



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

Nayara de Oliveira Gonçalves da Silva

**Análise da virulência e resistência a antimicrobianos em linhagens
de *Staphylococcus* spp. através de técnicas de genômica e proteômica**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
de título de Mestre em Doenças Tro-
picais.

Orientadora: Prof.^a. Associada Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu – São Paulo

2022

Nayara de Oliveira Gonçalves da Silva

**Análise da virulência e resistência a antimicrobianos em linhagens de
Staphylococcus spp. através de técnicas de genômica e proteômica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Pau-
lista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Associada Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu – São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Nayara de Oliveira Gonçalves da.

Análise da virulência e resistência a antimicrobianos em linhagens de *Staphylococcus* spp. através de técnicas de genômica e proteômica / Nayara de Oliveira Gonçalves da Silva.
- Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Capes: 40101096

1. *Staphylococcus*. 2. Virulência. 3. Resistência microbiana a medicamentos. 4. Unidade de terapia intensiva neonatal.

Palavras-chave: Resistência a antimicrobianos; *Staphylococcus epidermidis*; Unidade de terapia intensiva neonatal; Virulência.



Resumo

RESUMO

O avanço das técnicas moleculares nas últimas décadas nos mostra que o genoma procarioto está em constante evolução. Tais mudanças podem resultar em alterações significativas no comportamento epidemiológico de diversas espécies de micro-organismos patogênicos. *Staphylococcus aureus*, principal representante do grupo dos coagulase-positivo, e *Staphylococcus epidermidis*, principal espécie no grupo dos estafilococos coagulase-negativos (ECN) persistem entre os principais patógenos causadores de infecções adquiridas em hospitais e na comunidade. Diante deste cenário, a virulência estafilocócica e a disseminação de linhagens multidroga resistentes (MDR) representam um sério problema de saúde pública. Neste contexto, alguns métodos são de extrema importância, como por exemplo a identificação e investigação molecular de genes e proteínas relacionados a patogenicidade. Além disso, o número crescente de sequências genômicas e proteômicas depositadas nos bancos de dados tem nos permitido um melhor entendimento acerca da variabilidade do perfil patogênico destes micro-organismos, permitindo assim elucidar os mecanismos relacionados a virulência, resistência e disseminação. Estudos envolvendo linhagens clínicas de ECN têm revelado a presença de genes relacionados a virulência e resistência em linhagens de *S. epidermidis*, evidenciando seu potencial patogênico, além da sua importância como um reservatório de genes, que podem ser transferidos para outras bactérias presentes em um mesmo nicho ecológico. O genoma e proteoma de *S. aureus* vêm sendo amplamente descritos, porém ainda mal caracterizados em linhagens de ECN. Tendo em vista a rápida evolução da virulência e resistência destes micro-organismos e seus altos índices de infecção e mortalidade, são necessários estudos que envolvam o sequenciamento do genoma e proteoma de linhagens de *Staphylococcus* spp., sobretudo de *S. epidermidis*, que vem se destacando como um importante patógeno emergente dentre os ECNs. Diante disso, investigamos linhagens de *S. epidermidis* isoladas de hemoculturas provenientes de recém-nascidos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Foi realizado o sequenciamento

do genoma e proteoma destas linhagens clínicas de *S. epidermidis* com o intuito de caracterizar a presença de genes e proteínas relacionados a patogenicidade destes isolados clínicos. Além disso, as amostras foram analisadas quanto ao perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos. O resultado do sequenciamento do genoma total das duas linhagens clínicas revelou genes relacionados a resistência a tetraciclina, gentamicina, cefoxitina/oxacilina, penicilina, trimetoprim, ácido fusídico, ciprofloxacina e outras quinolonas, bem como genes codificadores de fatores de virulência para produção de enzimas e toxinas relacionados a mecanismos de aderência, evasão imune e sistemas de secreção. A análise proteômica mostrou a produção de proteínas relacionadas a patogênese, como por exemplo as enzimas SspA (serina V8 protease) e SspB (cisteína protease), além da autolisina Atl, validando os resultados obtidos a partir do sequenciamento. Os resultados deste estudo revelaram uma série de fatores de virulência que provavelmente contribuem para a patogenicidade de *S. epidermidis*, principalmente no que diz respeito a formação de biofilme, além de um repertório de genes de resistência aos antimicrobianos, alertando para a importância de *S. epidermidis* como patógenos emergentes no contexto das infecções nosocomiais. Tendo em vista que as populações de *S. aureus* e *S. epidermidis* podem ocupar nichos ecológicos sobrepostos, o fluxo gênico pode ocorrer entre essas espécies, o que destaca a importância da vigilância contínua para detectar novas linhagens recombinantes que promovem a emergência de micro-organismos multirresistentes e virulentos.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis*, resistência a antimicrobianos, virulência, Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.



Abstract

ABSTRACT

The advancement of molecular techniques in recent decades shows us that the prokaryotic genome is constantly evolving. Such changes can result in significant alterations in the epidemiological behavior of several species of pathogenic microorganisms. *Staphylococcus aureus*, the main representative of the coagulase-positive group, and *Staphylococcus epidermidis*, the main species of the coagulase-negative staphylococci (SCN) group persist among the main pathogens that cause infections acquired in hospitals and in the community. In this scenario, staphylococcal virulence and the spread of multidrug resistant (MDR) strains represent a serious public health problem. In this context, some methods are extremely important, such as the identification and molecular investigation of genes and proteins related to pathogenicity. In addition, the increasing number of genomic and proteomic sequences deposited in databases has allowed us to better understand the variability of the pathogenic profile of these microorganisms, thus allowing us to elucidate the mechanisms related to virulence, resistance and dissemination. Studies involving clinical strains of SCN have revealed the presence of genes related to virulence and resistance in strains of *S. epidermidis*, evidencing its pathogenic potential, in addition to its importance as a reservoir of genes, which can be transferred to other bacteria. present in the same ecological niche. The genome and proteome of *S. aureus* have been widely described, but still poorly characterized in SCN strains. In view of the rapid evolution of virulence and resistance of these microorganisms and their high rates of infection and mortality, studies involving the sequencing of the genome and proteome of strains of *Staphylococcus* spp., especially *S. epidermidis*, which has been standing out as an important emerging pathogen among SCNs. Therefore, we investigated *S. epidermidis* strains isolated from blood cultures from newborns admitted to a Neonatal Intensive Care Unit (NICU). The genome and proteome sequencing of these clinical strains of *S. epidermidis* was performed in order to characterize the presence of genes and proteins related to the pathogenicity of these clinical isolates. Furthermore, the

samples were analyzed for the phenotypic profile of antimicrobial susceptibility. The result of whole genome sequencing of the two clinical strains revealed genes related to resistance to tetracycline, gentamicin, ceftazidime/avopivoxil, penicillin, trimethoprim, fusidic acid, ciprofloxacin and other quinolones, as well as genes encoding virulence factors for production of enzymes and toxins related to adherence mechanisms, immune evasion and secretion systems. The proteomic analysis showed the production of proteins related to pathogenesis, such as the enzymes SspA (serine V8 protease) and SspB (cysteine protease), in addition to autolysin Atl, validating the results obtained from the sequencing. The results of this study revealed a series of virulence factors that probably contribute to the pathogenicity of *S. epidermidis*, especially with regard to biofilm formation, in addition to a repertoire of antimicrobial resistance genes, alerting to the importance of *S. epidermidis* as emerging pathogens in the context of nosocomial infections. Considering that the populations of *S. aureus* and *S. epidermidis* can occupy overlapping ecological niches, gene flow can occur between these species, which highlights the importance of continuous surveillance to detect new recombinant lineages that promote the emergence of multidrug-resistant and virulent microorganisms.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, antimicrobial resistance, virulence, Neonatal Intensive Care Unit.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	2
OBJETIVOS.....	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
METODOLOGIA	20
Amostras	20
<i>Dados demográficos e clínicos do RN</i>	<i>20</i>
<i>Cultivo e identificação fenotípica</i>	<i>21</i>
<i>Identificação genotípica.....</i>	<i>21</i>
Sequenciamento de nova geração (NGS)	21
<i>Análise Bioinformática.....</i>	<i>22</i>
Teste de susceptibilidade antimicrobiana	22
Proteômica	22
<i>Extração de proteínas</i>	<i>22</i>
<i>Quantificação de proteínas.....</i>	<i>23</i>
<i>Eletroforese unidimensional</i>	<i>23</i>
<i>Digestão Enzimática das proteínas em solução.....</i>	<i>23</i>
<i>Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas.....</i>	<i>24</i>
<i>Análise dos dados.....</i>	<i>24</i>
RESULTADOS.....	26
Sequenciamento NGS.....	26
<i>Montagem do genoma</i>	<i>26</i>
<i>Busca por genes de resistência</i>	<i>28</i>
<i>Teste de susceptibilidade antimicrobiana</i>	<i>32</i>
<i>Multilocus sequence typing (MLST).....</i>	<i>34</i>

<i>Busca por genes de virulência através da ferramenta VFDB.....</i>	<i>35</i>
<i>Busca por Plasmídeos.....</i>	<i>38</i>
Proteômica	39
<i>Eletroforese Unidimensional: Controle de qualidade das proteínas</i>	<i>39</i>
<i>Proteínas encontradas no extrato celular</i>	<i>40</i>
<i>Proteínas encontradas no sobrenadante.....</i>	<i>41</i>
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	67
Tabela S1: Proteínas encontradas no extrato celular da linhagem clínica H-295/96.....	67
Tabela S2: Proteínas encontradas no extrato celular da linhagem clínica H-802/93.....	69
Tabela S3: Proteínas encontradas no sobrenadante da linhagem clínica H-295/96.....	76
Tabela S4: Proteínas encontradas no sobrenadante da linhagem clínica H-802/93.....	77



Introdução

INTRODUÇÃO

O avanço das técnicas moleculares nas últimas décadas nos mostra que o genoma procaríoto está em constante evolução. Tais mudanças podem resultar em alterações significativas no comportamento epidemiológico de diversas espécies de micro-organismos patogênicos, dentre eles as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., que persistem entre os principais patógenos causadores de infecções adquiridas em hospitais e na comunidade. Diante deste cenário, a virulência estafilocócica e a disseminação de linhagens multidroga resistentes (MDR) representam um sério problema de saúde pública.^{1,2}

O gênero *Staphylococcus* spp. abrange 61 espécies e 23 subespécies³, que se caracterizam por serem cocos gram-positivos que medem de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e se apresentam isolados ou em arranjos irregulares, lembrando cachos de uva. São imóveis, não formadores de esporos, catalase-positivos e anaeróbios facultativos, e se dividem em dois grupos, de acordo com a capacidade da produção da enzima coagulase, sendo *Staphylococcus aureus* o principal representante do grupo coagulase-positivo e *Staphylococcus epidermidis* principal espécie dos Estafilococos coagulase-negativos (ECN), por ser a mais abundante na microbiota normal humana e a espécie de ECN mais frequentemente associada aos processos infecciosos.^{4,5}

Estudos envolvendo linhagens clínicas de ECN têm revelado a presença de genes relacionados a virulência e resistência em linhagens de *S. epidermidis*, evidenciando seu potencial patogênico, além da sua importância como um reservatório de genes, que podem ser transferidos para outras bactérias presentes em um mesmo nicho ecológico. O genoma e proteoma de *S. aureus* vêm sendo amplamente descritos, porém ainda mal caracterizados nas espécies coagulase-negativas. Neste contexto, alguns métodos são de extrema importância, como por exemplo a identificação e investigação molecular de genes relacionados a patogenicidade. O número crescente de sequências depositados nos bancos de dados tem nos permitido um melhor entendimento acerca da variabilidade de seus perfis genéticos, permitindo assim elucidar os mecanismos relacionados a patogenicidade e disseminação.¹

