9 – triplicatas do secretoma de Sa36/BEC; e Colunas 10, 11 e 12 – triplicatas do secretoma de Sa82/PC.

Quando comparadas as amostras entre si (proteoma de Sa36 com proteoma de Sa82, e secretoma de Sa36 com secretoma de Sa82), foram identificadas seis bandas diferenciais no proteoma de Sa36, 11 no proteoma de Sa82, seis no secretoma de Sa36, e 9 no secretoma de Sa82 (Figura 13). Este total de 32 bandas foram excisadas do gel e analisadas através de espectrometria de massa, para anotação presumível da identidade dos peptídeos obtidos (Tabela 6).

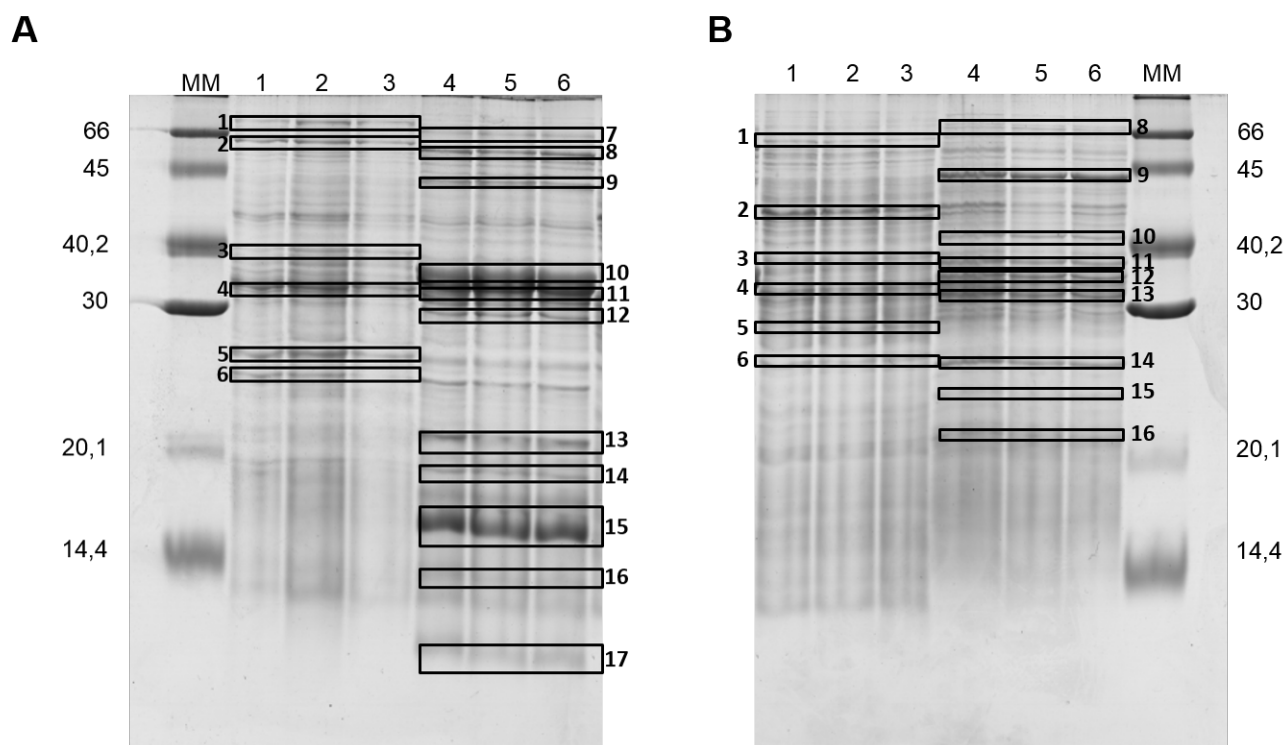


Figura 13. Esquema de corte das bandas de gel SDS-PAGE (12,5% acrilamida) de proteínas totais de *S. aureus*. A) proteoma e B) secretoma totais de *S. aureus* em SDS-PAGE (12,5% acrilamida). MM – Marcador de baixo peso molecular em kDa; A) Colunas 1, 2 e 3 – triplicatas do proteoma de Sa36/BEC; Colunas 4, 5 e 6 – triplicatas do proteoma de Sa82/PC; B) Colunas 1, 2 e 3 – triplicatas do secretoma de Sa36/BEC; Colunas 4, 5 e 6 – triplicatas do secretoma de Sa82/PC.

Tabela 6. Anotação presumível dos peptídeos obtidos a partir de bandas diferenciais do gel SDS-PAGE do proteoma e secretoma de *Staphylococcus aureus*.

Proteoma de Sa36								
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Acesso à Referência	Peptídeo de Maior Massa Predito	Score	e-value	Match	Espécie	Observação
Proteoma 1	bis(5'-nucleosil)-tetrafosfatase	gi 727748184	K.DSNVLTTTGVIKDADNMTLDSGFYK.T	111	6,3e-05	18	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 2	Lipase	gi 686366614	K.QVNMGNSQEDTVTAQSIGDQQTRE	213	4e-15	28	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 3	Glutamil endopeptidase	gi 600331719	K.GEAMQYDLSTTGGNSGSPVFNEK.N	102	0,0005	13	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 4	α -hemolisina	gi 446780219	K.ASSLLSSGFSPDFATVITMDRK.A	223	4e-16	24	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 5	Não identificado							
Proteoma 6	Serino-protease	gi 686395898	K.IINYPGKEDVSVIQVEER.A	110	7,9e-05	9	<i>S. aureus</i>	
Proteoma de Sa82								
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Acesso à Referência	Peptídeo de Maior Massa Predito	Score	e-value	Match	Espécie	Observação
Proteoma 7	Adesina	gi 658429511	R.NLTQTNTSDDKVATITSGNK.S	83	0,043	8	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 8	Lipase	gi 446764776	R.ENDGLVSVISSQHPFNQAYTNATDK.I	113	4e-05	16	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 9	Aldeído-desidrogenase	gi 657610022	K.YTGEALGAIREATAAEVDLAVAAAER.S	84	0,029	10	<i>Alicyclobacillus macrosporangiidus</i>	Família: Alicyclobacillaceae
Proteoma 10	Fator de alongamento Ts	gi 727720154	R.IGVLTVVEGSTDEEAARDIAMHIAAINPK.Y	85	0,023	10	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 11	Cisteíno-protease	gi 686444274	K.NTVTPTKVEENEAIQEDQVQYENTLK.N	88	0,011	12	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 12	Glicerofosforil diester fosfodiesterase	gi 126031711	-.EQTNQIANKPQAIQWHTNLTNER.F	210	7,9e-15	19	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 13	Nuclease - Cadeia A	gi 15826767	K.VAYVYKPNNTHEQLLRK.S	130	7,9e-07	17	<i>S. aureus</i>	
	Regulador transcricional	gi 516407888	R.YIEINQLNAGDKLPSEER.E	103	0,0004	12	<i>Oceanobacillus kimchii</i>	Família: Bacillaceae
Proteoma 14	Não identificado							
Proteoma 15	β -lactamase	gi 686439691	K.QIDLTKENVYDDFNK.K	99	0,0011	11	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 16	Proteína hipotética	gi 446692350	K.DSYTANLFDSNSIKQININVK.T	87	0,016	8	<i>S. aureus</i>	
Proteoma 17	Proteína hipotética	gi 504331771	R.GGEADSSPLRAASPMVSGMGGFK.E	82	0,048	5	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Classe: Clostridia

Cont.

Secretoma de Sa36								
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Acesso à Referência	Peptídeo de Maior Massa Preditado	Score	e-value	Match	Espécie	Observação
Secretoma 1	Fator de alongamento P	gi 487703990	R.VLDGAVTVLDAQSGVEPQTETVWR.Q	89	0,01	16	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 2	Fator de alongamento Tu	gi 658782539	K.NMITGAAQMDGGILVVSAAADGMPQTR.E	209	1e-14	26	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 3	Proteína de gancho flagelar	gi 489818000	K.AFFAIQPESLGKVEVLLK.K	87	0,017	12	<i>Listeria monocytogenes</i>	Família: Listeriaceae
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gi 686445204	K.VAAWYDNEMSYTAQLVR.T	83	0,043	12	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 4	α-hemolisina	gi 340707548	K.ASSLLSSGFSPDFATVITMDRK.A	122	5e-06	17	<i>S. aureus</i>	
	Subunidade β do componente E1 de piruvato desidrogenase	gi 486363730	R.SPFGGGVHTPELHADNLEGILAQSPGLK.V	109	0,0001	15	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 5	6-fosfofructoquinase	gi 548303546	K.IGVLTSGGDAPGMNAAIRAVVR.T	94	0,0031	7	<i>Ruminococcus sp.</i>	Ordem: Clostridia
Secretoma 6	Tagatose-6-fosfato quinase	gi 496178033	K.LNIYEMVVALGRVSAVFVSK.D	99	0,0011	9	<i>Peptoniphilus duerdenii</i>	Ordem: Clostridia
Secretoma de Sa82								
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Acesso à Referência	Peptídeo de Maior Massa Preditado	Score	e-value	Match	Espécie	Observação
Secretoma 8	Manosil-glicoproteína endo-β-N-acetilglicosamidase	gi 656012059	R.FINVEIVHTHDYASFAR.S	112	5e-05	18	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 9	Família protéica N-acetilmuramoil-L-alanina amidase	gi 659949003	K.AYLVDTAKPTPTPKPSTPTTNNK.L	130	7,9e-07	18	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 10	Manosil-glicoproteína endo-β-N-acetilglicosamidase	gi 446997264	R.WNPAHPGTHQYATDVDWANINAK.I	147	1,6e-08	24	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 11	Succinil-diaminopimelato desuccinilase	gi 686300697	R.IATVENPELSFASKYR.Y	160	7,9e-10	21	<i>S. aureus</i>	
	Fator de alongamento Ts	gi 446123531	K.GNDAVIVEINSETDFVAR.N	93	4e-03	15	<i>S. aureus</i>	

Cont.

