



Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Departamento de Genética e Evolução - DGE
Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada - LBGA

Marlon Breno Zampieri Lima

Diversidade molecular de fatores de virulência em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de lesões de pé diabético

São Carlos - SP

2023



Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Departamento de Genética e Evolução - DGE
Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada - LBGA

Marlon Breno Zampieri Lima

Diversidade molecular de fatores de virulência em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de lesões de pé diabético

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal de
São Carlos, como requisito para obtenção
do título de **Bacharel em Biotecnologia**.

Área de concentração: Genética molecular

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Cristina da Silva Pranchevicius

São Carlos - SP

2023

Folha de aprovação

Nome: LIMA, Marlon Breno Zampieri.

Título: Diversidade molecular de fatores de virulência em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de lesões de pé diabético.

Trabalho de conclusão de curso desenvolvido visando aprovação na disciplina TCC2, com objetivo de obtenção do título de bacharel em biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos.

Aprovado em: ___/___/_____

Banca avaliadora

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho,

À meus pais, José Mauro e Eliana, os quais não só me conceberam mas me nutriram, em corpo, alma e espírito, me amando e me provendo incondicionalmente também durante toda a graduação.

Ao meu irmão, Bruno, que sempre revive em mim a curiosidade e o orgulho por ser um homem da ciência.

Especialmenbte às minhas avós; “Vó Bia”, que infelizmente partiu durante as etapas finais da minha graduação, mas que sempre acreditou em mim e torceu pelo meu sucesso e à “Vó Talina”, que agora esquece quem somos, esquece meu nome mas que, de alguma forma, não esquece de me amar e sorrir abertamente pra mim.

Agradecimentos

Agradeço,

À ProfA. DrA. Maria Cristina da Silva Pranchevicius, por seus ensinamentos, paciência permanente, tempo, disponibilidade e orientação neste trabalho;

À Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha e Prof. Dr Iran Malavazi, por terem disponibilizado seu laboratório para a realização de experimentos e apoio durante o projeto;

Aos queridos Adriele Rocha e Arthur Dutra, Pedro Osmar e Leonardo Aoyagi, Paulo Lisboa e todos os membros da “República Sua Mãe”, por abrirem seus lares e me acolherem com conforto e amizade nos últimos dois meses de andamento deste trabalho;

Aos amigos conquistados na Biotec 016 – em especial aos queridos Samuel Pratavieira, Katiane Tostes, Isabelle Taira, Ideli Zanenco e Lucas Sustena: grato pelo tempo na presença de cada um, sem os quais esse momento da minha vida provavelmente não teria se concretizado deixando tamanha marca no coração;

A Guilherme Rodrigues e Renato Domingos, meus melhores amigos, no cerne do termo, que sempre estão presentes com conselhos valiosos, discussões produtivas, amizade e irmandade;

À cidade de São Carlos, por ser estímulo de autoconhecimento e constante evolução pessoal;

À Alexandra Elbakyan, idealizadora e programadora do *Sci-hub*, pela luta e democratização na acessibilidade do conhecimento científico;

À ciência, por dar sentido e sabor a minha existência;

Aos membros da banca, por disponibilizarem seu tempo e conhecimento nesse momento tão importante.

“O olho vê somente o que a mente está preparada para compreender.”

-DAVIES, Robertson (Tempest-Tost).

Resumo

O *diabetes mellitus* é uma doença de alta prevalência na população humana atual, que pode levar a complicações como a neuropatia diabética e a doença vascular periférica; ambas são fatores de risco para o aparecimento das lesões do pé diabético, que por sua vez podem se agravar por infecções polimicrobianas das quais a espécie *Staphylococcus aureus* é um dos principais e mais frequentes microrganismos presentes. O presente estudo teve como objetivo analisar genes de fatores de virulência comuns em *S. aureus* (n = 25), isolados de feridas em pés de pacientes com diabetes no Hospital Geral de Palmas, Tocantins. Os genes de virulência (*fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *sasX*, *hIA*, *hIB*, *hlgCB*, *seA*, *seB*, *seD*, *sel*, *seH*, *etA*, *etB*, *etD*, *lukED*, *LukPV*, *EDIN*, *arcA*, *Agr I*, *Agr II*, *Agr III* e *Agr IV*), biofilme (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*) e cápsula (*cap5* e *cap8*) foram detectados através de ensaios de PCR convencional. Os resultados dos ensaios mostraram a presença dos genes TSST em 14 amostras (56%); *arcA* em 10 (40%); *clfB* e *etA* em 9 (36%); *icaA* em 8 (32%); *cap5* e *LukPV* em 6 (24%); *icaD* em 5 (20%); *lukED* em 4 (16%); *sel* em 3 (12%); *Agr II* e *hIB* em 2 (8%) e *Agr I*, *hlgCB* e *fnbB* em 1 amostra (4%). Os genes *clfA*, *etb*, *etd*, *fnbA*, *sasX*, *hIA*, *EDIN*, *seA*, *seB*, *seD*, *seH*, *icaB*, *icaC*, *Agr III*, *Agr IV* e *cap8* não foram detectados. Das 25 amostras, 6 não apresentaram amplificação para nenhum gene, e uma amostra (33A) apresentou amplificação para 11 genes (35% do painel total de genotipagem). A amostra 11A apresentou configuração genética compatível com a descrita na literatura para marcador clonal de USA300. As amostras 33A e 33B apresentaram genótipo composto para *icaA+icaD+cap5*. A presença difusa encontrada do gene da síndrome do choque tóxico (TSST) em vários isolados alerta para aumento na dificuldade de tratamento devido a sua associação com cepas multidroga-resistentes. Mais estudos são necessários para entender a patogenicidade dessas cepas nas infecções do pé diabético.

Palavras-chave: Pé diabético, *Staphylococcus aureus*, Fatores de virulência, Reação em cadeia da polimerase, Diversidade genética

Abstract

Diabetes mellitus is a highly prevalent disease in the current human population, which can lead to complications such as diabetic neuropathy and peripheral vascular disease; both are risk factors for the appearance of diabetic foot lesions, which in turn can be aggravated by polymicrobial infections of which the *Staphylococcus aureus* species is one of the main and most frequent microorganisms present. The present study aimed to analyze genes of common virulence factors in *S. aureus* (n = 25), isolated from wounds on the feet of patients with diabetes at Hospital Geral de Palmas, Tocantins. The virulence genes (*fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *sasX*, *hIA*, *hIB*, *hlgCB*, *seA*, *seB*, *seD*, *sel*, *seH*, *etA*, *etB*, *etD*, *lukED*, *LukPV*, *EDIN*, *arcA*, *Agr I*, *Agr II*, *Agr III* and *Agr IV*), biofilm (*icaA*, *icaB*, *icaC* and *icaD*) and capsule (*cap5* and *cap8*) were detected by conventional PCR assays. Assay results indicated the presence of TSST genes in 14 samples (56%); *arcA* in 10 (40%); *clfB* and *etA* in 9 (36%); *icaA* in 8 (32%); *cap5* and *LukPV* in 6 (24%); *icaD* in 5 (20%); *LukED* in 4 (16%); *sel* in 3 (12%); *Agr II* and *hIB* in 2 (8%) and *Agr I*, *hlgCB* and *fnbB* in 1 sample (4%). The *clfA*, *etB*, *etD*, *fnbA*, *sasX*, *hIA*, *EDIN*, *seA*, *seB*, *seD*, *seH*, *icaB*, *icaC*, *Agr III*, *Agr IV* and *cap8* genes were not detected. Of the 25 samples, 6 showed no amplification for any gene, and one sample (33A) showed amplification for 11 genes (35% of the total genotyping panel). The sample 11A presented a genetic configuration compatible with that described in the literature for the clonal marker of USA300. Samples 33A and 33B showed a composite genotype for *icaA+icaD+cap5*. The diffuse presence of the toxic shock syndrome gene (TSST) found in several isolates alerts to the increase in the difficulty of treatment its association with multidrug-resistant strains. More studies are needed to understand the pathogenicity of these strains in diabetic foot infections.

Keywords: Diabetic foot, *Staphylococcus aureus*, Virulence factors, Polymerase chain reaction, Genetical diversity

Lista de ilustrações

- Figura 1** – Genoma completo do clone USA300 de *S. aureus*.
- Figura 2** – Perfil de virulência de 25 amostras de *S. aureus* isoladas de lesões de pés diabéticos.
- Figura 3** – Visualização de bandas em gel de agarose do gene *TSS1*, com banda com peso molecular de 447 pares de bases correspondentes ao tamanho do *amplicon* do gene.
- Figura 4** – Visualização de bandas em gel de agarose do gene *TSS1*, com os resultados das 6 amostras legendadas no topo da imagem.
- Figura 5** – Frequência de genes de biofilme *ica* e dos sorotipos de cápsula 5 (*Cap5*) e 8 (*Cap8*) nas 25 amostras de *S. aureus* genotipadas.
- Figura 6** – Visualização de bandas em gel de agarose do gene *icaA*, com banda de peso molecular de 770 pares de bases correspondentes ao tamanho do *amplicon* do gene.
- Figura 7** – Visualização de bandas em gel de agarose do gene *icaA*, com os resultados das 6 amostras legendadas no topo da imagem.
- Figura 8** – Frequência do aparecimento global de fatores de virulência por amostra de *S. aureus* genotipada.
- Figura 9** – Comparação das proporções de fatores de virulência encontrados nas amostras de *S. aureus* quando agrupados por fenótipo expresso.
- Figura 10** – Distribuição proporcional de todos os fatores de virulência positivos na coleção de *S. aureus* deste trabalho.

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1 – Classificação de risco de agentes biológicos;

Tabela 2 – Informações sobre os pares de *primers* utilizados para detecção dos genes de virulência;

Tabela 3 –. Relação dos genes de virulência encontrados nas 25 cepas de *S. aureus*

Quadro 1 – Relação dos genes de biofilme e cápsula encontrados nas 25 cepas de *S. aureus*.

Sumário

1 - Introdução	12
1.1 - <i>Diabetes mellitus</i> e a neuropatia diabética	12
1.2 - Pé diabético	12
1.3 - Infecções bacterianas	13
1.4 - A <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.5 - O genoma de <i>S. aureus</i>	16
1.6 - Fatores de virulência	18
1.7 - Patogenicidade em <i>S. aureus</i>	19
1.8 - Fatores de virulência analisados neste trabalho	21
1.9 - Classificação de risco biológico	26
2 - Objetivos	27
2.1 - Objetivos gerais	27
2.2 - Objetivos específicos	28
3 - Metodologia	28
3.1 - Origem das cepas bacterianas e aspectos éticos	28
3.2 - Extração do DNA total	29
3.3 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
4 - Resultados	31
4.1 - Detecção de genes de virulência através de PCR	31
4.2 - Detecção de fatores de virulência associados a formação de biofilme e cápsula	33
4.3 - Proporção entre os fatores de virulência encontrados	37
5 - Discussão	39
6 - Conclusão	46
6.1 - Perspectivas futuras do trabalho	46
7 - Referências bibliográficas	47

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – *Diabetes mellitus* e a neuropatia diabética

O *diabetes mellitus* é uma doença caracterizada pela deficiência de secreção ou ação da insulina no organismo, com grande prevalência na população humana atual e que pode levar a complicações (IDF, 2019; ADA, 2021). A neuropatia diabética é uma dessas complicações frequentes e afeta até 50% dos pacientes portadores, sendo uma complicação que pode levar a uma série de sintomas incluindo dor, formigamento, dormência e fraqueza muscular nos membros inferiores (Tesfaye e Boulton, 2010). Além disso, a neuropatia diabética pode contribuir para o desenvolvimento de úlceras nos pés e amputações nos pacientes (Dyck e Albers, 2011).

Sua patologia é complexa e ainda não está completamente compreendida. Acredita-se que a hiperglicemia crônica seja o principal fator envolvido no desenvolvimento da neuropatia diabética derivada do *diabetes mellitus*. A hiperglicemia crônica leva a uma série de alterações metabólicas e estruturais nos nervos periféricos afetando os nervos sensoriais, motores e autônomos (Callaghan *et al.*, 2012), levando a formação de produtos finais de glicação avançada, aumento da produção de radicais livres e disfunção mitocondrial (Pop-Busui *et al.*, 2017). Além disso, a disfunção endotelial, o estresse oxidativo, a inflamação e fatores genéticos também têm sido implicados em seu desenvolvimento (Tesfaye, 2012).

O controle da glicemia é fundamental no progresso e prevenção da neuropatia diabética e os pacientes podem ser tratados com analgésicos, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, opioides e outras medicações para a dor (Callaghan *et al.*, 2012). A prevenção de complicações inclui o uso de calçados adequados e o cuidado constante dos membros inferiores mas, em casos onde estes cuidados são subestimados, pode haver o aparecimento e recorrência das feridas e escaras características da complicação denominada de “pé diabético” (Dyck e Albers, 2011).

1.2 – Pé diabético

O pé diabético (PD) é definido como uma infecção, ulceração ou destruição de tecidos profundos dos membros inferiores, principalmente nos pés, associados com anormalidades neurológicas. Essas feridas geralmente aparecem em locais onde se exerce maior pressão, como por exemplo nas plantas dos pés (IDF, 2017). Cerca de 15% das pessoas com diabetes desenvolvem úlceras nos pés e 2,5% acabam sofrendo amputações (International Diabetes Federation, 2017). Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do pé diabético são a neuropatia diabética, a doença vascular periférica, a história prévia de úlceras nos pés e o tempo de duração do *diabetes mellitus* (Boulton *et al.*, 2008). A doença vascular periférica, que também é comum em pacientes diabéticos, está associada ainda ao aumento do risco de amputações (Hinchliffe, 2016).

1.3– Infecções bacterianas

A infecção bacteriana é uma das principais complicações do pé diabético, podendo levar a amputação, incapacidade e mortalidade. Neste contexto, é importante entender a epidemiologia e os fatores de risco para tais infecções, uma vez que há um índice de que aproximadamente 60% das úlceras de pé diabético se tornam infectadas (Lipsky, 2007), e dentre os fatores de risco destacam-se os o controle inadequado da glicemia, neuropatia diabética, doença vascular periférica, trauma, deformidades ósseas e calosidades (Li Y, 2020). Estas infecções tem caráter polimicrobiano, causadas por comunidades bacterianas, sendo que a presença dessa grande variedade de espécies é um fator dificultante para o diagnóstico e tratamento, além de aumentar o risco de complicações e de um prognóstico negativo (Cardoso *et al.*, 2018).

As infecções polimicrobianas são comuns em várias condições clínicas, incluindo infecções do trato respiratório, infecções da pele e tecidos moles, infecções do trato urinário e infecções intra-abdominais. A presença de múltiplas espécies bacterianas pode dificultar o diagnóstico e o tratamento, além de aumentar o risco de complicações (Garcia *et al.*, 2021). A patogênese dessas infecções envolve a interação entre as diferentes espécies bacterianas, bem como com o hospedeiro. Essas interações podem levar à formação de biofilmes

bacterianos, que são complexas comunidades bacterianas aderidas a um substrato biológico ou abiótico e embebidas em matriz (Malone *et al.*, 2017). Os biofilmes bacterianos podem ser altamente resistentes aos antibióticos e ao sistema imunológico, dificultando o tratamento e favorecendo a persistência da infecção (Parsek & Singh, 2003). Dentre os gêneros mais comuns de bactérias encontradas nessas infecções, são citados *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* e os estafilococos, sendo a *Staphylococcus aureus* a mais representativa, seguida de *Staphylococcus epidermidis* (Rodriguez *et al.*, 2014; Gelatti *et al.*, 2014).

A colonização de feridas por *S. aureus* é um fator de risco para o desenvolvimento de infecções. Esta bactéria está naturalmente presente na flora normal do corpo humano, especialmente na pele e nas narinas (Thammavongsa *et al.*, 2015). No entanto, a presença deste microrganismo na ferida pode levar a um aumento da inflamação e retardar o processo de cicatrização que, associada a resistência a antimicrobianos, é uma característica preocupante que pode levar ao fracasso do tratamento. Um estudo conduzido por Lourtet-Hascoët e colaboradores em 2018 demonstrou que a resistência à meticilina em *S. aureus* isolados de feridas é um problema crescente, com taxas de resistência acima de 50% em algumas regiões do mundo. A infecção de feridas por *S. aureus* pode levar a complicações graves, como septicemia e osteomielite (Santos *et al.*, 2007; Thammavongsa *et al.*, 2015). Ainda, a presença de fatores de virulência como as enterotoxinas, pode desencadear reações imunológicas exacerbadas, levando a síndrome do choque tóxico (Lamaita *et al.*, 2005; Carfora *et al.*, 2015).

1.4– A *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva esférica (cocos), que pode ser encontrada tanto na forma isolada como em aglomerados de colônias arredondadas, lisas e brilhantes que vão do acinzentado ao amarelo-ouro; sua superfície pode apresentar diferentes tipos de estruturas, como a presença de cápsula, peptidoglicano, ácido teicóico e proteínas de ancoragem à parede celular (Gründling *et al.*, 2010). O ácido teicóico e o peptidoglicano, principais constituintes dessa estrutura, são os responsáveis pela forma esférica da célula (Foster, 2005). Quando a bactéria apresenta cápsula, esta é constituída de

polissacarídeos, que confere resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Sayed *et al.*, 2012). Trata-se de uma bactéria cosmopolita, comumente encontrada em humanos e pode causar uma variedade de infecções, desde infecções de pele até doenças mais graves, como pneumonia e bacteremia. Sua taxonomia foi historicamente baseada em características fenotípicas, como a presença de catalase, coagulase e a capacidade de fermentar manitol, no entanto, a taxonomia molecular mostrou que existem várias subespécies e linhagens genéticas de *S. aureus* (Lindsay, 2014). A identificação taxonômica de *S. aureus* é uma tarefa importante para a compreensão da epidemiologia, virulência e resistência desse patógeno bacteriano.

Nos últimos anos, diversos estudos têm tratado de novas abordagens para a identificação precisa e rápida de *S. aureus*, incluindo ensaios fenotípicos e o uso de técnicas moleculares, tendo esta última se mostrado uma ferramenta valiosa, permitindo não só a identificação da espécie mas também a detecção de variantes genéticas associadas à virulência e resistência antimicrobiana. Técnicas como a PCR em tempo real, sequenciamento de genomas completos e análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) têm sido amplamente utilizadas para a identificação de *S. aureus* em diferentes amostras clínicas e ambientais (Köck *et al.*, 2013; Tong *et al.*, 2020). Além disso, a análise fenotípica tem sido aprimorada com o uso de novas tecnologias, como a espectrometria de massa por MALDI-TOF, que permite a identificação prática de *S. aureus* com alta sensibilidade e especificidade (Hoyos-Mallecot *et al.*, 2017). Outras técnicas fenotípicas, como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e a tipagem multilocus de sequência (MLST), também são amplamente utilizadas na identificação da bactéria em diferentes contextos clínicos e epidemiológicos (Valentin-Domelier *et al.*, 2011). Em conjunto, essas técnicas moleculares têm fornecido uma visão mais precisa e abrangente da sua identidade taxonômica, permitindo a identificação de variantes genéticas e fenotípicas associadas à virulência e resistência antimicrobiana. A utilização dessas abordagens para a identificação taxonômica de *S. aureus* é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de infecções por esse patógeno.

Análises genômicas comparativas recentes de *S. aureus* revelaram a presença de uma variedade de elementos genéticos móveis como plasmídeos,

bacteriófagos e ilhas genômicas, que contribuem para a diversidade genética desta bactéria (Lowder *et al.*, 2009). Esses elementos podem conter genes de virulência, resistência a antimicrobianos e fatores de adaptação ao hospedeiro, que contribuem para a patogenicidade em *S. aureus*. Além disso, sua análise filogenética mostrou que o táxon dessa bactéria pode ser dividido em vários agrupamentos genéticos, denominados *Clusters de Agrupamento de S. aureus* (SCCmec). Esses agrupamentos foram descobertos por meio da análise de elementos cromossômicos móveis que contêm genes de resistência a meticilina (*mecA*) (Ito *et al.*, 2004). Os SCCmec foram divididos em vários tipos, cada um com diferentes perfis de resistência a antimicrobianos e características epidemiológicas (Oliveira e Lencastre, 2002).

1.5– O genoma de *S. aureus*

O genoma do *S. aureus* é altamente adaptativo e pode sofrer variações por meio de processos como recombinação homóloga, transferência horizontal de genes e mutação. Estudos de genômica comparativa têm mostrado que diferentes linhagens de *S. aureus* apresentam variações em seu conteúdo gênico, incluindo genes que codificam fatores de virulência e resistência a antibióticos (Lowy, 1998). A análise do genoma completo de *S. aureus* tem sido uma ferramenta importante para entender a diversidade genética da bactéria e a evolução de suas diferentes linhagens (Tagini e Greub, 2017).

Um exemplo de variação genética em *S. aureus* é a presença do gene *mecA*, que confere resistência à meticilina, um antibiótico comumente utilizado no tratamento de infecções causadas por esta bactéria. Estudos genômicos têm mostrado que o gene *mecA* está frequentemente localizado no elemento genético móvel SCCmec, que pode ser transferido horizontalmente entre diferentes linhagens do gênero *Staphylococcus* (Shore e Coleman, 2013). Desse modo, o conhecimento sobre a estrutura e a distribuição do SCCmec em diferentes linhagens de *S. aureus* é importante para entender a epidemiologia e a evolução da resistência à meticilina nesta bactéria (Deurenberg e Stobbering, 2008).

Além da resistência a antibióticos, o *S. aureus* possui uma ampla variedade de fatores de virulência que contribuem para sua capacidade de causar

infecções. Estudos genômicos têm identificado genes que codificam proteínas envolvidas na adesão à superfície das células hospedeiras, na degradação de tecidos e na produção de toxinas (Novick e Geisinger, 2008). Um exemplo de proteína de adesão é a Ligante de fibronectina A (FnBPA), que é codificada pelo gene *fnbA*. Estudos recentes mostraram que a presença do gene *fnbA* em diferentes linhagens de *S. aureus* está diretamente associada à virulência da bactéria (Foster, 2005).

Um estudo conduzido por Diep *et al.* em 2006 executou o sequenciamento completo da cepa USA300, um clone epidêmico de *S. aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade, evidenciando o complexo mosaico de genes associados a resistência adquirida, ilhas de virulência, genes associados a produção de biofilmes entre outros, como é mostrado na **figura 1**.