Estudos mostram evidências de que, além de um genoma central conservado, responsável por carregar toda a informação genética necessária para garantir as funções celulares essenciais, algumas espécies de bactérias possuem uma diversidade de genes acessórios, capazes de conferir características vantajosas à algumas linhagens. Tais características podem ter sido adquiridas ao longo de seu processo evolutivo, através de mecanismos de transferência horizontal de genes (HGT), possibilitando à bactéria adquirir elementos genéticos móveis através

de transferências laterais, como por exemplo, conjugação e transdução mediada por fagos. A HGT contribui de maneira importante na patogenicidade, pois pode promover alterações de larga escala no genoma destes organismos.⁶

A HGT pode resultar na obtenção de resistência a antibióticos e aquisição de fatores de virulência, conferindo uma maior adaptação e patogenicidade até mesmo para espécies até então consideradas comensais e simbióticas. Um exemplo deste cenário são as evidências acerca da troca de genes entre *S. aureus* e *S. epidermidis*.⁷ A aquisição de elementos genéticos móveis pode resultar na obtenção de características vantajosas para a bactéria, muitas delas advindas de genes presentes em ilhas genômicas, também denominadas ilhas de patogenicidade. Classificadas como um tipo de elemento genético móvel, foram descritas anteriormente em algumas cepas patogênicas, ocasionando alterações rápidas e significantes no potencial de virulência destas bactérias. A maioria das toxinas e fatores de virulência de *S. aureus* são codificados nas ilhas de patogenicidade, também conhecidas como “SaPIs”.⁶

No estudo realizado em 2005 por Gill *et al.* foi realizado o sequenciamento do genoma completo de *S. aureus* COL e *S. epidermidis* RP62a, determinando as características do genoma que contribuem para o aumento da patogenicidade de *S. aureus* e a identificação de novas ilhas genômicas em *S. epidermidis*, que podem contribuir para a evolução da espécie de comensal a um patógeno mais agressivo.⁸ A análise comparativa de isolados de *S. aureus* sugeriu variações na história evolutiva das ilhas de patogenicidade, resultado da integração e mobilização de profagos residentes em outros membros dessa espécie.^{9,10} Por exemplo, na cepa de *S. aureus* COL, o gene *seb* é codificado na mesma posição que o gene *tst* (codificante da toxina da síndrome do choque tóxico) em *S. aureus* MW2, sugerindo o deslocamento ou eventos de aquisição independentes através dos fagos.^{8,9,10} Madhusoodanan *et al.* comprovaram a primeira evidência de uma ilha de patogenicidade em um isolado clínico de *S. epidermidis* (SePI). O genoma dessa cepa foi analisado e confirmou-se a presença de uma SePI-1 que codifica os genes da SEC-3 e SEIL, sendo também confirmado a expressão desses superantígenos por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) e por *western immunoblotting*.¹¹

Apesar de *S. epidermidis* produzir menos fatores de virulência que *S. aureus*, que é uma bactéria mais invasiva, a produção de toxinas pode favorecer sua permanência no hospedeiro, facilitando assim sua disseminação.¹² Além disso, a produção de algumas toxinas pode agravar as infecções causadas por esse micro-organismo.⁴ Muitos autores questionam o potencial de produção de toxinas por ECN, sugerindo erros de identificação das espécies, como linhagens de *S. aureus* produtoras de baixa (ou nenhuma) quantidade de coagulase.^{13,14} No entanto, alguns relatos indicam a produção de enterotoxinas estafilocócicas por ECN isolados de alimentos e

de materiais clínicos. Em estudo realizado em 2006 por Cunha *et al*, foi investigada a presença de genes toxigênicos em ECN isolados de alimentos. A técnica de PCR detectou 10% de amostras positivas, sendo que destas 25% apresentaram o gene *sec-1* e 75% apresentaram o gene *sea*.¹⁵ Em outro estudo, de 2007, Cunha *et al* detectaram os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas em *Staphylococcus* isolados de materiais clínicos (hemoculturas e secreções) de recém-nascidos. Das amostras estudadas, 46,6% dos *S. aureus* e 40% dos ECN foram positivos para a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas.¹⁶ Nos estudos realizados em 2011 por Calsolari *et al*. em ECN isolados de recém-nascidos, a técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) detectou a expressão do gene *sea* em três dos 14 isolados que foram positivos para esse gene pela técnica de PCR, enquanto o gene *sec* foi detectado em 33 isolados e sua expressão detectada em três.¹⁷

As enterotoxinas estafilocócicas são superantígenos que podem desencadear uma série de efeitos tóxicos, funcionando como potentes toxinas gastrointestinais e estimulando de forma inespecífica a proliferação de células T.¹⁸ Essa ativação inespecífica se dá através da ligação direta à molécula da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) e à cadeia $\nu\beta$ do receptor de antígeno da célula T (TCR), sem o processamento típico de antígenos normais, resultando na estimulação de muitas células T e consequentemente em produção excessiva de citocinas, tais como interleucina I (IL-1), IL-2, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).¹⁹ Todas as enterotoxinas apresentam atividade superantigênica, e suas principais ações podem ser observadas nos alimentos e nas complicações do quadro clínico de pacientes com infecções por *Staphylococcus* spp. Os principais sintomas da intoxicação estafilocócica são vômito e diarreia, podendo ocorrer náuseas, cólicas abdominais e sudorese, variando com o grau de susceptibilidade do indivíduo e com a concentração da enterotoxina ingerida. Já alguns autores associaram o desenvolvimento da artrite séptica com a ação das enterotoxinas, devido a uma maior resposta inflamatória que leva à lesão tecidual.^{20,21} A ação das enterotoxinas também é descrita em sepses, osteomielites e sinusites.^{22,23,24} Estes dados ressaltam a importância das linhagens capazes de produzir essas toxinas, e principalmente a disseminação destes patógenos no ambiente hospitalar.

Os genes codificantes das enterotoxinas estafilocócicas podem estar localizados em diferentes elementos móveis, o que pode favorecer a transferência de material genético de uma bactéria a outra. Os genes *sea* e *see* são carregados em profago e alguns estudos comprovam que esses genes estão altamente relacionados, apresentando sequências de 81% de homologia. Já o gene *seb* é cromossômico, e está localizado em ilhas de patogenicidade. O gene *sec* é plasmidial e apresenta três subtipos (*sec-1*, *sec-2* e *sec-3*), classificados com base nas diferenças

antigênicas e no hospedeiro com o qual eles estão associados.²⁵ O gene *sed* está localizado no plasmídeo *pIB485* e o gene *seh* em transposons.^{26,27} Os genes *seg* e *sei* coexistem em um mesmo elemento genético (*cluster egc*), arranjados em uma orientação em tandem e são co-expressados, juntamente com os genes *sem*, *sen* e *seo*.²⁷

Além das enterotoxinas estafilocócicas, outras toxinas têm papel fundamental na virulência de *Staphylococcus*, como por exemplo as leucotoxinas bicomponentes. São citotoxinas capazes de lisar as células de defesa do hospedeiro através de uma ação sinérgica de dois componentes proteicos diferentes classificados como subunidades ‘S’ e ‘F’.²⁸ Sua ação citotóxica ocorre por meio da formação de poros na membrana, resultando no aumento da permeabilidade aos cátions e consequente instabilidade osmótica. Esse processo causa a liberação de agentes pró-inflamatórios no meio extracelular, resultando em necrose tecidual e, quando presentes no pulmão, estão associadas à pneumonia necrotizante.^{29,30} Até o presente momento, foram descritas quatro leucotoxinas bi-componentes isoladas de linhagens de *S. aureus*, como mostra a **Tabela 1**. Todas possuem atividade citolítica, no entanto, cada uma delas apresenta uma configuração diferente de especificidade celular.^{31,32,33} Algumas delas foram amplamente estudadas, como por exemplo a Leucocidina Pantón-Valentine (PVL), que vem sendo bastante associada a cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina adquiridas na comunidade (CA-MRSA).³³ Em contrapartida, algumas delas foram pouco caracterizadas até hoje, como é o caso da LukED.^{34,35} Esta leucotoxina é a única dentre as quatro que demonstrou a capacidade de lisar fagócitos de camundongo com alta eficiência, como demonstrado por alguns estudos.^{36,37,38} Assim como a PVL, seus dados epidemiológicos mostram sua relação com linhagens de MRSA, indicando sua relevância dentre os fatores de virulência de *S. aureus*.^{39,40}

Tabela 1. Leucotoxinas, subunidades proteicas 'S' e 'F' e especificidade celular

Leucotoxinas	Subunidade 'S'	Subunidade 'F'	Especificidade celular
PVL	LukS-PV	LukF-PV	Leucócitos e Neutrófilos
Luk AB/Luk GH	LukA/LukH	LukB/LukG	Monócitos humanos, células dendríticas, neutrófilos e leucócitos
LukED	LukE	LukD	Células sanguíneas de coelho e leucócitos, neutrófilos humanos e fagócitos de camundongo
γ-Hemolisina	HlgA, HlgC	HlgB	Glóbulos vermelhos humanos, neutrófilos e leucócitos humanos e de coelho

Referência: Adaptado de Yoong e Torres, 2013³³

Os genes relacionados a leucotoxinas tem sido amplamente descritos no genoma de *S. aureus*, porém nunca foram relatados em espécies de ECN.

Enquanto *S. aureus* possui muitos mecanismos e fatores de virulência para evadir o sistema imune do hospedeiro, o potencial patogênico de *S. epidermidis* depende principalmente da formação de biofilme.⁴¹ Neste processo, as bactérias se ligam a uma superfície e em seguida se multiplicam, formando assim microcolônias capazes de produzir uma matriz extracelular formada por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (e-DNA). Isso permite a associação dos micro-organismos a superfícies de dispositivos médicos invasivos, como próteses e cateteres, de modo que se mantenham protegidos de fatores ambientais deletérios, como antibióticos e o próprio sistema imune do hospedeiro, representando uma estratégia utilizada pelas bactérias para sobrevivência e persistência no hospedeiro humano, além de servir como um reservatório, auxiliando na disseminação para novos locais de infecção.⁴²

Os biofilmes são sistemas biológicos dinâmicos e complexos, cujo desenvolvimento está atrelado a uma vasta rede de mecanismos reguladores necessários para modificar e ajustar o desenvolvimento do biofilme mediante mudanças nas condições ambientais. O processo de desenvolvimento do biofilme estafilocócico tem início quando as células planctônicas se ligam a uma superfície biótica ou abiótica. Durante a infecção, os estafilococos encontram principalmente superfícies bióticas compostas por matriz do hospedeiro, incluindo fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e colágeno. Este processo é mediado por uma série de diferentes fatores e mecanismos, como por exemplo as adesinas, proteínas que se encontram ancoradas na parede celular estafilocócica, denominadas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) que reconhecem componentes da matriz extracelular e do plasma sanguíneo do hospedeiro incluindo fibrinogênio, fibronectina, fibroblasto e colágeno.⁴¹