Secretoma de Sa82								
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Acesso à Referência	Peptídeo de Maior Massa Predito	Score	e-value	Match	Espécie	Observação
Secretoma 12	Gama-hemolisina – Subunidade B	gi 686154383	R.WPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPK.N	137	1,6e-07	17	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 13	Proteína hipotética	gi 681105049	R.VKITIQTTPPGYELK.N	89	9,5e-03	7	<i>Peptoniphilus sp.</i>	Ordem: Clostridia
Secretoma 14	Não identificado							
Secretoma 15	Proteína geral de stress	gi 686194877	R.KDLSNAGAHVVDESVVVDNNIVTSR.V	90	8,3e-03	6	<i>S. aureus</i>	
Secretoma 16	Proteína L6 ribossomal 50S	gi 686171343	K.EQVGALASNIRSVRPPEPYK.G	97	1,5e-03	7	<i>S. aureus</i>	
	succinil-diaminopimelato desuccinilase	gi 686434492	K.NNNWHVHWSVIANDLK.Y	96	2,1e-03	10	<i>S. aureus</i>	

Comparando-se os proteomas das cepas analisadas, os peptídeos anotados bis(5'-nucleosil)-tetrafosfatase, glutamil endopeptidase, α -hemolisina e serino protease foram exclusivos de Sa36/BEC; enquanto os peptídeos adesina (correspondente à Cna), aldeído-desidrogenase, o fator de alongamento Ts, cisteíno protease, glicerofosfodiester diesterase, nuclease, um regulador transcricional, β lactamase (enzima responsável pela resistência à antibióticos β lactâmicos), e duas proteínas hipotéticas foram exclusivas para o proteoma de Sa82/PC.

Em relação ao secretoma, os fatores de alongamento P e Tu, uma proteína de gancho flagelar, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, α -hemolisina (também encontrada no proteoma desta cepa), piruvato desidrogenase, 6-fosfofructoquinase e tagatose-6-fosfato quinase foram observados exclusivamente em Sa36/BEC; e os peptídeos manosil-glicoproteína endo- β -N-acetilglicosamidase, N-acetilmuramoil-L-alanina amidase, succinil-diaminopimelato desuccinilase, o fator de alongamento Ts (também encontrado no proteoma), gama hemolisina, uma proteína hipotética, uma proteína ribossomal, e uma proteína geral de estresse, foram observados exclusivamente em Sa82/PC.

Apenas a lipase foi observada no proteoma de ambas as cepas analisadas, porém diferencialmente expressa, apresentando pesos moleculares distintos no gel SDS-PAGE (bandas correspondentes aos proteomas dois e oito na Figura 13A).

A localização subcelular e o processo biológico ou função dos peptídeos identificados foram obtidos, assim como a identificação dos genes correspondentes aos peptídeos (Tabela 7, Figuras 14, 15 e 16).

Tabela 7. Anotação ontológica, correspondência gênica, e relação com a virulência dos peptídeos obtidos a partir de bandas diferenciais do gel SDS-PAGE do proteoma e secretoma de *Staphylococcus aureus*.

Proteoma de Sa36									
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Espécie	Função ou Processo Biológico	Localização Subcelular	Gene Correspondente ao Peptídio	score	e-value	Gene Correspondente em <i>S. aureus</i>	Função na Virulência
Proteoma 1	bis(5'-nucleosil)-tetrafosfatase	<i>S. aureus</i>	Adesão Celular	Parede Celular	<i>sdrD</i>	188	6e-49	<i>sdrD</i>	Sim
Proteoma 2	Lipase	<i>S. aureus</i>	Metabolismo de Lipídios	Parede Celular	<i>lip</i>	241	1e-67	<i>lip</i>	Sim
Proteoma 3	Glutamil endopeptidase	<i>S. aureus</i>	Proteólise	Meio extracelular	<i>sspA</i>	127	1e-39	<i>sspA</i>	Sim
Proteoma 4	α -hemolisina	<i>S. aureus</i>	Citólise	Meio extracelular	<i>hla</i>	343	5e-114	<i>hla</i>	Sim
Proteoma 6	Serino-protease	<i>S. aureus</i>	Proteólise	Meio extracelular	<i>spB</i>	122	1e-28	<i>spB</i>	Sim
Proteoma de Sa82									
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Espécie	Função ou Processo Biológico	Localização Subcelular	Gene Correspondente ao Peptídio	score	e-value	Gene Correspondente em <i>S. aureus</i>	Função na Virulência
Proteoma 7	Adesina	<i>S. aureus</i>	Adesão Celular	Parede Celular	<i>cna</i>	94	2e-19	<i>cna</i>	Sim
Proteoma 8	Lipase	<i>S. aureus</i>	Metabolismo de Lipídios	Parede Celular	<i>lip</i> ou <i>gehC</i>	127	4e-29	<i>lip</i> ou <i>gehC</i>	Sim
Proteoma 9	Aldeído-desidrogenase	<i>A. macrosporangiidus</i>	Metabolismo Celular	Desconhecida	NI	NI	NI	<i>aldH1, aldH2, aldA</i>	Não
Proteoma 10	Fator de alongamento Ts	<i>S. aureus</i>	Tradução	Citoplasma	<i>tsf</i>			<i>tsf</i>	Não
Proteoma 11	Cisteíno-protease	<i>S. aureus</i>	Proteólise	Meio extracelular	<i>sspB</i>	254	8e-80	<i>sspB</i>	Sim
Proteoma 12	Glicerofosforil diester fosfodiesterase	<i>S. aureus</i>	Metabolismo de Lipídios	Desconhecida	<i>glpQ</i>	339	1e-120	<i>glpQ</i>	Não
Proteoma 13	Nuclease - Cadeia A	<i>S. aureus</i>	Metabolismo de Ácidos Nucléicos	Desconhecida	<i>nuc</i>	181	3e-53	<i>nuc</i>	Sim
	Regulador transcricional	<i>O. kimchii</i>	Regulação Celular	Desconhecida	NI	NI	NI	<i>qacR, trsN</i>	Não
Proteoma 15	β -lactamase	<i>S. aureus</i>	Resposta a Antibióticos	Meio extracelular	NI	NI	NI	<i>blaZ</i>	Não
Proteoma 16	Proteína hipotética	<i>S. aureus</i>	Desconhecida	Desconhecida	NI	NI	NI	NI	NI

Cont.

Fragmento do gel	Anotação Presumível	Espécie	Função ou Processo Biológico	Localização Subcelular	Gene Correspondente ao Peptídio	score	e-value	Gene Correspondente em <i>S. aureus</i>	Função na Virulência
Proteoma 17	Proteína hipotética	<i>C. acetobutylicum</i>	Desconhecida	Desconhecida	NI	NI	NI	NI	NI
Secretoma de Sa36									
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Espécie	Função ou Processo Biológico	Localização Subcelular	Gene Correspondente ao Peptídio	score	e-value	Gene Correspondente em <i>S. aureus</i>	Função na Virulência
Secretoma 1	Fator de alongamento P	<i>S. aureus</i>	Tradução	Citoplasma	NI	NI	NI	<i>efp</i>	Não
Secretoma 2	Fator de alongamento Tu	<i>S. aureus</i>	Tradução	Citoplasma	<i>tuf</i>	404	1e-142	<i>tuf</i>	Não
Secretoma 3	Proteína de gancho flagelar	<i>L. monocytogenes</i>	Motilidade	Desconhecida	NI	NI	NI	NI	NI
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>S. aureus</i>	Metabolismo de Carboidratos	Desconhecida	<i>gapC</i>	105	1e-23	<i>gapC</i>	Não
Secretoma 4	α -hemolisina	<i>S. aureus</i>	Citólise	Meio extracelular	<i>hla</i>	269	2e-85	<i>hla</i>	Sim
	Subunidade β do componente E1 de piruvato desidrogenase	<i>S. aureus</i>	Processo Metabólico	Desconhecida	<i>pdhB</i>	289	2e-92	<i>pdhB</i>	Não
Secretoma 5	6-fosfofructoquinase	<i>Ruminococcus</i> sp.	Metabolismo de Carboidratos	Citoplasma	NI	NI	NI	<i>pfkA</i>	Não
Secretoma 6	Tagatose-6-fosfato quinase	<i>P. duerdenii</i>	Metabolismo de Carboidratos	Desconhecida	NI	NI	NI	<i>lacC</i>	Não
Secretoma de Sa82									
Fragmento do gel	Anotação Presumível	Espécie	Função ou Processo Biológico	Localização Subcelular	Gene Correspondente ao Peptídio	score	e-value	Gene Correspondente em <i>S. aureus</i>	Função na Virulência
Secretoma 8	Manosil-glicoproteína endo- β -N-acetilglicosamidase	<i>S. aureus</i>	Processamento de Peptidioglicano	Desconhecida	<i>atl</i>	100	4e-27	<i>atl</i>	Sim
Secretoma 9	Família protéica N-acetilmuramoil-L-alanina amidase	<i>S. aureus</i>	Organização de Parede Bacteriana	Meio extracelular	<i>atl</i>	255	1e-80	<i>atl</i>	Sim

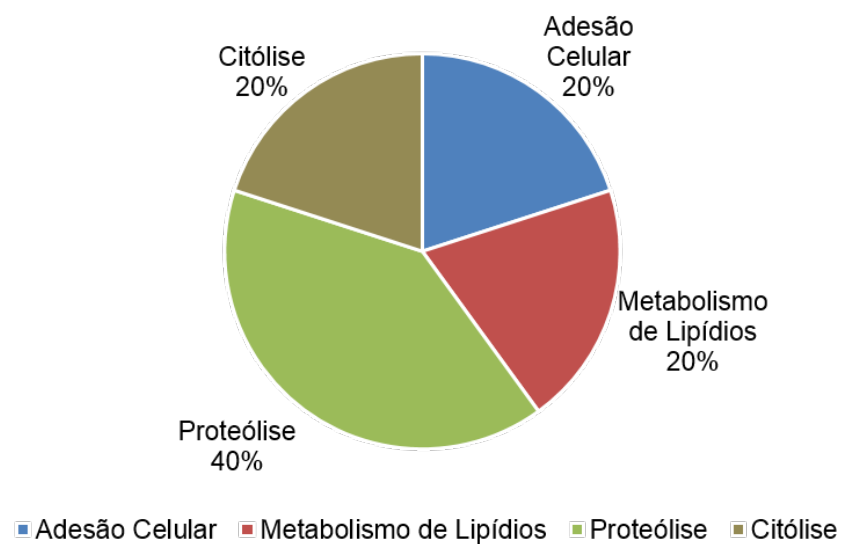
Cont.