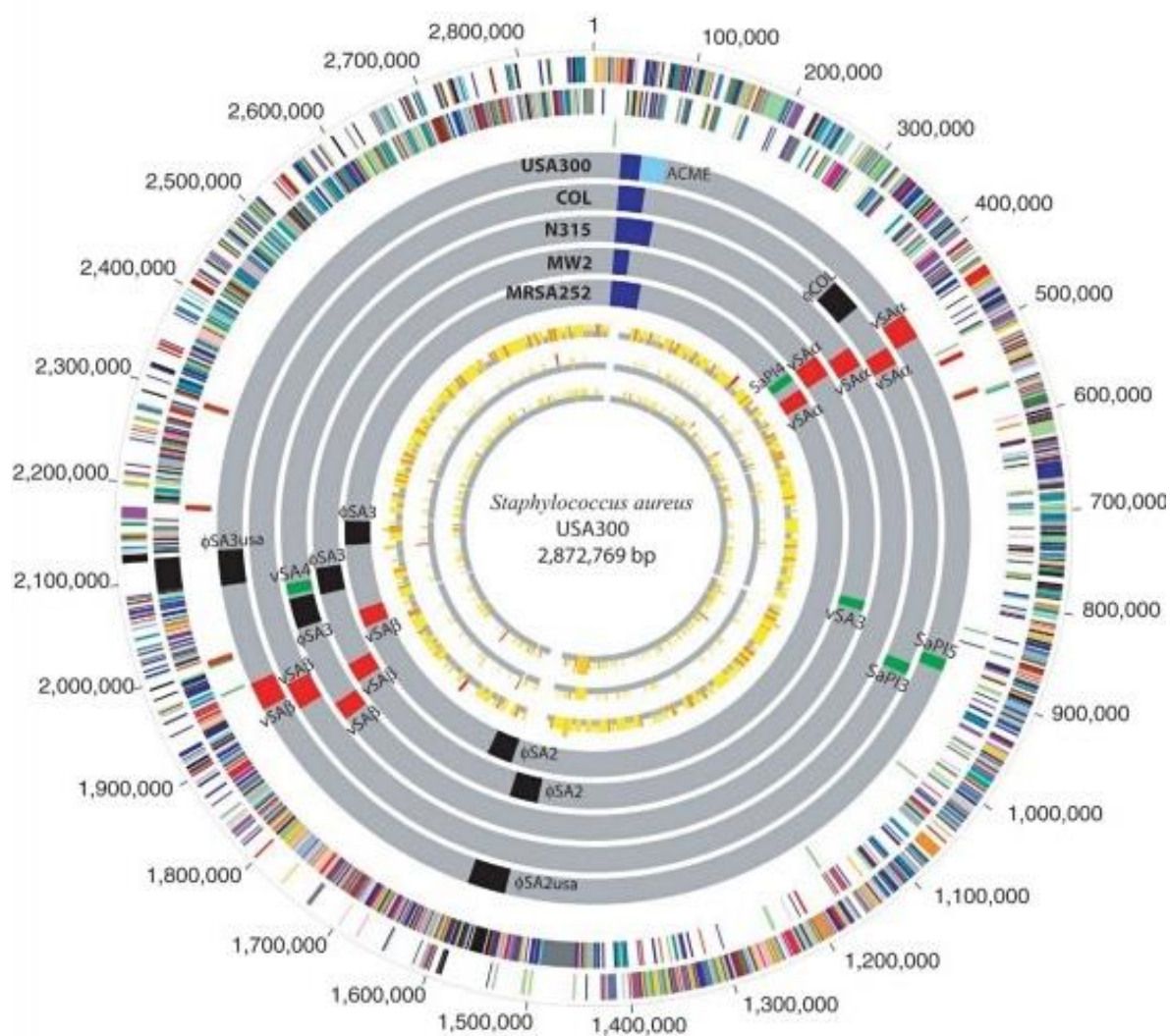


Figura 1 – Genoma completo do clone USA300 de *S. aureus* (Diep *et al.*, 2006). Cada círculo numerado do mais externo ao mais interno, representa os dados genômicos obtidos para *S. aureus* USA300 cepa FPR3757 e comparação com outras cepas: COL, N315, MW2 e MRSA252. Os dois primeiros círculos representam as genes de codificação previstas nas fitas *sense* e *antisense*, respectivamente, coloridas de modo a legendar as sequências por suas funções sendo em salmão genes de biossíntese de aminoácidos; azul claro genes de biossíntese de cofatores e grupos prostéticos; verde claro genes de envelope da célula; vermelho sequências processos celulares (*housekeeping*); marrom sequências de metabolismo intermediário central; amarelo genes de metabolismo do DNA; verde escuro sequências de metabolismo energético; roxo genes de metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídios; rosa genes de síntese e endereçamento de proteínas; laranja genes de metabolismo de ácidos nucleicos; azul escuro genes de funções regulatórias; cinza genes de transcrição; turquesa genes de transporte e de proteínas de ligação e em preto genes de proteínas hipotéticas e conservadas. O terceiro círculo mostra rRNA (vermelho), sRNA (azul) e tRNA (verde). Do quarto ao oitavo círculos - cepas USA300 FPR3757, COL, N315, MW2 e MRSA252, respectivamente – exibe-se sequências identificadas como ilhas de virulência (verde ou vermelho), prófago (preto), SCCmec (azul) e ACME (azul claro). O nono círculo exibe SNPs totais por 5 kb em comparação com *S. aureus* cepa COL e por fim, o décimo e o décimo primeiro círculos, respectivamente, apresentam os dados relativos ao número de SNPs sinônimos e não sinônimos encontrados dentro dos genes de codificação comparando com a cepa COL. **Fonte (adaptado):** Diep, Binh An *et al.* “Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*.”, 2010.

1.6 – Fatores de virulência

Fatores de virulência são componentes moleculares que conferem a um microrganismo a capacidade de causar doença em um hospedeiro suscetível. Eles incluem uma ampla variedade de estruturas, como proteínas secretadas, toxinas, polissacarídeos de superfície e moléculas de adesão (Bhattacharya *et al.*, 2015). As toxinas podem ser produzidas e liberadas durante a infecção, ou podem ser produzidas dentro das células do hospedeiro infectadas. Por exemplo, a toxina botulínica produzida por *Clostridium botulinum* é uma proteína que bloqueia a liberação de neurotransmissores nas terminações nervosas, levando à paralisia muscular (Rossetto *et al.*, 2014). Outro fator de virulência importante é a capacidade do microrganismo de evitar ou suprimir a resposta imunológica do hospedeiro. Isso pode ser feito por meio da modificação da superfície celular, evitando o reconhecimento pelo sistema imunológico, ou pela produção de proteínas que inibem a atividade dos leucócitos do hospedeiro (Bardoel *et al.*, 2012).

S. aureus pode causar diversas infecções em humanos, desde infecções cutâneas leves até infecções sistêmicas graves, como endocardite e septicemia e sua capacidade em causar essas e outras doenças está relacionada à produção de diversos fatores de virulência (Bhattacharya *et al.*, 2016; Falkow,

2017). Um exemplo de seus fatores de virulência é a produção de proteínas adesinas que permitem que a bactéria se ligue a células e tecidos do hospedeiro. Entre suas proteínas adesinas, destacam-se a proteína A (SpA) e a já mencionada ligante de fibronectina (FnBP), que se ligam a moléculas presentes na superfície das células hospedeiras (Foster, 2019). Outro fator de virulência importante de *S. aureus* é a produção de toxinas, que podem causar danos celulares e levar a sintomas como febre, vômitos e diarreia (Otto, 2014). Além disso, *S. aureus* é capaz de produzir enzimas que permitem que a bactéria degrade componentes do tecido do hospedeiro e escape do sistema imune. Entre essas enzimas, destacam-se a estafiloquinase, que degrada a fibrina, e a catalase, que neutraliza os radicais livres produzidos pelas células do hospedeiro (Cheung & Otto, 2018).

1.7 – Patogenicidade em *S. aureus*

Como já mencionado, a patogenicidade de *S. aureus* está ligada a quais fatores de virulência o clone irá carregar em seu genoma (Boyle-Vavra & Daum, 2006; Sotto *et al.*, 2008; Diep & Otto, 2008). Um dos principais fatores de virulência já citado é capacidade de produção de toxinas, como outro exemplo a toxina alfa-hemolisina (HIA), que pode causar danos às células hospedeiras e induzir a morte celular (Otto, 2014). Estudos recentes mostraram que a Hla também pode ativar a inflamação do tecido pulmonar e contribuir para a patogênese da pneumonia causada por *S. aureus* (Inoshima *et al.*, 2011; Wilke & Bubeck-Wardenburg, 2010). Além disso, como mencionado anteriormente, o *S. aureus* é capaz de formar biofilmes, que são comunidades de células bacterianas aderidas a uma superfície e envoltas em uma matriz extracelular polissacarídica. Por sua natureza polimérica, esses biofilmes são muito resistentes a difusão de fármacos, como antibióticos e ao sistema imunológico do hospedeiro, o que torna o tratamento das infecções por *S. aureus* ainda mais difícil (Otto, 2013).

As sequências associadas a fenótipos de virulência podem estar agrupadas nas chamadas ilhas de virulência ou ilhas de patogenicidade, que por definição são regiões do genoma bacteriano que possuem genes que conferem vantagens adaptativas, como resistência a antibióticos, capacidade de colonizar e

sobreviver em diferentes ambientes, e produção de toxinas. Essas ilhas geralmente são transferidas horizontalmente entre diferentes cepas bacterianas, o que pode aumentar a virulência e a patogenicidade dessas bactérias (Hacker & Kaper, 2017). Um exemplo de ilha de virulência é a *pathogenicity island 1* (SPI-1), presente em *Salmonella enterica*. A SPI-1 é responsável pela invasão das células intestinais e pela produção de inflamação no hospedeiro (López-Garrido e Casadesús, 2010). Outra ilha de virulência importante é a *genomic island 1* (GI-1), presente em *Acinetobacter baumannii*. A GI-1 contém genes que conferem resistência a antibióticos, além de genes envolvidos na colonização e persistência em ambientes hospitalares (Karah *et al.*, 2012). Alguns estudos têm mostrado que as ilhas de virulência podem ser reguladas por sistemas de *quórum sensing*, que são mecanismos de comunicação celular utilizados por bactérias para coordenar a expressão coletiva de genes como por exemplo em *Vibrio cholerae*, onde a produção de toxina é regulada por esse mecanismo, o que permite que as bactérias ajustem a produção de toxina de acordo com a densidade populacional (Ng & Bassler, 2019). Desse modo, a identificação e caracterização dos genes presentes nas ilhas de virulência podem ser úteis nos levando a entender a evolução e a adaptação das bactérias e assim ajudar no desenvolvimento de novas estratégias e tratamentos de infecções protagonizadas por elas.

Dentre os fatores que contribuem para a virulência de *S. aureus* estão os genes de virulência responsáveis por codificar proteínas envolvidas em processos como adesão, invasão e destruição de células hospedeiras (Lakhundi e Zhang, 2018; Foster, 2004). Um dos genes de virulência mais conhecidos de *S. aureus* é o gene codificador da toxina Pantón-Valentine (*PVL*), que é uma citolisina que pode causar necrose de tecidos e leucocitólise. O *PVL* é associado a infecções de pele e tecidos moles, como furúnculos e abscessos, além de infecções mais graves, como pneumonia necrosante e sepse (Otto, 2012). Outro fator de virulência relevante de *S. aureus* são os genes codificadores da enterotoxina estafilocócica (*SE*), uma toxina que pode causar intoxicação alimentar. Estudos mostraram que o subtipo *SeA* está presente em cerca de 50% das cepas clínicas de *S. aureus* e sua produção é regulada por fatores de transcrição específicos como *AgrA* e *SarA* (Heinrichs *et al.*, 1996; Misawa *et al.*, 2015).

Uma vez que a frequência de fatores de virulência nas bactérias podem ser influenciada por vários agentes adaptativos (Karah *et al.*, 2012; Hacker & Kaper, 2017), um cenário onde a situação de infecções polimicrobianas torna-se mais preocupante é o ambiente hospitalar, com o agravante do fenômeno da resistência antimicrobiana em decorrência de situações recorrentes neste tipo de ambiente, como por exemplo o uso inadequado de antibióticos e de acessórios de diagnóstico e de tratamento invasivos (cateteres urinários e respiratórios) bem como sua esterilização ineficiente sobretudo em unidades de terapia intensiva; doenças intercorrentes que declinam para internações; pacientes com queimaduras extensas e por fim as comorbidades e particularidades de cada caso, como idade e condição imunológica (de Melo *et al.*, 2020 *apud* Dallacorte *et al.*, 2016; Waele *et al.*, 2018). Neste contexto, *S. aureus* é uma das principais agentes acusadoras de infecções nosocomiais, sendo os seus clones de cepas resistentes a meticilina os protagonistas da situação problema (Magill *et al.*, 2014). A exemplo disso, mesmo tendo apresentado algum declínio de casos de infecções hospitalares contabilizados de 2005 a 2011 nos Estados Unidos, os casos de infecção por esta espécie nesses ambientes ainda se mantem significativamente preocupantes para a saúde pública local (Gajdács, Urbán & Terhes, 2019).

1.8– Fatores de virulência analisados neste trabalho

Alguns fatores de virulência encontrados no gênero *Staphylococcus* são comumente descritos como associados às infecções humanas. Dentre estes, elenca-se no presente trabalho alguns grupos organizados em genes codificadores de fatores de adesão como as adesinas ligadoras de fibronectina *fnbA*, *fnbB*, os fatores de ligação (*Clumping factors*) *clfA*, *clfB* e o gene *sasX*; codificadores de toxinas como os genes de hemolisina *h1A*, *h1B* e *hlgCB*, os genes de enterotoxinas *seA*, *seB* e *seD*; de exotoxinas *etA*, *etB* e *etD* e os genes de leucocidinas *lukED* e *LukPV (PVL)*. Outros genes selecionados neste trabalho incluem fatores de virulência associados a colonização como de enterotoxinas *sel* e *seH* e o *EDIN*; reguladores genéticos como o Elemento móvel do catabolismo de Arginina (*arcA*) e os genes *Agr* (subtipos *I*, *II*, *III* e *IV*); superantígenos como o gene da Toxina da síndrome do choque tóxico (*TSST*) e

também os genes associados a formação de biofilme do complexo *ica* (tipos *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*). Dois genes relacionados a formação de cápsula também foram triados, sendo eles *Cap5* e *Cap8*.

Os genes *fnbA* e *fnbB* codificam para as Proteínas ligadoras de fibronectina A (FnBPA) e B (FnBPB), respectivamente, sendo fatores importantes para a colonização do hospedeiro humano uma vez que a FnBPA tem a capacidade de se associar a fibronectinas da matriz extracelular e a FnBPB ao fibrinogênio presente no sangue (Sinha *et al.*, 1999 ; Shinji *et al.*, 2011). Sua expressão pode ser regulada por fatores ambientais, como a presença de íons metálicos, pH e temperatura (Sinha *et al.*, 1999), tendo uma regulação complexa que envolve diversos sistemas de regulação, incluindo o sistema *Agr* (Accessory gene regulator) e o sistema *Sae* (*S. aureus* exoprotein expression) (Saïd-Salim *et al.*, 2003). Há ainda grande diversidade genética de *FnbA* e *FnbB* com diferentes variantes destes genes em linhagens bacterianas distintas, o que sugere que a evolução deles pode estar relacionada a adaptação bacteriana á diferentes nichos (Loughman *et al.*, 2008; Burke *et al.*, 2010).

As sequências *clfA* e *clfB* codificam proteínas de superfície ligadoras de fibronectina, as *clumping factors*, em situações distintas sendo a *clfA* expressa na ausência de plasma e está mais associada a colonização de pele e mucosas (McDevitt *et al.*, 1994), enquanto que a *clfB* é expressa em contato com plasma humano e indicada como importante na colonização do trato respiratório superior (Siboo *et al.*, 2001). A regulação destes genes envolve vários fatores independentes, o que sugere que as proteínas codificadas desempenham papéis diferentes em infecções distintas (Cheung *et al.*, 2008).

O *sasX* é associado a colonização e a severidade das infecções de pele e pulmões em hospitais, sendo descrito com grande prevalência asiática, como na China, sendo o codificador de uma proteína de superfície bacteriana com potencial para ligação á vários alvos humanos (Li *et al.*, 2012). De frequência rara nas cepas da comunidade, este gene é predominantemente espalhado em ambientes hospitalares (Li *et al.*, 2012).

Os genes de hemolisina *hIA*, *hIB* e *hlgCB* codificam para as subunidades alfa, beta e gama da hemolisina gama, uma porina que interage com as membranas celulares e promove a lise de neutrófilos, monócitos e macrófagos de humanos e primatas; ao entrar em contato com o sangue humano, há a regulação positiva

da secreção desses fatores que lisando também eritrócitos, fornece a *S. aureus* acesso a hemoproteínas e ao ferro (Malachowa; DeLeo, 2011; Becker *et al.*, 2014).

Um dos principais fatores de virulência de *S. aureus* é a produção de de enterotoxinas como as da família SE (*SeA*, *SeB*, *SeD*, *Sel* e *SeH*), todas codificando proteínas relacionadas mais comumente com infecções alimentares (Chen & Sangma, 2019; Nasaj *et al.*, 2020). Os genes *seA* e *seB* são dois genes de virulência que codificam enterotoxinas estafilocócicas que podem desencadear uma resposta imune e inflamatória no hospedeiro (Schad *et al.*, 1997). A expressão desses genes é regulada pelo sistema *Agr* e sua prevalência varia de acordo com a região geográfica. Suas toxinas resistem a condições adversas do trato gastrointestinal, o que aumenta a capacidade de *S. aureus* de causar intoxicação alimentar (Balaban & Rasooly, 2000). Os genes *seD* e *sel*, encontrados respectivamente em plasmídeos e no cromossomo (de Oliveira Calsolari *et al.*, 2011), também codificam enterotoxinas estafilocócicas, com produtos gênico de baixo peso molecular, termotolerantes e também muito relacionado com intoxicações alimentares (Bhatia & Zahoor, 2007; MANFREDI *et al.*, 2010). Alguns estudos mostram que o gene *seD* pode estar de alguma forma associado a regulação de produção de biofilme e mutações no gene *sel* podem estar relacionadas com a transmissão de *S. aureus* entre humanos e animais, uma vez que cepas com mutações neste gene foram encontradas em animais de fazenda e seus tratadores (Cuny *et al.*, 2006). A presença do gene *seH*, além de estar associada a capacidade de colonização, pode ser usada para detecção de linhagens hipervirulentas e/ou epidêmicas da cepa ST1/USA400, também conhecida como MW2 (Diep & Otto, 2008).

As toxinas esfoliativas expressas pelos genes *ET* são toxinas secretadas produzidas por várias espécies estafilocócicas, causando bolhas tanto em infecções humanas como em animais (Ladhani *et al.*, 1999). Três (*etA*, *etB* e *etD*) dos quatro diferentes subtipos desta toxina estão ligados diretamente a infecções em humanos (Dunyach-Remy *et al.*, 2016). O gene *etA* de *S. aureus* codifica a exotoxina alfa, que é uma proteína secretada no meio, causa lise de células hospedeiras e é capaz de induzir a produção de citocinas inflamatórias (Li *et al.*, 2012). O gene *etB* codifica a exotoxina beta, uma proteína também secretada no meio, que causa dano tecidual e cuja expressão é regulada

negativamente pelo gene *mgrA*, que também regula a expressão de outras proteínas de virulência em *S. aureus* (Chen *et al.*, 2013). Já a presença do gene *etD* em triagens moleculares de *Staphylococcus* é considerada marcador clonal para a linhagem caMRSA ST80, também conhecido de clone europeu (Aires de Sousa *et al.*, 2003; Strommenger *et al.*, 2008).

A Síndrome do choque tóxico está associada a presença do gene *TSST*, ou *TSST-1*, que codifica uma proteína considerada um superantígeno estafilocócico (Lina *et al.*, 2004). Essa proteína ativa uma grande quantidade de células T, levando a uma resposta inflamatória sistêmica (Krakauer, 2019), tendo sua expressão regulada por vários fatores ambientais como pH, temperatura e presença de nutrientes assim bem como está ligada ao sistema componente de regulação *Agr* (Bohach *et al.*, 1990; Krakauer, 2019). Seu diagnóstico é baseado na detecção da toxina no sangue ou em outros fluidos corporais ou pode ser feita usando ensaios imunológicos, como ensaios de ELISA (Miwa *et al.*, 1994).

As leucocidinas são toxinas de *S. aureus* que agem de modo a inibir ou matar células do sistema imunológico do organismo humano. *LukED* (Leucotoxina ED) é o gene de uma toxina de dois componentes que tem como alvo específico as células T CD4+ e CD8+, inibindo a ativação dessas células através do bloqueio de seus canais de cálcio (Tam & Torres, 2018). Também pode atuar usando o receptor para quimiocinas CCR5 para matar linfócitos e outras células do sistema imune. Em células deficientes em CCR5, ela pode se ligar a outros receptores de quimiocinas como CXCR1 e CXCR2 (REYES-ROBLES *et al.*, 2013). Já o gene *LukPV* se trata de um *operon* que produz a leucocidina Pantón-Valentín, uma toxina também de dois componentes produzida pela codificação dos genes em sequência *lukF-PV* e *lukS-PV* (Strommenger *et al.*, 2008; Dunyach-Remy *et al.*, 2016). É geralmente associada a severidade de infecções cutâneas e respiratórias por *S. aureus*, com atividade citolítica em monócitos e neutrófilos, sendo pouco verificada em cepas nosocomiais (David & Daum, 2010; Dormanesh *et al.*, 2015).

A proteína EDIN tem sido implicada na capacidade de *S. aureus* de colonizar e invadir as células epiteliais, contribuindo para a virulência da bactéria (Falugi *et al.*, 2013). O EDIN (Epidermal Cell Differentiation Inhibitor) é uma proteína que, quando secretada por algumas cepas de *S. aureus*, inibe a diferenciação de células epiteliais resultando em lesões cutâneas graves, levando a formação

de bolhas e atraso na cicatrização de feridas (Messad *et al.*, 2013). O EDIN é codificado pelo gene homônimo *EDIN*, localizado em um plasmídeo encontrado em algumas cepas de *S. aureus* (Falugi *et al.*, 2013).

O gene *arcA*, descoberto pela primeira vez em cepas comunitárias de *S. aureus* resistentes à meticilina (CA-SARM), é considerado uma ilha genômica em estafilococos, que configura aumento em sua patogenicidade e é marcador clonal da cepa USA300 (Diep *et al.*, 2006) acreditando-se que seja um fator de sobrevivência importante para a espécie (Goering *et al.*, 2007; Granslo *et al.*, 2010). É um elemento genético móvel composto por dois *operons* (*arc-operon* e *opp3-operon*) onde o *arc-operon* é composto por sua vez por 6 genes de enzimas da via do catabolismo de arginina, conferindo patogenicidade por uma suposta via de virulência que converte l-arginina em dióxido de carbono, carbamoil-orнитina, amônia e ATP (Diep *et al.*, 2008; Granslo *et al.*, 2010).

O regulador *quórum-sensing* *Agr* é um importante regulador global da virulência em *S. aureus*, sendo um sistema composto por quatro grupos distintos, *AgrI*, *AgrII*, *AgrIII* e *AgrIV*, que são codificados por diferentes variantes alélicas do gene (Queck *et al.*, 2009). Cada um dos grupos alélicos *Agr* parece ter uma função diferente na patogênese de *S. aureus*. O grupo *AgrI* é encontrado em cepas hospitalares e está associado a infecções invasivas graves, como sepse e endocardite enquanto o grupo *AgrII* é encontrado em cepas de comunidade e está associado a infecções de pele, como furúnculos e abscessos (Queck *et al.*, 2009). O grupo *AgrIII* é encontrado em cepas bovinas e está associado a mastite bovina e *AgrIV* é encontrado em cepas de animais de estimação e de fazenda (Monecke *et al.*, 2013). O principal efetor do sistema *Agr* é o RNAIII, atuando como um miRNA regulando a expressão de vários fatores de virulência, incluindo a maioria dos que são codificantes de exotoxinas além de outras proteínas extracelulares e proteínas de parede celular (Gong *et al.*, 2014).