Foram descritas em *S. epidermidis* três principais proteínas de superfície: SdrG, SdrF e SdrH. Vários estudos mostraram que o SdrG se liga ao fibrinogênio e SdrF liga os componentes da matriz hospedeira colágeno e queratina.⁴³ Além da ligação às superfícies bióticas compostas pela matriz do hospedeiro, também ocorre a ligação a superfícies abióticas, como por exemplo cateteres e implantes, e às superfícies de poliestireno de placas de microtitulação frequentemente usadas para experimentos de biofilme *in vitro*. Neste tipo de ligação, destaca-se a atuação das autolisinas AtlA em *S. aureus* e AtlE em *S. epidermidis*. O mecanismo exato que descreve a contribuição desta enzima na adesão à superfície ainda não foi completamente esclarecido, mas a hipótese é que a atividade enzimática desta autolisina é capaz de modificar a hidrofobicidade da superfície bacteriana, resultando em maior adesão à superfície.⁴⁴ Além disso, AtlA e AtlE são responsáveis pela liberação de DNA extracelular (eDNA), que é um dos componentes da matriz de biofilme estafilocócico.^{45,46,47}

Após se fixarem na superfície, as bactérias se proliferam, formando microcolônias, dando início a segunda etapa, onde a matriz extracelular começa a ser produzida. Durante a proliferação e maturação do biofilme, as células são mantidas juntas por fatores adesivos dentro da matriz. Em biofilmes dependentes de polissacarídeos, o principal componente é a poli-b(1-6)-N-acetilglucosamina (PNAG), também conhecida como adesina intercelular polissacarídica (PIA). A produção de PIA é dependente do operon de adesão intracelular (*ica*). O operon *ica* compreende quatro genes dispostos na seguinte ordem: *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*. Ensaio *in vitro* usando UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) como substrato mostraram que a glicosiltransferase transmembrana IcaA bem como IcaD é essencial para a síntese de PIA.⁴⁸ A co-expressão da proteína de membrana putativa IcaC é necessária para produzir cadeias de oligômeros mais longas⁴⁸ e, portanto, foi proposta como importante para a translocação da cadeia de polissacarídeo em crescimento para a superfície da célula. Após a exportação o PIA é desacetilado pela proteína IcaB que introduz cargas positivas, que são cruciais para sua localização superficial e função biológica. A produção de PIA e a sua desacetilação têm sido reconhecidas como fatores chave na virulência de *S. epidermidis* e são os mecanismos predominantes no acúmulo em biofilme.⁴⁹

A terceira etapa, de estruturação do biofilme e desprendimento celular, ocorre principalmente pela degradação da matriz do biofilme induzida por proteases e pela ruptura do biofilme por modulinas solúveis em fenol (PSMs). A importância das proteases individuais para a degradação e dispersão do biofilme é altamente específica da cepa e, até o momento, as proteases SspA, SspB, ScpA e Aur demonstraram degradar biofilmes de *S. aureus*. Para *S. epidermidis*,

três proteases secretadas foram identificadas: a metaloprotease SepA, a serina protease Esp, que demonstrou degradar biofilmes de *S. aureus*, e a cisteína protease EcpA, todos com baixa especificidade de substrato.⁵⁰ Outro componente importante da matriz do biofilme estafilocócico, o eDNA, está sujeito à degradação por nucleases. Nucleases termoestáveis (Nuc) são expressas por *S. aureus*. É interessante que o eDNA precisa ter um tamanho mínimo de 11 kDa para facilitar a integridade do biofilme, e a falta de atividade de nuclease é o fator determinante para a preservação do eDNA de alto peso molecular.⁵¹

Algumas toxinas podem desempenhar múltiplos papéis na virulência estafilocócica, como por exemplo as hemolisinas, com base na capacidade de lisar hemácias, mas como sua atividade biológica não é restrita às hemácias, introduziu-se o termo chamado toxina citolítica. São polipeptídeos capazes de lisar glóbulos vermelhos de diferentes espécies animais, plaquetas, células endoteliais, células epiteliais e leucócitos e estão divididos em diferentes classes, de acordo com sua estrutura e mecanismo de ação.⁵² No mínimo, três toxinas citolíticas ou lesivas à membrana são produzidas pelos ECN, incluindo-se a toxina alfa (Hla), beta (Hlb) e delta (Hld).⁵³ Hla é secretado como um monômero solúvel em água, e se liga à proteína transmembrana ADAM10, que é um receptor celular para a toxina α . Em seguida, a toxina oligomeriza em um heptâmero na membrana plasmática e um pré-poro é formado e, no final, ocorre a formação do canal transmembrana.⁵⁴

A hemolisina- β foi identificada pela primeira vez em 1935 por Glenney e Stevens⁵⁵ e a sequência do gene hlb foi descoberta em 1989 por Projan et al.⁵⁶ Esta toxina tem se mostrado altamente hemolítica em relação aos eritrócitos em carneiros, mas não em coelhos.⁵⁷ A diferença na suscetibilidade para eritrócitos pode ser devido aos diferentes conteúdos de esfingomielina dessas células, uma vez que a toxina também é conhecida como esfingomielinase. As esfingomielinases são hidrolases de diéster fosfórico que clivam as esfingomielinas, o esfingolípido mais abundante na membrana eucariótica.⁵⁸

Além de lisar eritrócitos, a beta-hemolisina (Hlb) possui atividade citotóxica para os queratinócitos humanos, leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos T e inibe a expressão da interleucina-8 (IL-8) pelas células endoteliais⁵⁴, e indução da formação de biofilme.⁵⁹

A toxina δ de *S. epidermidis* é também denominada PSM γ . Modulinas solúveis em fenol (PSMs) foram descobertas em 1999 por Mehlin et al.⁶⁰ em uma cultura de *S. epidermidis*. Nesse estudo, três peptídeos foram identificados - PSM α , PSM β e PSM γ - e foram descritos como um

complexo pró-inflamatório isolado por extração de fenol quente do filtrado de cultura.⁶⁰ Acredita-se que a produção de PSMs está altamente correlacionada com a capacidade das espécies estafilocócicas causar infecções invasivas, devido à sua capacidade de lisar neutrófilos humanos e estimular respostas inflamatórias, além do seu papel na estruturação de biofilme e desprendimento celular.⁵⁰

A **Tabela 2** apresenta um resumo das funções de alguns outros fatores de virulência estafilocócicos, além de alguns já descritos acima.

Tabela 2. Fatores de virulência estafilocócicos

Fator de virulência		Gene	Função
Aderência	Autolisina bifuncional	<i>atl</i>	Interação com proteínas extracelulares humanas, além de estar relacionada a produção de biofilme. ⁶¹
	Proteína de ligação à fibronectina associada à parede celular	<i>ebh</i>	Se liga especificamente à fibronectina humana durante a infecção estafilocócica. ⁶²
	Proteína de ligação à elastina	<i>ebp</i>	Se liga especificamente a elastina humana durante a infecção estafilocócica. ⁶³
	Proteínas de superfície	<i>sdrF</i> , <i>sdrG</i> , <i>sdrH</i>	Proteínas presentes na superfície celular bacteriana capazes de interagir com moléculas presentes no tecido do hospedeiro, contribuindo para a colonização durante as infecções. ⁶⁴
	Adesina intercelular	<i>icaA</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> , <i>icaR</i>	Produção de biofilme. ⁶⁵
Enzima	Serina V8 protease	<i>sspA</i>	Proteases que atuam como enzimas proteolíticas contribuindo para a virulência em <i>Staphylococcus</i> spp. ⁶⁶
	Cisteína protease	<i>sspB</i>	
	Lipase	<i>geh</i> , <i>lip</i>	Hidrólise de substratos lipídicos do hospedeiro. ⁶⁷

	Termonuclease	<i>nuc</i>	DNase termoeestável específica que degrada o DNA. ⁵¹
Evasão imune	Cápsula de ácido poliglutâmico (Bacillus)	<i>capB</i> , <i>capC</i>	Importante fator de virulência em <i>B. anthracis</i> , integrou-se no genoma de <i>S. epidermidis</i> provavelmente como resultado da transferência de genes mediada por plasmídeos entre os dois gêneros. Pode estar relacionado com a produção de biofilme. ⁸
Sistema de secreção	Sistema de secreção tipo VII	<i>esaA</i> , <i>essaA</i> <i>essB</i> , <i>essC</i> , <i>esxA</i>	Promove a secreção de exoproteínas, fatores de virulência transportados através do envelope bacteriano. ⁶⁸
Toxina	Beta hemolisina	<i>hly</i>	Hemolisina capaz de lisar glóbulos vermelhos de algumas espécies (carneiro, homem e boi), além de apresentar atividade citotóxica em leucócitos, macrófagos e fibroblastos. Também está relacionada a produção de biofilme. ^{59,69}

A resistência à antimicrobianos é outro fator importante na abordagem de *Staphylococcus* spp. A emergência de micro-organismos MDR vem se tornando uma ameaça cada vez mais séria à saúde pública global, representando uma das maiores preocupações da Organização Mundial de Saúde (OMS).⁷⁰ Nas últimas décadas, infecções causadas por bactérias MDR deixaram de ser restritas somente a ambientes hospitalares, se estendendo para a comunidade, como é o caso de *Staphylococcus* spp. Neste contexto, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), antes considerado um agente exclusivo de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS), passou a ser responsável por infecções de origem comunitária, atingindo indivíduos imunocompetentes.⁷ No entanto, a resistência estafilocócica não se restringe apenas a *S. aureus*. Espécies de ECN apresentam alto índice de resistência, com destaque para *S. epidermidis*, que apresenta frequência de resistência de até 80% em isolados nosocomiais, ultrapassando os índices de frequência de MRSA.⁷¹

O perfil de resistência estafilocócica vem sofrendo alterações desde a década de 40, com o surgimento das primeiras linhagens resistentes à penicilina. Estas linhagens são capazes de sintetizar uma enzima denominada penicilinase, classificada como uma beta-lactamase de classe A. Sua produção é mediada pelo gene *blaZ*, que está sob o controle de dois genes

reguladores, *blaI* e *blaR1*. Desde então, foram descritas cepas com fenótipos de resistência cada vez mais abrangentes, envolvendo uma diversidade de genes de resistência, muitos deles inseridos em elementos genéticos móveis (EGMs). Por exemplo, os genes relacionados a resistência a penicilina (*blaZ*, *blaI* e *blaR1*) são carregados por um plasmídeo, que também carrega outros genes de resistência relacionados a desinfetantes (compostos de amônio quaternário), corantes (acriflavina e brometo de etídio), metais pesados (chumbo, mercúrio e cádmio) e outros antibióticos, como eritromicina, ácido fusídico e aminoglicosídeos.^{72,73}

Após o surgimento da resistência a penicilina e sua consequente difusão, surgiu a necessidade de desenvolver uma penicilina semissintética capaz de contornar a atividade da beta-lactamase. Assim surgiu a meticilina, o primeiro antibiótico desenvolvido especificamente para neutralizar um mecanismo de resistência bacteriana. Entretanto, não demoraram a aparecer linhagens apresentando um fenótipo de resistência ainda mais complexo, ocasionando consequências importantes para o tratamento das infecções estafilocócicas. O gene *mecA*, inserido no cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), está relacionado com o fenótipo de resistência a meticilina, que torna a bactéria resistente a uma ampla gama de antibióticos β -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e carbapenens.⁷⁴ Este mecanismo de resistência está relacionado com a integridade da parede celular bacteriana, estrutura essencial para a sobrevivência do micro-organismo. A transpeptidase, conhecida como proteína de ligação à penicilina (PBP), está presente na parede celular bacteriana e é fundamental na síntese de peptidoglicano. Por este motivo, essa estrutura é alvo de antimicrobianos, especialmente os beta-lactâmicos.^{75,76} *S. aureus* apresentam vários tipos de PBPs, mas a que caracteriza o MRSA é a PBP2a. A proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a ou PBP 2'), codificada pelo gene *mecA*, tem uma afinidade reduzida para a meticilina, tornando a droga ineficaz.^{75,76,77} Sendo assim, quando os estafilococos adquirem e expressam o gene em questão, tornam-se capazes de crescer na presença de meticilina e outros beta-lactâmicos, incluindo cefalosporinas e carbapenens, com exceção das cefalosporinas de quinta geração, ceftarolina e ceftobiprole que são utilizadas para tratamento das infecções causadas por MRSA.⁷⁸