Fragmento do gel	Anotação Presumível	Espécie	Função ou Processo Biológico	Localização Subcelular	Gene Correspondente ao Peptídio	score	e-value	Gene Correspondente em <i>S. aureus</i>	Função na Virulência
Secretoma 10	Manosil-glicoproteína endo- β -N-acetilglicosamidase	<i>S. aureus</i>	Processamento de Peptidioglicano	Desconhecida	<i>atl</i>	154	3e-44	<i>atl</i>	Sim
Secretoma 11	Succinil-diaminopimelato desuccinilase	<i>S. aureus</i>	Proteólise	Desconhecida	<i>lukS-PV</i>	291	5e-101	<i>lukS-PV</i>	Sim
	Fator de alongamento Ts	<i>S. aureus</i>	Tradução	Citoplasma	<i>tsf</i>	259	4e-90	<i>tsf</i>	Não
Secretoma 12	Gama-hemolisina – Subunidade B	<i>S. aureus</i>	Citólise	Parede Celular	<i>hlgB</i>	75,1	2e-20	<i>hlgB</i>	Sim
Secretoma 13	Proteína hipotética	Peptoniphilus sp.	Desconhecida	Desconhecida	NI	NI	NI	NI	NI
Secretoma 15	Proteína geral de stress	<i>S. aureus</i>	Processo Metabólico	Desconhecida	<i>pfpl</i>	103	3e-33	<i>pfpl</i>	Não
Secretoma 16	Proteína L6 ribossomal 50S	<i>S. aureus</i>	Tradução	Citoplasma	<i>rplF</i>	99,8	7e-32	<i>rplF</i>	Não
	succinil-diaminopimelato desuccinilase	<i>S. aureus</i>	Proteólise	Desconhecida	<i>lukS-PV</i>	206	5e-101	<i>lukS-PV</i>	Sim

Legenda: NI = não identificado.

A

Proteoma Sa36/BEC

**B**

Proteoma Sa82/PC

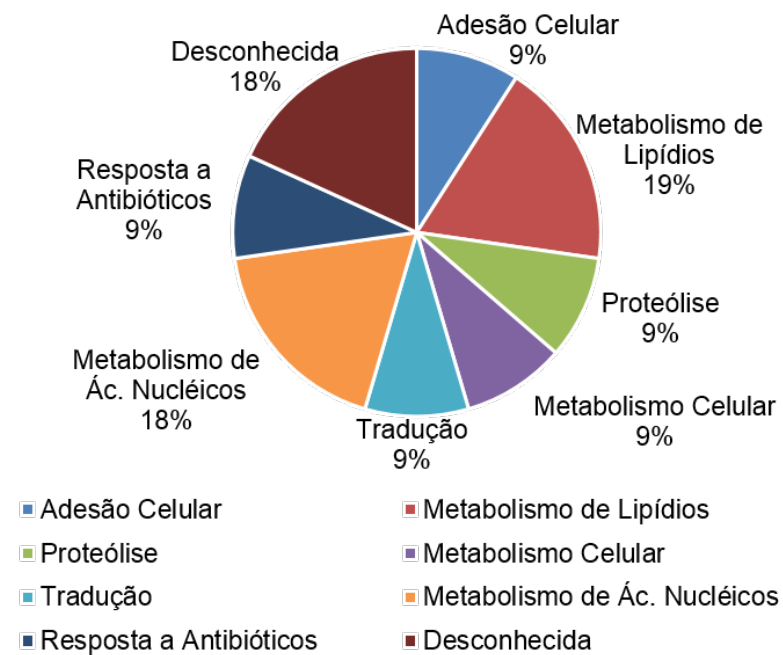
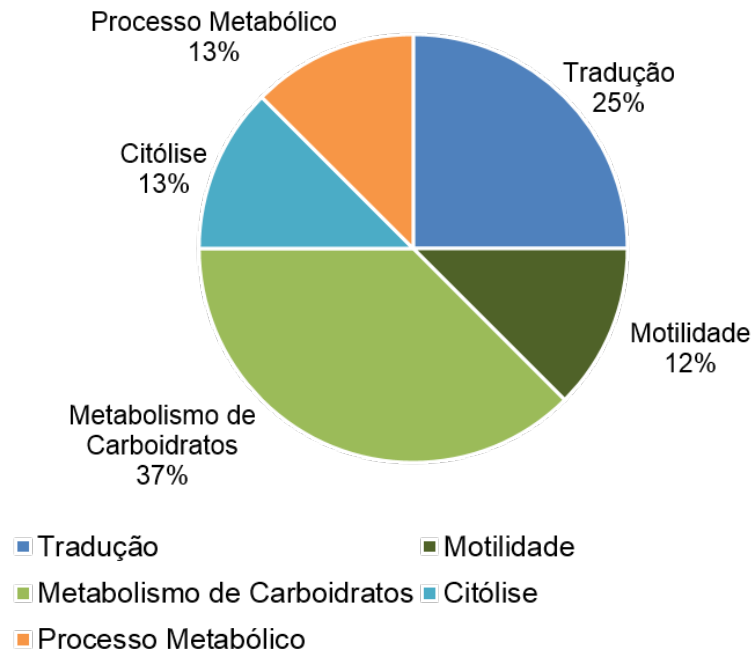


Figura 14. Anotação ontológica dos peptídeos identificados no proteoma de *Staphylococcus aureus*. A) Proteoma de Sa36/BEC; B) Proteoma de Sa82/PC.

A

Secretoma Sa36/BEC

**B**

Secretoma Sa82/PC

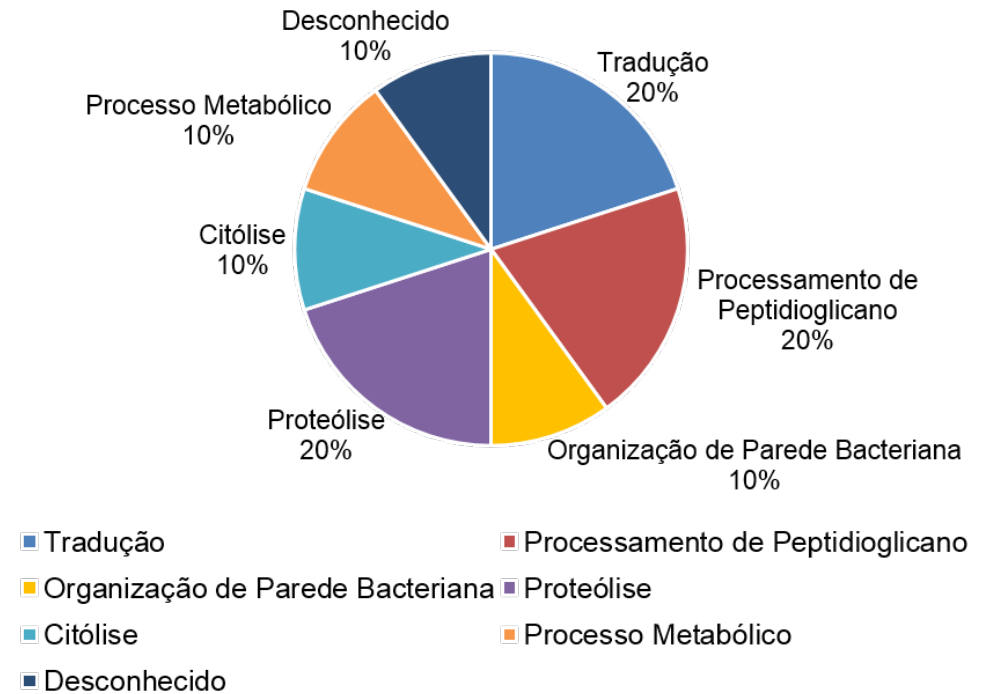


Figura 15. Anotação ontológica dos peptídeos identificados no secretoma de *Staphylococcus aureus*. A) Secretoma de Sa36/BEC; B) Secretoma de Sa82/PC.