Os genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* são responsáveis pela síntese do polissacarídeo intercelular (PIA), que é um dos principais componentes do biofilme produzido por *S. aureus* (Archer *et al.*, 2011). A regulação dos genes *ica* é complexa e afetada por vários fatores, incluindo a presença de antimicrobianos, a presença de proteínas de ligação à parede celular e a presença de outros fatores de virulência bacteriana. O gene *icaA* codifica a enzima N-acetilglucosaminiltransferase, que é responsável pela síntese do

precursor do polissacarídeo (PIA). Os genes *icaB* e *icaC* codificam proteínas envolvidas na polimerização do polissacarídeo, enquanto o gene *icaD* codifica uma proteína envolvida na regulação da expressão do *operon* (Kropec *et al.* 2005). Estudos recentes demonstraram que a regulação dos genes *ica* também pode ser afetada por fatores ambientais, como pH e temperatura (Vaezi *et al.*, 2020) enquanto outros estudos apontam para que mutações no *operon* desses genes resultam em redução da produção de PIA e diminuição da capacidade de formação de biofilmes (Kropec *et al.*, 2005; Archer *et al.*, 2011).

Dentre os vários fatores de virulência produzidos pelas bactérias se encontram as cápsulas polissacarídicas, que ajudam na colonização e evitam a resposta imunológica do hospedeiro. Existem muitos tipos de cápsulas e a expressão delas é regulada por vários genes, incluindo *cap5* e *cap8*, ambos elencados para o presente estudo. O gene *cap5* codifica a proteína de transferência de grupamento de açúcar (UDP-GlcNAc), que é essencial para a síntese da cápsula polissacarídica do tipo 5 (Kiser *et al.*, 1999), uma das principais expressas em cepas de *S. aureus* que causam infecções em humanos (Kuroda *et al.*, 2013). Por sua vez, o gene *cap8* é responsável pela síntese da cápsula polissacarídica do tipo 8, uma cápsula de menor prevalência, mas ainda associada a cepas de *S. aureus* que causam infecções em animais (Cabral *et al.*, 2004), mas também isoladas de infecções graves em humanos (Tuchscher *et al.*, 2018).

1.9– Classificação de risco biológico

A classificação de risco de agentes biológicos é uma prática essencial para garantir a segurança dos profissionais de saúde e da população em geral. Ela se baseia em uma avaliação de risco dos agentes biológicos, que inclui a identificação de microrganismos patogênicos levando em conta sua facilidade de transmissão, a estabilidade ambiental, a capacidade de se disseminar e causar epidemias, e a disponibilidade de tratamentos eficazes (CDC, 2009). A avaliação de cada um desses critérios é fundamental para determinar o nível de precauções necessárias para prevenir a exposição aos agentes biológicos e minimizar o risco de disseminação (WHO, 2004). A *S. aureus* é classificada atualmente na categoria do **tipo 2 de risco biológico**. Essa categoria engloba

de forma cumulativa a cada critério: 1) microrganismos de risco individual moderado e risco limitado para a comunidade; 2) inclui agentes biológicos que provocam infecções no ser humano e ou em animais (zoonóticos); 3) esses microrganismos tem potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente de forma limitada e 4) existem medidas profiláticas e terapêuticas eficazes conhecidas para as patologias que estes desenvolvem nos hospedeiros (BINSFELD *et al.*, 210).

Classe de Risco	Risco individual	Risco à coletividade	Aptidão para zoonoses	Capacidade de propagação	Profilaxia ou Terapia eficaz
1	Baixo	Baixo	Não	Baixa	Existe
2	Moderado	Baixo	Sim	Baixa	Existe
3	Elevado	Moderado	Sim	Moderada	Usualmente existe
4	Alto	Alto	Sim	Alta	Ainda não existe

Tabela 1 - Classificação de risco de agentes biológicos (ADAPTADO). (Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde, 2022).

A espécie *S. aureus* sendo uma das principais e mais frequentes bactérias responsáveis por infecções nosocomiais, aliado ao fato de ter um genoma altamente adaptativo que pode se munir de genes de virulência e resistência a antimicrobianos (Lowy, 1998; Shore e Coleman, 2013) e sua capacidade de disseminação na comunidade, meio ambiente e risco para os seres humanos e demais organismos, já é um importante alvo de estudos de caracterização molecular, necessários para o desenvolvimento de estratégias e manobras de controle epidemiológico mais rápidas e robustas (Magill *et al.*, 2014; Gajdacs, Urbán & Terhes, 2019).

Desse modo, o presente trabalho visa fazer a cobertura dos fatores de virulência de uma coleção de amostras de *S. aureus*, possibilitando uma melhor identificação da presença desses genes em lesões nos pés de pacientes com diabetes.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi o de analisar a presença de genes de virulência, biofilme e formação de cápsula de cepas *Staphylococci*, isoladas de lesões nos pés de pacientes diabéticos.

2.2– Objetivos específicos

- a) Analisar a presença de genes associados a virulência de cepas de *S. aureus* isoladas de pés de pacientes com diabetes;
- b) Identificar qual grupo de genes relacionados aos fatores de virulência (Fatores associados a colonização, Enterotoxinas, Exotoxinas, Hemolisinas, Leucocidinas, Reguladores genéticos e Evasinas) é o mais prevalente nas amostras.

3 – METODOLOGIA

3.1– Origem das cepas bacterianas e aspectos éticos

Foram utilizadas 25 cepas *Staphylococci* de *S. aureus* com caráter multirresistente, isoladas de úlceras de pés de pacientes diabéticos admitidos no Hospital Geral de Palmas (Tocantins, BR) durante janeiro a junho de 2013. As amostras foram coletadas após debridamento da úlcera, levadas para cultivo na Universidade Federal do Tocantins, onde logo após seguiram-se etapas de isolamento, identificação dos espécimes baseada em morfologia de colônias, coloração de Gram, mobilidade, teste de catalase, oxidase e coagulase, demais testes bioquímicos e a caracterização fenotípica quanto a resistência a antimicrobianos através do método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado, de acordo com o preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), testes estes executados e descritos por Perim *et al.* (2015).

As cepas são identificadas com um número correspondendo ao paciente e uma letra correspondendo a ordem de identificação da bactéria, para identificar cada uma das bactérias encontradas nas amostras adquiridas através do debridamento. As 25 cepas analisadas no presente estudo estão em uma coleção que se encontra atualmente armazenada no laboratório de pesquisa no Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos (São Paulo, BR), sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Maria

Cristina da Silva Pranchevicius.

3.2– Extração do DNA total

Em resumo, o DNA total foi extraído das bactérias que foram cultivadas em caldo LB (Luria-Bertani), preparado na proporção de 20g do pó em 1L de água destilada ou deionizada e cujo crescimento das bactérias se desenvolveu por 24h à 37°C. 2 ml de cultura de cada isolado bacteriano foram aliqüotados para a extração que foi feita utilizando o método de lise térmica proposto por Adwan (2014).

3.3– Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação para cada gene foram preparadas contendo 1X de Master Mix Taq Pol 2X Green – Cellco, somados a 65 ng de DNA total, 10 nmol de cada *primer forward* e *reverse* (Exxtend, BR) e o restante completo com água tipo 3. Cada reação foi conduzida isoladamente em tubos de polipropileno do tipo eppendorf de 200uL em termociclador C1000 Touch® Bio-Rad (EUA).

Na **Tabela 2** são apresentadas informações sobre os *primers* utilizados para triagem de cada gene, explicitando as temperaturas de *melting* usadas em cada reação e o tamanho esperado dos *amplicons* resultantes de acordo com a literatura. As condições de ciclagem foram seguidas como descrito nas respectivas referências associadas.

Tabela 2 - Informações sobre os pares de *primers* utilizados para detecção dos genes de virulência.

Gene alvo	Sequência do <i>primer</i> (5'–3'), F/R	<i>Amplicon</i> (pb)	TM (°C)	Referências
<i>fnbA</i>	CACAACCAGCAAATATAG CTGTGTGGTAATCAATGTC	1,362	50	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>fnbB</i>	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTTC	523	55	Tristan <i>et al.</i> , 2003
<i>clfA</i>	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT CGTTTCTCCGTAGTTGCATTTG	1,584	56	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>hIA</i>	ATGAAAACACGTATAGTCAGCTCAGTAACAAC TTAATTTGTCAATTTCTTCTTTTCCCAATCGA	960	72	Lin <i>et al.</i> , 2021
<i>hIB</i>	GTGCACTTACTGACAATAGTGC GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	58	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
<i>hlgCB</i>	GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC CCATAGACGTAGCAACGGAT	938	55	Kumar <i>et al.</i> , 2009

<i>etA</i>	CTATTTACTGTAGGAGCTAG ATTTATTTGATGCTCTCTAT	741	46,5	Ružicková <i>et al.</i> , 2005
<i>etB</i>	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC AGTGAACCTTATCTTTCTATTGAAAAACTC	612	55,5	Li <i>et al.</i> , 2018
<i>etD</i>	CCCGTTGATTAGTCATGCAG TCCAGAATTTCCCGACTCAG	606	55	Strommenger <i>et al.</i> , 2008
<i>Seh</i>	CAACTGCTGATTTAGCTCAG GTCGAATGAGTAATCTCTAGG	358	55	Strommenger <i>et al.</i> , 2008
<i>lukED</i>	TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	269	60	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
<i>lusk/F-PV (PVL)</i>	ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCC GCATCAAGTGATTGGATAGCAAAAGC	432	58	Strommenger <i>et al.</i> , 2008
<i>ACME-arcA</i>	GCTCAAACCTTTGAGAGATGAA TTACGTACGCCAGCCATGAT	216	54	Strommenger <i>et al.</i> , 2008
<i>EDIN</i>	GAAGTATCTAATACTTCTTTAGCAGC TCATTTGACAATTCTACACTTCCAAC	625	54	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
<i>TSST</i>	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG ATCGAACTTTGGCCATACTTT	447	54,5	Becker <i>et al.</i> , 1998
<i>sasX</i>	AGAATTAGAAGTACGTCTAAATGC GCTGATTATGTAAATGACTCAAATG	521	53	Li <i>et al.</i> , 2012
<i>icaA</i>	GATTATGTAATGTGCTTGGA ACTACTGCTGCGTTAATAAT	770	50	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>icaB</i>	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA AAAGTCCCATAAGCCTGTTT	302	56	Solati <i>et al.</i> , 2015
<i>icaC</i>	TAACCTTAGGCGCATATGTTTT TTCCAGTTAGGCTGGTATTG	400	56	Solati <i>et al.</i> , 2015
<i>icaD</i>	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA	198	55,5	Arciola <i>et al.</i> , 2001
<i>Agr I</i>	ATCGCAGCTTATAGTACTTGT CTTGATTACGTTTATATTTTCATC	739	50	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>Agr II</i>	AACGCTTGACAGCTTTATTT CGACATTATAAGTATTACAACA	691	50	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>Agr III</i>	TATATAAATTGTGATTTTTTATTG TTCTTTAAGAGTAAATTGAGAA	712	50	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>Agr IV</i>	TATATAAATTGTGATTTTTTATTG TTCTTTAAGAGTAAATTGAGAA	683	50	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>seA</i>	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTT	560	55	Jarraud <i>et al.</i> , 1999
<i>seB</i>	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA ATCCGTTTCATAAGGCGAGT	404	52	Salamandane <i>et al.</i> , 2022
<i>seD</i>	GTGGTGAAATAGATAGGACTGC ATATGAAGGTGCTCTGTGG	384	58,5	Machado <i>et al.</i> , 2020
<i>sel</i>	AGGCAGTCCATCTCCTGTATAA TGCTCAAGGTGATATTGGTGTAG	568	60	Moura <i>et al.</i> , 2020
<i>clfB</i>	TGGCGGCAAATTTACAGTGACAGA AGAAATGTTGCGCCATTTGGTTT	404	60	Campbell <i>et al.</i> , 2008
<i>Cap5</i>	CGAACCGATGATTGATGCTATTG TGCTATGACTGCACCACTATT	555	61	Acosta <i>et al.</i> , 2018
<i>Cap8</i>	GGAGGAAATGACGATGAGGATAG TAGCTTCTGTAGCGGTGAATG	608	61	Acosta <i>et al.</i> , 2018

pb = pares de bases; **Tm** (°C) = Temperatura de *Melting*.

Os fragmentos de DNA amplificados (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese convencional em gel de Agarose a 1% (p/v), utilizando tampão TAE 1X (Tris-acetato, 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) a 90 V por 30 minutos. O volume total cada reação foi aplicado no gel, o qual foi previamente confeccionado com

Brometo de etídio a 1% (p/v). Por fim, o padrão de bandas produzidas pela eletroforese foi visualizado e registrado em transiluminador Gel Doc XR+ System® Bio-rad (EUA) em ultravioleta, utilizando o programa Image Lab5™.

4 – RESULTADOS

4.1 – Detecção de genes de virulência através de PCR

A presença de genes de virulência foi verificada através de ensaios de PCR convencional, incluindo os genes descritos no **Tabela 2** da subseção 3.3 (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) da Metodologia deste trabalho. Na **Tabela 3** são relacionados os resultados positivos obtidos em gel de agarose para cada amostra, sendo utilizado como critério de triagem a presença evidente de uma banda fluorescente com peso molecular correspondente ao tamanho esperado do *amplicon*.

Tabela 3 - Relação dos genes de virulência encontrados nas 25 cepas de *S. aureus*.

Amostra	Fatores associados a colonização	Hemolisinas	Enterotoxinas	Exotoxinas	Leucocidinas	Reguladores genéticos
2C	-	-	-	-	-	-
5A	-	-	-	TSST	-	<i>arcA</i>
5C	<i>clfB</i>	-	-	TSST, <i>etA</i>	<i>LukPV</i> , <i>LukED</i>	<i>Agr I</i>
5D	<i>clfB</i>	-	-	TSST, <i>etA</i>	-	<i>arcA</i>
10A	<i>clfB</i>	-	-	TSST, <i>etA</i>	<i>LukPV</i>	-
10B	-	<i>hlgCB</i>	-	TSST	-	<i>arcA</i>
11A	-	-	-	TSST	<i>LukPV</i>	<i>arcA</i>
11C	<i>clfB</i>	-	-	-	-	-
11D	<i>clfB</i>	-	-	TSST	-	-
12A	-	-	-	TSST	<i>LukPV</i>	-
18A	<i>clfB</i>	-	-	TSST, <i>etA</i>	<i>LukPV</i>	-
18D	-	-	-	TSST	<i>LukPV</i>	-
20A	<i>clfB</i>	-	-	-	-	<i>arcA</i>
20C	-	-	-	-	-	-
21A	-	-	-	-	-	-
24A	<i>sel</i>	<i>hIB</i>	-	TSST, <i>etA</i>	-	<i>arcA</i>
24B	-	-	-	TSST, <i>etA</i>	-	<i>arcA</i>
25A	-	-	-	-	-	<i>arcA</i>
26A	-	-	-	-	-	-
29A	-	-	-	-	-	-
33A	<i>clfB</i> , <i>sel</i>	-	-	TSST, <i>etA</i>	<i>LukED</i>	<i>arcA</i> , <i>Agr II</i>

33B	<i>clfB, sel</i>	<i>hIB</i>	-	-	<i>LukED</i>	<i>arcA, Agr II</i>
36A	<i>fnbB</i>	-	-	-	<i>LukED</i>	-
36B	-	-	-	<i>TSST, etA</i>	-	-
39A	-	-	-	<i>etA</i>	-	-

As seqüências triadas estão organizados em grupos de fatores de virulência cujos produtos gênicos compartilham de atividades similares.

As frequências dos genes de virulência analisados no presente estudo estão descritas na **Figura 2**, indicadas pelas barras que representam a porcentagem simples observada para cada fator de virulência triado.

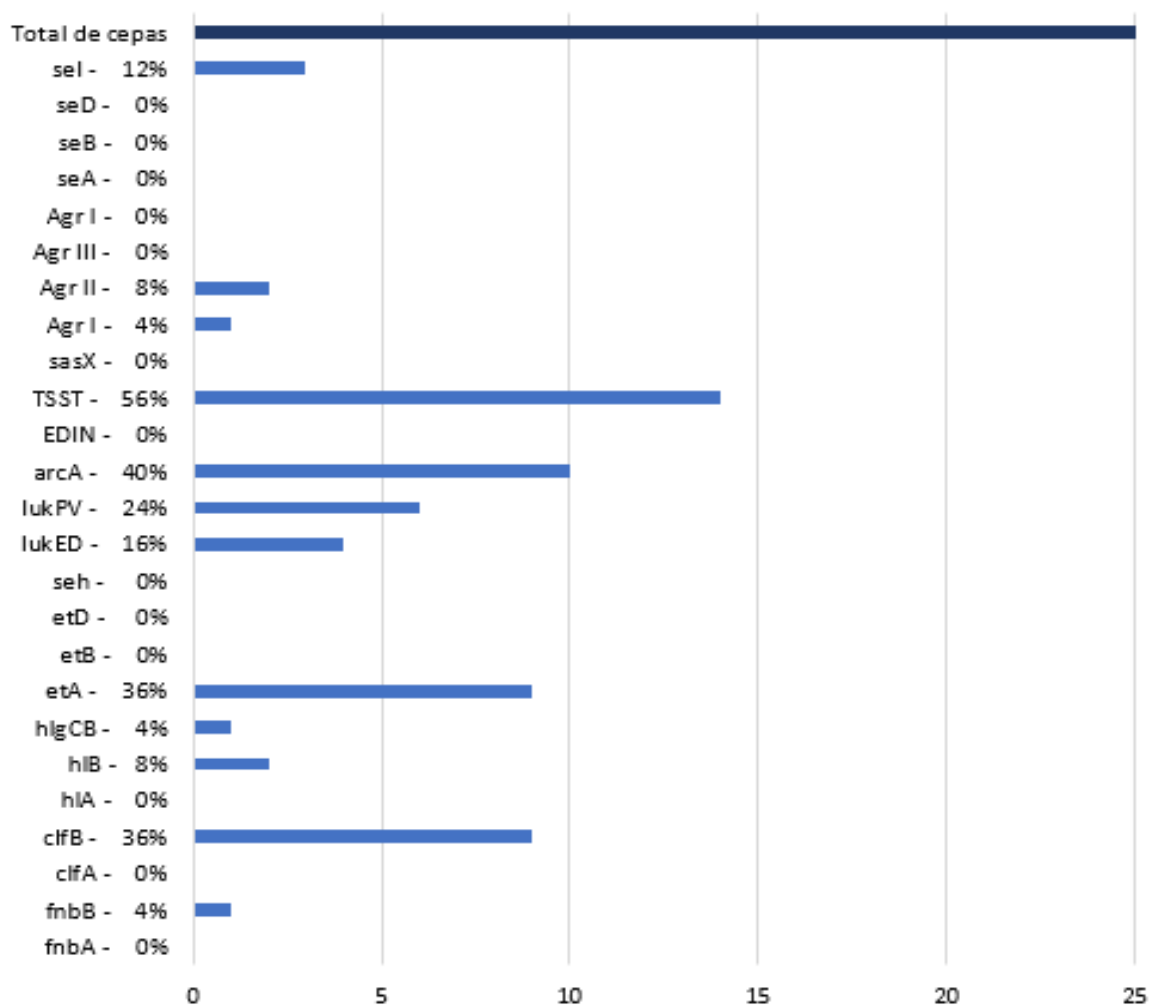


Figura 2 - Perfil de virulência de 25 amostras de *S. aureus* isoladas de lesões de pés diabéticos.

Dentre os 15 genes que apresentaram resultado positivo para os ensaios de PCR (48% do painel total), a representatividade dos fatores de virulência, da maior para a menor foi de: 56% das amostras para *TSST*; 40% para *arcA*; 36% para *clfB* e *etA*; 24% para *LukPV*; 16% para *lukED*; 12% para *sel*; 8% para *Agr II* e *hIB* e

4% para *Agr I*, *hlgCB* e *fnbB*. Os demais genes, como não apresentaram nenhum padrão de amplificação nos géis, assumem frequência de 0% nas amostras. Das 31 triagens conduzidas nas 25 amostras, os genes *clfA*, *etB*, *etD*, *fnbA*, *sasX*, *hIA*, *EDIN*, *seA*, *seB*, *seD*, *seH*, *icaB*, *icaC*, *Agr III*, *Agr IV* e *cap8* não indicaram amplificação com bandas correspondentes aos amplicons descritos na literatura.

Nas **figuras 3** e **Figura 4** é possível observar o padrão de bandas formado para genotipagem do fator de virulência de maior frequência, o gene *TSST*, servindo como exemplificação da visualização dos resultados em gel de agarose.

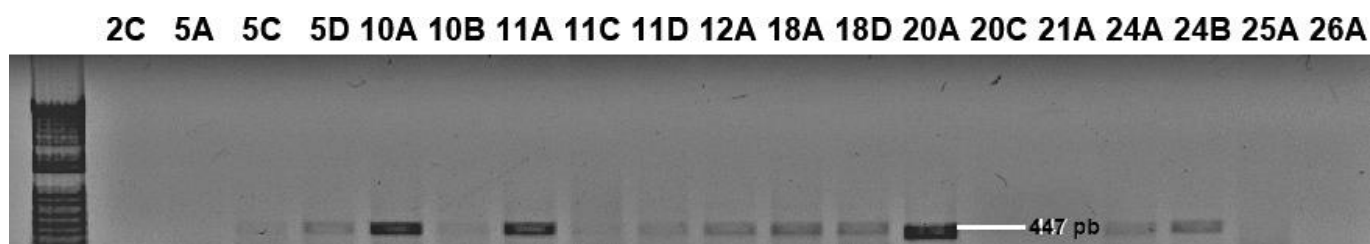


Figura 3 - Visualização de bandas em gel de agarose do gene *TSST*, com banda com peso molecular de 447 pares de bases correspondentes ao tamanho do *amplicon* do gene. A figura apresenta os resultados das 19 amostras legendadas no topo da imagem.

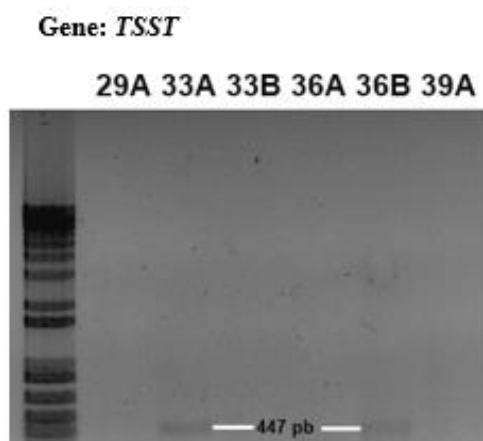


Figura 4 – Visualização de bandas em gel de agarose do gene *TSST*, com os resultados das 6 amostras legendadas no topo da imagem.

4.2– Detecção de fatores de virulência associados a formação de biofilme e cápsula

Quatro genes de formação de biofilme e dois genes de formação de cápsula também foram analisados com ensaios de PCR. Os fatores de virulência associados a biofilme deste trabalho fazem parte dos genes *ica*, subdivididos nos quatro tipos correspondentes a *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* e são responsáveis pela síntese do polissacarídeo intercelular (PIA), que é um dos principais

componentes do biofilme de *S. aureus* (ARCHER *et al.*, 2011). Já os fatores associados a formação de cápsula correspondem aos genes *Cap5* e *Cap8*, descritos na literatura como pertencendo a uma família de codificadores de cápsula ou microcápsula, uma vez que essa estrutura só pode ser visualizada em *S. aureus* através de micrografia eletrônica (Salasia, Khusnan e Artanto, 2004).