Várias classes de antibióticos vêm sendo usadas em infecções estafilocócicas, porém em contrapartida, estes micro-organismos têm demonstrado a capacidade de responder rapidamente a cada um deles por meio do desenvolvimento de um novo mecanismo de resistência. Muitos destes mecanismos de resistência são adquiridos pela bactéria através de uma transferência de material genético advindo de outro micro-organismo. Além da transferência horizontal, existem outros meios pelos quais a bactéria pode se tornar resistente. A resistência endógena, ou seja, a resistência adquirida através do processo de mutação aleatória e seleção sob

pressão de antibióticos, também causa um impacto significativo na prática clínica. Desta maneira, bactérias do gênero *Staphylococcus* se tornaram resistentes a fluoroquinolonas, daptomicina, linezolida, dentre outras.⁷⁹

As fluoroquinolonas são agentes antimicrobianos sintéticos com ampla e potente atividade antibacteriana contra organismos gram-negativos e positivos e têm sido usados contra várias infecções bacterianas, incluído as infecções estafilocócicas. A resistência a fluoroquinolonas é mediada pelo gene *norA*, cujo produto é uma bomba de efluxo codificada cromossomicamente, bastante estudada em *S. aureus*.^{80,81} Além das fluoroquinolonas (norfloxacin e ciprofloxacin), *norA* também confere resistência a uma ampla gama de compostos estruturalmente diferentes, incluindo biocidas (por exemplo, cetrimida, benzalcônio), corantes (por exemplo, etídio, rodaminas), puromicina e cloranfenicol.^{82,83,84}

As tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina, minociclina) são uma classe de antimicrobianos de amplo espectro usados para gerenciar e tratar várias infecções bacterianas, incluindo infecções estafilocócicas. São classificadas como antibióticos inibidores da síntese de proteínas, e atuam por meio da inibição do crescimento e replicação celular. Há uma preocupação crescente com a disseminação de linhagens resistentes a estes medicamentos. Os genes envolvidos na resistência a tetraciclinas são frequentemente carregados por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons. Os mecanismos de resistência a tetraciclinas podem estar relacionados com alterações em proteínas de proteção ribossomal ou por bombas de efluxo. As alterações proteicas permitem que os ribossomos prossigam com a síntese de proteínas, independentemente dos altos níveis intracelulares da droga. Já as bombas de efluxo são estruturas transmembrana capazes de expulsar os antimicrobianos para fora da célula, evitando sua morte. Existe ainda um outro mecanismo de resistência que consiste na modificação da tetraciclina. Todos estes mecanismos atuam reduzindo a eficácia da droga.^{84,85,86,87} Em estafilococos, os mecanismos de resistência estão relacionados com as alterações em proteínas de proteção ribossomal, envolvendo os genes *tetM*, *tetO*, *tetS* e *tetW*, ou então por bombas de efluxo, codificadas pelos genes *tetK*, *tetL*, *tet38* e *tet42*. Existe ainda outro mecanismo pouco estudado, que é codificado pelo gene *tetU*.^{88,89,90,91}

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos utilizada no tratamento de infecções estafilocócicas, sendo frequentemente administrados sinergicamente em combinação com betalactâmicos ou glicopeptídeos.⁹² A resistência aos aminoglicosídeos ocorre principalmente por meio de sua inativação através de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), que são codificadas por elementos genéticos.^{93,94} Já foram relatadas diversas classes distintas de AMEs.⁹⁵ Clinicamente, os AMEs mais comuns em estafilococos são ANT (4')-I, AAC

(6'))/APH(2'') e APH (3')-III, que modificam aminoglicosídeos de significado terapêutico, incluindo tobramicina, gentamicina e canamicina, respectivamente.⁹⁶

O ácido fusídico é um antibiótico de espectro estreito que foi usado por mais de 35 anos para tratar infecções por *Staphylococcus aureus*. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica bacteriana através da ligação ao fator de alongamento G (EF-G). A resistência ao ácido fusídico no gênero *Staphylococcus* spp. é mediada pelos genes *fusB*, *fusC* e *fusD*. Os genes *fusB* e *fusC* foram encontrados em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos^{97,98,99,100} e *fusD* é um fator intrínseco que causa resistência ao ácido fusídico em *Staphylococcus saprophyticus*.⁹⁹

Os macrolídeos são um grupo de antibióticos de amplo espectro inibidores da síntese de proteínas, sendo a azitromicina e a claritromicina as que possuem as maiores aplicações clínicas. Poucos anos após a introdução dos macrolídeos surgiram as primeiras cepas estafilocócicas resistentes. A resistência a macrolídeos é mediada pelos genes *erm* carregados em plasmídeos, transposons e ilhas genômicas e podem ser facilmente transferidos horizontalmente entre linhagens e espécies.^{101,102}

O trimetoprim exerce seu efeito antibacteriano através da inibição competitiva da diidrofolato redutase (DHFR), uma enzima chave na via de biossíntese de ácido fólico. Como consequência, os níveis intracelulares de folatos reduzidos se esgotam, levando à inibição do crescimento bacteriano. O trimetoprim exibe ação sinérgica com as sulfonamidas, uma vez que estas também têm como alvo a biossíntese de ácido fólico. Esse sinergismo tem sido explorado na combinação de drogas amplamente utilizada co-trimoxazol, compreendendo trimetoprima e sulfametoxazol, que apresenta boa atividade contra *S. aureus* sensível à meticilina e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Além disso, o cotrimoxazol foi recentemente recomendado para o tratamento de infecções por MRSA associada à comunidade (CA-MRSA), uma vez que as cepas causadoras dessas infecções são tipicamente sensíveis ao cotrimoxazol.^{103,104}

Dois mecanismos distintos de resistência ao trimetoprim foram descritos em estafilococos, as mutações pontuais no gene *dfrA* cromossômico e a aquisição horizontal de determinantes de resistência, tipicamente plasmidiais, que codificam variantes resistentes a drogas de DHFR (tipos S1, S2 e S3). A mutação de DHFR endógeno em *S. aureus* geralmente confere resistência de nível baixo a moderado, enquanto a expressão de DHFR adquirida horizontalmente confere resistência de alto nível.¹⁰⁵

A co-colonização das superfícies da mucosa humana causa encontros frequentes entre várias espécies estafilocócicas, criando oportunidades para a aquisição horizontal de EGMs.

Genes de resistência a antimicrobianos são tipicamente transferidos por plasmídeos conjugativos e eventos de recombinação, enquanto a transdução mediada por fago é o mecanismo mais comum para a mobilização de genes de toxinas superantigênicas.^{106,107,108} Além disso, o movimento horizontal de ilhas genômicas entre diferentes cepas de *S. aureus* desempenha um papel não só relacionado a evolução de isolados clínicos virulentos, como também na aquisição de genes de resistência.^{109,110} Para identificar e caracterizar estes fenômenos, alguns métodos são de extrema importância, como por exemplo o sequenciamento do genoma total bacteriano.

A análise de dados genômicos tem contribuído significativamente na compreensão da patogenicidade de *S. aureus*, no entanto as pesquisas envolvendo o sequenciamento de *S. epidermidis* ainda são escassas. Análises genômicas usando tipagem de sequência multilocus (MLST) revelam que a espécie possui um alto nível de diversidade genética. Em 2007, Miragaia *et al.* conduziram um estudo em que foram analisados 217 isolados de *S. epidermidis*, no qual revelou a existência de nove linhagens clonais epidêmicas disseminadas em todo o mundo, sugerindo que cepas nosocomiais de *S. epidermidis* evoluem rapidamente de maneira dinâmica por meio de transferência de elementos genéticos móveis, incluindo os relacionados à resistência, como o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), que pode ser facilmente transportado entre diversas linhagens de *Staphylococcus* spp.¹¹¹

O SCC*mec* é caracterizado pelas diferentes combinações entre o complexo *mec*, que é responsável pela resistência à meticilina, e o complexo *ccr*, que codifica enzimas importantes na mobilidade deste elemento genético.¹¹² Atualmente são conhecidos 13 tipos diferentes de SCC*mec*.¹¹³ O tamanho destes complexos pode variar conforme o seu conteúdo.¹¹⁴ Os elementos móveis SCC*mec* I a III são maiores que os demais, encontrados e associados principalmente a infecções de ambientes hospitalares, por este motivo são especificados pela sigla HA-MRSA (*Healthcare associated methicillin resistant Staphylococcus aureus*). Já os SCC*mec* tipo IV e V, são bem menores e encontrados em ambiente comunitário, fora dos centros de saúde, sendo conhecido, portanto, como CA-MRSA (Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).^{115,116} Por ser menor, os tipos IV e V são mais facilmente distribuídos entre as cepas.⁷¹ Se compararmos os HA-MRSA com CA-MRSA podemos notar algumas diferenças. Os HA-MRSA possuem uma maior gama de genes exógenos, dentre estes estão os genes que conferem resistência à múltiplas classes de antimicrobianos, tais como aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina, tornando portanto, a fisiologia celular da bactéria mais complexa.¹¹⁷ Já os CA-MRSA apresentam crescimento rápido e menor grau de resistência aos beta-lactâmicos, porém cepas de *S. aureus* que apresentam este fenótipo tendem a ser mais virulentas, pois apresentam níveis mais elevados de expressão de enterotoxinas, hemolisinas e superantígenos.^{118,119}

Multilocus Sequence Typing (MLST) é um método de genotipagem altamente discriminatório bastante utilizado na caracterização de diversos patógenos, incluindo bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. Este método consiste na análise de sequência de fragmentos internos de aproximadamente 450 pb de sete genes constitucionais (*housekeeping*). Especificamente para *S. epidermidis*, os sete genes usados no esquema de tipagem são *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpiA* e *yqiL*. Cada alelo recebe um número, onde através da combinação de alelos dos sete genes housekeeping é possível classificar cada isolado com um tipo de sequência (ST) que definem a origem evolutiva dos isolados, onde aqueles que compartilham mais de cinco alelos idênticos são agrupados em um mesmo complexo clonal, através da comparação com os alelos conhecidos em cada locus no banco de dados do MLST (<http://mlst.net>).¹²⁰