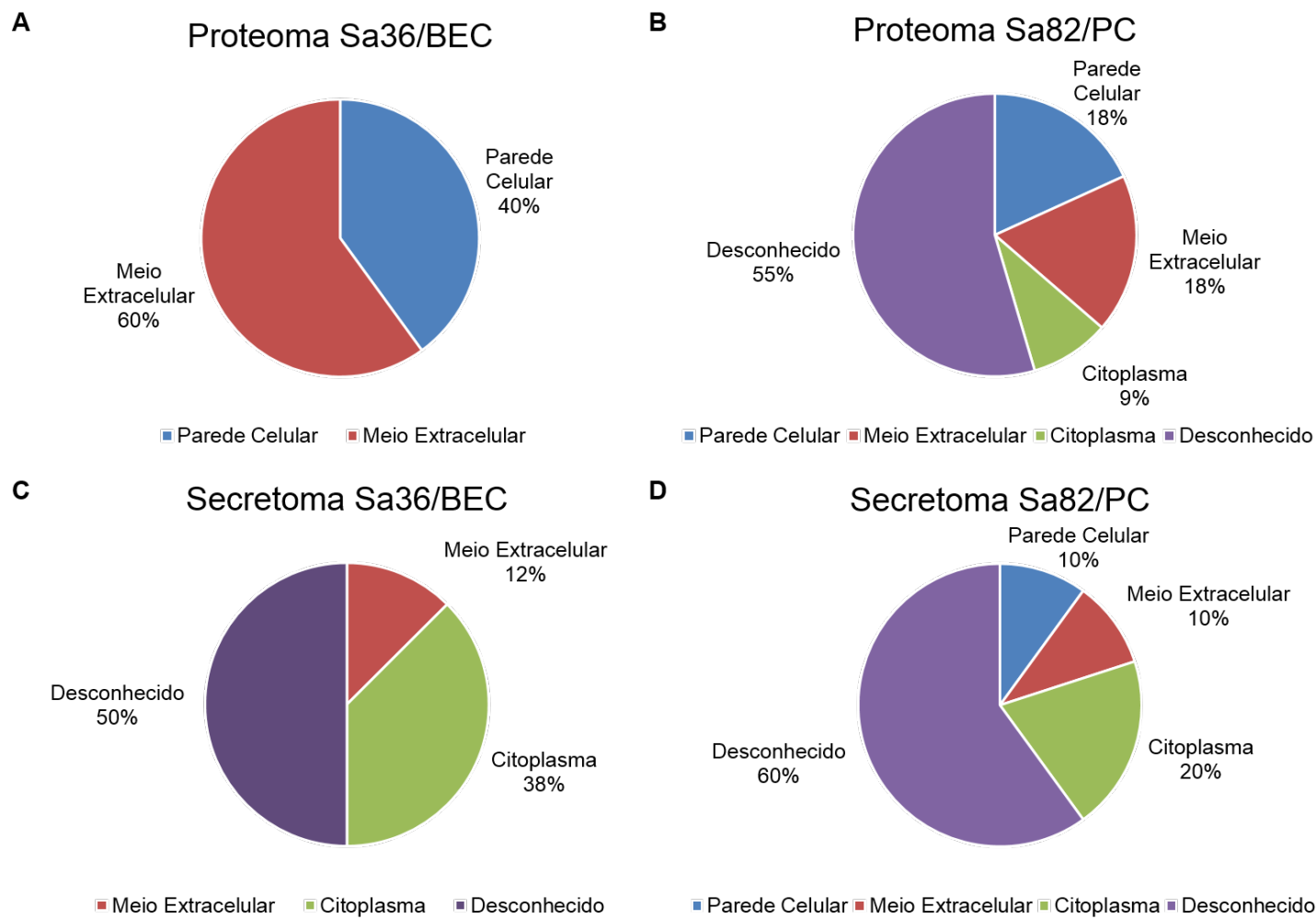


Figura 16. Localização subcelular dos peptídeos identificados no proteoma e secretoma de *Staphylococcus aureus*. A) Proteoma de Sa36/BEC; B) Proteoma de Sa82/PC; C) Secretoma de Sa36/BEC; D) Secretoma de Sa82/PC.

Na análise dos géis bidimensionais dos secretomas estudados, foram observados, em média, aproximadamente 70 spots para Sa36/BEC e 86 spots para Sa82/PC. Comparando-se os seis géis, dos 125 *matches* foram identificados, 93 peptídeos diferencialmente expressos (DEPs) e estatisticamente relevantes (ANOVA menor ou igual a 0,05) (Figura 17), sendo 33 spots exclusivos para Sa36/BEC, 51 exclusivos para Sa82/PC, e nove em comum.

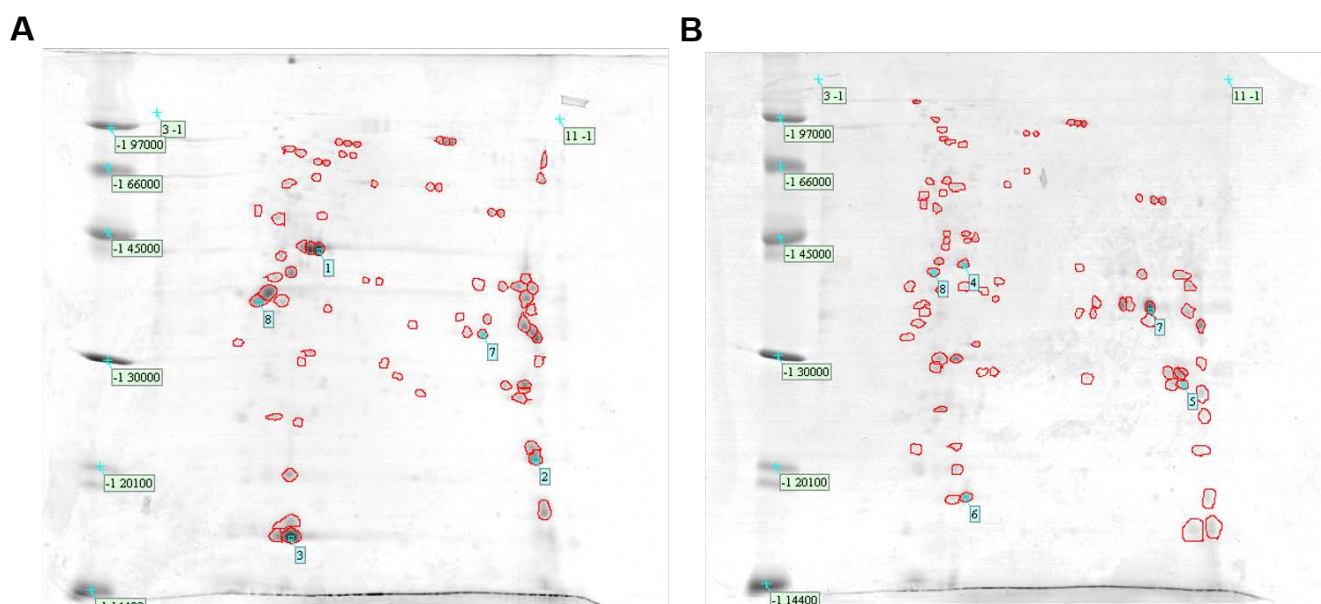


Figura 17. Proteínas totais do secretoma de *Staphylococcus aureus* em gel bidimensional (12,5% acrilamida). MM – Marcador de baixo peso molecular GE (em kDa); A) secretoma de Sa36/BEC; B) secretoma de Sa82/PC. Em vermelho, os spots de *matches* com relevância estatística.

6. Discussão

Uma das causas da diversidade patogênica de *S. aureus* é sua habilidade de produzir um grande número de fatores de virulência, sendo estes em sua maioria, secretados ou associados à parede bacteriana, como, por exemplo, toxinas, lipase, hemolisinas, enterotoxinas e adesinas. Estas proteínas podem agir só ou em conjunto, de forma que o curso das infecções por *S. aureus* e sua severidade dependa da interação dos fatores de virulência entre si e com componentes do hospedeiro (Engelmann e Hecker, 2009).

A literatura descreve que, uma das diferenças genéticas entre isolados comunitários (CA-MRSA) e hospitalares (HA-MRSA) é a presença dos genes da citotoxina PVL nos CA-MRSA (Millar *et al.*, 2007), ou seja, PVL estaria intimamente relacionada com *SCCmec* dos tipos IV e V. Porém, Brust *et al.* (2013) observaram, em estudo com 16 isolados de *S. aureus* do Rio de Janeiro, a presença dos genes *lukF-PV* e *lukS-PV* associados com *SCCmec* tipo III em todos os *S. aureus* investigados.

Diversas variantes genéticas do clone BEC já foram descritas, e quando agrupadas, são chamadas de Complexo Clonal Epidêmico Brasileiro (ou BECC). A patogenicidade deste clone depende de diversos fatores, que variam de acordo com as diferentes variantes, e um destes fatores é a citotoxina PVL (Rodríguez-Noriega e Seas, 2010).

Staphylococcus aureus que comportam *SCCmec* IV neste trabalho foram, através de técnicas de tipagem molecular previamente realizadas (Andrade, 2013), relacionados com o Clone Pediátrico (ou USA800) e todos, com exceção apenas de Sa1, possuem um padrão de MLST (ou perfil alélico) determinado ST5. Sete (63,6%) dos isolados relacionados ao PC aqui estudados foram positivos

para PVL. Foi observado que, na Argentina, 94% dos MRSA ST5 analisados comportam PVL (Rodríguez-Noriega e Seas, 2010). O isolado Sa1, também PVL positivo, apresenta um perfil alélico diferente e nunca antes descrito, que já foi submetido aos bancos de dados e recebeu a designação de ST2381 (Andrade, 2013).

O OSPC é relacionado a infecções comunitárias, sendo considerado um CA-MRSA. Este clone é o mais frequentemente encontrado na Nova Zelândia, e é caracterizado por SCCmec tipo IV e pela presença dos genes codificantes da PVL (Williamson *et al.*, 2013). Todos os 10 *S. aureus* associados ao clone OSPC deste trabalho, embora sejam MSSA e não apresentem SCCmec, comportaram os genes da PVL.

Waldenburger *et al.* (2014), em estudo realizado na Alemanha, descreveram a presença de PVL em MSSA, onde foram observados que 42 (correspondendo a 45%) de seus isolados MSSA comportavam os genes *lukF-PV* e *lukS-PV*, corroborando com os 34 MSSA aqui apresentados que também foram positivos para estes genes.

De maneira geral, são observadas diferentes frequências para PVL em diferentes países. Em estudo na África, Oosthuysen *et al.* (2013) descreveram uma frequência de 43,6%, enquanto na Índia, segundo Lim *et al.* (2012), foi observada uma frequência de aproximadamente 13,43% (9/67).

Staphylococcus aureus capazes de produzir tanto PVL como a TSST-1 são raros, porém comumente descritos como cepas supervirulentas, já tendo sido associados a relatos de casos fatais de pneumonia necrosante (Li *et al.*, 2011). Dos 55 isolados produtores de PVL do nosso estudo, cinco (Sa8 – isolado proveniente de paciente de ambulatório; Sa32 – enfermaria; Sa82 – enfermaria;

Sa87 – UTI; e Sa88 – ambulatório) também comportam o gene *tst* (Andrade, 2013). O isolado denominado Sa82, além de possuir ambos os genes, também é resistente à metilicina. É importante lembrar que os genes codificantes destas toxinas (*lukS*-PV e *lukF*-PV) estão localizados em elementos genéticos móveis (*luk*-PV no profago, e *tst*, em uma ilha genômica de patogenicidade), o que pode acarretar uma possível transmissão horizontal destes fatores de virulência entre cepas (Malachowa e DeLeo, 2010; Li *et al.*, 2011).

Diferentes cepas de *S. aureus*, MRSA ou MSSA, geralmente possuem um arsenal de fatores de virulência diferentes. O BEC é associado aos genes *cna*, *fnbA*, *fnbB* e ao loco *ica*, enquanto o Clone Pediátrico geralmente apresenta *fnbA* e o loco *ica* (Schuenck *et al.*, 2012), o que corresponde ao observado no presente trabalho. Também como aqui observado, clones isolados de uma mesma cepa epidêmica podem ser extremamente diferentes em relação aos genes que possuem em regiões altamente variáveis do genoma (Engelmann e Hecker, 2009).