Das 25 amostras analisadas, 12 apresentaram amplificação para pelo menos um dos 4 genes do grupo *ica* e dos sorotipos de capsula 5 e 8. Nenhuma das amostra apresentou resultado simultaneamente positivo para os genes *cap5* e *cap8*, no entanto, duas amostras (33A e 33B) apresentaram genótipos sinérgicos para 2 fatores *ica*, amplificando os genes *icaA* e *icaD*. O **Quadro 1**, apresenta a relação dos resultados obtidos das 12 cepas positivas para estes genes.

Quadro 1 - Relação dos genes de biofilme e cápsula encontrados nas 25 cepas de *S. aureus*.

Amostra	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>
5C						
5D						
10A						
11A						
11C						
12A						
18A						
18D						
20A						
24A						
33A						
33B						

Os resultados positivos apresentam marcação em verde, relacionando a presença de *amplicon* com a amostra analisada. Os campos em branco representam os resultados negativos para amplificação do gene.

A frequência global destes fatores de virulência nas 25 amostras é apresentada na **Figura 5**, com percentual simples calculado para cada gene. As frequências observadas para os genes de biofilme foram de 32% para *icaA*, 20% para *icaD* e 0% para *icaC* e *icaB*. Já para os genes de cápsula foram de 24% para o sorotipo *Cap5* e 0% para sorotipo *Cap8*.

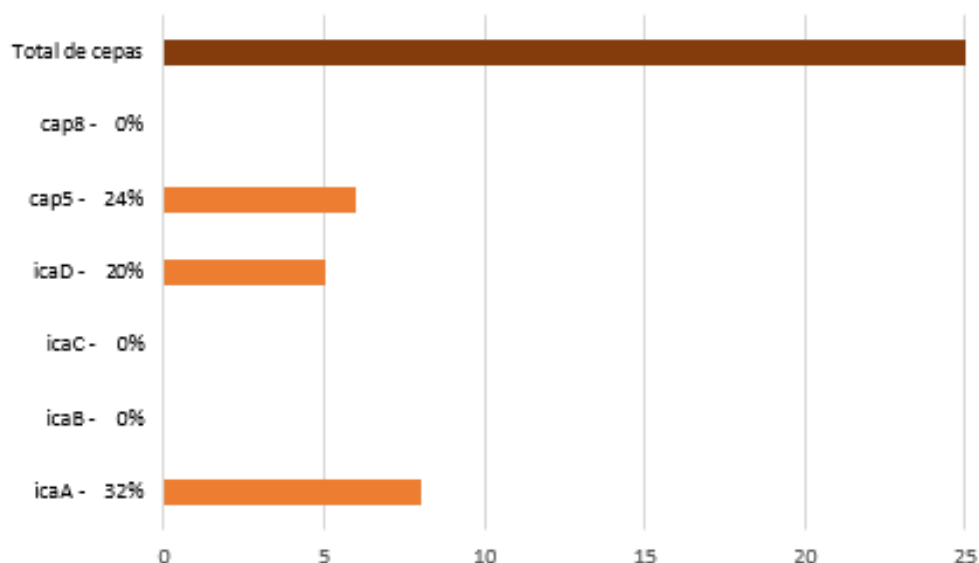


Figura 5 - Frequência de genes de biofilme *ica* e dos sorotipos de cápsula 5 (*Cap5*) e 8 (*Cap8*) nas 25 amostras de *S. aureus* genotipadas.

O gene que mais apareceu dentre as Evasinas foi o *icaA*, como nota-se na frequência apresentada de cada genótipo encontrado na **Figura 5**. Nas **Figuras 6** e **Figura 7** observa-se o resultado do gel de agarose confeccionado com os ensaios de PCR deste fator de virulência. Ainda na **Figura 7** (referente a imagem gerada do gel das amostras 29A, 33A, 33B, 36B e 39A), é possível observar um padrão de amplificação inespecífica, com aparecimento de *amplicons* de peso molecular não consistente com o descrito na literatura para este gene. Destas amostras, apenas 33A e 33B foram consideradas positivas para a presença do gene, pois apresentaram além do padrão de banda inespecífico, o *amplicon* com peso molecular correto para *icaA* - 770 pares de bases – (Peacock *et al*, 2002). As bandas com peso molecular diferente do descrito para o gene, precisam ser sequenciadas para detectar o que é o *amplicon* e averiguar o padrão de amplificação inespecífico.

Gene: *icaA*

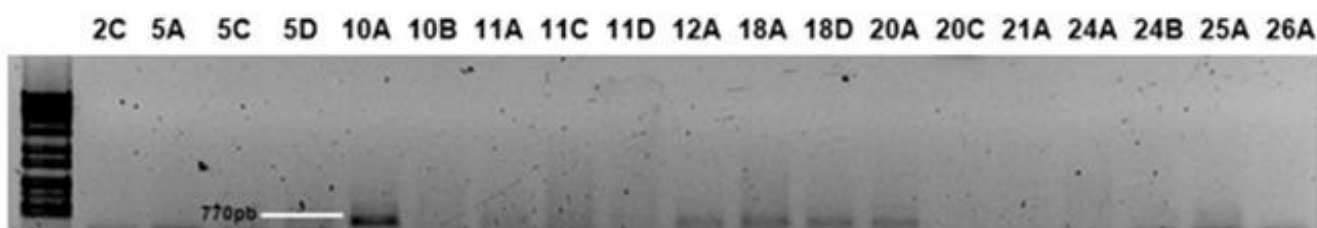


Figura 6 - Visualização de bandas em gel de agarose do gene *icaA*, com banda de peso

molecular de 770 pares de bases correspondentes ao tamanho do *amplicon* do gene. A figura apresenta os resultados das 19 amostras legendadas no topo da imagem.

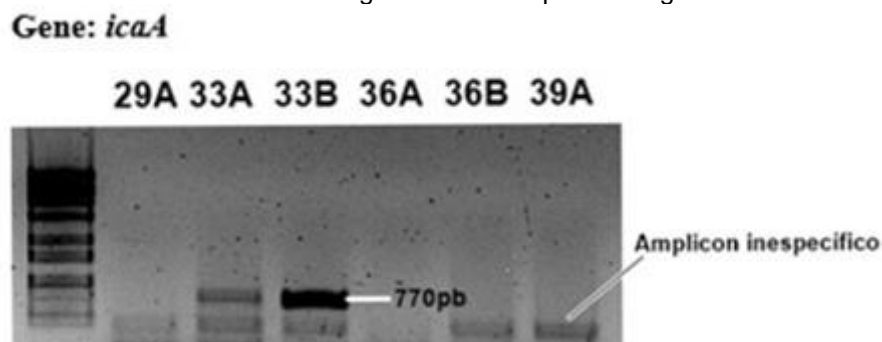


Figura 7 - Visualização de bandas em gel de agarose do gene *icaA*, com os resultados das 6 amostras legendadas no topo da imagem. Observa-se padrão de amplificação inespecífico apontado pela linha em cinza.

Quando observamos a frequência total de genes por amostra, a cepa 33A foi a detentora do maior número de genes, positiva para 10 dos 31 fatores de virulência testados, mostrada em vermelho na **Figura 8**. Em seguida coloca-se a amostra 33B, apresentando resultado positivo para 9 genes. Os genes em comum entre as duas cepas foram *clfB*, *lukED*, *sel*, *Agr II*, *icaA*, *icaD* e *cap5*.

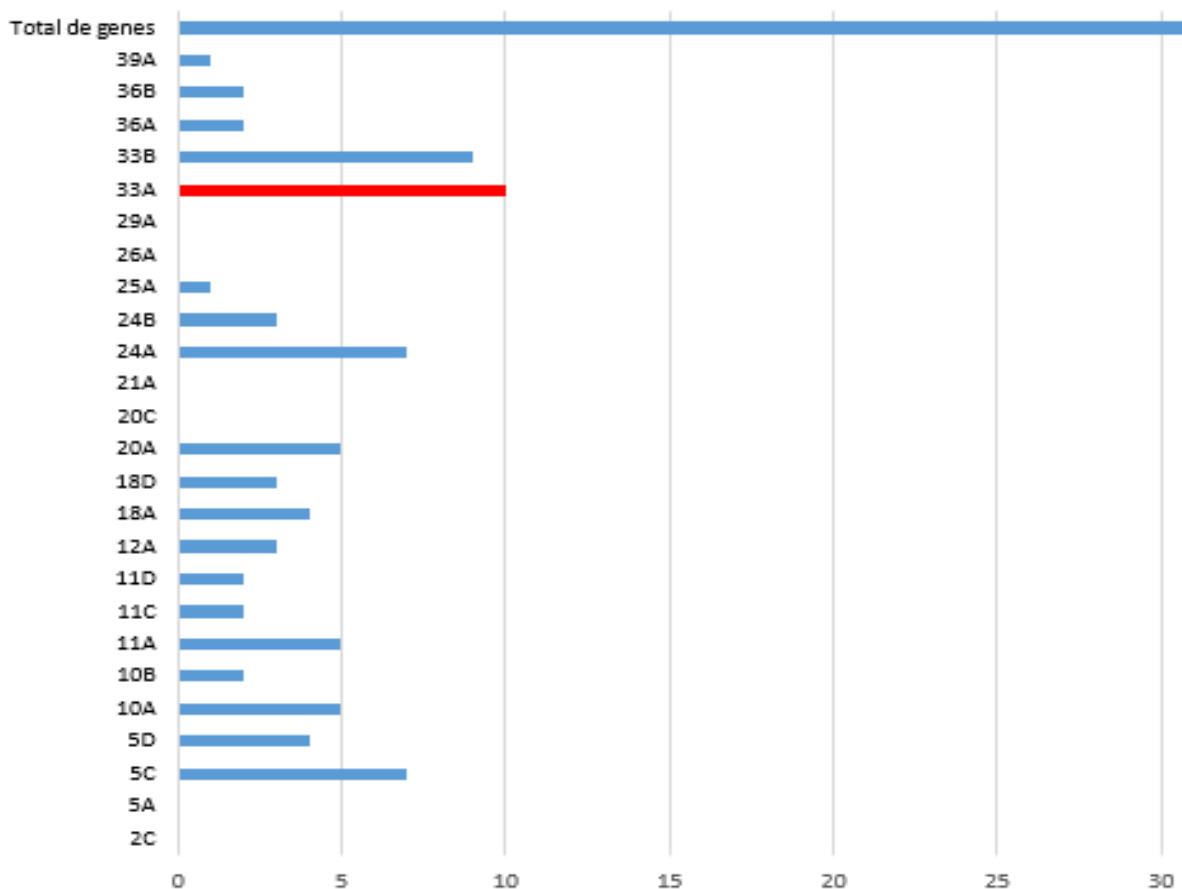


Figura 8 - Frequência do aparecimento global de fatores de virulência por amostra de *S.*

aureus genotipada.

4.3– Proporção entre os fatores de virulência encontrados

Os fatores de virulência cuja presença foi positiva em pelo menos uma das amostras foram organizados em grupos de acordo com sua funcionalidade para a biologia, interação com o hospedeiro ou patogenicidade conferida a *S. aureus*.

Os genes que codificam produtos de virulência de atividade semelhante foram reunidos de modo a resultar em 7 grupos, com a intenção de se comparar qual atividade de virulência foi mais representativa entre as 25 amostras testadas. Os grupos formados foram: Fatores associados a colonização (*clfB* e *fnbB*); Hemolisinas (*hlyB* e *hlyCB*); Exotoxinas (*etA* e *TSST*); Leucocidinas (*LukPV* e *lukED*); Reguladores (*arcA*, *Agr I* e *Agr II*) e o grupo dos fatores de Evasinas (*icaA*, *icaD* e *cap5*).

De acordo com as proporções encontradas, o genótipo de virulência de maior frequência na coleção de *S. aureus* analisada neste trabalho, foi o de Exotoxinas que se mostraram presentes em 28% das amostras positivas para pelo menos um gene triado, seguido sequencialmente pelo genótipo das Evasinas com 24%, como é apresentado na **Figura 9**.

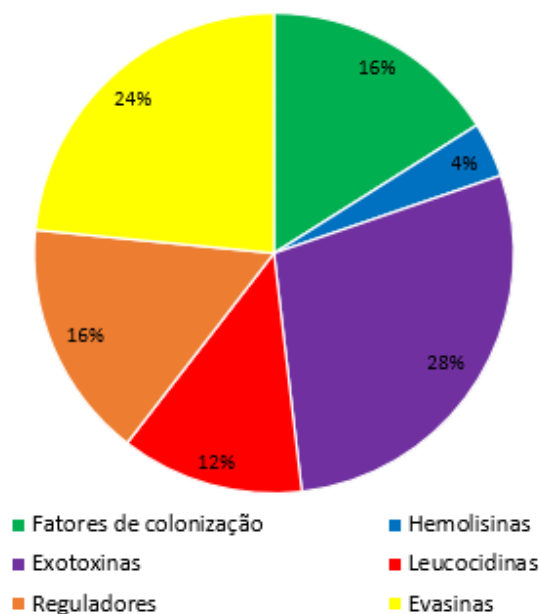


Figura 9. Comparação das proporções de fatores de virulência encontrados nas amostras de *S. aureus* quando agrupados por fenótipo expresso.

Em uma contagem global, incluindo mesmo as cepas que não amplificaram

nenhum gene, 12 amostras apresentaram fatores de virulência aqui agrupados como Evasinas, 13 apresentaram genes de Exotoxinas, 10 apresentaram genes de Fatores associados a colonização, 8 apresentaram genes de Reguladores genéticos, 10 apresentaram genes de Leucocidinas e 3 apresentaram genes de Hemolisinas. Nenhuma amostra amplificou genes do grupo das Enterotoxinas, que neste trabalho compreende somente aos genes *seA*, *seB* e *seD* uma vez que *seI* e *seH*, apesar de codificarem toxinas, foram alocados no grupo dos Fatores associados a colonização pela atividade putativa de seus produtos gênicos no processo de infecção por *S. aureus*. Desse modo, é possível visualizar a distribuição de todos os genes de virulência encontrados nas amostras testadas e sua proporção de acordo com a organização dos grupos de fenótipo expressado, na **Figura 10**.



Figura 10 – Distribuição proporcional de todos os fatores de virulência positivos na

coleção de *S. aureus* deste trabalho.

5 – DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou a identificação e frequência de fatores de virulência de uma coleção de amostras de *Staphylococcus aureus*, que foi isolada e fenotipada por Perim *et al.*, (2015), e cujos genes de resistência foram analisados por Valéria Christiane da Silva, que foi aluna de Iniciação Científica em nosso grupo de pesquisa no ano de 2018. Muitas das cepas analisadas apresentaram genes de resistência, que estava de acordo com o perfil de multirresistência observado por Perim *et al.*, (2015), incluindo cepas *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Nesse estudo, as *S. aureus* isoladas de pacientes com lesões nos pés apresentaram múltiplos genes de virulência. Segundo a literatura, há indício de que cepas multirresistentes como MRSA possuem mais genes de virulência em seu genoma (Baba *et al.*, 2002; David & Daum, 2010), por uma possível associação entre localizações adjacentes dessas duas classes de genes em elementos genéticos móveis, que acabam por ser transportados juntos quando há transferência genética horizontal (Peacock *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2008).

No grupo identificado como Fatores associados a colonização, obteve-se a presença dos genes *clfB* (9), *fnbB* (1) e *sel* (3). Os genes *clfA* e *clfB* codificam proteínas conhecidas como *clumping factor*, adesinas de ligação a fibronectina expressas diferencialmente na presença ou ausência de plasma humano (McDevitt *et al.*, 1994; Siboo *et al.*, 2001). Já foram encontrados ubiquamente em cepas isoladas de amostras de sangue e de pacientes com abscessos, feridas e queimaduras purulentas (Peacock *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2008). Esses dois fatores de virulência parecem ser muito comuns e difundidos em vários clones ao redor do mundo sendo encontrados em pacientes com doenças invasivas ou mesmo pacientes saudáveis, como apontam Tristan e colaboradores em seu estudo de 2003, em contraste com os resultados encontrados no presente trabalho onde a frequência desses genes não foi rara. Há indícios, porém, de que ambos os fatores sejam mais relacionados a infecções crônicas intradermais, como em abscessos infectados (Campbell *et al.*, 2008). Ainda assim, a triagem do gene *clfA* apresentou um padrão de banda não

correspondente ao descrito da literatura consultada para obtenção do protocolo de PCR, no entanto, 3 bandas nítidas apareceram com o mesmo peso molecular em amostras diferentes; essas bandas devem ser sequenciadas afim de identificar o que é o amplicon isolado no gel. No caso dos genes *fnbA* e *fnbB*, estes se apresentam seguindo uma linha evolutiva de adaptação das bactérias a diferentes nichos (Loughman *et al.*, 2008; Burke *et al.*, 2010). No presente estudo, gene *fnbB* foi presente em apenas uma de nossas amostras. Nos resultados obtidos por Campbell e colaboradores num estudo conduzido em 2008, mostraram que cepas MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina) eram mais propensas a carregar *fnbB* e outros genes de virulência, do que cepas MSSA (*Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina) ao passo que *fnbA* está mais associado a infecções de caráter mais invasivo (Peacock *et al.*, 2002; Tristan *et al.*, 2003). As enterotoxinas codificadas pelos genes *seI* e *seH*, neste trabalho foram alocadas no grupo dos Fatores associados a colonização por seus respectivos efeitos aparentes no processo infeccioso de *S. aureus*. *SeI* é descrito como um gene cromossomal (de Oliveira Calsolari *et al.*, 2011) e foi positiva em 13 amostras do presente estudo enquanto *seH* não apareceu nenhuma vez. Estes genes não eram largamente descritos até a década de 90, quando alguns estudos apontaram para a existência de mais genes de enterotoxina próximos ao cluster genético tradicional composto por *seA*, *seB*, *seC* e *seD* (Strommenger *et al.*, 2008; Jarraud *et al.*, 2009). De fato, foram encontrados outros genes associados a produção dessas enterotoxinas no trabalho de Jarraud e colaboradores em 2009, conduzindo um estudo com cepas isoladas na França onde todas as suas amostras foram positivas para *seI* e *seG*, indicando ainda pelos ensaios de PCR executados que os genes se encontravam associados em tandem separados por 1,9 kb (kilobases) de DNA intergênico, o que parece não ser incomum entre as toxinas estafilocócicas (Zhang, Jandolo & Stewart; 1998; Lindsay *et al.*, 1998). Em comparação, *seH* parece estar mais associado a infecções de tecidos mais profundos em humanos, como pneumonia e bacteremia, sendo ainda mais encontrado em contaminações animais como em mastites bovinas (Strommenger *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2014).

O gene *EDIN* não esteve presente em nenhum dos isolados do atual trabalho, também sendo pouco encontrados em outros trabalhos na literatura, como nos

ensaios de PCR de Thompson e Brown em 2017 que encontraram poucas cepas positivas para esse genótipo dentre seus isolados da Jamaica. Esse gene é encontrado em plasmídeos (Falugi *et al.*, 2013) e produz um fator que inibe a diferenciação de células epiteliais resultando em lesões cutâneas graves (Messad *et al.*, 2013).

O gene *sasX* também não foi encontrado em nossas amostras. Este fator de virulência é descrito na literatura como sendo extremamente raro fora de países asiáticos; na China ele é fortemente associado a disseminação de clones MRSA em ambiente hospitalar, sendo utilizado como marcador clonal para a cepa ST239 (Li *et al.*, 2012). O gene encontrado em elemento genético móvel do tipo prófago é indicado com promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de imunização uma vez que sua proteína codificada é expressa na membrana celular para atuação em mecanismos de evasão imune como encontrado em doenças pulmonares e abscessos em pacientes em hospitais na China (Li *et al.*, 2012).

No grupo identificado como Hemolisinas, obteve-se a presença dos genes *hIB* (2) e *hlgCB* (1). As hemolisinas são produzidas em *S. aureus* atuando na citólise de leucócitos e eritrócitos tanto como um ataque direto ao sistema imunológico quanto para obtenção de componentes férricos (Malachowa; DeLeo, 2011; Becker *et al.*, 2014). O gene *hIA* não apresentou amplificação em nenhuma amostra do presente estudo. Por outro lado, Lin *et al.* descreveu muita incidência deste e de *hIB* e *hlgCB* na China em isolados de pacientes de procedimentos médicos invasivos no ano de 2021. Em outro contexto, gene *hIB* foi amplamente encontrado em amostras coagulase-positivas isoladas de comida de rua no estudo de Salamandane e colaboradores em Moçambique em 2002. A presença de *hIB* em *S. aureus* parece estar associada a uma transferência horizontal entre linhagens limitadas, como sugerido anteriormente por Booth *et al.*, baseado nos resultados de análises filogenéticas conduzidas em 2001 que evidenciaram um grande contraste da distribuição deste gene em suas amostras. O fator de virulência associado a produção da hemolisina gama também teve pouca frequência nos resultados do presente estudo, assim como os achados de Kumar *et al.* em 2009, onde a presença de *hlgCB* representava menos de 25% das cepas isoladas de ambiente hospitalar, contrastando com os resultados na China por Lin *et al.* em 2021. Se a causa da distribuição diferente

dos genes de hemolisinas não for devida somente ao trânsito mundial das cepas, mas também tiver relação com complexos clonais e linhagens específicas, diferenças regionais e maior quantidade de espécimes devem ser examinados com mais profundidade.

Do grupo das Enterotoxinas, as reações de PCR não acusaram a presença de nenhum gene de toxina entérica elencado para esse trabalho. Os genes *seA*, *seB* e *seD* compõem uma região plasmidial que codifica para as enterotoxinas do tipo A, tipo B e tipo D, respectivamente sendo ainda que *seA* e *seD* compartilham intimamente de determinantes imunológicos (Schad et al., 1997). Esses genes apresentaram pouca prevalência no cenário de infecções hospitalares, sendo mais associados a cepas de infecções alimentares (Argudín et al., 2010; Chen & Sangma, 2019; Nasaj et al., 2020) em contraste com as amostras deste estudo oriundas de feridas em membros inferiores. Machado e colaboradores, em 2014, ainda associaram o genótipo *seD* mais recorrentemente a contaminações de origem animal.

Dos isolados genotipados neste trabalho, 14 amostras apresentaram amplificação para o gene *TSST*, sendo este portanto, o gene de virulência com maior prevalência no presente estudo. Este gene que codifica a exotoxina considerada superantígeno estafilocócico TSST-1, uma proteína de 22 quilodaltons que quando presente no organismo hospedeiro, leva aos sintomas da síndrome do choque tóxico como por exemplo febre alta, descamações e erupções cutâneas, hipotensão, choque hipovolêmico podendo evoluir ainda para falência múltipla de órgãos (Ahmad-Mansour et al., 2021). Essa toxina foi amplamente encontrada conservada em linhagens europeias e norte americanas de *S. aureus* na década de 1990 até os anos 2000 (Becker et al., 1998; Peacock et al., 2002; Campbell et al., 2008). Nas amostras oriundas dos EUA, a literatura reforça uma possível ligação entre a presença do gene e cepas resistentes, justificando que o gene é localizado em uma ilha de patogenicidade que deve ser adjacente a elementos genéticos móveis dotados de genes de resistência (Peacock et al., 2002; Campbell et al., 2008). A grande incidência deste gene nas amostras do presente trabalho está de acordo com essa hipótese, uma vez que a maior parte das cepas utilizadas nesse trabalho foi resistente a maioria dos antibióticos testados nos testes de fenotipagem, realizados por Perim et al. em 2015.