Além da genômica, técnicas atuais envolvendo proteômica tem sido utilizada para verificar a expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade bacteriana. A caracterização do proteoma bacteriano pode esclarecer a maioria dos mecanismos de resistência a antimicrobianos e demais fatores de virulência, como por exemplo a produção de toxinas. As proteínas estão entre os principais alvos moleculares ao se tratar da investigação de processos metabólicos inerentes à célula bacteriana, pois atuam como enzimas, antígenos, componentes estruturais ou receptores celulares. Além disso, a patogenicidade estafilocócica é impulsionada por uma ampla variedade de fatores de virulência, como autolisinas, coagulases, lipases e proteínas de ligação ao fibrinogênio. Esses fatores de virulência estão envolvidos na colonização e disseminação dentro dos hospedeiros.¹²¹ Novas redes funcionais em todo o proteoma podem gerar oportunidades interessantes para descobrir o modo de ação de vias funcionais relevantes, fatores de virulência e potenciais mecanismos antimicrobianos de *S. aureus*.¹²² A análise por MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization–time off light*) tem sido amplamente utilizada na identificação de linhagens bacterianas, tanto no âmbito clínico, como também na classificação precisa de micro-organismos presentes em alimentos.^{123,124} A técnica consiste em espectrometria de massa que permite a análise de moléculas de elevado peso molecular e de moléculas de baixo peso, com massa inferior a 10 kDa. É uma das estratégias mais utilizadas quando se trata de identificação de patógenos através de proteômica, pois fornece resultados analíticos específicos, rápidos e confiáveis. A técnica de MALDI-TOF consiste na deposição de uma determinada amostra em uma matriz capaz de fornecer prótons para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando esta matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso. Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são direcionados para o

analisador TOF, onde são acelerados através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo, até que atinja o detector. Neste tubo a vácuo, os componentes da amostra são separados de acordo com suas unidades de massa atômica por unidade fundamental de carga (m/z), chegando ao detector em diferentes tempos.¹²⁵ No entanto, atualmente as abordagens proteômicas dispõe de estratégias mais sensíveis e dinâmicas no que diz respeito a caracterização do proteoma total e investigação de fatores de virulência em linhagens bacterianas, como por exemplo a abordagem *shotgun*, que é bastante utilizada na análise de amostras de alta complexidade.¹²⁶

Estudos envolvendo linhagens de *S. epidermidis* têm revelado a presença de genes relacionados a virulência e resistência, evidenciando seu potencial patogênico, além da sua importância como um reservatório de genes, que podem ser transferidos para outras bactérias presentes em um mesmo nicho ecológico. O genoma e proteoma de *S. aureus* tem sido amplamente estudado, porém ainda mal caracterizados nas espécies de ECN e, portanto, a importância de sequenciar o genoma e proteoma de linhagens de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemoculturas provenientes de recém-nascidos internados em uma unidade de terapia intensiva neonatal com o intuito de caracterizar a presença de genes relacionados a virulência e resistência a antimicrobianos nestes isolados clínicos.



Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Sequenciar o genoma e proteoma de linhagens de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemoculturas provenientes de recém-nascidos internados em uma unidade de terapia intensiva neonatal com o intuito de caracterizar a presença de genes relacionados a virulência e resistência a antimicrobianos nestes isolados clínicos.

Objetivos específicos

- Sequenciar o genoma total de linhagens clínicas de *S. epidermidis*
- Realizar a montagem dos genomas obtidos e compará-los com sequências de linhagens referência de *S. epidermidis*, com o intuito de analisar os parâmetros de qualidade do sequenciamento.
- Caracterizar o fenótipo de resistência das cepas através de antibiogramas e compará-lo aos resultados do sequenciamento
- Investigar a presença de genes relacionados a virulência
- Sequenciar o proteoma de duas linhagens clínicas de *S. epidermidis* com o intuito de identificar as proteínas relacionadas a virulência presentes no sobrenadante e extrato celular destas linhagens.



Metodologia

METODOLOGIA

Amostras

As amostras estudadas foram isoladas de hemoculturas provenientes de recém-nascidos (RN) internados na Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB, Botucatu, São Paulo, Brasil), e armazenadas no Acervo de Culturas do Setor de Microbiologia e Imunologia, pertencente ao Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP). Para este estudo foram selecionadas duas linhagens de *S. epidermidis*, devido aos resultados provenientes de análises anteriores feitas em nosso grupo de pesquisa que revelaram um significativo potencial patogênico.

Dados demográficos e clínicos do RN

As duas linhagens de *S. epidermidis* selecionadas para este estudo são provenientes de hemoculturas de recém-nascidos (RNs) da UTIN do Hospital das Clínicas de Botucatu (UNESP). A **Tabela 3** apresenta as características dos dois RNs.

Tabela 3. Características dos recém-nascidos com hemocultura positiva para *S. epidermidis*

	Linhagens	
	H-295/96	H-802/93
Sexo	feminino	masculino
Idade Gestacional (semanas)	38	31-36
Peso ao nascer (gramas)	3400 g	2200 g
Quadro clínico	Abcesso cerebral	Pneumonia e enterocolite necrosante
Evolução/Idade	Alta/50 dias	Óbito/50 dias
Dreno	sim	sim
Ventilação mecânica	não	não
Nutrição parenteral	não	não

Cultivo e identificação fenotípica

As duas linhagens foram semeadas em placas de ágar sangue e incubadas por 24h a 37°C e em seguida as colônias isoladas foram submetidas a coloração de Gram para caracterização de sua morfologia e coloração específicas. Em seguida, foram feitos os testes de catalase, coagulase em tubo e os testes para confirmação da identificação fenotípica dos isolados.¹²⁷

Identificação genotípica

Colônias isoladas foram cultivadas em caldo BHI e incubadas por 24h a 37°C, para extração do DNA genômico total, utilizando o Kit Illustra (GE Healthcare, Chicago, Illinois, United States) seguindo as instruções do fabricante.

O DNA da amostra foi utilizado em sua identificação genotípica, realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers direcionando sequências conservadas de *Staphylococcus epidermidis*, como mostra a **Tabela 4**.

Tabela 4. Primers utilizados na identificação genotípica de *Staphylococcus epidermidis*.

Identificação de <i>Staphylococcus epidermidis</i>		
Primers	Sequência de nucleotídeos 5'- 3'	Tamanho
SE - 1	ATC AAA AAG TTG GCG AAC CTT TTC A	124 pb
SE - 2	CAA AAG AGC GTG GAG AAA AGT ATC A	

Referência: Martineau *et al.*, 1996¹²⁸

Sequenciamento de nova geração (NGS)

As concentrações do DNA das duas linhagens foram quantificadas através de fluorometria (Qubit® 2.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) utilizando o kit de quantificação de DNA Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as normas do fabricante.

O DNA purificado das duas linhagens foi preparado para sequenciamento usando o Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA), com indexação Nextera XT Index Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA). As bibliotecas foram quantificadas utilizando o KAPA Library Quantification Kit (Roche) e foram carregadas para corrida no *Miseq system* em modo de corrida paired-end 2x250 ciclos.

Análise Bioinformática

Os reads brutos de cada linhagem foram analisados com a ferramenta FastQScreen para verificar a presença de contaminantes nas amostras. Em seguida foram utilizados os softwares TrimGalore e FastQC para remover adaptadores de contaminantes e determinar o corte de qualidade de leitura ($qv > 20$). A montagem dos contigs foi feita com o software *SPAdes* e em seguida realizada a montagem dos *scaffolds* utilizando a ferramenta MEDUSA. Para a anotação do genoma foi utilizado o software *Prokka*.

A análise filogenética foi realizada utilizando o método de tipagem *Multilocus Sequence Typing* (MLST) analisados com a ferramenta MLST 2.0. Em seguida, para pesquisar fatores de virulência, foi utilizada a ferramenta VFDB (*Virulence factors of Pathogenic Bacteria*). Os parâmetros de qualidade da montagem foram feitos com o software QUAST. Foi realizada uma busca por plasmídeos com a ferramenta *PlasmidFinder*, e uma busca por genes de resistência com a ferramenta CARD.

Foram geradas imagens através do software BRIG (*BLAST Ring Image Generator*) com o intuito de comparar as linhagens clínicas sequenciadas com linhagem referência de *S. epidermidis* depositada no *GenBank* (ATCC 14990, CP035288.1), além de evidenciar a localização de genes de virulência e resistência.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana

Os isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade antimicrobiana pelo método de difusão em disco, com discos impregnados conforme determinações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).^{129,130} As drogas utilizadas foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos no sequenciamento. A atividade do antimicrobiano foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI.

Proteômica

Extração de proteínas

Duzentos microlitros (200 μ L) do tampão de lise (Uréia 8 M, NaCl 75 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, MgCl₂ 2 mM, Inibidor de Protease Roche 1x, Benzonase 1 U) foram adicionados em cada amostra, as quais foram em seguida submetidas ao equipamento Sonics Vibra-Cell VCX-600 Ultrasonic Processor utilizando 5 pulsos de 1 minuto (25 kHz de potência/20% amplitude) com intervalo de 1 minuto entre os pulsos. Ao final deste processo de extração mecânica, as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 30 minutos e os sobrenadantes foram

coletados.

Quantificação de proteínas

As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas pelo método de Bradford¹³¹, utilizando o kit BioRad® Protein Assay (cod. 500-0001), tendo albumina bovina (BSA), como proteína padrão.

Eletroforese unidimensional

O controle de qualidade das extrações de proteínas foi realizado por meio da estratégia de eletroforese unidimensional, sob condições desnaturantes em sistema vertical (Mini VE, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) de acordo com Laemmli, 1970¹³². O gel de separação à 12% (m/v) e de empilhamento à 5% (m/v) de poliacrilamida foram utilizados para separação das proteínas. Foram utilizados 100µg/10µL de proteína total de cada amostra por poço, diluída (1:5) em tampão de corrida, contendo TRIS-HCl 60 mM, pH 6.8, 50% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS, 23 mM 2-mercapetanol e 0,1% (m/v) azul de bromofenol. As amostras foram homogeneizadas e submetidas à 70°C em banho seco durante 7 minutos. Foi usado um marcador de massa molecular (Low Molecular Weight Markers, 96-14,4 kDa, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para monitorar a corrida. A separação proteica foi efetuada sob amperagem constante (15 mA/gel) e voltagem aberta (máximo de 300V). Os géis foram corados com Coomassie coloidal G-250 e posteriormente, armazenados em ácido acético 10% (v/v).

Digestão Enzimática das proteínas em solução

Primeiramente, 50µg de proteínas totais de cada amostra foram diluídas em 60µL de bicarbonato de amônio 50 mM e em seguida, 25µL do surfactante Padrão RapiGest SF (código 186001861, Waters) foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas à 37°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas às etapas de redução e alquilação, utilizando DTT 10 mM e iodoacetamida 45 mM, respectivamente. A digestão enzimática em solução foi realizada por meio da enzima tripsina na concentração 1:100 (enzima: amostra) solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu durante 18 horas e foi interrompida com a adição de 10µL de ácido fórmico 5% (v/v). As amostras foram incubadas por 90 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, centrifugadas à 14.000g à 6°C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido para um tubo novo. Os digestos tripticos contidos em cada amostra foram submetidos às colunas de dessalinização Peptide Cleanup C18 Spin (código 5188-2750 Agilent Technologies) segundo as recomendações do fabricante.

Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B, ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30µm x 5mm (Código 164649, *ThermoFisher Scientific*), e dessalinizados num gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3µm, 120 Å, 105mm, Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP) utilizando um gradiente linear de 4-55%B por 30 min, 55% à 90%B por 1 min, mantido à 90%B por 5 minutos e reequilibrado à 4%B por 20 minutos à um fluxo de 300 nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP). O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 à m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, *ThermoFisher Scientific Inc.*).

Análise dos dados

Os dados brutos de espectrometria de massas no formato RAW foram submetidos ao software *PatternLab* [versão 4.0.0.84]¹³³ para a obtenção da identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados UNIPROT (*Taxonomy Staphylococcus*); enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (*False Discovery Rate*) máxima foi considerada de $\leq 1\%$.