Em estudo realizado por Peacock *et al* (2002), com *S. aureus* adquiridos no Reino Unido, foram encontradas frequências de 98%, 100%, 32% e 77% para *clfA*, *clfB*, *cna* e loco *ica*, respectivamente, em isolados de colonização (recuperados de indivíduos saudáveis), e frequências de 100%, 100%, 52% e 92% para os mesmos fatores, em *S. aureus* provenientes de infecções invasivas. As frequências observadas neste estudo (100% para *clfA*, 96,6% para *clfB*, 47,1% para *cna*, e 100% para genes do loco *ica*) se assemelham aquelas observadas por Peacock *et al.* (2002) para cepas responsáveis por infecções graves.

A resistência a metilicina nos *S. aureus* pode alterar o fenótipo do biofilme e atenuar a virulência em infecções associadas a dispositivos hospitalares, tais

como cateteres e respiradores artificiais, por exemplo. Cepas MRSA podem expressar biofilme de maneira independente ao loco *ica*, mas dependente da presença de proteínas que se ligam a fibronectina (genes *fnbAB*) e uma autolisina (Atl). Este fenótipo de biofilme Atl/FnbPAB é menos frequente ou ausente em cepas MSSA, que, *in vitro*, apresentam um biofilme dependente de PIA/PNAG (e consequentemente, do loco *ica*) (Pozzi *et al.*, 2012).

Abraham e Jefferson (2012) descrevem que o fator ClfB também possui função no fenótipo de biofilme, porém sob condições quelantes (ausência de cálcio). Os autores afirmam que, em um ambiente pobre em cálcio, PNAG e DNA extracelular (presente no meio extracelular por células mortas), que são componentes essenciais para formação e maturação do biofilme, bem como outras moléculas mediadoras do biofilme independente do loco *ica* (FnbPAB), não seriam expressos ou seriam inativos, porém o biofilme seria mantido pela proteína ClfB.

Para que se possa definir a relação de um isolado clínico com um clone epidêmico, são necessárias diversas técnicas diferentes de tipagem molecular que consomem tempo, mão de obra e recursos financeiros. No sequenciamento do gene *icaD*, foram encontrados três polimorfismos de base única (SNPs) nos isolados relacionados ao BEC. A sequência de referência de uma cepa BEC corrobora com os SNPs encontrados, sugerindo que estes sejam uma assinatura deste clone em específico. Desta maneira, pode-se sugerir que seria possível identificar o clone BEC através de uma única amplificação e sequenciamento do gene *icaD*, porém estudo com um maior número de cepas deste e de outros clones necessita ser realizado.

A cápsula polissacarídica é um fator de virulência expresso por vários patógenos bacterianos, e constitui uma importante defesa do microrganismo à opsonofagocitose (Nanra *et al.*, 2013).

Os testes mais utilizados para identificação do tipo de polissacarídeo capsular são aglutinação e sorotipagem com anticorpos de coelho (Verdier *et al.*, 2007; Sutter *et al.*, 2011). Segundo Nanra *et al.* “todas as cepas clínicas de *S. aureus* possuem a via biossintética para produzir CP5 ou CP8”. Entretanto, cepas que se mostram não encapsuladas ou não-tipáveis, segundo os testes acima citados, podem reagir fortemente com anticorpos contra o polissacarídeo tipo 336. Este polissacarídeo é uma variante do ácido teicóico normalmente encontrado na parede bacteriana de *S. aureus*, e é um antígeno prevalente na superfície da parede bacteriana de cepas consideradas não-encapsuladas (Sutter *et al.*, 2011). Se as cepas consideradas não-tipáveis são realmente não-encapsuladas, ou se somente produzem outro tipo de cápsula, não se tem certeza (Foster, 2005). Desta forma, os seis isolados que se mostraram negativos para os dois tipos de cápsula pesquisados neste trabalho podem expressar outro tipo de polissacarídeo capsular, ou possuir uma maior quantidade do polissacarídeo 336 em sua superfície.

Grunert *et al.* em 2013 declararam que a determinação dos alelos *cap* para as cepas não-tipáveis que não apresentaram expressão de cápsula revelou que tais cepas apresentavam ou o alelo *cap5*, ou *cap8*, ou nenhum deles, ou ambos. Diante desta informação, os 26 isolados clínicos que foram positivos para ambos os alelos podem não expressá-los, e, portanto, para definição correta do tipo de cápsula polissacarídica presente, outros experimentos devem ser realizados.

Em relação às enterotoxinas estafilocócicas, a maior parte dos isolados relacionados ao PC possuíam os cinco principais genes do *cluster egc*. De Miranda *et al.* (2007) realizaram um estudo com isolados provenientes de Recife/PE e Rio de Janeiro/RJ, e relataram que todos os isolados relacionados ao PC apresentavam o *cluster egc*. Este estudo sugere que a presença do *cluster*, entre outros fatores, pode ter contribuído para a introdução desse clone no ambiente hospitalar.

Em uma pesquisa realizada na China, foram investigados diversos genes de enterotoxinas em oito isolados clínicos de *S. aureus*, provenientes de pacientes associados com surto de intoxicação alimentar estafilocócica. Os genes das enterotoxinas não-clássicas foram observados em maior frequência do que as enterotoxinas clássicas (*sea-see*). Os autores sugerem que enterotoxinas, cuja ação enterotoxigênica ainda não foi comprovada, também tenham a capacidade de causar intoxicação alimentar, visto que três dos oito isolados estudados apresentaram apenas os genes *sek*, *sem*, *sen*, *ser* e *seu* (Tang *et al.*, 2011).

As enterotoxinas SEG e SEI do *cluster egc* já foram anteriormente relacionadas com síndromes parecidas à Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócica (sendo estas chamadas TSS-like), juntamente com SEA, SEB, SEC, SED e SEH (Bania *et al.*, 2006; Gordon e Lowy, 2008).

Secretoma é definido como o subconjunto do proteoma total secretado no meio extracelular. Também denominado proteoma exportado, ou exo-proteoma, esta fração proteica inclui proteínas ativamente secretadas pelo organismo e proteínas remanescentes de células mortas (Enany *et al.*, 2012). Além do conhecimento da presença e ausência de genes de virulência, a investigação do proteoma e secretoma pode fornecer informações importantes sobre a expressão

de fatores de virulência e suas possíveis modificações pós-traducionais. Já foram descritas (Engelmann e Hecker, 2009) diferenças de expressão nas proteínas reguladoras de genes de virulência, que levaram a variações na quantidade de fatores produzidos em diferentes isolados clínicos.

A presença de proteínas normalmente secretadas na fração do proteoma, como por exemplo, lipase (proteoma dois e oito) e α -hemolisina (proteoma quatro), pode ser considerada normal, devido às proteínas serem produzidas dentro da célula bacteriana para depois serem enviadas ao meio extracelular. A α -hemolisina, por exemplo, foi observada no proteoma e no secretoma de Sa36/BEC, com aproximadamente o mesmo peso molecular no gel SDS-PAGE (aproximadamente 30 kDa).

Por sua vez, foram observadas proteínas normalmente intracelulares na porção do secretoma, como por exemplo, os fatores de alongamento P (secretoma um), Tu (secretoma dois) e Ts (secretoma 11). De maneira similar, 35 de 74 proteínas identificadas no secretoma de *S. aureus* em estudo por Pocsfalvi *et al.* (2008) também apresentam localização intracelular, incluindo o fator de alongamento Tu, também encontrado no secretoma de Sa36/BEC, e proteínas ribossomais L17 e L22. No trabalho aqui descrito, a proteína ribossomal L6 foi encontrada no secretoma de Sa82/PC.

A secreção de proteínas é, na sua maioria, mediada por uma maquinaria de transporte que reconhece uma sequência específica (peptídeo sinal ou motivo) na proteína, indicando que esta deve ser secretada. Em bactérias, existem quatro sistemas ou vias conhecidas para secreção de proteínas, todos dependentes da presença de um peptídeo sinal. Entretanto, algumas proteínas podem ser secretadas mesmo na ausência deste peptídeo, e a este fenômeno se dá o nome

de secreção não clássica. Tais proteínas podem possuir alguma outra função no meio extracelular, além daquela conhecida no meio intracelular (Bendtsen *et al.*, 2005; Pocsfalvi *et al.*, 2008).

Segundo Bendtsen *et al.* (2005), a detecção de proteínas secretadas de maneira não clássica pode ser atribuído à lise celular durante procedimentos laboratoriais, porém algumas destas proteínas podem ser observadas secretadas ou na superfície celular em várias espécies bacterianas diferentes, como por exemplo, a proteína ribossomal L9 e o fator de alongamento Tu em *Listeria monocytogenes*, n-acetilmuramoil-L-alanina amidase em *Bacillus subtilis*, e subunidade E3 da piruvato desidrogenase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em ambas as espécies bacterianas citadas. Todas as proteínas acima mencionadas foram encontradas na porção secretada de *S. aureus* estudada neste trabalho.

Na identificação por espectrometria de massas, 16 dos 36 peptídeos anotados possuem alguma relação com a virulência em *S. aureus*. São eles: bis(5'-nucleosil)-tetrafosfatase (proteoma um), lipase (proteomas dois e oito), glutamil endopeptidase (proteoma três), α -hemolisina (proteoma quatro e secretoma quatro), serino protease (proteoma seis), adesina (proteoma sete), cisteíno protease (proteoma 11), nuclease (proteoma 13), manosil-glicoproteína endo- β -N-acetilglicosamidase (secretomas oito e 10), N-acetil-muramoil-L-alanina amidase (secretoma nove), e succinil-diaminopimelato desuccinilase (secretomas 11 e 16).

Proteínas da família Sdr (proteínas que contém repetição serina-aspartato), como a SdrE, com a qual o peptídeo bis(5'-nucleosil)-tetrafosfatase foi relacionado, são proteínas presentes na parede bacteriana que possuem a

capacidade de se ligar ao fibrinogênio e possivelmente ao colágeno, que também estão incluídas no grupo MSCRAMM. Estas proteínas são estruturalmente muito semelhantes à ClfA e ClfB, com exceção de dois domínios adicionais (Foster *et al.*, 2014).