Nove amostras deste trabalho apontaram para presença do gene *etA* enquanto nenhuma apresentou o gene *etB* ou *etD*. Esses genes codificam para as exotoxinas esfoliativas ligadas a infecções de pele em humanos (Dunyach-Remy *et al.*, 2016), produzindo um quadro de bolhas em infecções menos invasivas (Ladhani *et al.*, 1999). De acordo com a revisão da literatura, sua distribuição em cepas ao redor do mundo não foi notadamente uniforme (Becker *et al.*, 1998; RŽIKOVÁ *et al.*, 2005) e enquanto em 2005 RŽIKOVÁ indicou que a presença de qualquer gene de toxina esfoliativa não precisa ser associada a presença genes de resistência, Thompson & Brown em 2017 levantaram a hipótese de uma associação entre *etB* e o elemento regulatório *Agr*, baseado nos resultados de seus ensaios de PCR, ampliando a lacuna para estudos mais profundos acerca de distribuição e associação entre genes de fenótipos distintos.

Os genes de leucocidinas tem pouca prevalência em ambientes nosocomiais, segundo descreve a literatura. O *LukPV* é codificado num elemento genético derivado de bacteriófago, estando bastante associado a *S. aureus* resistentes à meticilina associados à comunidade (caMRSA) (Baba *et al.*, 2002, David & Daum, 2010), e o fato de historicamente ter sido pouco reportado em ambiente clínico-hospitalar consona com os resultados de Lin e colaboradores em 2021 com isolados de pacientes de pós-cirurgia, e também do presente estudo onde de 25 amostras isoladas de ambiente hospitalar, 6 foram positivas para a presença do gene. No trabalho de Strommenger e colaboradores de 2008, avaliaram cepas comunitárias de amostras oriundas da Alemanha e Europa Central e *LukPV* foi indicado como um possível marcador de cepas de caMRSA. O gene *LukED*, também pertencente à família das leucotoxinas bicomponentes, também corroborou pouca frequência, sendo encontrado em 4 amostras do presente trabalho.

Os resultados das PCRs para elementos reguladores genéticos indicaram 10 amostras positivas para o gene *arcA*, 2 para *Agr II* e 1 para *Agr I*. O elemento *arcA* é uma ilha genômica dotada de dois *operons* que por sua vez, produzem enzimas da via do catabolismo de arginina (Diep *et al.*, 2008; Granslo *et al.*, 2010). Pouca prevalência em espécies estafilocócicas de ambiente hospitalar é reportada no trabalho de Salgueiro e colaboradores de 2017, em contraste com os resultados deste estudo. A literatura levanta a hipótese de associação da presença desses elementos com genes de virulência, onde dependendo da

combinação encontrada, a associação pode ser usada como marcador clonal (Diep *et al.*, 2006). Strommenger e colaboradores indicaram em 2008 que a combinação de *arcA* e *LukPV* aponta para a presença do clone USA300 e essa configuração foi encontrada em um isolado do presente estudo (amostra 11A). Já os elementos *Agr* são reguladores genéticos baseados no mecanismo de *quórum-sensing*, permitindo às bactérias regularem a expressão de vários genes de virulência de acordo com a densidade populacional (Heinrichs *et al.*, 1996; Queck *et al.*, 2009). É um elemento associado a infecções invasivas graves e tem distribuição diferencial de seus 4 subtipos, o que sugere uma relação evolutiva de adaptação das bactérias a diferentes ambientes e hospedeiros (Queck *et al.*, 2009; Monecke *et al.*, 2013). Notadamente no presente estudo, as cepas que apresentaram um dos dois alelos *Agr* positivos (*Agr I* e *Agr II*), também apresentaram mais de um gene de toxina associado (amostras 5C, 33A e 33B). Em nosso estudo, o genótipo *Agr I* foi positivo em apenas uma amostra, no entanto, a presença desse gene está associada a cepas nosocomiais de infecções graves como endocardite e sepse (Queck *et al.*, 2009). A presença desse gene quando associada a outros fatores de virulência específicos, pode também indicar uma adaptação bacteriana ao nicho intracelular (Bardiau *et al.*, 2016).

No grupo dos fatores denominados no presente trabalho como Evasinas, apareceram *icaA* (8), *icaD* (5) e *cap5* (6). Os genes do complexo *ica* são responsáveis diferencialmente pela síntese e polimerização de PIA (polissacarídeo Intercelular), que compõe caracteristicamente o biofilme em *S. aureus* (Kropec *et al.*, 2005; Archer *et al.*, 2011). Estes genes se encontram no cromossomo (Peacock *et al.*, 2002) e estudos indicam que, embora sua presença esteja mais relacionada ao ambiente hospitalar (Kumar *et al.*, 2009), se encontra variavelmente presente nos isolados clínicos (Solati *et al.*, 2015). Gad e colaboradores, em 2009 no Irã, acharam muito mais produção de biofilme dos isolados de urina do que de cateter de diálise; ainda assim, muito menos cepas foram produtoras do que as encontradas no Egito das mesmas fontes. Silva e colaboradores relataram em 2002 que de todos os subtipos de *ica*, *icaA* e *icaD* tem um papel significativo na formação de biofilme em estafilococos. Em 2015, Solati e colaboradores encontraram todos os genes do complexo em 80 isolados de *Staphylococcus epidermidis*, espécie indicada pela literatura como

reservatório genético de fatores de virulência e resistência (Otto, 2013). Em seus ensaios fenotípicos, as amostras que menos expressavam biofilme correspondiam as que tinham um genótipo apenas de *icaA* + *icaD*, o que é corroborado pelo fato que a expressão isolada de *icaA* induz apenas uma atividade enzimática menor, no entanto, para uma produção completa de biofilme, é necessária a coexpressão de pelo menos *icaA* e *icaD* (Gerke *et al.*, 1998; Arciola *et al.*, 2001). Nos resultados do presente estudo, duas amostras em particular (33A e 33B) apresentaram um genótipo composto de *icaA* + *icaD* + *cap5*, sugerindo um alto potencial de evasão desses isolados em respostas do sistema imunológico e ainda, dificuldade em resposta a farmacoterapias. Desse modo, o reconhecimento de bactérias aptas a produzir biofilme se prova importante para prevenir e controlar possíveis surtos epidêmicos por estas. Os genes *cap5* e *cap8* são responsáveis pela expressão de capsulas polissacarídicas de diferentes tipos em *S. aureus* (tipo 5 e tipo 8, respectivamente). Essa estrutura só pode ser visualizada em *S. aureus* através de micrografia eletrônica, portanto também é chamada de microcápsula (Salasia, Khusnan e Artanto, 2004). A literatura indica que *cap5* é mais associado a infecções humanas e *cap8*, em animais (Kiser *et al.*, 1999; Cabral *et al.*, 2004; Tuchscher *et al.*, 2018). Acosta e colaboradores aponta em seu trabalho de 2018 que o genótipo *cap8* tende a ser mais virulento por ter mais genes de virulência associado, o que corrobora com Tuchscher e colaboradores que no mesmo ano, indica a presença deste genótipo em infecções humanas de caráter mais grave. Há ainda na literatura a hipótese de que enquanto o genótipo *cap5-Agr I* indica para cepas mais adaptadas ao nicho intracelular e gere infecções crônicas, o genótipo *cap8-AgrII* indica para cepas mais adaptadas ao nicho extracelular e gere infecções mais agudas (Bardiau *et al.* 2016). Das 25 amostras do presente trabalho triadas para estes genes, nenhuma apresentou resultado simultaneamente positivo para os dois.

A maior quantidade de fatores de virulência foi associada a duas amostras de um mesmo paciente. A presença de 11 e 10 fatores de virulência distintos encontrada nas amostras 33A e 33B, respectivamente, pode indicar que o paciente possivelmente apresentava um quadro de infecção mais vigoroso. Entre as duas amostras, 7 genes eram comuns, indicando ainda a transferência putativa de genes horizontalmente entre bactérias de uma mesma ferida ou de

feridas distintas de um mesmo hospedeiro, talvez por auto reinfecção ou por higienização ineficiente.

6 – CONCLUSÃO

Foram encontradas nesse estudo bactérias com um perfil de virulência diversos. As diferentes combinações de genes encontradas sugere um aumento na dificuldade de tratamentos para as bactérias de pés diabéticos;

Genes reportados neste trabalho também foram associados a marcadores clonais e sua presença demonstra a necessidade uma caracterização molecular dos perfis de virulência mais aprofundada, uma vez que alguns desses marcadores estão relacionados à patogenicidade de cepas portadoras.

A presença difusa do gene da síndrome do choque tóxico (TSST) em vários isolados alerta para o risco de infecções com prognóstico negativo, podendo impactar futuramente o sistema público de saúde. Além disso, o desenvolvimento crescente de infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina associadas à expressão de TSST-1 torna o tratamento mais difícil.

6.1 – Perspectivas do trabalho

Com o advento de novas técnicas e metodologias em biotecnologia, há a possibilidade de aplicações cada vez mais práticas dos conhecimentos produzidos por ciência de base, como os do presente trabalho. Sugere-se identificação dos clones mais prevalentes na coleção de *S. aureus*, através da técnica de MLST. A MLST é uma técnica poderosa para estudar a diversidade genética de bactérias, permitindo a identificação de clones emergentes e o estudo da evolução e filogenia de bactérias patogênicas (Maiden *et al.*, 1998).

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, Atzel C. et al . Frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes in milk of cows and goats with mastitis. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro , v.

38, n. 11, p. 2029-2036, Nov. 2018. Available from <http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2018001102029&lng=en&nrm=iso>. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5786>.

Adwan, Kamel. "Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci." *Folia microbiologica* vol. 59,1 (2014): 5-8. doi:10.1007/s12223-013-0259-1

Ahmad-Mansour, Nour et al. "Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments." *Toxins* vol. 13,10 677. 23 Sep. 2021, doi:10.3390/toxins13100677

AIRES DE SOUSA, M.; DE LENCASTRE, H. Evolution of Sporadic Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Hospitals and Their Similarities to Isolates of Community-Acquired MRSA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(8):3806-3815. doi:10.1128/JCM.41.8.3806-3815.2003.

Akinyemi, Kabir O et al. "The potential role of mobile phones in the spread of bacterial infections." *Journal of infection in developing countries* vol. 3,8 628-32. 15 Sep. 2009, doi:10.3855/jidc.556

American Diabetes Association. ADA Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S15-S33.

Archer, Nathan K et al. "Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease." *Virulence* vol. 2,5 (2011): 445-59. doi:10.4161/viru.2.5.17724

Arciola, C R et al. "Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections." *Journal of clinical microbiology* vol. 39,6 (2001): 2151-6. doi:10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001

Argudín, María Ángeles et al. "Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins." *Toxins* vol. 2,7 (2010): 1751-73. doi:10.3390/toxins2071751

Armbruster, C. E. et al. Indirect pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in polymicrobial otitis media occurs via interspecies quorum signaling. 2010. *mBio*, v. 1, n. 3, p. 1–9.

Balaban, N, and A Rasooly. "Staphylococcal enterotoxins." *International journal of food microbiology* vol. 61,1 (2000): 1-10. doi:10.1016/s0168-1605(00)00377-9

Bardiau M., Caplin J., Detilleux J., Graber H., Moroni P., Taminiau B. & Mainil J.G. 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Vet. Microbiol.* 185:1-6.

Bardoel, Bart W et al. "The balancing act of neutrophils." *Cell host & microbe* vol. 15,5 (2014): 526-36. doi:10.1016/j.chom.2014.04.011

Becker, K et al. "Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene." *Journal of clinical microbiology* vol. 36,9 (1998): 2548-53. doi:10.1128/JCM.36.9.2548-2553.1998

BECKER, R. E. et al. Tissue-specific patterning of host innate immune responses by *Staphylococcus aureus* α -toxin. *Journal of innate immunity*, v. 6, n. 5, p. 619-631, 2014.

BHATIA, A & Zahoor, Shahina. *Staphylococcus Aureus Enterotoxins: A Review.* *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 1; 2007.

Bhattacharya, Mohini et al. "Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms." *Expert review of anti-infective therapy* vol. 13,12 (2015): 1499-516. doi:10.1586/14787210.2015.1100533

BINSFELD, P. C. et al. Classificação de risco dos agentes biológicos de importância para a saúde pública. *International Journal of Biosafety and Biosecurity*, v. 1, n. 2, 2010.

Bohach, G A et al. "Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses." *Critical reviews in microbiology* vol. 17,4 (1990): 251-72. doi:10.3109/10408419009105728

Booth, M. C., L. M. Pence, P. Mahasreshti, M. C. Callegan, and M. S. Gilmore. 2001. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect. Immun.* 69:345–352.

Boulton AJ, Armstrong DG, Albert SF, et al. Comprehensive foot examination and risk assessment: a report of the task force of the foot care interest group of the American Diabetes Association, with endorsement by the American Association of Clinical Endocrinologists. *Diabetes Care.* 2008;31(8):1679-1685.

BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S. Community-acquired methicillin resistant

Staphylococcus aureus: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab. Investig.* 2006; 87:3–9.C

Burke, F. M., McCormack, N., Rindi, S., Speziale, P., and Foster, T. J. (2010). Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 10:160. doi: 10.1186/1471-2180-10-160

Cabral K., Lämmler C., Zschöck M., Langoni H., De Sá M.E.P., Victória C. & Da Silva A. 2004. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can. J. Microbiol.* 50(11):901-909.

Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;(6):CD007543.

Callaghan, Brian C et al. “Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments.” *The Lancet. Neurology* vol. 11,6 (2012): 521-34. doi:10.1016/S1474-4422(12)70065-0

Campbell, Steven J et al. “Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections.” *Journal of clinical microbiology* vol. 46,2 (2008): 678-84. doi:10.1128/JCM.01822-07

Cardoso, N. A., et al.. “Fatores De Risco Para Mortalidade Em Pacientes Submetidos a Amputações Maiores Por Pé Diabético Infectado”. *Jornal Vascular Brasileiro*, vol. 17, no. J. vasc. bras., 2018 17(4), Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vascular (SBACV), Oct. 2018, pp. 296–302, doi:10.1590/1677-5449.010717

Carfora, V.; Caprioli, A.; Marri, N.; Sagrafoli, D.; Boselli, C.; Giacinti, G.; Giangolini, G.; Sorbara, L.; Dottarelli, S.; Battisti, A.; Amatiste, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *International Dairy Journal*, 42: 12-15, 2015.

CDC. (2009). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Centers for Disease Control and Prevention.

Chen, Qi, and Sangma Xie. “Genotypes, Enterotoxin Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Associated with Foodborne Outbreaks in Hangzhou, China.” *Toxins* vol. 11,6 307. 29 May. 2019, doi:10.3390/toxins11060307

Chen, Yan et al. "Complete genome sequence of a Pantón-Valentine leukocidin-negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain of sequence type 72 from Korea." *PloS one* vol. 8,8 e72803. 20 Aug. 2013, doi:10.1371/journal.pone.0072803

Cheung, Ambrose L et al. "The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*." *The international journal of biochemistry & cell biology* vol. 40,3 (2008): 355-61. doi:10.1016/j.biocel.2007.10.032

Cheung, Gordon Y C et al. "Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*." *Virulence* vol. 12,1 (2021): 547-569. doi:10.1080/21505594.2021.1878688

Cuny, C et al. "Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans." *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* vol. 11,1 (2006): 44-7.

Dallacorte TS, Indras DM, Teixeira JJV, et al. Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de hemoculturas realizadas em hospitais particulares. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2016;75:1702.

de Melo, Roberta Crevelário et al. "Gestão das intervenções de prevenção e controle da resistência a antimicrobianos em hospitais: revisão de evidências" [Prevention and control of antimicrobial stewardship: a review of evidence Gestión de las intervenciones en materia de prevención y control de la resistencia a los antimicrobianos en los hospitales: revisión de la evidencia]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health* vol. 44 e35. 23 Sep. 2020, doi:10.26633/RPSP.2020.35

de Oliveira Calsolari, Regina Adriana et al. "Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil." *Microbiology and immunology* vol. 55,6 (2011): 394-407. doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00336.x

Delany, Isabel et al. "Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* vol. 3,5 a012476. 1 May. 2013, doi:10.1101/cshperspect.a012476

Desjardins, P., B. Picard, B. Kaltenbock, J. Elion, and E. Denamur. 1995. Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction fragment-length

polymorphism. *J. Mol. Evol.* 41:440–448

Deurenberg, Ruud H, and Ellen E Stobberingh. "The evolution of *Staphylococcus aureus*." *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* vol. 8,6 (2008): 747-63. doi:10.1016/j.meegid.2008.07.007

DIEP, B. A.; OTTO, M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends in microbiology.* 2008;16(8):361-369. doi:10.1016/j.tim.2008.05.002.

Diep, Binh An et al. "Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Lancet (London, England)* vol. 367,9512 (2006): 731-9. doi:10.1016/S0140-6736(06)68231-7

Diep, Binh An et al. "Goeris." *The Journal of infectious diseases* vol. 197,11 (2008): 1523-30. doi:10.1086/587907

DORMANESH, B.; SIROOSBAKHAT, S.; KHODAVERDI DARIAN, E.; AFSHARKHAS, L. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated From Various Types of Hospital Infections in Pediatrics: Panton-Valentine Leukocidin, Staphylococcal Chromosomal Cassette mec SCCmec Phenotypes and Antibiotic Resistance Properties. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2015;8(11):e11341. doi:10.5812/jjm.11341.

Dyck PJ, Albers JW, Andersen H, et al. Diabetic polyneuropathies: update on research definition, diagnostic criteria and estimation of severity. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011;27(7):620-628.

Falkow, S. 1997. What is a pathogen? *ASM News* 63:359–370.

Falugi, Fabiana et al. "Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*." *mBio* vol. 4,5 e00575-13. 27 Aug. 2013, doi:10.1128/mBio.00575-13

Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(12):948-958.

Foster, Timothy J. "Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*." *Microbiology spectrum* vol. 7,4 (2019): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0046-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0046-2018

Foster, Timothy J. "The *Staphylococcus aureus* "superbug"." *The Journal of*

clinical investigation vol. 114,12 (2004): 1693-6. doi:10.1172/JCI23825

Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Amin M, Hassan I, Abolella H et al (2009) Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 3:342–351

Gajdács, Márió et al. “Comparative Epidemiology and Resistance Trends of Common Urinary Pathogens in a Tertiary-Care Hospital: A 10-Year Surveillance Study.” *Medicina* (Kaunas, Lithuania) vol. 55,7 356. 9 Jul. 2019, doi:10.3390/medicina55070356

GARCIA, TF et al . Perfil microbiológico das infecções de úlceras de perna: estudo de revisão. *Rev. Bras. Enferm.*, Brasília , v. 74, n. 3, e20190763, 2021

Gelatti CL, Bonamigo RR, Becker AN, Eidt LM, Ganassini L, Azevedo PA. Phenotypic, molecular and antimicrobial susceptibility assessment in isolates from chronic ulcers of cured leprosy patients: a case study in Southern Brazil. *An Bras Dermatol.* 2014;89(3):404-8

Gerke, C., A. Kraft, R. Sussmuth, O. Schweitzer, and F. Gotz. 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273:18586–18593.

Goering, Richard V et al. “Epidemiologic distribution of the arginine catabolic mobile element among selected methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates.” *Journal of clinical microbiology* vol. 45,6 (2007): 1981-4. doi:10.1128/JCM.00273-07

Gong, Jian et al. “The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine intracranial abscesses model.” *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* vol. 18,5 (2014): 501-6. doi:10.1016/j.bjid.2014.03.005

Granslo, Hildegunn N et al. “Arginine catabolic mobile element is associated with low antibiotic resistance and low pathogenicity in *Staphylococcus epidermidis* from neonates.” *Pediatric research* vol. 68,3 (2010): 237-41. doi:10.1203/PDR.0b013e3181eb01e0

Gründling A, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* mutants with increased lysostaphin resistance. *J Bacteriol.* 2006;188(17):6286-6297.

Hacker, J, and J B Kaper. “Pathogenicity islands and the evolution of

microbes." Annual review of microbiology vol. 54 (2000): 641-79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.641

Heinrichs, J H et al. "Characterization of the sar locus and its interaction with agr in *Staphylococcus aureus*." Journal of bacteriology vol. 178,2 (1996): 418-23. doi:10.1128/jb.178.2.418-423.1996

Hinchliffe RJ, Brownrigg JR, Apelqvist J, et al. IWGDF guidance on peripheral artery disease and infection. Diabetes Metab Res Rev. 2016;32 Suppl 1:230-237.

Hoyos-Mallecot, Y et al. "MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp." Letters in applied microbiology vol. 58,4 (2014): 325-9.

Inoshima, Ichiro et al. "A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice." Nature medicine vol. 17,10 1310-4. 18 Sep. 2011, doi:10.1038/nm.2451

International Diabetes Federation. IDF Clinical Practice Recommendations for Managing Type 2 Diabetes in Primary Care. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 9th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2019.

Ito, Teruyo et al. "Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*." Antimicrobial agents and chemotherapy vol. 48,7 (2004): 2637-51. doi:10.1128/AAC.48.7.2637-2651.2004

Jarraud, S et al. "Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever." Journal of clinical microbiology vol. 37,8 (1999): 2446-9. doi:10.1128/JCM.37.8.2446-2449.1999

Jarraud, Sophie et al. "Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease." Infection and immunity vol. 70,2 (2002): 631-41. doi:10.1128/IAI.70.2.631-641.2002

Johnson, W M et al. "Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction." Journal of clinical microbiology vol. 29,3 (1991): 426-30. doi:10.1128/jcm.29.3.426-430.1991

Karah, Nabil et al. "Insights into the global molecular epidemiology of

carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*.” Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy vol. 15,4 (2012): 237-47. doi:10.1016/j.drup.2012.06.001

Kiser, K B et al. “Staphylococcus aureus cap5P encodes a UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase with functional redundancy.” Journal of bacteriology vol. 181,16 (1999): 4818-24. doi:10.1128/JB.181.16.4818-4824.1999

Köck, Robin et al. “Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany.” PloS one vol. 8,2 (2013): e55040.

Krakauer, Teresa. “Staphylococcal Superantigens: Pyrogenic Toxins Induce Toxic Shock.” Toxins vol. 11,3 178. 23 Mar. 2019, doi:10.3390/toxins11030178

Kropec, Andrea et al. “Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection.” Infection and immunity vol. 73,10 (2005): 6868-76. doi:10.1128/IAI.73.10.6868-6876.2005

Kumar, J Dinesh et al. “Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency.” International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases vol. 13,6 (2009): e450-5. doi:10.1016/j.ijid.2009.02.020

Kuroda, M et al. “Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.” Lancet (London, England) vol. 357,9264 (2001): 1225-40. doi:10.1016/s0140-6736(00)04403-2

Lakhundi, Sahreena, and Kunyan Zhang. “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology.” Clinical microbiology reviews vol. 31,4 e00020-18. 12 Sep. 2018, doi:10.1128/CMR.00020-18

Lamaita, H.; Cerqueira, M.; Carmo, L.; Santos, D.; Penna, C.; Souza, M. *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 57(5): 702-709, 2005.

Li M, Du X, Villaruz AE, Diep BA, Wang D, Song Y, Tian Y, Hu J, Yu F, Lu Y, Otto M. 2012. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. Nat Med 18:816–819. doi: 10.1038/nm.2692.