Resultados

RESULTADOS

Sequenciamento NGS

Montagem do genoma

A montagem dos *contigs* com a ferramenta SPADES revelou 105 *contigs* para a linhagem H-295 e 281 *contigs* para a linhagem H-802. A montagem dos *scaffolds* através da ferramenta MEDUSA resultou em 33 *scaffolds* para a linhagem H-295/96 e 188 *scaffolds* para a linhagem H-802/93. Os parâmetros de qualidade obtidos através do *software* QUASt estão descritos na **Tabela 5**:

Tabela 5. Parâmetros de qualidade da montagem dos genomas das linhagens H-295/96 e H-802/93 quando comparados a linhagem referência ATCC14990 (*GenBank*: CP035288.1).

Parâmetros	ATCC 14990	H-295/96	H-802/93
Tamanho do genoma (bp)	2466502	2630095	2489244
Genoma alinhado	-----	2324037	2262874
Número de genes	2370	2220	2165
Porcentagem do genoma sequenciado em relação a referência (%)	-----	93,917	91,089
G + C (%)	32,25	32,03	31,91

A representação do genoma circular foi realizada através do *software* BRIG (*BLAST Ring Image Generator*), cuja imagem de saída mostra a semelhança entre uma sequência de referência central de *S. epidermidis* (ATCC14990, *GenBank*: CP035288.1) e das duas linhagens clínicas sequenciadas como um conjunto de anéis concêntricos, além de uma escala indicativa do percentual de identidade entre as linhagens clínicas e a linhagem referência (**Figura 1**).

A faixa circular mais interna (em preto) evidencia a similaridade de tamanho entre o genoma referência (2466502 bp) e as duas linhagens sequenciadas. Movendo-se para fora, a faixa circular verde e roxa representa o conteúdo de GC. Por fim, as duas faixas externas representam os genomas das linhagens clínicas H-295/96 (azul claro) e H-802/93 (azul escuro).

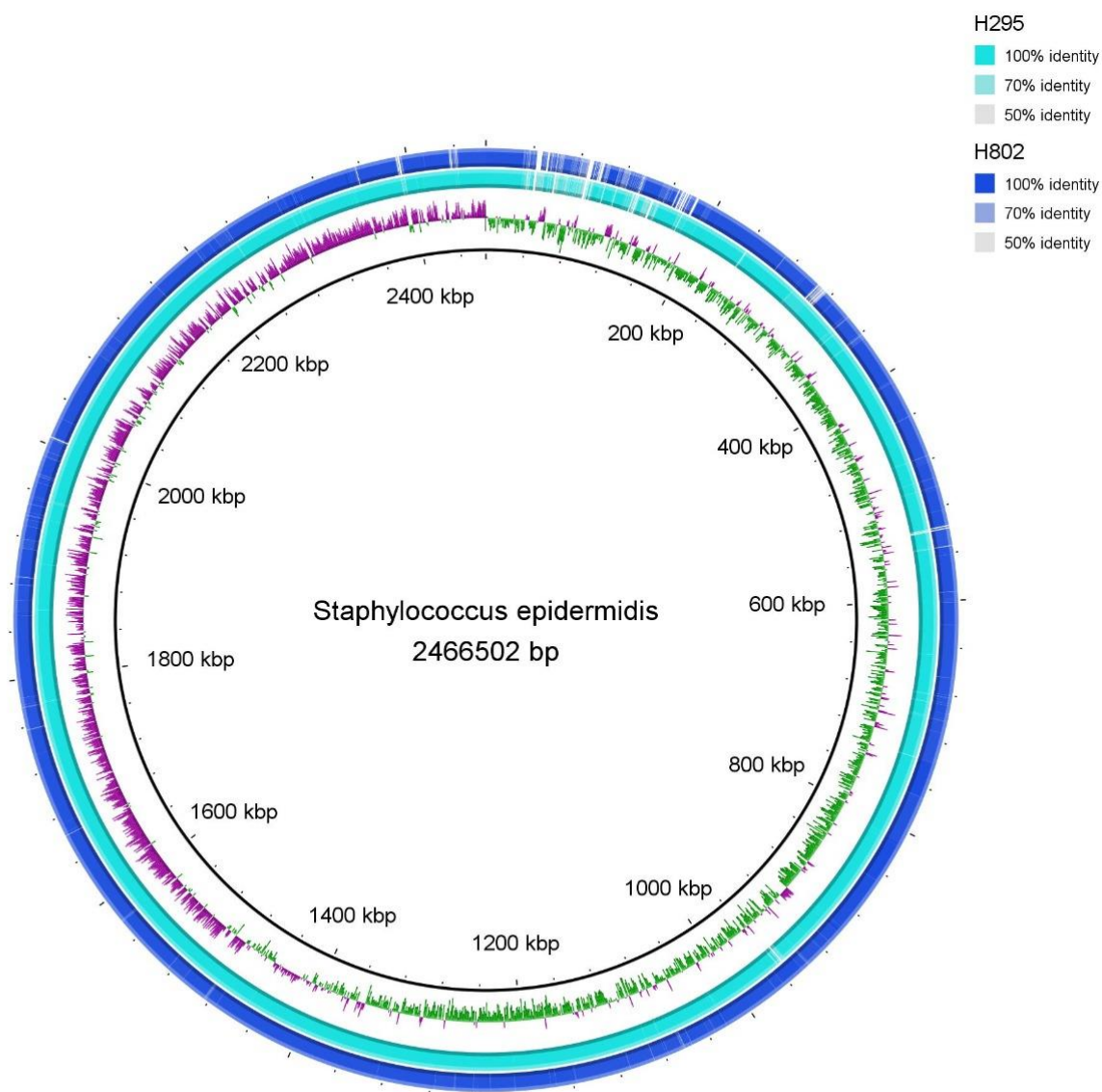


Figura 1: Mapa genômico representativo das linhagens H-295/96 e H-802/93 quando comparadas a uma linhagem referência de *S. epidermidis* ATCC14990 (*GenBank*: CP035288.1).

Busca por genes de resistência

A busca por genes de resistência com a ferramenta CARD revelou um perfil de resistência semelhante entre as duas linhagens sequenciadas, que inclui genes relacionados a resistência a tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftaxima e oxacilina, penicilina G, cefotaxime e trimetopim. O gene *tet(K)* que confere resistência a tetraciclina, *fusB*, que confere resistência ao ácido fusídico e *ermC* (eritromicina/clindamicina) foram identificados apenas na linhagem H-295/96. A **Tabela 6** mostra os genes de resistência identificados nas duas linhagens, bem como a localização destes genes nas amostras sequenciadas e em duas linhagens referência de *S. epidermidis* (RP62A e ATCC14990).

Tabela 6. Genes identificados nas linhagens H-802/93 e H-295/96 de *Staphylococcus epidermidis* relacionados a resistência a antimicrobianos, e sua localização no genoma (*start códon-stop códon*) comparada a linhagens referência de *S. epidermidis*.

Antimicrobianos	Genes	Produto	Localização do gene			
			H-295/96	H-802/93	<i>S. epidermidis</i> RP62A	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990
Cefoxitina/Oxacilina	<i>mecI</i>	repressor de resistência à meticilina tipo <i>mecA</i> MecI	45842-46213	-----	2574428-2574799	-----
	<i>mecR1</i>	sensor beta-lactâmico/transdutor de sinal MecR1	44085-45842	-----	2574799-2576556	-----
	<i>mecA</i>	proteína 2' de ligação à penicilina	41979-43985	3045-5051	572719-573441	1898443-1899165
Tetraciclina	<i>tet(K)</i>	proteína de efluxo de tetraciclina	727997-729376	-----	-----	-----
Ciprofloxacino	<i>norA</i>	bomba de efluxo multidrogas	504279-505442	190509-191804	352474-353637	2110842-2112005
Gentamicina	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	aminoglicosídeo acetiltransferase	400-1839	526-1965	1614064-1615503	-----
	<i>ant(4')-Ib</i>	Kanamicina nucleotidiltransferase	259-1029	-----	-----	-----

		aminoglicosídeo fosfotransferase		126568-127362		
	<i>aph(3')-IIIa</i>		-----		-----	-----
Ácido fusídico	<i>fusA</i>	mutações no fator de alongamento G	-----	-----	194988-197069	2258721-2260802
	<i>fusB</i>	proteína de ligação ao zinco de 2 domínios	247406-248047	-----	-----	-----
Eritromicina ou Clindamicina	<i>ermC</i>	Metiltransferase	1038-1772	-----	-----	-----
	<i>ermA</i>	Metiltransferase	-----	-----	1253251-1253982	-----
Penicilina G	<i>blaZ</i>	β-Lactamase	9948-10793	198124-198969	1526929-1527774	955026-955871
Trimetoprim	<i>dhfrC</i>	diidrofolato redutase	1207912-1208397	301679-302164 635544-636029	1016993-1017478	1450672-1451157
Quinolonas	<i>gyrB</i>	subunidades da DNA girase	101945-103876	183282-185213	2609812-2611743	

O software BRIG (*BLAST Ring Image Generator*) foi utilizado para gerar um gráfico circular representando a localização dos genes de resistência. A **Figura 2** mostra os genes de resistência das linhagens H-295/96 (em vermelho) e H-802/93 (em azul).

Os genes escritos em vermelho pertencem a linhagem H-295/96: *ant(4')-Ib*; *aac(6')-le-aph(2'')-Ia*; *ermC*; PC1 beta-lactamase (*blaZ*); *mecA*; *mecR1*; *mecI*; *gyrB*; *fusB*; *norA* e *tet(K)* e *dfrC*. Os genes escritos em azul pertencem a linhagem H-802/93: *AAC(6')-le-APH(2'')-Ia*; *mecA*, *APH(3')-IIIa*; *norA*; PC1 beta-lactamase (*blaZ*) e *dfrC*.