Além da serino protease e cisteíno protease (proteomas seis e 11, respectivamente), a glutamil endopeptidase (proteoma três), relacionada ao gene *sspA*, é uma serino protease glutamato-específica, também chamada protease V8 (Gordon e Lowy, 2008; Park *et al.*, 2011). Segundo Park *et al.* (2011), proteases extracelulares desempenham papel na patogênese de *S. aureus* por danificar o tecido hospedeiro, degradar a matriz protéica extracelular e induzir permeabilidade vascular.

Hemolisinas e leucocidinas (como por exemplo, PVL) são proteínas semelhantes em função (formação de poros nas células do hospedeiro) e em estrutura (toxinas barril- β), e fazem parte de uma mesma família protéica. As hemolisinas são responsáveis pela lise de eritrócitos, macrófagos e linfócitos. Em especial a α -hemolisina (proteoma e secretoma quatro), também conhecida como α -toxina, possui importância na patogênese de sepse, pneumonia e infecções graves de pele (Otto, 2010; Lee *et al.*, 2014).

A nuclease em *S. aureus* é um importante fator, não só de virulência, mas como marcador amplamente utilizado para identificação desta bactéria em alimentos ou amostras clínicas (Hu *et al.*, 2013). *Staphylococcus aureus* é capaz de produzir duas nucleases termoestáveis: a nuclease estafilocócica codificada pelo gene *nuc1* (também nomeada SNase), ou a termonuclease codificada pelo gene *nuc2* (ou TNase). Tais proteínas são capazes de hidrolizar o DNA ou RNA das células do hospedeiro, levando a destruição tecidual e dispersão das células

bacterianas (Tang *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012), porém, além desta atuação direta, a nuclease potencialmente contribui com biofilme em *S. aureus*, visto que DNA é um dos componentes principais para a formação do biofilme estafilocócico (em conjunto com PIA/PNAG e proteínas secretadas). Ao degradar o DNA do biofilme bacteriano, a nuclease contribui para o rompimento de biofilmes maduros, e consequente dispersão bacteriana (Mann *et al.*, 2009; Berends *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2011).

Os peptídeos manosil-glicoproteína endo- β -N-acetilglicosamidase (secretomas oito e 10) e N-acetil-muramoil-L-alanina amidase (secretoma nove) estão relacionados ao gene *atl*, que codifica a principal proteína autolítica de *S. aureus*, uma proteína bifuncional. Autolisinas são enzimas que degradam a camada de peptidoglicano da parede bacteriana (Singh, 2014). Autolisinas também aparentam apresentar função na secreção de proteínas que não possuem peptídeo sinal (secreção não clássica de proteínas) (Pasztor *et al.*, 2010).

O peptídeo que foi denominado adesina (proteoma sete), presente no proteoma de Sa82/PC, corresponde à proteína Cna, codificado pelo gene *cna*. Na investigação de fatores de virulência realizada neste trabalho, na qual o gene *cna* foi pesquisado em todos os isolados clínicos de *S. aureus*, a cepa Sa82 já havia se mostrado positiva para este gene. A observação da expressão desta proteína nesta cepa corrobora os resultados previamente descritos.

De maneira semelhante, a cepa Sa82 também se mostrou positiva para a PCR que engloba os genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, que codificam as subunidades que formam a PVL. O peptídeo succinil-diaminopimelato desuccinilase (secretomas 11 e 16) mostrou relação com *lukS-PV*, que codifica a subunidade S

desta leucocidina. Assim como *cna*, a presença desta proteína expressa nesta cepa é suportada pelos resultados obtidos para a investigação dos fatores de virulência.

Em relação à eletroforese bidimensional desenvolvida neste trabalho, as duas cepas estudadas mostraram um padrão protéico diverso entre si, como pode ser observado pelas diferenças no número de spots exclusivos de cada cepa. Porém, apresentaram uma distribuição semelhante no gel, com a maior parte das proteínas agrupadas nas extremidades (pH ácido e básico), e poucas proteínas neutras. Este padrão se assemelha ao observado em Engelmann e Hecker (2009), e em Enany *et al.* (2013).

Segundo Kusch e Engelmann (2014), o secretoma de 15 *S. aureus* cujo genoma já foi completamente sequenciado consistiu em 133 proteínas, das quais 35 são conservadas entre as cepas e 98 são variáveis. A porção conservada é composta por proteases, lipases, enzimas hidrolizantes, proteínas de ligação ao fibrinogênio, hemolisinas e proteínas de ligação a IgG enquanto a porção variante é composta principalmente por toxinas, proteínas envolvidas na resistência a antimicrobianos e proteínas moduladoras do sistema imune. Analisando os resultados obtidos neste trabalho diante desta perspectiva, foi encontrado um menor número de proteínas diferencialmente expressas em ambos os clones (9 spots), e um maior número de proteínas exclusivamente expressas (33 para Sa36/BEC e 51 para Sa82/PC), e na espectrometria de massas a partir do gel SDS-PAGE, foram observadas lipases e hemolisinas em ambas as cepas analisadas. A identificação dos peptídeos a partir da eletroforese bidimensional está em fase de conclusão, e os resultados encontrados virão a somar e ampliar os resultados já obtidos.

A análise de dados proteômicos permitem uma visão ampla do objeto de estudo, uma vez que o conhecimento efetivo de onde, como e quando proteínas são produzidas é essencial para a compreensão de processos biológicos. Neste contexto, a elucidação da regulação da expressão gênica a partir de géis e espectrometria de massas, possibilita a identificação de peptídeos e seus respectivos genes codificantes, trazendo um avanço na determinação dos mecanismos de regulação e das interações entre diferentes genes.

A partir dos dados aqui expostos é possível inferir, de maneira geral, o potencial virulento destas bactérias e se correspondem ou não ao cenário observado mundialmente para os clones epidêmicos de *S. aureus*. Os isolados clínicos estudados, tanto sensíveis quanto resistentes a meticilina, apresentaram um extenso arsenal de virulência em seu genoma, o que pode sugerir que tais cepas sejam aptas a iniciar, manter e evoluir uma infecção com sucesso. Os isolados relacionados a clones epidêmicos mostraram um perfil de fatores de virulência condizente àquele observado na literatura para clones epidêmicos de outras regiões geográficas.

7. Conclusões

- a)** Os isolados clínicos de *S. aureus* do presente estudo apresentaram uma elevada frequência de fatores de virulência, demonstrando um alto potencial patogênico.
- b)** A alta frequência da leucocidina Panton-Valentine encontrada, bem como sua concomitância com o gene da toxina 1 do choque tóxico (previamente investigado), chama atenção e constitui um risco, devido a sua relação epidemiológica com pneumonia necrosante e a capacidade supervirulenta destes isolados.
- c)** A frequência observada para os genes de MSCRAMMs, genes do loco *ica* e de cápsula polissacarídica foi bastante elevada, e condiz com o encontrado no panorama mundial para cepas de *S. aureus* provenientes de infecções.
- d)** O gene *icaD* pode ser um candidato em potencial para identificação do Clone Epidêmico Brasileiro, pela presença de quatro SNPs que podem vir a funcionar como uma assinatura deste clone específico.
- e)** A alta frequência dos genes toxigênicos que compõem o *cluster* gênico de enterotoxinas sugerem que estes *S. aureus* são capazes de causar infecções alimentares e outras doenças, além da própria característica superantigênica, capaz de causar toxicidade sistêmica e debilitar o paciente.

- f)** Foi possível observar a presença de várias proteínas relacionadas a fatores de virulência expressas nas cepas relacionadas aos clones BEC e PC estudadas, enfatizando o amplo arsenal de fatores de virulência que *S. aureus* possui, e foi possível estabelecer uma relação entre a investigação gênica realizada, como evidenciado pela identificação dos genes *cna* e *lukS-PV*.
- g)** Os clones BEC e PC mostraram um perfil protéico no secretoma bastante diverso entre si, sugerindo a versatilidade deste patógeno e a plasticidade de seu genoma e, conseqüentemente, seu perfil protéico.
- h)** Através dos resultados pode-se sugerir que os *S. aureus* do presente estudo sejam capazes de colonizar e infectar hospedeiros humanos com sucesso, uma vez que possuem os fatores de virulência necessários, além de melhor compreender o perfil genético de virulência dos clones circulantes nos hospitais estudados.

8. Referências Bibliográficas

- Abraham NM, Jefferon KK (2012) *Staphylococcus aureus* clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. *Microbiol*, 158: 1504-1512.
- Andrade MA (2013) Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* metilicina sensíveis e metilicina resistentes isolados de amostras clínicas. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco.
- Baker MD, Acharya R (2004) Superantigens: structure-function relationships. *Int J Med Microbiol*, 293: 529-537.
- Bania J, Dabrowska A, Korzekwa K (2006) The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 315-320.
- Beltrame C, Botelho AM, Silva-Carvalho MC, *et al.* (2012) Restriction modification (RM) tests associated to additional molecular markers for screening prevalent MRSA clones in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31: 2011-2016.
- Bendtsen JD, Kiemer L, Fausbøll A, *et al.* (2005) Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol*, 5:58.
- Berends ET, Horswill AR, Haste NM, *et al.* (2010) Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun*, 2: 576-586.
- Blaiotta G, Ercolini D, Pennachia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, Villani F (2004) PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. *J Appl Microbiol*, 97: 719-730
- Boyle-Vavra S, Daum RS (2007) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of panton-valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*, 87: 3-9.
- Brust T, Costa TM, Amorim JC, *et al.* (2013) Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the PVL gene outbreak in a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:865-868.
- Burke FM, McCormack N, Rindi S, *et al.* (2010) Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*, 10:160.
- Calfee DP (2011) The epidemiology, treatment, and prevention of transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infusion Nursing*, 34: 359-364.
- Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, *et al.* (2008) Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol*, 46: 678-684.

- Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo-Filho PP (2010) Methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis*, 14:71-76.
- Chiang YC, *et al.* (2006) PCR primers for the detection of staphylococcal enterotoxins K, L and M survey of staphylococcal enterotoxin types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning cases in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 69: 1072-1079.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100/ S22, v. 32, n. 3.
- Collery MM; Smyth DS.; Tumilty JJG *et al.* (2009) Associations between enterotoxin gene *cluster* types *egc1*, *egc2* and *egc3*, *agr* types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 13-25
- Cue D, Lei MG, Lee CY (2012) Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2:38.
- De Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, *et al.* (2007) Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clinical Microbiology and Infection*, 13:1165-72.
- Deurenberg RH, Stobberingh EE (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8:747-63.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 13: 16-34.
- Enany S, Yoshida Y, Magdeldin S, *et al.* (2012) Extensive proteomic profiling of the secretome of European community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Peptides*, 37:128-137.
- Enany S, Yoshida Y, Magdeldin S, *et al.* (2013) Two dimensional electrophoresis of the exo-proteome produced from community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* belonging to clonal complex 80. *Microbol Res*, 168:504-511.
- Engelmann S, Hecker M (2009) A proteomics view of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenomics*, 6:187-197.
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, *et al.* (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 7687-7692.
- Foster T (2005) Immune evasion by Staphylococci. *Nat Rev*, 3:948-58.
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, *et al.* (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*, 12: 49-62.
- Franco BDGM, Landgraff M (2000) *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu.

- Fuda CCS, Fisher JF, Mobashery S (2005) β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptative resistance of a plastic genome. *Cel Mol Life Sci*, 62: 2617-33.
- Fujishima H et al (2012) The role of staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration. *Allergy*, 67: 799-803.
- Gordon R, Lowy F (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*, 46:S350-9.
- Grunert T, Wenning M, Barbagelata MS, et al. (2013) Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted fourier transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol*, 51: 2261-2266.
- Hennekinne J, De Buyser M, Dragacci S (2011) *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 815-36.
- Hu D, Maina EK, Omoe K, et al. (2011) Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Tohoku J Exp Med*, 225:161-169.
- Hu Y, Xie Y, Tang J, et al. (2012) Comparative expression analysis of two thermostable nuclease genes in *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog Dis*, 9: 265-271.
- Hu Y, Meng J, Shi C, et al. (2013) Characterization and comparative analysis of a second themonuclease from *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*, 168: 174-182.
- Ingraham JL, Ingraham CA (2010) Introdução à Microbiologia, Uma Abordagem Baseada em Estudos de Casos. Tradução da 3ª edição norte-americana. 1. ed., São Paulo: Cengage Learning.
- Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, et al. (1999) Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol*, 37: 2446-9.
- Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, et al. (2001) *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin genes, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 166: 669-77.
- Koneman EW (2001) Cocos gram-positivos: Parte I: Estafilococos e microrganismos relacionados. In Koneman EW. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5. Ed., Rio de Janeiro: Medsi, 551-588.
- Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggiman P (2011) Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting panton-valentine leukocidin: a review of case reports. *Annals of Intensive Care*, 1: 52.
- Krishna S, Miller LS (2012) Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol*, 15: 28-35.
- Kusch H, Engelmann S (2014) Secrets of the secretome in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 304:133-141.

- Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, *et al.* (2007) *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*, 315: 1130-3.
- Lee K, Lee JH, Kim SI, *et al.* (2014) Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 9447-9457.
- Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P (2003) Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc cluster* of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 38-43.
- Li Z, Hamilton SM, Parimont T, *et al.* (2011) Fatal *S. aureus* hemorrhagic pneumonia: genetic analysis of a unique clinical isolate producing both PVL and TSST-1. *PloS One*, 6:e27246.
- Lim K, Hanifah YA, Yusof MYM, *et al.* (2012) Characterisation of the virulence factors and genetic types of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* from patients and healthy individuals. *Indian J Microbiol*, 52: 593-600.
- Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, *et al.* (2011) Panton-valentine leucocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. *PLoS One*, 6: e22864
- Lo WT, Wang CC (2011) Panton-valentine leucocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr Neonatol*, 52: 59-65.
- Lowy FD (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111: 1265-1273.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2008) *Biología de los microorganismos*. 10. ed., London: Pearson Prentice Hall.
- Malachowa N, DeLeo FR (2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 3057-3071.
- Mann EE, Rice KC, Boles BR, *et al.* (2009) Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 4: e5822.
- Marimón JM, Villar M, García-Arenzana JM, *et al.* (2012) Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the panton-valentine leucocidin genes in northern Spain. *Journal of Infection*, 64: 47-53.
- McCourt J, O'Halloran DP, McCarthy H, *et al.* (2014) Fibronectin binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. *FEMS Microbiol Lett*, 353: 157-164.
- Mehndiratta PL, Bhalla P (2012) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a technical review. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30: 16-23.
- Millar BC, Loughrey A, Elborn JS, Moore JE (2007) Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Journal of Hospital Infection*, 67: 109-113.
- Mims CA *et al.* (1999) *Microbiologia Médica*. 2. ed., São Paulo: Manole Ltda.

- Moore PCL, Lindsay JA (2001) Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal gene transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol*, 39: 2760-2767.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2010) *Staphylococcus* e cocos gram positivos relacionados. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 6. ed., Rio de Janeiro: Elsevier Editora Limitada, p. 717-786.
- Nanra JS, Buitrago SM, Crawford S, *et al.* (2013) Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccin Immunother*, 9: 480-487.
- O'Gara JP (2007) *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microb. Lett.* 270:179-188.
- O'Riordan K, Lee JC (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*, 17: 218-234.
- Oliveira AC, Silva RS (2008) Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, 10: 189-197.
- Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, *et al.* (2002) Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol*, 40: 857-862.
- Oosthuysen WF, Orth H, Lombard CJ, *et al* (2013) Population structure analyses of *Staphylococcus aureus* as Tygerberg Hospital, South Africa, reveals a diverse population, a high prevalence of Panton-Valentine leukocidin genes, and unique local methicillin-resistant *S. aureus* clones. *Clin Microbiol and Infect*, 20: 652-659.
- Ote I, Taminiau B, Duprez JN, *et al.* (2011) Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 153: 285-292.
- Otto M (2010) Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol*, 64:143-162.
- Parham P (2001) O Sistema Imune. Porto Alegre: Artmed.
- Park JW, Park JE, Park JK, *et al.* (2011) Purification and biochemical characterization of a novel glutamyl endopeptidase secreted by a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Med*, 27: 637-645.
- Pasztor L, Ziebandt AK, Nega M, *et al.* (2010) Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins. *J Biol Chem*, 19: 36794-36803.
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, *et al.* (2002) Virulent combinations of adhesions and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 70:4987-4996.
- Pocsfalvi G, Cacace G, Cuccurullo M, *et al.* (2008) Proteomic analysis of enterotoxins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Proteomics*, 8: 2462-2476.

- Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, *et al.* (2012) Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PloS Pathogens*, 8: e1002626.
- Rajagopalan G, Smart MK, Murali N, *et al.* (2007) Acute systemic immune activation following vaginal exposure to staphylococcal enterotoxin B – implications for menstrual shock. *J Reprod Immunol*, 73: 51-59.
- Rodriguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, *et al.* (2010) Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin-America. *International Journal of Infectious Diseases*, 17: e560-566.
- Rodríguez-Noriega E, Seas C (2010) Padrão de mudança de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina na América Latina: implicações para a prática clínica na região. *Braz J Infect Dis* 14: S87-S96.
- Rosec JP, Gigaud O (2002) Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, 25: 61-67.
- Saravia-Otten P, Müller HP, Arvidson S (1997) Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. *J Bacteriol* 179: 5259 – 5263.
- Schwartz KL, Nourse C (2011) Panton-valentine leukocidin-associated *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia in infants: a report of four cases and review of the literature. *Eur J Pediatr*, 171: 711-717.
- Shore AC, Deasy EC, Slickers P, *et al.* (2011) Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 3765-73.
- Silva-Carvalho MC, *et al.* (2009) Comparison of different methods for detecting methicillin resistance in MRSA isolates belonging to international lineages commonly isolated in the American continent. *Microbiology and Immunology*, 53: 117-122.
- Singh VK (2014) High level expression and purification of Atl, the major autolytic protein of *Staphylococcus aureus*. *Int J Microbiol*, 615965.
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, *et al.* (2011) Formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2: 580-92.
- Schuenck RP, Cavalcante FS, Emery E, *et al.* (2012) *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 65:501-504.
- Scully IL, Liberator PA, Jansen KU, Anderson AS (2014) Covering all the bases: preclinical development of an effective *Staphylococcus aureus* vaccine. *Front Immunol*, 24: 109.
- Stefani S, Goglio A (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *International Journal of Infectious Diseases*, 14: S19-22.

- Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, *et al.* (2012) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods. *Int J Antimicrob Agents*, 39: 273-82.
- Sutter DE, Summers AM, Keys CE, *et al.* (2011) Capsular serotype of *Staphylococcus aureus* in the era of community-acquired MRSA. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 63: 16-24.
- Tang J, Kang M, Chen H, *et al.* (2011) The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. *Sci China Life Sci*, 54: 863-869.
- Tang J, Tang C, Chen J, *et al.* (2011) Phenotypic characterization and prevalence of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from outbreaks of illness in Chengdu City. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8: 1317-1320.
- Tristan A, Ying L, Bes M, *et al.* (2003) Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesions involved in human hematogenous infections. *J Clin Microbiol*, 4: 4465.
- Turlej A, Hryniewicz W, Empel J (2011) Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. *Polish Journal of Microbiology*, 60: 95-103.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2001) *Microbiologia*. 6. ed.; Porto Alegre: Artmed Editora.
- Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N, *et al.* (2009) Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 6839-6849.
- Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, *et al.* (2003) Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, 92: 179-185.
- Verdier I, Durand G, Bes M, *et al.* (2007) Identification of the polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *J Clin Microbiol*, 45: 725-9.
- Vidal PM, Trindade PA, Garcia TO, *et al.* (2009) Differences between “classical” risk factors for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV MRSA strain. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30: 139-45.
- Vojtov N, Ross HF, Novick RP (2002) Global repression of enterotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 99: 10102-10107.
- Von Eiff C, Becker K, Machka K, *e al.* (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia: Study group. *N Engl J Med*, 344: 11-16.
- Waldeburger S, Vogel U, Goebeler M, *et al.* (2014) Community-acquired skin infections caused by *Staphylococcus aureus*: what is the role of the Panton-Valentine leukocidin toxin? *Journal of the German Society of Dermatology*, 12: 59-66.