Li Y, Jiang N, Liang X, et al. Adjunctive therapies for diabetic foot ulcers: A

systematic review and network meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020 May;99(19):e20107

Li, Min et al. "Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains." *The Journal of infectious diseases* vol. 202,12 (2010): 1866-76. doi:10.1086/657419

Lin, Tao et al. "Investigation of Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* Isolated from Sterile Body Fluid Samples and Their Correlation with Clinical Symptoms and Outcomes." *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale* vol. 2021 5354747. 26 Dec. 2021, doi:10.1155/2021/5354747

Lina, Gerard et al. "Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*." *The Journal of infectious diseases* vol. 189,12 (2004): 2334-6. doi:10.1086/420852

Lindsay, J. A., A. Ruzin, H. F. Ross, N. Kurepina, and R. P. Novick. 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 29:527–543.

Lindsay, Jodi A. "Staphylococcus aureus genomics and the impact of horizontal gene transfer." *International journal of medical microbiology : IJMM* vol. 304,2 (2014): 103-9.

Lipsky BA. Epidemiology and pathogenesis of foot infections in persons with diabetes. *Curr Diab Rep.* 2007 Apr;7(2):85-93.

Li X, Fang F, Zhao J, Lou N, Li C, Huang T, et al.. Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection. *Braz J Infect Dis [Internet]*. 2018Nov;22(Braz J Infect Dis, 2018 22(6)):487–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.12.001>

López-Garrido, Javier, and Josep Casadesús. "Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation." *Genetics* vol. 184,3 (2010): 637-49. doi:10.1534/genetics.109.108985

Loughman, A., Sweeney, T., Keane, F. M., Pietrocola, G., Speziale, P., and Foster, T. J. (2008). Sequence diversity in the A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *BMC Microbiol.* 8:74. doi: 10.1186/1471-2180-8-74

Lourtet-Hascoët, J et al. "Species and antimicrobial susceptibility testing of

coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections." *Epidemiology and Infection* vol. 146,14 (2018): 1771-1776. doi:10.1017/S0950268818001437

Lowder, Bethan V et al. "Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 106,46 (2009): 19545-50. doi:10.1073/pnas.0909285106

Lowy, F D. "Staphylococcus aureus infections." *The New England Journal of Medicine* vol. 339,8 (1998): 520-32. doi:10.1056/NEJM199808203390806

Machado, Virginia et al. "Presence of genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from food, food establishment surfaces and cases of foodborne diseases." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* vol. 62 e5. 7 Feb. 2020, doi:10.1590/S1678-9946202062005

Magill, Shelley S et al. "Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections." *The New England Journal of Medicine* vol. 370,13 (2014): 1198-208. doi:10.1056/NEJMoa1306801

Maiden, M C et al. "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 95,6 (1998): 3140-5. doi:10.1073/pnas.95.6.3140

MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. *Staphylococcus aureus* survival in human blood. *Virulence*, v. 2, n. 6, p. 567-569, Nov./Dec. 2011.

Malone, Matthew et al. "Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* vol. 15,2 (2017): 147-156. doi:10.1080/14787210.2017.1262257

MANFREDI, E. A.; LEOTTA, G.A.; RIVAS, M.. PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y see de *Staphylococcus aureus*: Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Rev. argent. microbiol.*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires , v. 42, n. 3, p. 212-215, sept. 2010 . Disponible en <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412010000300013&lng=es&nrm=iso>

McDevitt, D et al. "Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*." *Molecular Microbiology* vol. 11,2 (1994):

237-48. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00304.x

Messad, N et al. "Distribution of edin in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers." *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* vol. 19,9 (2013): 875-80. doi:10.1111/1469-0691.12084

Milkman, R. 1997. Recombination and population structure in *Escherichia coli*. *Genetics* 146:745–75027 – Smith, J. M., N. H. Smith, M. O'Rourke, and B. G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4384–4388.

Misawa, Yoshiki et al. "Staphylococcus aureus Colonization of the Mouse Gastrointestinal Tract Is Modulated by Wall Teichoic Acid, Capsule, and Surface Proteins." *PLoS pathogens* vol. 11,7 e1005061. 22 Jul. 2015, doi:10.1371/journal.ppat.100506

Miwa, K et al. "Rapid assay for detection of toxic shock syndrome toxin 1 from human sera." *Journal of clinical microbiology* vol. 32,2 (1994): 539-42. doi:10.1128/jcm.32.2.539-542.1994

Monecke, Stefan et al. "Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle." *Veterinary microbiology* vol. 125,1-2 (2007): 128-40. doi:10.1016/j.vetmic.2007.05.016

MOURA, Guilherme S. et al . Gangrenous mastitis in sheep caused by multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro , v. 40, n. 12, p. 947-954, Dec. 2020 . Available from <http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2020001200947&lng=en&nrm=iso>.

Nasaj, M.; Saeidi, Z.; Tahmasebi, H.; Dehbashi, S.; Arabestani, M.R. Prevalence and distribution of resistance and enterotoxins/enterotoxin-like genes in different clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus*. *Eur. J. Med. Res.* 2020, 25, 48.

Ng, Wai-Leung, and Bonnie L Bassler. "Bacterial quorum-sensing network architectures." *Annual review of genetics* vol. 43 (2009): 197-222. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134304

Novick, Richard P, and Edward Geisinger. "Quorum sensing in staphylococci." *Annual review of genetics* vol. 42 (2008): 541-64. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091640

Oliveira, Duarte C, and Hermínia de Lencastre. "Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 46,7 (2002): 2155-61. doi:10.1128/AAC.46.7.2155-2161.2002

Otto, Michael. "Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* vol. 35,1 (2013): 4-11. doi:10.1002/bies.201200112

Otto, Michael. "Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections." *Seminars in immunopathology* vol. 34,2 (2012): 201-14. doi:10.1007/s00281-011-0296-2

Otto, Michael. "Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity." *Annual review of medicine* vol. 64 (2013): 175-88. doi:10.1146/annurev-med-042711-140023

Otto, Michael. "Staphylococcus aureus toxins." *Current opinion in microbiology* vol. 17 (2014): 32-7. doi:10.1016/j.mib.2013.11.004

Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:677-701.

Peacock, Sharon J et al. "Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*." *Infection and immunity* vol. 70,9 (2002): 4987-96. doi:10.1128/IAI.70.9.4987-4996.2002

Perim, Michele Cezimbra et al. "Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* vol. 48,5 (2015): 546-54. doi:10.1590/0037-8682-0146-2015

Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, et al. Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2017;40(1):136-154.

Queck, Shu Y et al. "Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA." *PLoS pathogens* vol. 5,7 (2009): e1000533. doi:10.1371/journal.ppat.1000533

REYES-ROBLES, T. et al. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote

infection. *Cell Host & Microbe*, Cambridge, v. 14, n. 4, p. 453-459, Oct. 2013.

Rodriguez SP, Machado AD, Delgado CAG, González YG. Crecimiento bacteriano en la úlcera del pie diabético previo al uso de Heberprot-P. *Bacterial growth in diabetic foot ulcer prior to Heberprot-P. Rev Cub Med Mil.* 2014;43(2):169-75.

Rossetto, Ornella et al. "Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights." *Nature reviews. Microbiology* vol. 12,8 (2014): 535-49. doi:10.1038/nrmicro3295

Růzicková, V et al. "Multiplex PCR for detection of three exfoliative toxin serotype genes in *Staphylococcus aureus*." *Folia microbiologica* vol. 50,6 (2005): 499-502. doi:10.1007/BF02931437

Saïd-Salim, B et al. "Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot." *Journal of bacteriology* vol. 185,2 (2003): 610-9. doi:10.1128/JB.185.2.610-619.2003

Salamandane A, Oliveira J, Coelho M, Ramos B, Cunha MV, Malfeito-Ferreira M, Brito L. Enterotoxin- and Antibiotic-Resistance-Encoding Genes Are Present in Both Coagulase-Positive and Coagulase-Negative Foodborne *Staphylococcus* Strains. *Applied Microbiology.* 2022; 2(2):367-380. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2020028>

Salasia, Siti & Khusnan, & Artanto, Sidna. Distribution of cap5 and cap8 genes of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis cows in Central Java, Indonesia; 2004. *Indonesian Journal of Biotechnology.* 701-705.

SALGUEIRO, V. C.; IORIO, N. L. P.; FERREIRA, M. C.; et al. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. *BMC Microbiology.* 2017;17:15. doi:10.1186/s12866-017-0930-9.

SANTOS, André Luis dos et al . *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab.,* Rio de Janeiro , v. 43, n. 6, p. 413-423, Dec. 2007.

Sayed, Nour et al. "Functional and structural insights of a *Staphylococcus aureus* apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module." *The Journal of biological chemistry* vol. 287,52 (2012): 43454-63.

Schad, E M et al. "A structural and functional comparison of staphylococcal enterotoxins A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity." *Journal of*

molecular biology vol. 269,2 (1997): 270-80. doi:10.1006/jmbi.1997.1023

Shinji, Hitomi et al. "Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*." *Infection and immunity* vol. 79,6 (2011): 2215-23. doi:10.1128/IAI.00133-11

Shore, Anna C, and David C Coleman. "Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights." *International journal of medical microbiology : IJMM* vol. 303,6-7 (2013): 350-9. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.002

Siboo, I R et al. "Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets." *Infection and immunity* vol. 69,5 (2001): 3120-7. doi:10.1128/IAI.69.5.3120-3127.2001

Silva De, Silva GDI, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR et al (2002) The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 40:382–388

Sinha, B et al. "Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1." *Cellular microbiology* vol. 1,2 (1999): 101-17. doi:10.1046/j.1462-5822.1999.00011.x

Solati, Seyed Mostafa et al. "Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran." *AMB Express* vol. 5,1 (2015): 134. doi:10.1186/s13568-015-0134-3

SOTTO, A.; LINA, G.; RICHARD, J. L.; et al. Virulence potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2008;31:2318–2324. doi: 10.2337/dc08-1010

Strommenger, B et al. "Multiplex PCR for rapid detection of *Staphylococcus aureus* isolates suspected to represent community-acquired strains." *Journal of clinical microbiology* vol. 46,2 (2008): 582-7. doi:10.1128/JCM.01600-07

Tagini, F, and G Greub. "Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* vol. 36,11 (2017): 2007-2020. doi:10.1007/s10096-017-3024-6

Tam, Kayan, and Victor J Torres. "Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes." *Microbiology spectrum* vol. 7,2 (2019): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018

Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care*. 2010;33(10):2285-2293.

Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28 Suppl 1:8-14.

Thammavongsa, Vilasack et al. "Staphylococcal manipulation of host immune responses." *Nature reviews. Microbiology* vol. 13,9 (2015): 529-43. doi:10.1038/nrmicro3521

Thompson, Terissa A, and Paul D Brown. "Association between the agr locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model." *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* vol. 54 (2017): 72-76. doi:10.1016/j.ijid.2016.11.411

Tong, Steven Y C et al. "Effect of Vancomycin or Daptomycin With vs Without an Antistaphylococcal β -Lactam on Mortality, Bacteremia, Relapse, or Treatment Failure in Patients With MRSA Bacteremia: A Randomized Clinical Trial." *JAMA* vol. 323,6 (2020): 527-537.

Tristan, Anne et al. "Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections." *Journal of clinical microbiology* vol. 41,9 (2003): 4465-7. doi:10.1128/JCM.41.9.4465-4467.2003

Tuchscher, Lorena et al. "Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections." *PLoS pathogens* vol. 11,4 e1004870. 29 Apr. 2015, doi:10.1371/journal.ppat.1004870

Vaezi, Sayedeh Saleheh et al. "Application of artificial neural networks to describe the combined effect of pH, time, NaCl and ethanol concentrations on the biofilm formation of *Staphylococcus aureus*." *Microbial pathogenesis* vol. 141 (2020): 103986. doi:10.1016/j.micpath.2020.103986

Valentin-Domelier, Anne-Sophie et al. "Methicillin-susceptible ST398 *Staphylococcus aureus* responsible for bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone?." *PloS one* vol. 6,12 (2011): e28369.

Waele JJ, Akova M, Antonelli M, Canton R, Carlet J, De Backer D, et al. Antimicrobial resistance and antibiotic stewardship programs in the ICU: insistence and persistence in the fight against resistance. A position statement

from ESICM/ESCMID/WAAAR round table on multi-drug resistance. *Intensive Care Med.* 2018;44(2): 89-196.

WHO. (2004). *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. World Health Organization.

Wilke, Georgia A, and Juliane Bubeck Wardenburg. "Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 107,30 (2010): 13473-8. doi:10.1073/pnas.1001815107

Zhang, S., J. J. Iandolo, and G. C. Stewart. 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol. Lett.* 168:227–233.

ANEXO A

Informações sobre os *primers* utilizados nos ensaios de PCR e condições de programação no termociclador (temperatura e tempo) em que foram conduzidas as reações para a triagem de cada gene.

Gene alvo	Sequência do <i>primer</i> (5'-3'), F/R	Amplicon (pb)	Número de ciclos	Condições de Ciclagem
<i>fnbA</i>	CACAACCAGCAAATATAG CTGTGTGGTAATCAATGTC	1,362	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 50°C/60seg/Ext:72°C/2min; Exf: 72°C/7min
<i>fnbB</i>	GTAACAGCTAATGGTCAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	523	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 55°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 10min
<i>clfA</i>	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT CGTTTCTCCGTAGTTGCATTTG	1,584	40	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 45°C/60seg/ Ext: 72°C/2min; Exf:72°C, 7min
<i>hIA</i>	ATGAAAACACGTATAGTCAGCTCAGTAACAAC TTAATTTGTCATTTCTTCTTTTTCCAATCGA	960	35	Abl: 98°C/2min; Ab: 98°C/10seg; Hb: 72°C/20seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 5min
<i>hIB</i>	GTGCACTTACTGACAATAGTGC GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	35	Abl: 94°C/30seg; Ab: 94°C/30seg; Hb: 55°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:72°C/7min
<i>hlgCB</i>	GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC CCATAGACGTAGCAACGGAT	938	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 95°C/60seg; Hb: 55°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 5min
<i>etA</i>	CTATTTACTGTAGGAGCTAG ATTTATTTGATGCTCTCTAT	741	35	Abl: 94°C/4min; Ab: 94°C/30seg; Hb: 54°C/30seg/ Ext: 72°C/90seg; Exf:72°C/7min
<i>etB</i>	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	612	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/45seg; Hb: 55°C/60seg/ Ext: 72°C/90seg; Exf:m72°C/ 10min
<i>etD</i>	CCC GTTGATTAGTCATGCAG TCCAGAATTTCCCGACTCAG	606	35	Abl: 94°C/3min; Ab: 94°C/45seg; Hb: 55°C/45seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 5min (ADAPTADO)
<i>Seh</i>	CAACTGCTGATTTAGCTCAG GTCGAATGAGTAATCTCTAGG	358	35	Abl: 94°C/3min; Ab: 94°C/45seg; Hb: 55°C/45seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 5min (ADAPTADO)
<i>lukED</i>	TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	269	35	Abl: 94°C/30seg; Ab: 94°C/30seg; Hb: 55°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:72°C/7min
<i>lucS/F-PV (PVL)</i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCC GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAGC	432	35	Abl: 94°C/3min; Ab: 94°C/45seg; Hb: 55°C/45seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 5min (ADAPTADO)
<i>ACME-arcA</i>	GCTCAAACCTTGAGAGATGAA TTACGTACGCCAGCCATGAT	216	35	Abl: 94°C/3min; Ab: 94°C/45seg; Hb: 55°C/45seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 5min (ADAPTADO)
<i>EDIN</i>	GAAGTATCTAATACTTCTTTAGCAGC TCATTTGACAATTCTACTTCCAAC	625	35	Abl: 95°C/5min; Ab: 94°C/1min; Hb: 55°C/60seg/ Ext: 72°C/2min; Exf:m72°C/ 10min
<i>TSST</i>	AAGCCCTTGTGCTTGC ATCGAACCTTGGCCCACTTT	447	35	Abl: 95°C/2min; Ab: 95°C/60seg; Hb: 55°C/60seg/ Ext: 72°C/2min; Exf:m72°C/ 5min –

<i>sasX</i>	AGAATTAGAAGTACGTCTAAATGC GCTGATTATGTAAATGACTCAAATG	521	35	Abl: 94°C/4MIN; Ab: 94°C/45seg; Hb: 55°C/45seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 5min (ADAPTADO)
<i>icaA</i>	GATTATGTAATGTGCTTGGGA ACTACTGCTGCGTTAATAAT	770	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 50°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:72°C/5min – 35 ciclos
<i>icaB</i>	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA AAAGTCCCATAAAGCCTGTTT	302	50	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/30seg; Hb: 54°C/30seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 2min
<i>icaC</i>	TAACTTTAGGCGCATATGTTTT TTCCAGTTAGGCTGGTATTG	400	50	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/30seg; Hb: 54°C/30seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 2min
<i>icaD</i>	ATGGTCAAGCCAGACAGAG AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA	198	50	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/30seg; Hb: 55.5°C/30seg/ Ext: 72°C/40seg; Exf:m72°C/ 2min
<i>Agr I</i>	ATCGCAGCTTATAGTACTTGT CTTGATTACGTTTATATTCATC	739	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 50°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/7min – 35 ciclos
<i>Agr II</i>	AACGCTTGACAGCAGTTTATTT CGACATTATAAGTATTACAACA	691	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 50°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/7min – 35 ciclos
<i>Agr III</i>	TATATAAATTGTGATTTTTTATTG TTCTTAAAGAGTAAATTGAGAA	712	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 50°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/7min – 35 ciclos
<i>Agr IV</i>	TATATAAATTGTGATTTTTTATTG TTCTTAAAGAGTAAATTGAGAA	683	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 50°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/7min – 35 ciclos
<i>seA</i>	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	560	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 55°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:72°C/7min – 35 ciclos
<i>seB</i>	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	404	35	Abl: 94°C/min; Ab: 94°C/30seg; Hb: 52°C/45seg/ Ext: 72°C/45seg; Exf:m72°C/ 5min
<i>seD</i>	GTGGTGAAATAGATAGGACTGC ATATGAAGGTGCTCTGTGG	384	35	Abl: 94°C/4min; Ab: 94°C/60seg; Hb: 57°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 4min
<i>sel</i>	AGGCAGTCCATCTCCTGTATAA TGCTCAAGGTGATATTGGTGTAG	568	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/2min; Hb: 57°C/2min/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 7min
<i>clfB</i>	TGGCGGCAAATTTTACAGTGACAGA AGAAATGTTTCGCGCCATTTGGTTT	404	35	Abl: 95°C/5min; Ab: 95°C/60seg; Hb: 60°C/60seg/ Ext: 72°C/60seg; Exf:m72°C/ 10min
<i>Cap5</i>	CGAACCGATGATTGATGCTATTG TGCTATGACTGCACCAGTATTT	555	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/ 60 seg; Hb: 61°C/60seg; Ext: 72°C/60seg; Exf: 72°C/ 5min
<i>Cap8</i>	GGAGGAAATGACGATGAGGATAG TAGCTTCTGTAGCGGTGAATG	608	35	Abl: 94°C/5min; Ab: 94°C/ 60 seg; Hb: 61°C/60seg; Ext: 72°C/60seg; Exf: 72°C/ 5min

F/R: Forward/Reverse; pb: pares de bases; Abl: Abertura inicial; Ab: Abertura; Hb: Hibridização; Ext: Extensão; ExF: Extensão final.

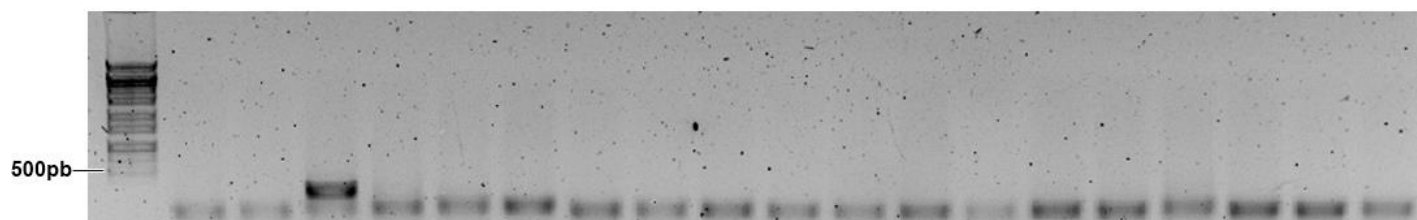
ANEXO B

Resultados das genotipagens dos fatores de virulência agrupados em “Associados a colonização”, “Hemolisinas”, “Enterotoxinas”, “Exotoxinas”, “Leucocidinas” e “Reguladores Genéticos”.