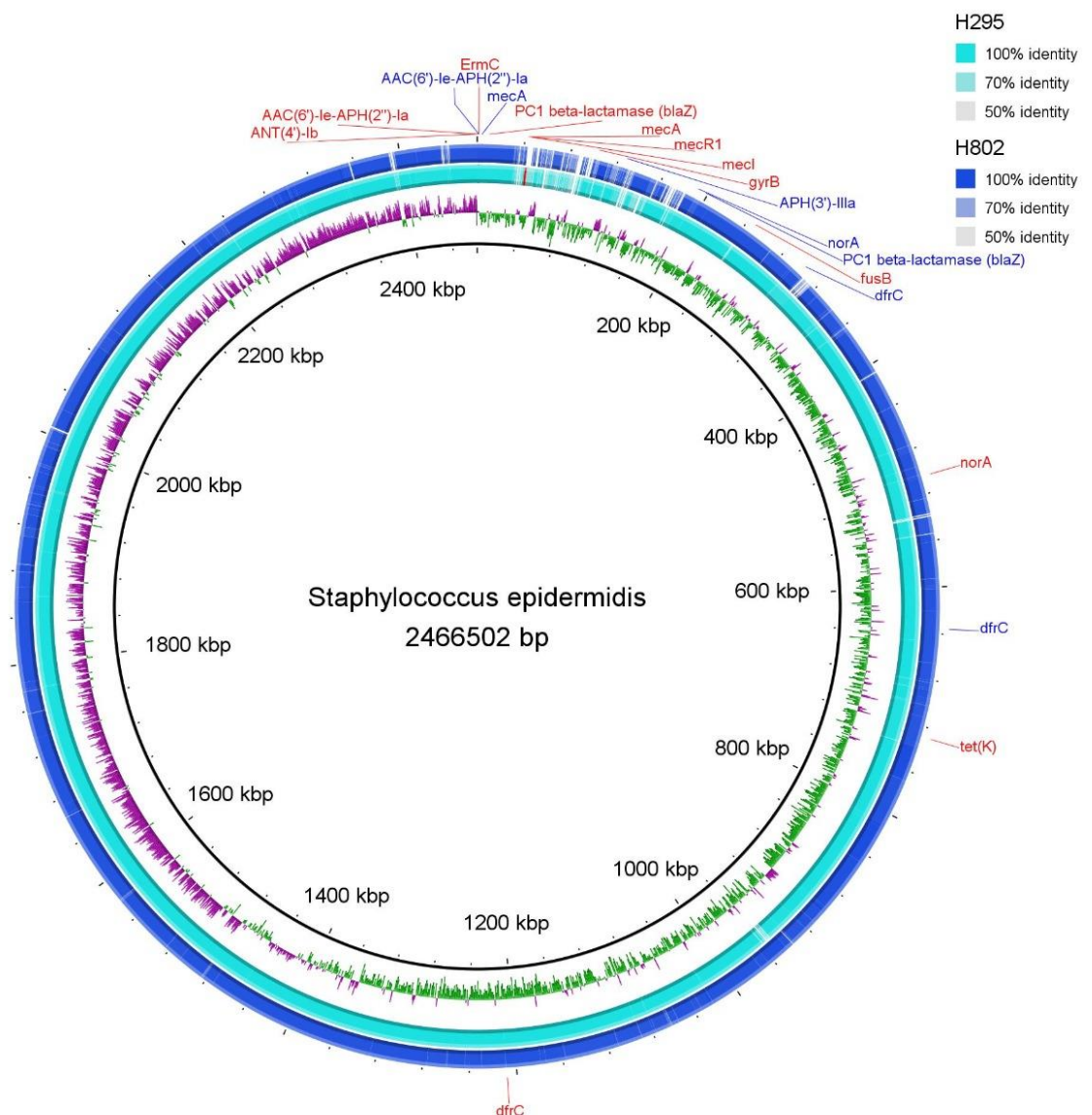


Figura 2: Visão geral dos genomas das linhagens H-295/96 (em vermelho) e H-802/93 (em azul) evidenciando a localização de genes relacionados a resistência a antimicrobianos.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana

As drogas utilizadas na realização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana foram escolhidas frente aos genes de resistência encontrados no sequenciamento de nova geração (NGS) apresentados na **Tabela 6**. Os resultados revelaram a expressão dos genes de resistência detectados nas linhagens estudadas para a maioria dos antimicrobianos testados no teste de disco difusão, com exceção do ácido fusídico na linhagem de *S. epidermidis* H-295/96 e da ciprofloxacina das duas linhagens estudadas.

Tabela 7. Comparação dos perfis fenotípicos de susceptibilidade antimicrobiana de linhagens H-802/93 e H-295/96 de *Staphylococcus epidermidis* e seus genes associados detectados no sequenciamento de nova geração (NGS).

Antimicrobianos	Genes	Linhagens de <i>S. epidermidis</i>			
		H-295/96		H-802/93	
		Presença do gene associado	Disco difusão	Presença do gene associado	Disco difusão
Cefoxitina/ Oxacilina	<i>mecI</i>	+	-----	-----	-----
	<i>mecR1</i>	+	-----	-----	-----
	<i>mecA</i>	+	Resistente/ Resistente	+	Sensível/ Sensível
Tetraciclina	<i>tet(K)</i>	+	Resistente	-	Sensível
Ciprofloxacina	<i>norA</i>	+	Sensível	+	Sensível
Gentamicina	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	+	Resistente	+	Resistente
	<i>ant(4')-Ib</i>	+	Resistente	-----	-----
	<i>aph(3')-IIIa</i>	-----	-----	+	Resistente

Ácido fusídico	<i>fusA</i>	-----	-----	-----	-----
	<i>fusB</i>	+	Sensível	-----	Sensível
Eritromicina/ Clindamicina	<i>ermC</i>	+	Resistente/ Resistente	-----	Sensível/ Sensível
	<i>ermA</i>	-----	-----	-----	-----
Penicilina G	<i>blaZ</i>	+	Resistente	+	Resistente
Trimetoprim	<i>dfrC</i>	+	Resistente	+	+
Ciprofloxacina	<i>gyrB</i>	+	Sensível	+	Sensível

Multilocus sequence typing (MLST)

Os resultados relacionados a tipagem de sequência multilocus (MLST) da linhagem de *S. epidermidis* H-802/93 revelaram 100% de identidade com os locus *arcC* (alelo 3), *aroE* (alelo 29), *gtr* (alelo 5), *mutS* (alelo 5), *pyrR* (alelo 3) e *yqiL* (alelo 4), e 99,7642% de identidade com o locus *tpiA* (alelo 4), indicando como *sequence type* (ST) mais próximo o ST369. Como não foi encontrado 100% de identidade com o gene *tpiA*, esses resultados podem indicar um novo alelo.

Center for Genomic Epidemiology

HomeServicesInstructionsOutput

MLST-2.0 Server - Results

mlst Profile: *sepidermidis*

Organism: *Staphylococcus epidermidis*

Sequence Type: 369*

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
arcC	100	100	465	465	0	arcC_3
aroE	100	100	420	420	0	aroE_29
gtr	100	100	438	438	0	gtr_5
mutS	100	100	412	412	0	mutS_5
pyrR	100	100	428	428	0	pyrR_3
tpiA	99.7642	100	424	424	0	tpiA_4*
yqiL	100	100	416	416	0	yqiL_4

Notes: * alleles with less than 100% identity found

* tpiA: Novel allele, ST may indicate nearest ST.

Figura 3: Tipagem de sequência multilocus (MLST) da linhagem clínica H-802/93 obtida a partir da análise dos dados de sequenciamento *Illumina*.

Os resultados relacionados a tipagem de sequência multilocus (MLST) da linhagem de *S. epidermidis* H-295/96 revelaram 100% de identidade com os locus *arcC* (alelo 7), *aroE* (alelo 1), *gtr* (alelo 2), *mutS* (alelo 2), *pyrR* (alelo 4) e *tpiA* (alelo 1) e *yqiL* (alelo 1), confirmando a linhagem como *S. epidermidis* ST2.

Center for Genomic Epidemiology						
Home Services Instructions Output						
MLST-2.0 Server - Results						
mlst Profile: <i>sepidermidis</i>						
Organism: <i>Staphylococcus epidermidis</i>						
Sequence Type: 2						
Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
<i>arcC</i>	100	100	465	465	0	<i>arcC_7</i>
<i>aroE</i>	100	100	420	420	0	<i>aroE_1</i>
<i>gtr</i>	100	100	438	438	0	<i>gtr_2</i>
<i>mutS</i>	100	100	412	412	0	<i>mutS_2</i>
<i>pyrR</i>	100	100	428	428	0	<i>pyrR_4</i>
<i>tpiA</i>	100	100	424	424	0	<i>tpiA_1</i>
<i>yqiL</i>	100	100	416	416	0	<i>yqiL_1</i>

Figura 4: Tipagem de sequência multilocus (MLST) da linhagem clínica H-295/96 obtida a partir da análise dos dados de sequenciamento *Illumina*.

Busca por genes de virulência através da ferramenta VFDB

Os resultados das duas linhagens clínicas revelaram a presença de genes de virulência relacionados a aderência, como o gene *atl*, codificante da autolisina, além de genes relacionados a proteínas associadas a parede celular e capazes de se ligar a fibronectina (*ebh*), elastina (*ebp*) e fibrinogênio (*sdrG*). A ferramenta também revelou genes relacionados a enzimas (cisteína protease (*sspB*), lipase (*geh* e *lip*), serina V8 protease (*sspA*) e termonuclease (*nuc*)), evasão imune (Cápsula de ácido poliglutâmico *capB* e *capC*), além da toxina beta-hemolisina (*hly*). Apenas a linhagem H-802/93 apresentou genes relacionados ao sistema de secreção do tipo VII (*esaG*, *essB*, *essC*, *esxA*), enquanto a linhagem H-295/96 apresentou genes codificantes de adesinas intercelulares (genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaR*), diretamente relacionados a produção de PIA importante na formação de biofilme em *S. epidermidis*. (**Tabelas 8 e 9**).

Tabela 8. Fatores de virulência da linhagem H-802/93

Classe	Fator de virulência	Gene
Aderência	Autolisina	<i>atl</i>
	Proteína de ligação à fibronectina	<i>ebh</i>
	Proteína de ligação à elastina	<i>ebp</i>
	Proteínas de ligação ao fibrinogênio	<i>sdrG</i>
Enzima	Cisteína protease	<i>sspB</i>
	Lipase	<i>geh, lip</i>
	Serina V8 protease	<i>sspA</i>
	Termonuclease	<i>nuc</i>
Evasão imune	Cápsula de ácido poliglutâmico (<i>Bacillus</i>)	<i>capB, capC</i>
Sistema de secreção	Sistema de secreção tipo VII	<i>esaG, essB, essC, esxA</i>
Toxina	Beta hemolisina	<i>hly</i>

Tabela 9. Fatores de virulência da linhagem H-295/96

Classe	Fator de virulência	Gene
Aderência	Autolisina	<i>atl</i>
	Proteína de ligação à fibronectina associada à parede celular	<i>ebh</i>
	Proteína de ligação à elastina	<i>ebp</i>
	Adesina intercelular	<i>icaA, icaB, icaC, icaR</i>
	Proteínas de ligação ricas em Ser-Asp	<i>sdrF, sdrG, sdrH</i>
Enzima	Cisteína protease	<i>sspB</i>
	Lipase	<i>geh, lip</i>
	Serina V8 protease	<i>sspA</i>
	Termonuclease	<i>nuc</i>
Evasão imune	Cápsula de ácido poliglutâmico (<i>Bacillus</i>)	<i>capB, capC</i>
Toxina	Beta hemolisina	<i>hly</i>

O software BRIG (*BLAST Ring Image Generator*) foi utilizado para gerar um gráfico

circular representando a localização dos genes de virulência. A **Figura 5** mostra os genes de virulência das linhagens H-295/96 (em vermelho) e H-802/93 (em azul).