- Watkins RR, David MZ, Salata RA (2012) Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol, 61:1179-93.
- Williamson DA, Roberts SA, Ritchie SR, *et al.* (2013) Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New Zealand: rapid emergence of sequence type 5 (ST5)-SCCmec-IV as the dominant community-associated MRSA clone. PLoS One, 8: e62020.
- Xie Y, He Y, Gehring A, *et al.* (2011) Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. PLoS One, 6: e28276.

Fontes online:

- IWG-SCC – International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (2012) Disponível em: <http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html>. Acesso em 25 de outubro.
- MASCOT Software Online - Peptide Mass Fingerprint Tool. Disponível em: <http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF>. Acesso em: 19 de janeiro, 2014.
- NCBI – NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2014) Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 01 de dezembro, 2014.
- SCIENCE PHOTO LIBRARY. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/>>. Acesso em: 11 de outubro, 2012.

9. Anexos

ANEXO 1

Adaptação do protocolo do kit Instagene (Bio Rad) de extração de DNA para

Staphylococcus aureus

Extração de DNA – Adaptação do protocolo do Instagene para *S. aureus*

1. Crescimento e isolamento da bactéria em placa.
2. Com a cultura pura, pegar uma estria e adicionar a um tubo contendo 200 µL de TE.
3. Vortex (para quebrar o pellet)
4. Adicionar 20 µL de Lisozima (10 mg/mL)
5. Adicionar 10 µL de Proteinase K (10 mg/mL)
6. Incubar a 60°C por 20 minutos
7. Adicionar 100 µL de STE (EDTA, Tris-HCl e SDS)
8. Incubar a 60°C por 15 minutos
9. Esperar 5 minutos em temperatura ambiente
10. Adicionar 200 µL de Instagene (Bio-Rad), no fluxo, usando ponteira de 1000 µL
11. Homogeneizar “suavemente”
12. Incubar a 56°C por 30 minutos
13. Centrifugar (12.000 a 14.000 rpm) por 3 minutos
14. Separar o sobrenadante em tubos novos e descartar os antigos
15. Adicionar 420 µL de Isopropanol
16. Guardar no deep freezer por 30 minutos, ou no freezer overnight
17. Incubar por 5 minutos no gelo
18. Centrifugar (14.000 rpm, 4°C) por 10 minutos
19. Descartar o sobrenadante e inverter os tubos na bancada por 3 minutos para retirar o excesso de Isopropanol
20. Ressuspender o pellet de DNA em 20 µL de água miliQ.

ANEXO 2

Extração de proteínas totais solúveis desenvolvida para *Staphylococcus aureus*

Protocolo Detalhado – Extração de PROTEÍNA para *S. aureus*

DIA 1

1. Fazer o pré-inóculo em 5 mL de LB e deixar 24h a 37°C

DIA 2

2. No dia seguinte, colocar 200 mL de LB + os 5 mL da cultura crescida em um erlenmeyer, e colocar a 37°C, sob agitação (180 rpm) por 18 horas. Essas 18 horas não podem ser falhas, porque ela que garante o seu extrato protéico total. Se for comparar entre duas cepas, elas têm que ter crescido exatamente o mesmo tempo para poder garantir com que elas se encontrem na mesma fase do crescimento celular.

DIA 3 – Extração de Proteína

3. Centrifugar a 8.000 g (ou 10.000 rpm) por 10 minutos a 4°C. Com o precipitado celular será feita a extração do proteoma (proteínas solúveis intracelulares e algumas proteínas de parede celular), e com o meio de cultura, o secretoma (proteínas secretadas pelas células bacterianas). Para facilitar, separar o meio de cultura em vários falcons de 50 mL.

APENAS COM O PRECIPITADO CELULAR (PROTEOMA)

4. Ressuspender as células em 4 mL do tampão de lise¹ e transferir para falcons de 15 mL.
5. Adicionar *glass beads* (0,1 mm³).
6. Vortexar 8 vezes. Garantir que as *glass beads* saiam do lugar, porque como elas são mais pesadas, elas tendem a acumular no fundo do falcon. Entre um vortex e outro, esperar 10 minutos no gelo.

OBS: Lembrar que tudo o que for fazer com proteína, tem que ser feito no gelo, para não dar chance de nenhuma proteína desnaturar.
7. Sem centrifugar, esperar um minuto para as *glass beads* voltarem para o fundo do falcon (15 mL) e retirar o sobrenadante, com uma pipeta de 1000 µL, sem pegar as *glass beads*.
8. Nesse novo falcon, centrifugar (5.000 rpm, 15 minutos, 4°C).
9. Remover o sobrenadante e passar para um novo falcon. Descartar o precipitado, que só tem restos celulares.

A partir desse momento, o protocolo para o proteoma e o secretoma são iguais.

10. Adicionar 10% do volume de TCA 100%² a cada falcon.
11. Deixar overnight (entre 16 e 18 horas).
12. Centrifugar (5.000 rpm, 15 minutos, 4°C).
13. Descartar o sobrenadante.
14. Lavar o precipitado protéico com 1 mL de acetona 80%³ gelada (ou menos, desde que seja o suficiente para cobrir 3 vezes o tamanho do precipitado).
15. Deixar os tubos abertos dentro do fluxo para permitir que a acetona evapore, no gelo. Mais ou menos 1 hora ou 1 hora e meia.

Limpeza das Amostras

16. Solubilizar em 2 mL de tampão SDS saturado com sacarose⁴.
17. Adicionar *glass beads* novamente.
18. Vortexar 5 vezes. Entre um vortex e outro, esperar 10 minutos no gelo (Repetir os mesmos cuidados da etapa 6).
19. Adicionar o mesmo volume de fenol (2 mL, ou o quanto tiver de volume no falcon) e misturar por inversão.
20. Centrifugar (5.000 rpm, 20 minutos, 4°C).
21. Transferir a fase fenólica (em cima) para falcon novo.
22. Adicionar 5 vezes o volume de metanol/acetato de amônia⁵ gelado.
23. Deixar overnight (entre 16 e 18 horas).

DIA 4

24. Centrifugar (5.000 rpm, 15 minutos, 4°C).
25. Descartar o sobrenadante, e lavar o precipitado com 1 mL de metanol/acetato de amônia gelado 2 vezes.
26. Lavar com 1 mL de acetona 80% gelada 2 vezes.
27. Deixar os tubos abertos dentro do fluxo para permitir que a acetona evapore, no gelo. Mais ou menos 1 hora ou 1 hora e meia.
28. Ressuspender em tampão de reidratação⁶.

Extração de Proteína – Tampões, Soluções e Cálculos

1. Tampão de Lise:

5,4 g de uréia
0,4 g de chaps
0,15 g de DTT
Completar com H₂O mili-Q para 10 mL

On...

18,9 g de uréia
0,525 de DTT
5 uL de Tween 20
Completar com H₂O mili-Q para 35 mL

2. Cálculos para 10% de TCA:

Se o TCA estiver a 100%...

$$100\%.V1=10\%.(40+V1)$$

$$100\%.V1=10\%.(40+V1)$$

$$10V_1 = 40 + V_1$$

$$10V_1 - V_1 = 40$$

$$9V_1 = 40$$

$$V_1 = 40/9$$

V1=4,4 mL

OBS: 40 mL aqui é o volume onde será adicionado o TCA. Pode ser substituído por qualquer outro valor.

Se o TCA estiver a 50%...

$$50\%.V1=10\%.(40+V1)$$

$$50\%.V1 = 10\%.(40 + V1)$$

$$5V_1 = 40 + V_1$$

$$5V_1 - V_1 = 40$$

$$4V_1 = 40$$

$$V_1 = 40/4$$

$V_1 = 10 \text{ mL}$

3. Acetona 80%:

800 mL de Acetona

200 mL de H₂O mili-Q

4. Tampão SDS saturado com sacarose:

15 gramas de sacarose 99,9%

5 mL de TRIS-HCl, pH 8, 1 M

10 mL de SDS 10%

2,5 mL de β -mercaptoetanol 100%

Completar com H₂O mili-Q para volume final de 50 mL

5. Metanol/Acetato de amônia 0,1 M:

1 L de metanol

7,7 g de acetato de amônia

6. Tampão de reidratação:

10,5 g de uréia

3,8 g de tiouréia

0,5 g de chaps

50 uL de azul de bromofenol 1%⁷

Completar com H₂O mili-Q para volume final de 25 mL

7. Azul de bromofenol 1%:

100 mg de azul de bromofenol

60 mg de TRIS-base

Completar com H₂O mili-Q para volume final de 10 mL

10. Curriculum vitae (Lattes)

Ana Carolina de Oliveira Luz

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Ana Carolina de Oliveira Luz
Filiação Marcos Antônio do Couto Luz e Ana Cláudia Fernandes de Oliveira Luz
Nascimento 28/11/1990 - Recife/PE - Brasil

Formação acadêmica/titulação

2013 - 2015 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Orientador: Tereza Cristina Leal Balbino
Co-orientador: Mariana Andrade-Figueiredo
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Antônio Henrique Santana Cavalcante. **INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE Staphylococcus aureus**. 2013. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco

2. Emanuelle Cordeiro Azevedo Souza. **INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE Staphylococcus aureus**. 2014. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XX Encontro de Genética do Nordeste**, 2014. (Encontro)
Análise de fatores de virulência em isolados clínicos de Staphylococcus aureus com diferentes contextos genéticos.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE**, 2014. (Reunião)
Investigação molecular de fatores de virulência em isolados clínicos de Staphylococcus aureus.

3. Avaliador no(a) **II Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde**, 2014. (Congresso)
Avaliador de Painéis.

4. Avaliador no(a) **XX Ciência Jovem**, 2014. (Exposição)
Avaliador de Trabalhos.

5. Avaliador no(a) **XIX Ciência Jovem**, 2013. (Exposição)
Avaliador de Trabalhos.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2013.
(Congresso)
Estudo dos fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes e meticilina sensíveis relacionados a clones internacionais isolados de amostras clínicas.

Organização de evento

1. **LUZ, A. C. O.** **III Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2013. (Congresso, Organização de evento)