Associados a colonização

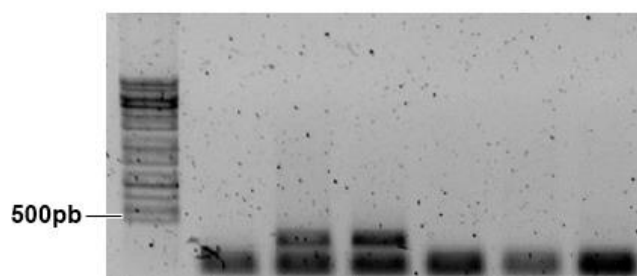
Gene: *clfA* (1584pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



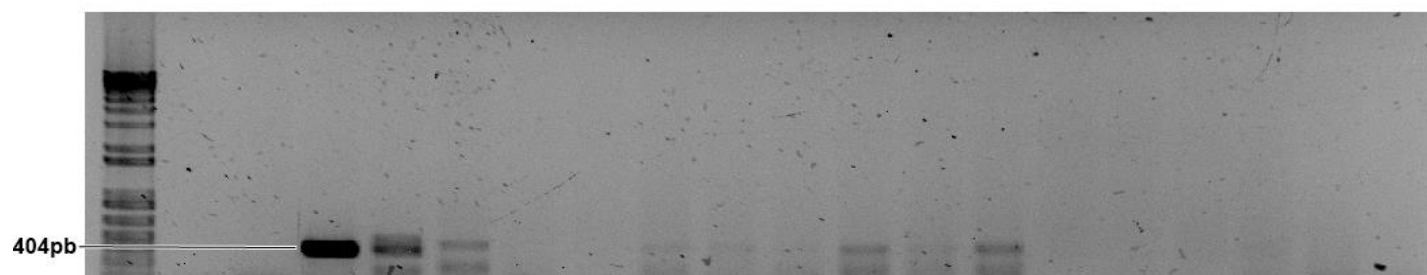
Gene: *clfA* (1584pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



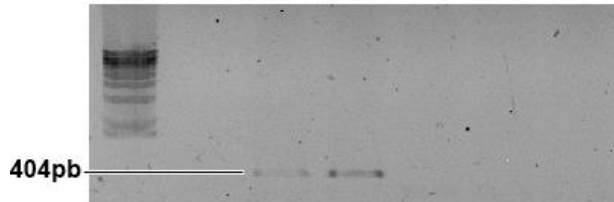
Gene: *clfB* (404pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



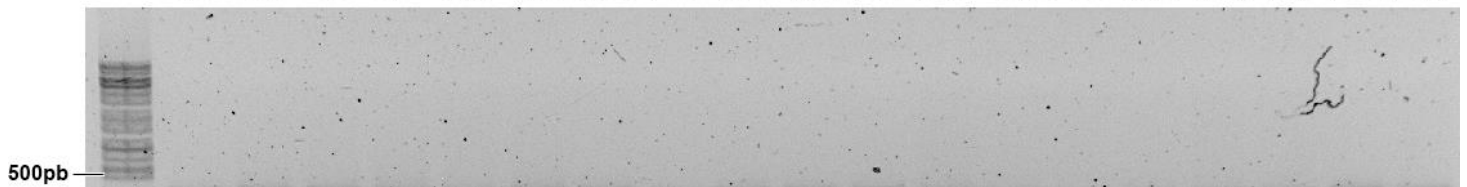
Gene: *clfB* (404pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



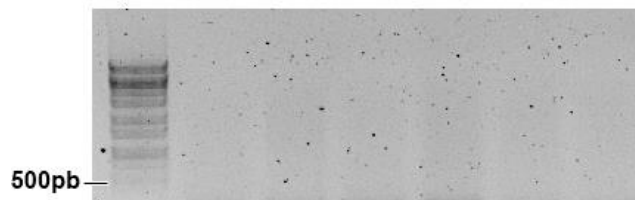
Gene: *fnbA* (1362pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



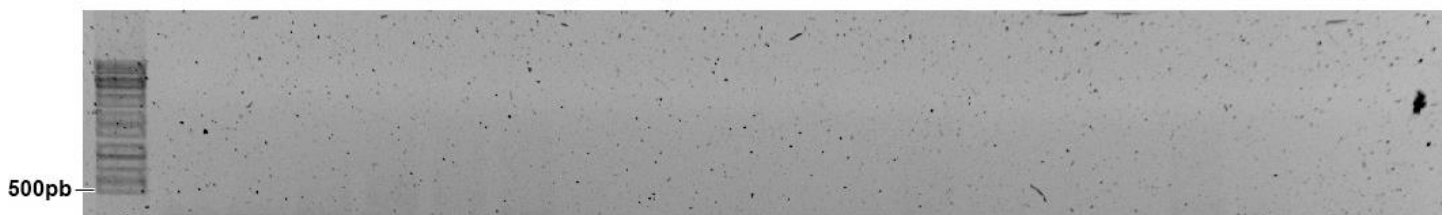
Gene: *fnbA* (1362pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A

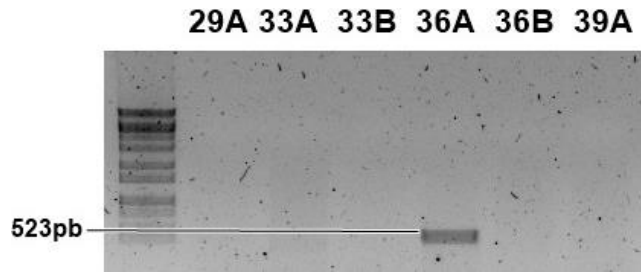


Gene: *fnbB* (523pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



Gene: *fnbB* (523pb)



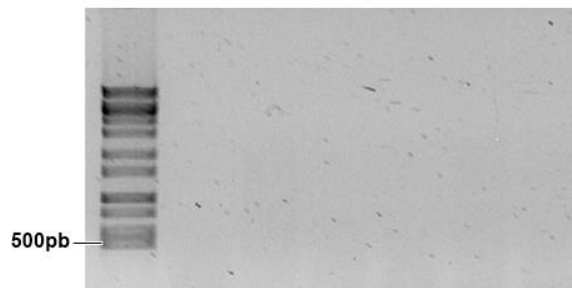
Gene: *EDIN* (625pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



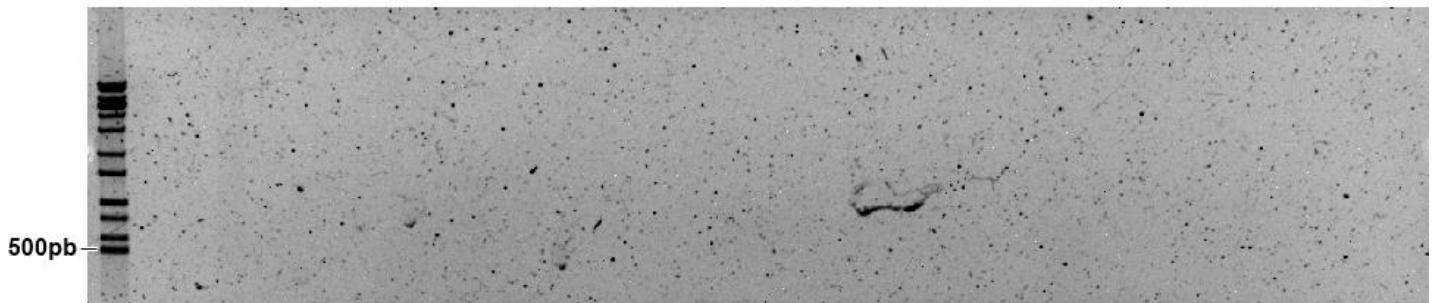
Gene: *EDIN* (625pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A

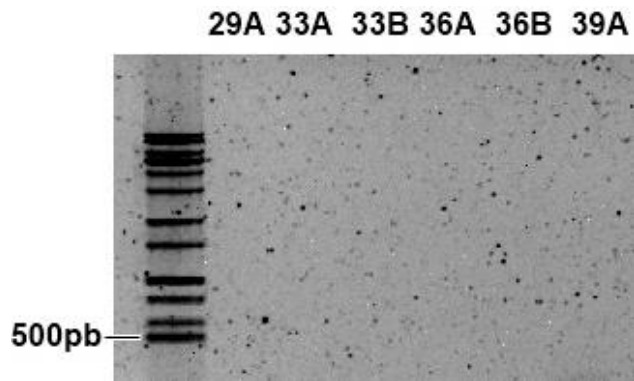


Gene: *sasX* (521pb)

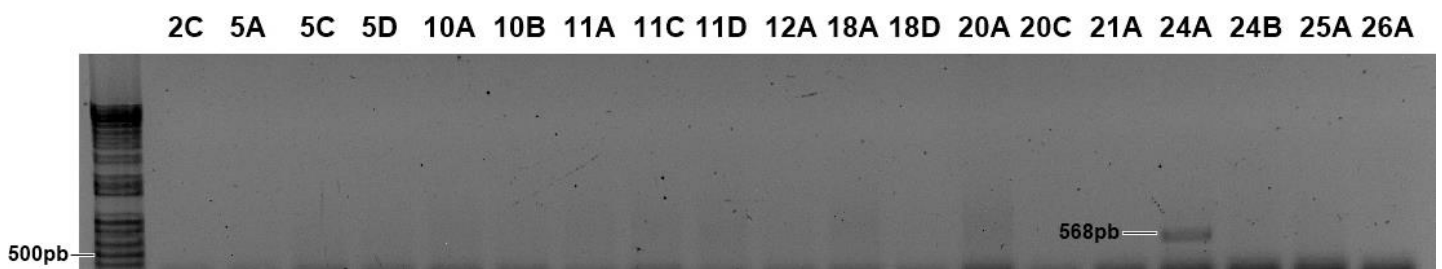
2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



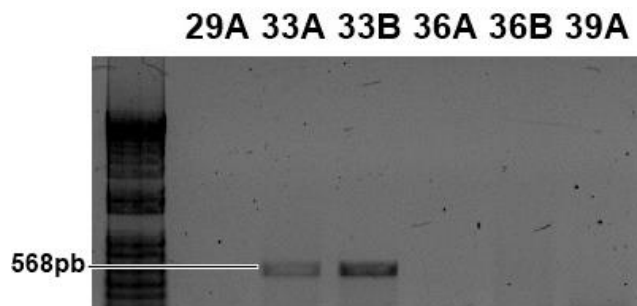
Gene: *sasX* (521pb)



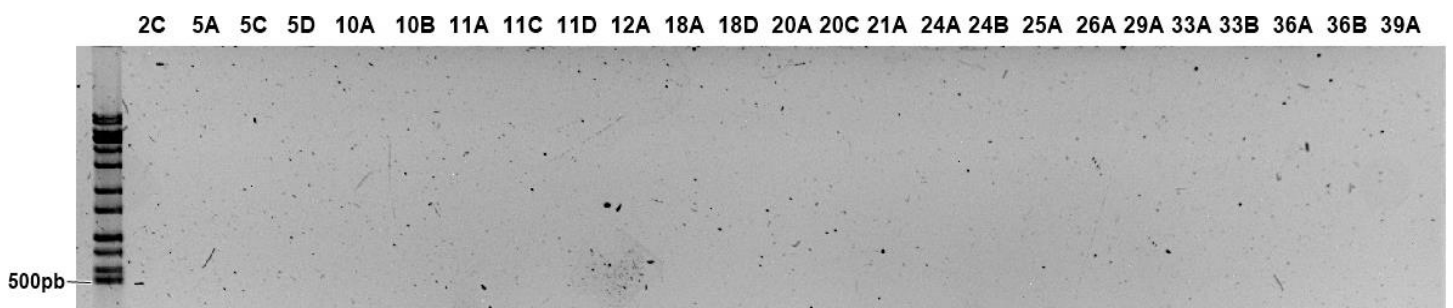
Gene: *sel* (568pb)



Gene: *sel* (568pb)



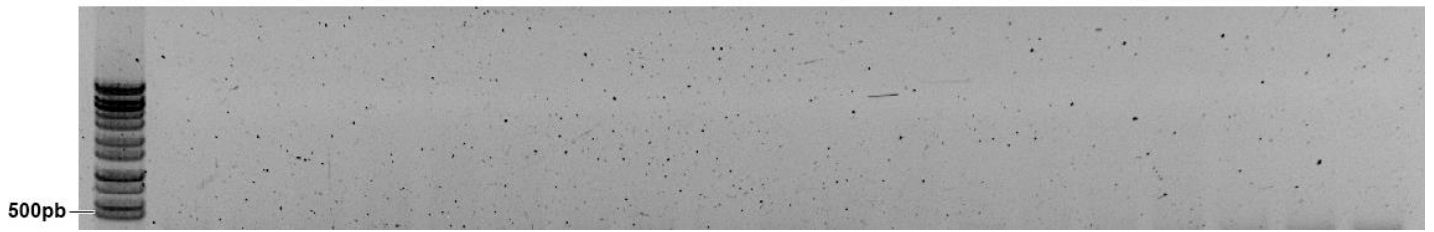
Gene: *seH* (358pb)



Hemolisinas

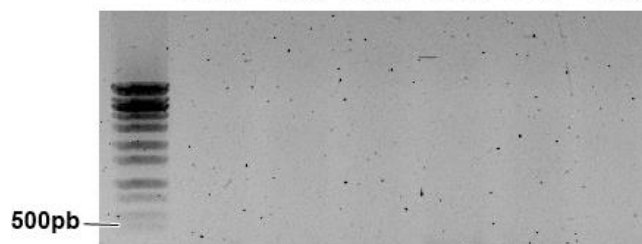
Gene: *hIA* (960pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



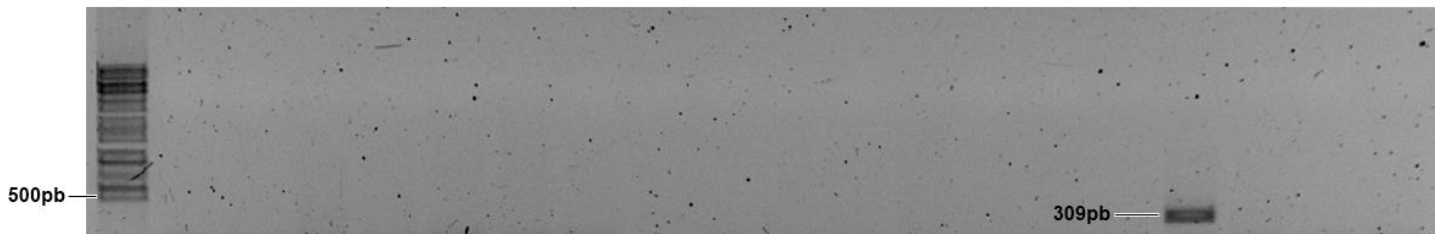
Gene: *hIA* (960pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



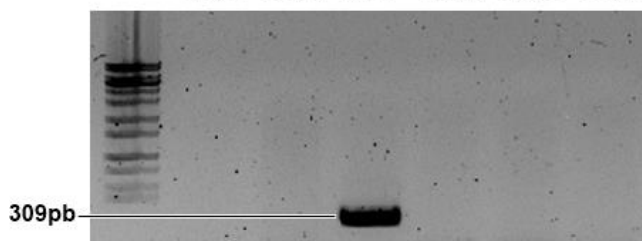
Gene: *hIB* (309pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



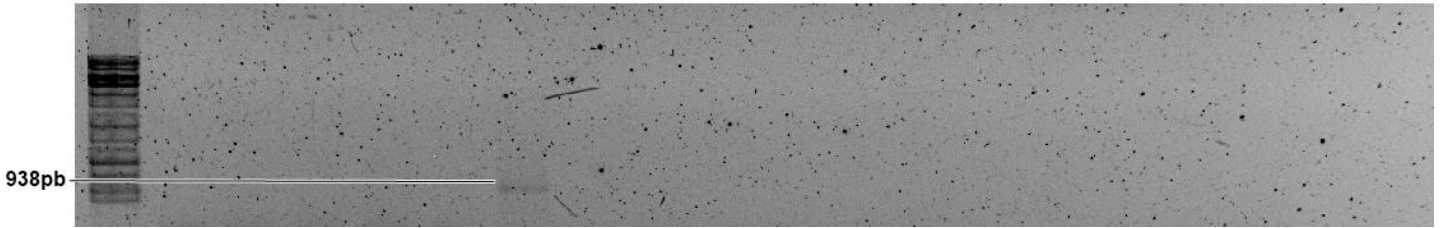
Gene: *hIB* (309pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



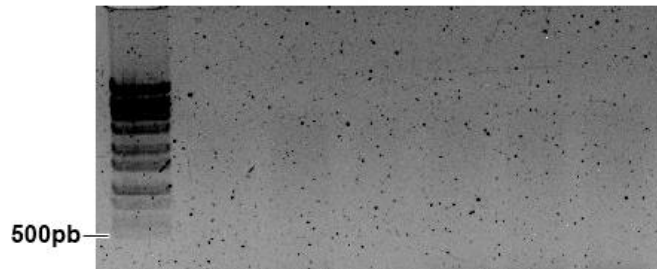
Gene: *hlgCB* (938pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



Gene: *hlgCB* (938pb)

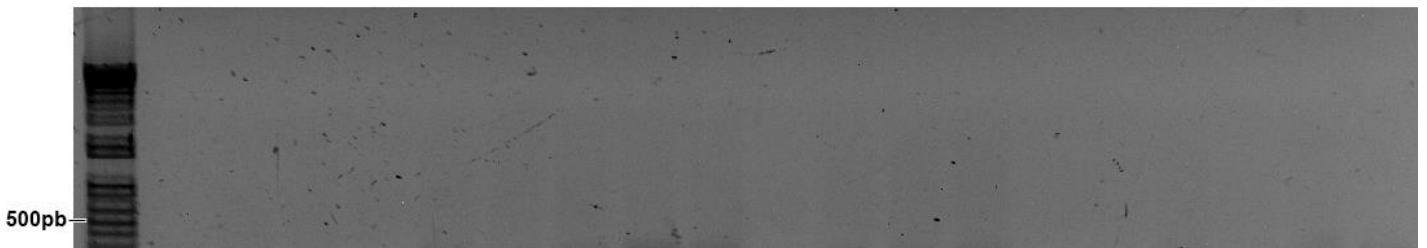
29A 33A 33B 36A 36B 39A



Enterotoxinas

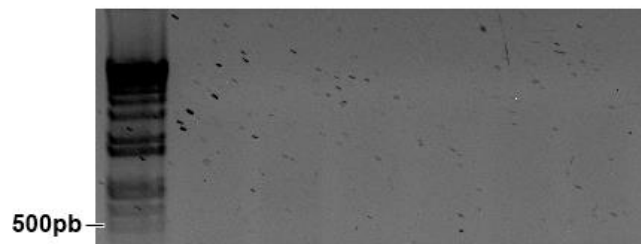
Gene: *seA* (560pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



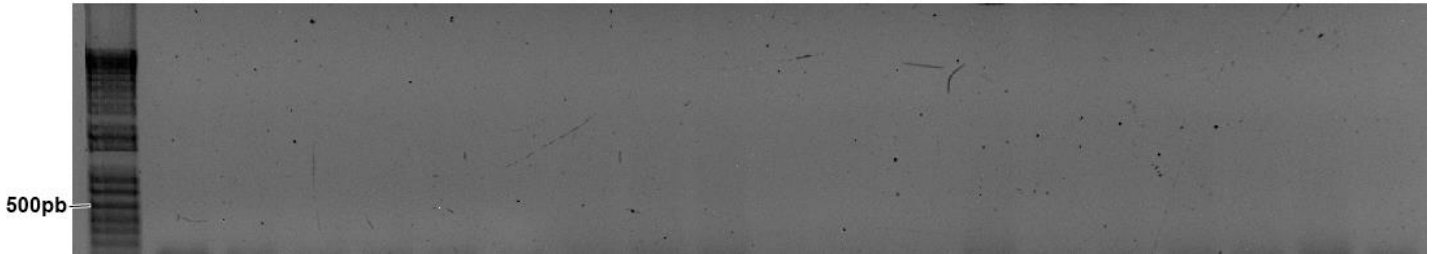
Gene: *seA* (560pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



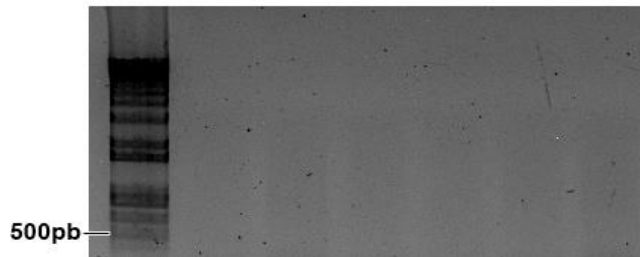
Gene: *seB* (404pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



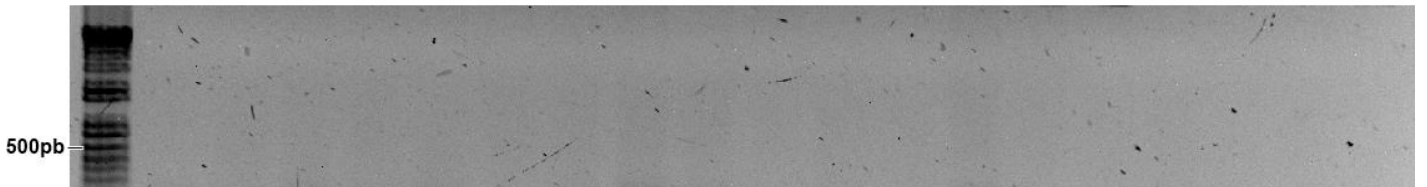
Gene: *seB* (404pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



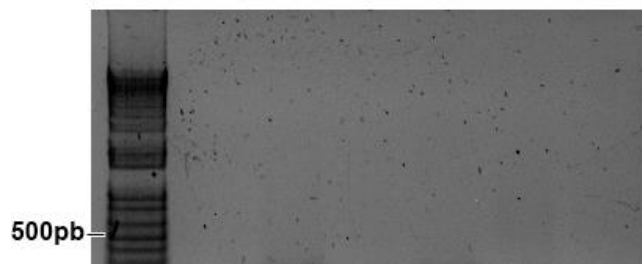
Gene: *seD* (384pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



Gene: *seD* (384pb)

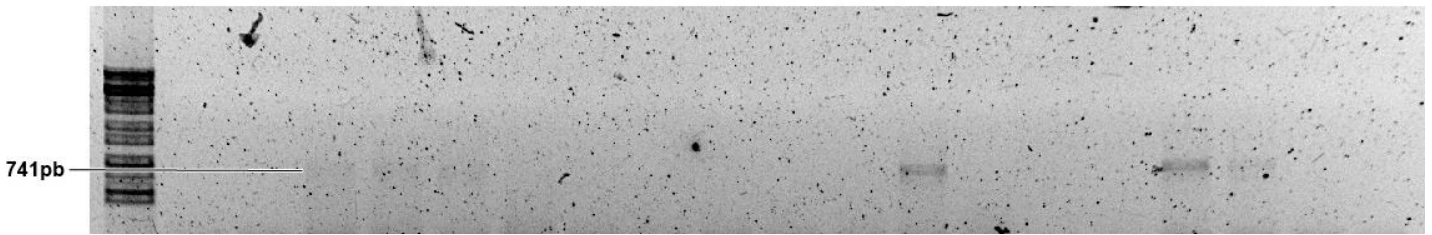
29A 33A 33B 36A 36B 39A



Exotoxinas

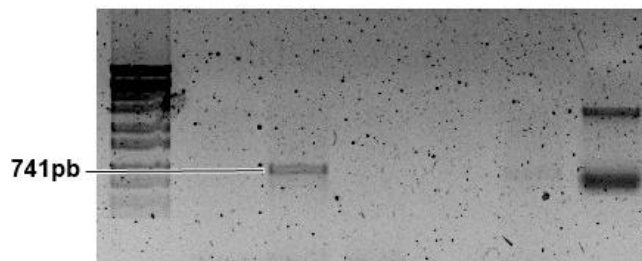
Gene: *etA* (714pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



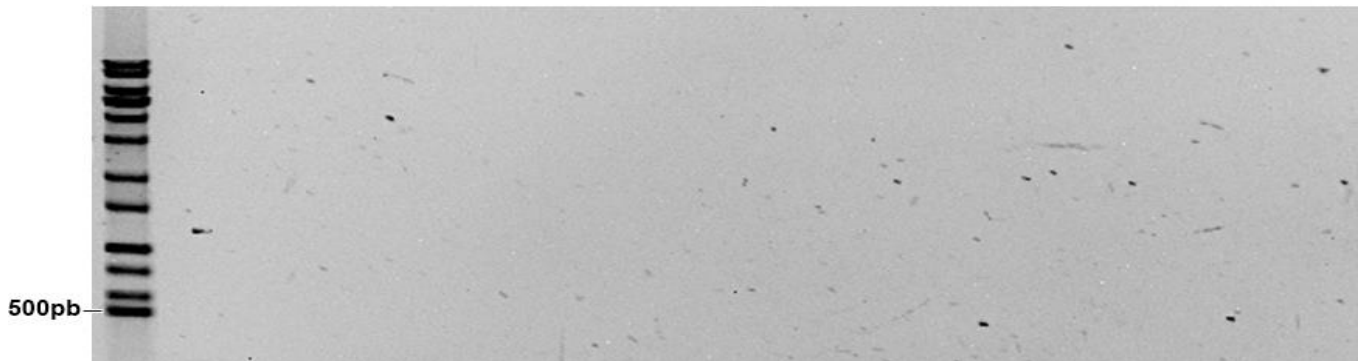
Gene: *etA* (741pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



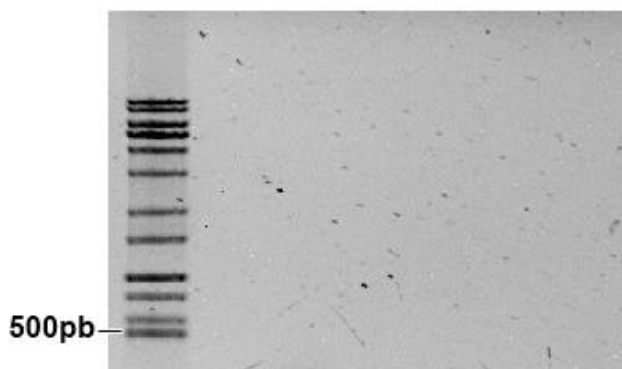
Gene: *etB* (612pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



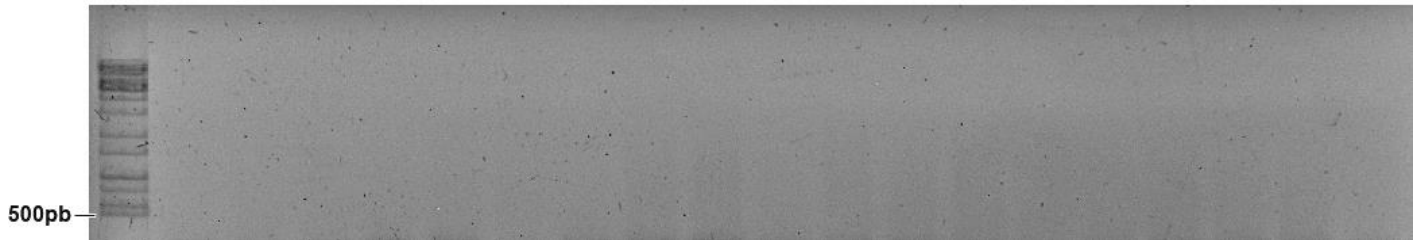
Gene: *etB* (612pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



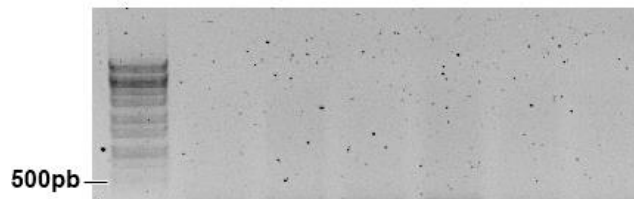
Gene: *etD* (605pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



Gene: *etD* (605pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



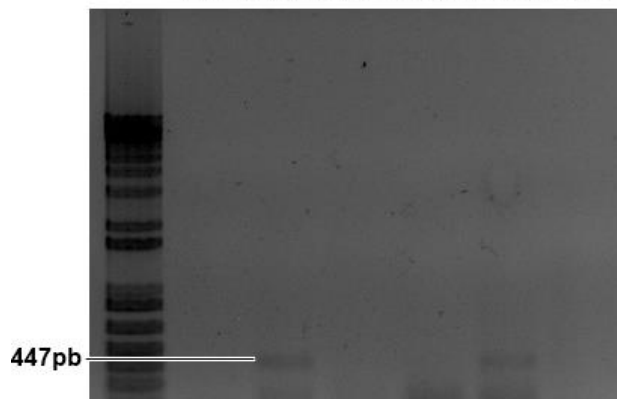
Gene: *TSST* (447pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



Gene: *TSST* (447pb)

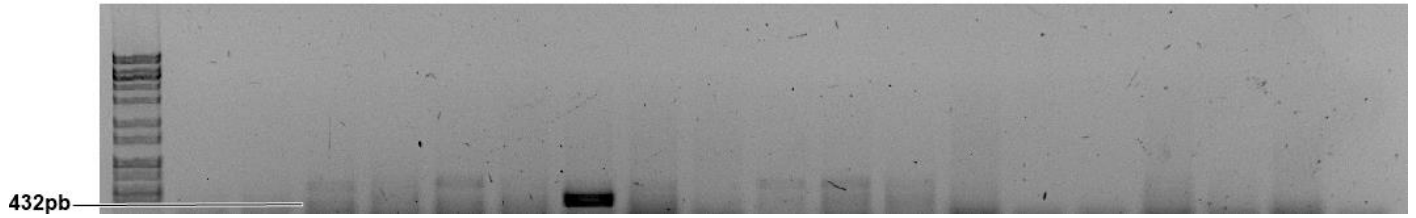
29A 33A 33B 36A 36B 39A



Leucocidinas

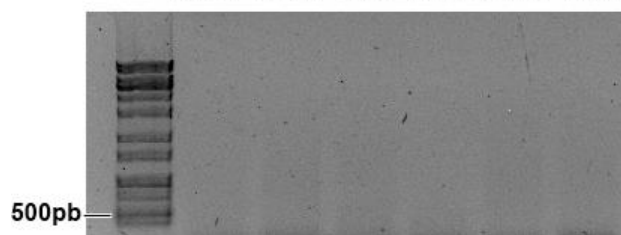
Gene: *LukPV* (432pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



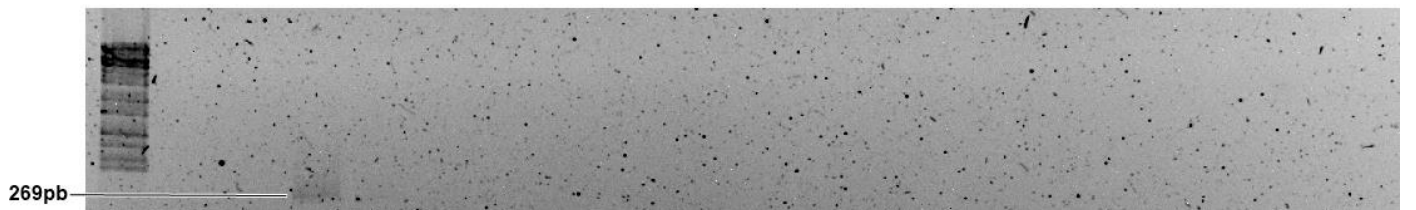
Gene: *LukPV* (432pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



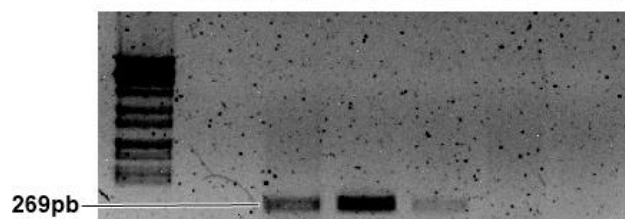
Gene: *LukED* (269pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



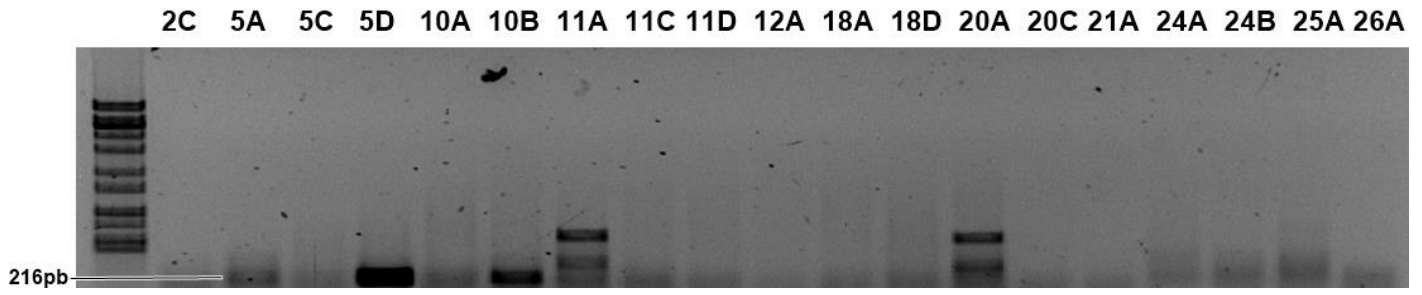
Gene: *LukED* (269pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A

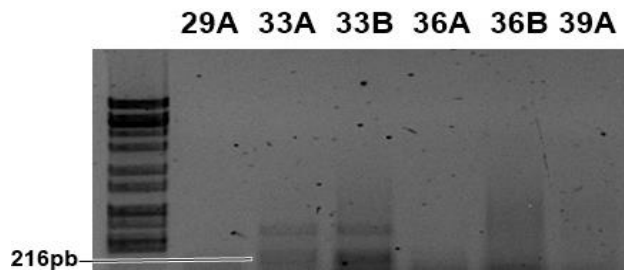


Reguladores Genéticos

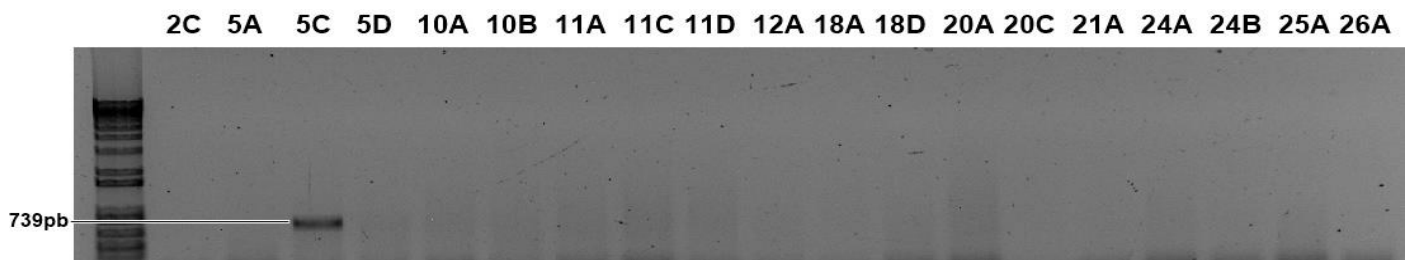
Gene: *arcA* (216pb)



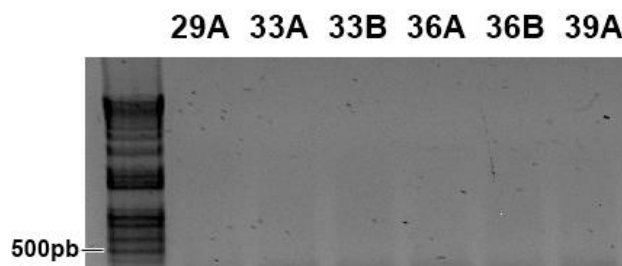
Gene: *arcA* (216pb)



Gene: *AgRI* (739pb)

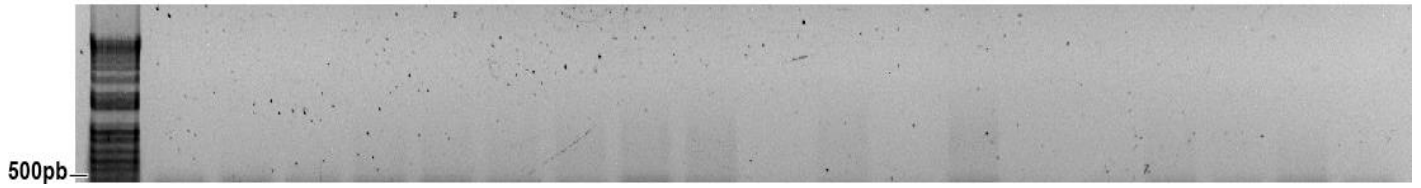


Gene: *AgRI* (739pb)



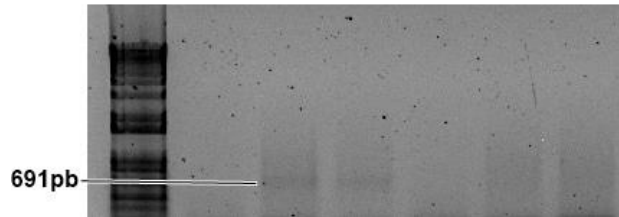
Gene: *AgRI* (691pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



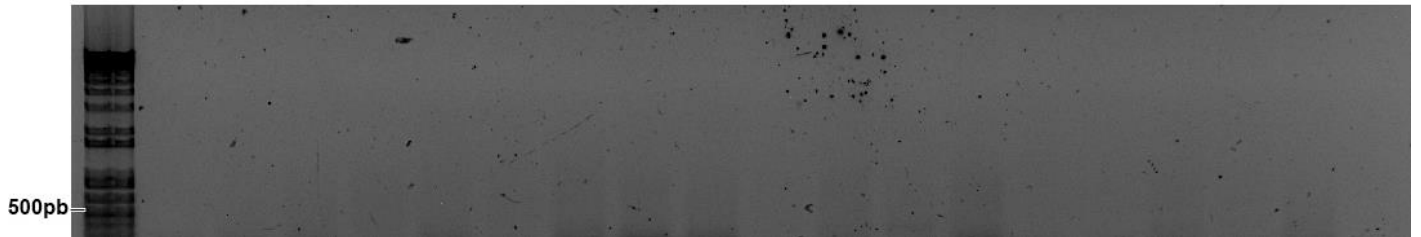
Gene: *AgR II* (691pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



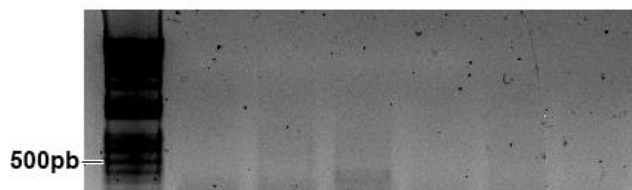
Gene: *AgR III* (712pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



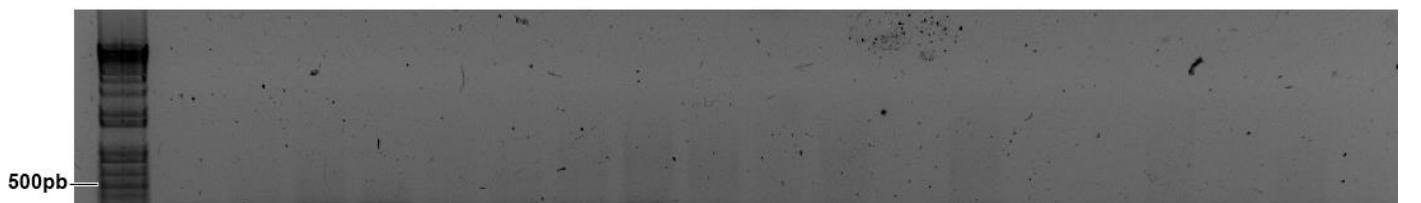
Gene: *AgR III* (712pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



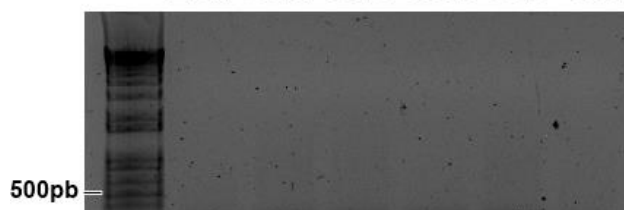
Gene: *AgR IV* (683pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



Gene: *AgR IV* (683pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



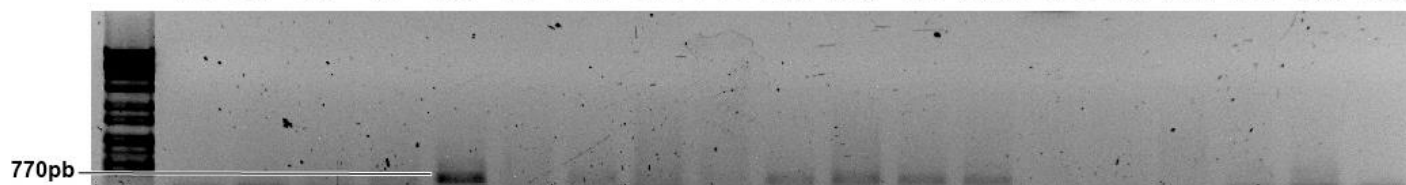
ANEXO C

Resultados das genotipagens dos fatores de virulência agrupados em “Evasinas”, correspondentes aos genes associados à formação de biofilme e cápsula.

Biofilme

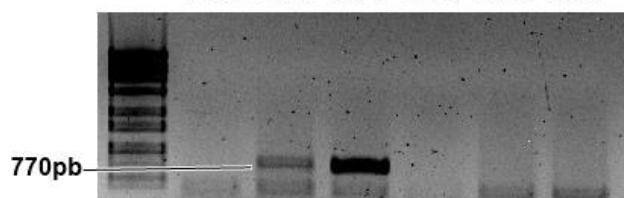
Gene: *icaA* (770pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



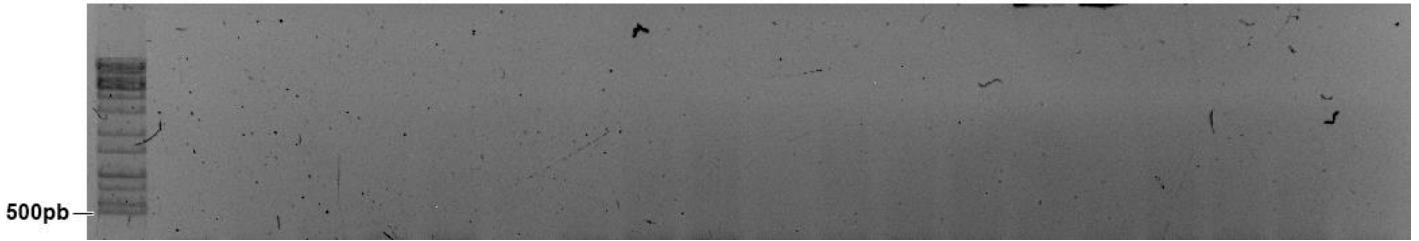
Gene: *icaA* (770pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



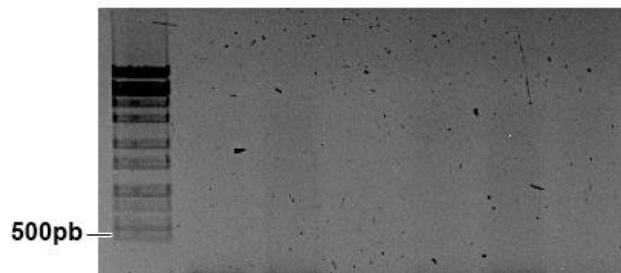
Gene: *icaB* (302pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



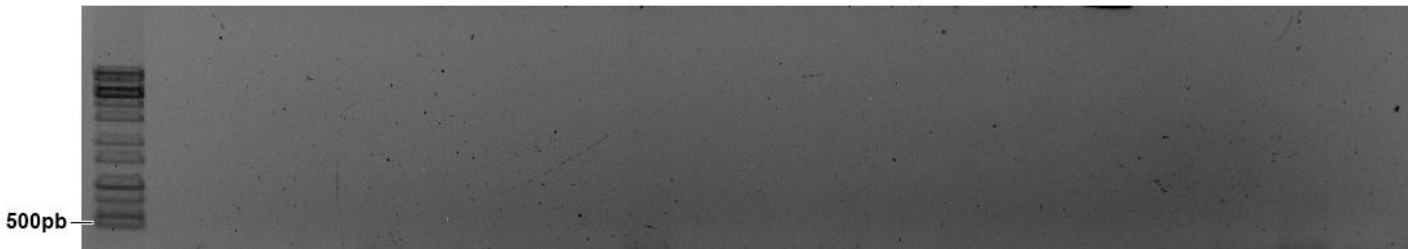
Gene: *icaB* (302pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



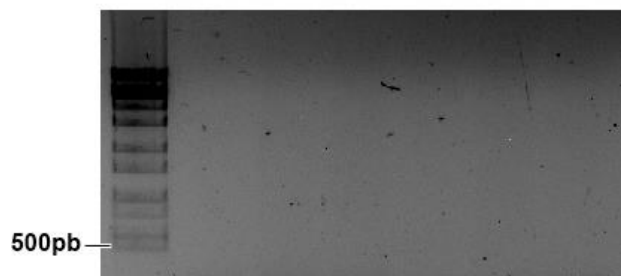
Gene: *icaC* (400pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



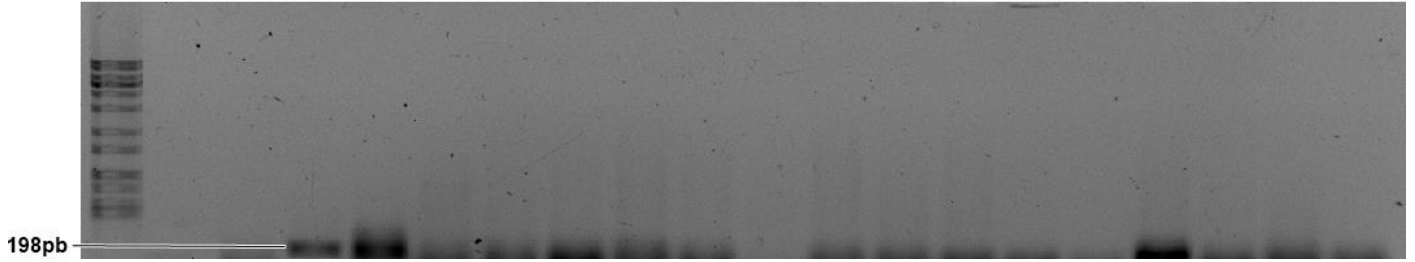
Gene: *icaC* (400pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



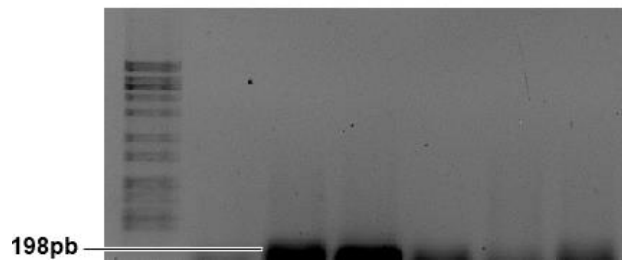
Gene: *icaD* (198pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



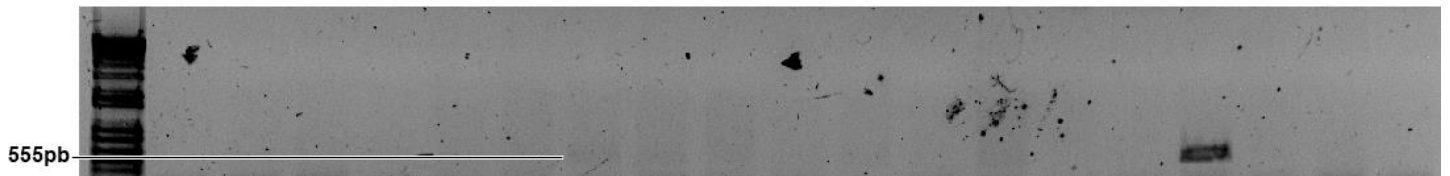
Gene: *icaD* (198pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



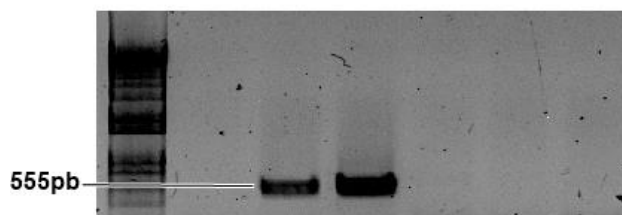
Gene: *cap5* (555pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



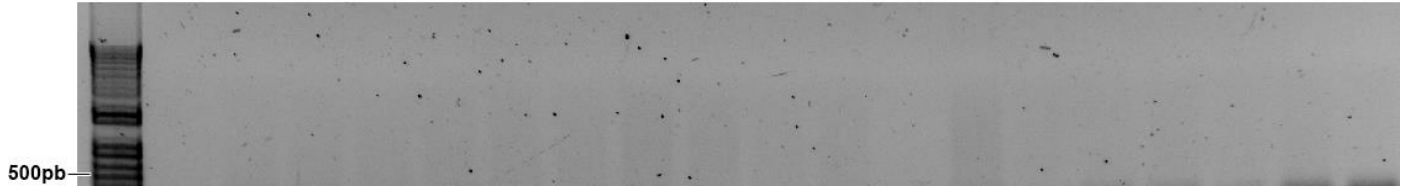
Gene: *cap5* (555pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A



Gene: *cap8* (608pb)

2C 5A 5C 5D 10A 10B 11A 11C 11D 12A 18A 18D 20A 20C 21A 24A 24B 25A 26A



Gene: *cap8* (608pb)

29A 33A 33B 36A 36B 39A