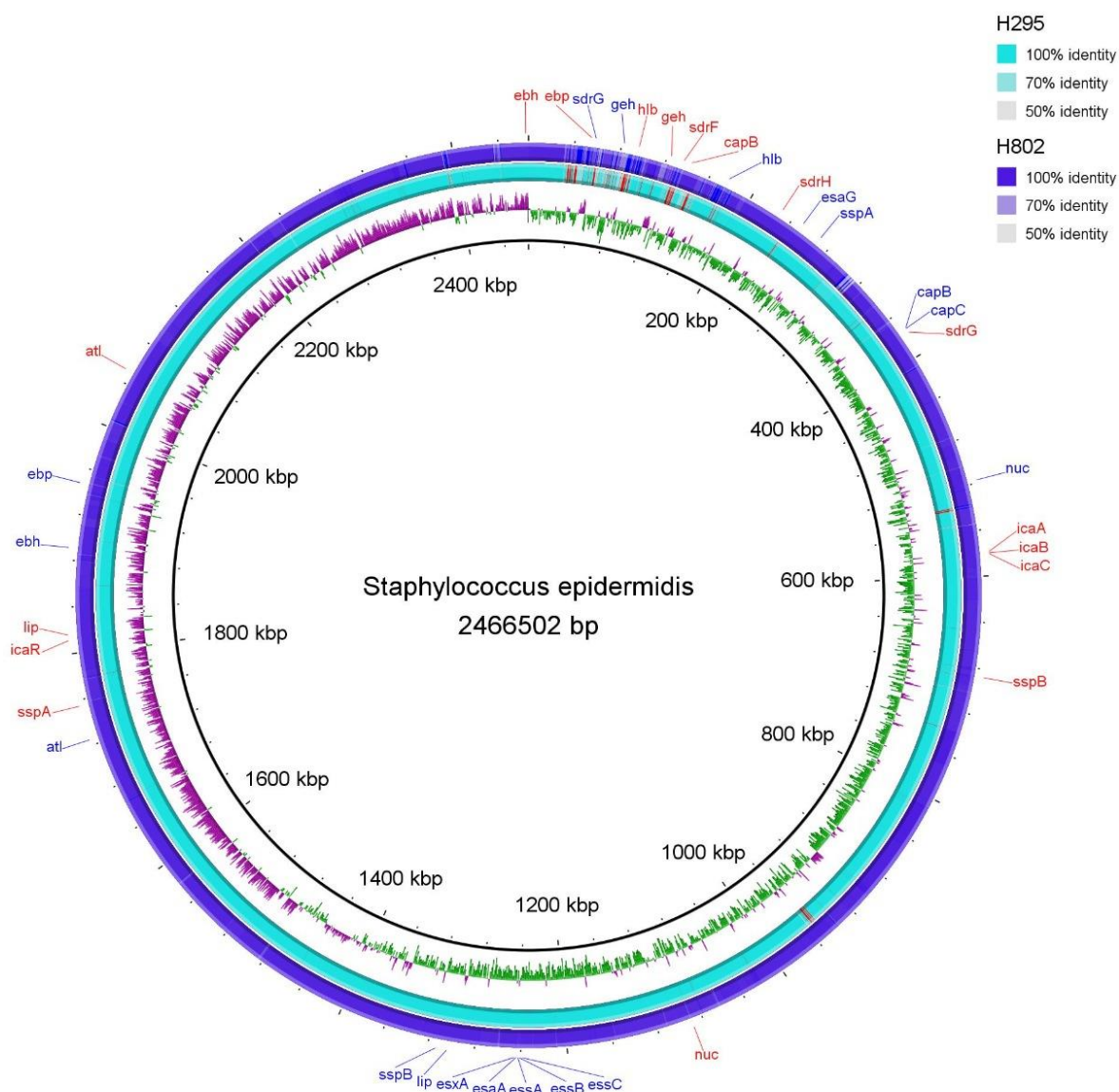


Figura 5: Visão geral dos genomas das linhagens H-295/96 e H-802/93 evidenciando a localização de genes relacionados a virulência. Os genes escritos em vermelho pertencem a linhagem H-295/96: *ebh*, *ebp*, *hlb*, *geh*, *sdrF*, *capB*, *sdrH*, *sdrG*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *sspB*, *nuc*, *sspA*, *icaR*, *lip* e *atI*. Os genes escritos em azul pertencem a linhagem H-802/93: *sdrG*, *geh*, *hlb*, *esaG*, *sspA*, *capB*, *capC*, *nuc*, *essC*, *essB*, *essA*, *esxA*, *lip*, *sspB*, *atI*, *ebh* e *ebp*.

Busca por Plasmídeos

Foi realizada uma busca por plasmídeos nas duas linhagens utilizando a ferramenta *PlasmidFinder*. A análise da linhagem H-802/93 apresentou identidade de 100% com o plasmídeo rep7a, 94,8% com rep20 e 91,46% com rep5d. As posições em que estão inseridos, bem como os números de acesso correspondentes são mostrados na **Figura 6**:

PlasmidFinder-2.0 Server - Results						
Organism(s): <i>Gram Positive,Enterobacteriaceae</i>						
Rep_trans						
Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
rep7a	100	945 / 945	Scaffold_32	566..1510	repC(Cassette)	AB037671
RepA_N						
Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
rep20	94.08	912 / 939	Scaffold_1	12492..13403	repA(pSSAP2)	HE616681
Rep3						
Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
rep5d	91.46	492 / 636	Scaffold_3	4019..4509	rep(pJE1)	AF051916

Figura 6: Resultado da busca por plasmídeos na linhagem H-802/93 obtidos através da ferramenta *PlasmidFinder*.

A análise da linhagem H-295/96 resultou na presença de 6 plasmídeos, cujas porcentagens de identidade, posições em que estão inseridos e números de acesso correspondentes são mostrados na **Figura 7**:

PlasmidFinder-2.0 Server - Results						
Organism(s): <i>Enterobacteriaceae, Gram Positive</i>						
Rep1						
Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
rep22	99.9	1005 / 1005	Scaffold_8	3643..4647	repB(pAMalpha1)	AF503772
RepL						
Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
rep10	100	477 / 477	Scaffold_27	114..590	repL(pDLK1)	GU562624
Rep_trans						
Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
rep7a	100	615 / 945	Scaffold_7	727221..727835	repC(Cassette)	AB037671
rep7a	100	615 / 750	Scaffold_7	727221..727835	repC(pS0385p1)	AM990993
rep7a	91.96	597 / 597	Scaffold_7	736632..737227	repI(pGB354)	SAU83488
RepA_N						
Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
rep40	99.12	1254 / 1254	Scaffold_7	725577..726830	repA(SAP106A)	GQ900454

Figura 7: Resultado da busca por plasmídeos na linhagem H-295/96 obtidos através da ferramenta *PlasmidFinder*.

Proteômica

Eletroforese Unidimensional: Controle de qualidade das proteínas

A **Figura 8** mostra a imagem digitalizada do gel *SDS-page* resultante da eletroforese unidimensional, evidenciando a integridade das proteínas e os perfis proteômicos dos sobrenadantes de três linhagens referência de *S. aureus* e das duas linhagens clínicas de *S. epidermidis* estudadas.

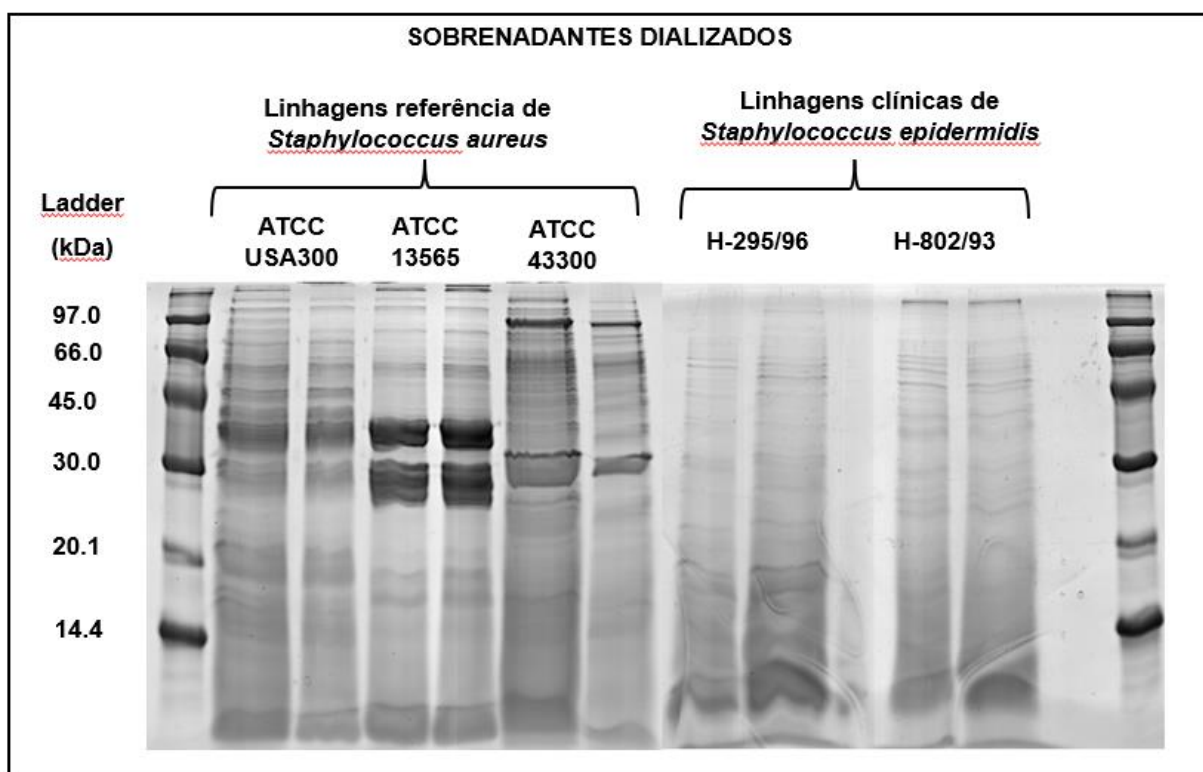


Figura 8: Gel SDS-page resultante da eletroforese unidimensional dos sobrenadantes dializados

A **Figura 9** mostra a imagem digitalizada do gel *SDS-page* resultante da eletroforese unidimensional evidenciando os perfis proteômicos do extrato celular de duas linhagens clínicas de *S. epidermidis* (1 e 2) e de três linhagens referência de *S. aureus* (3, 4 e 5).

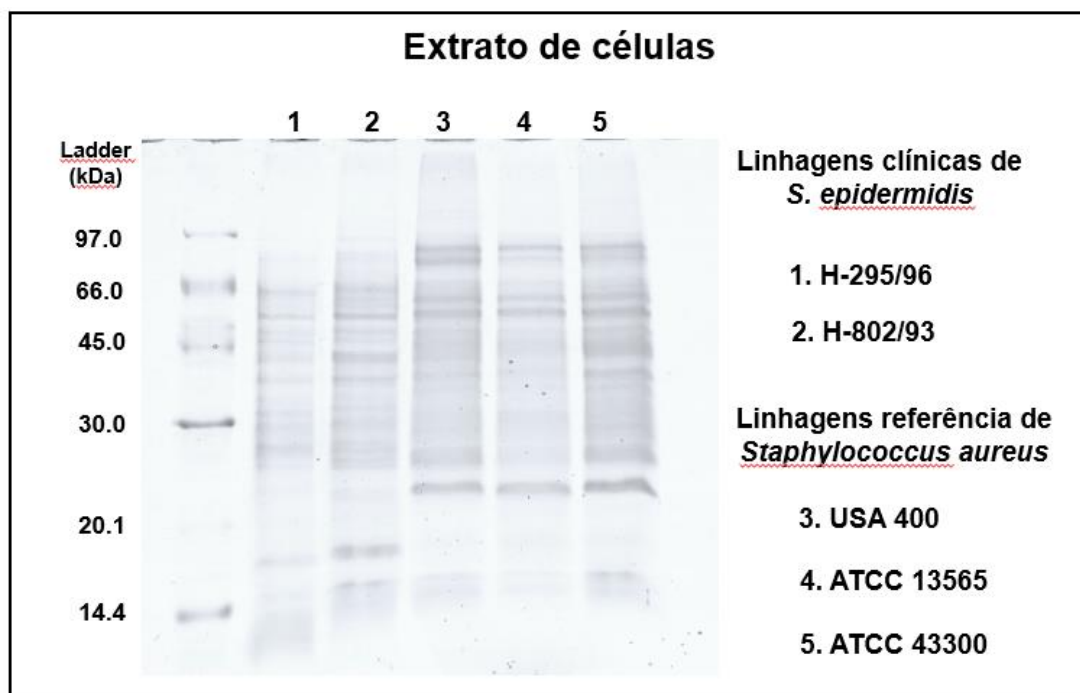


Figura 2: Gel *SDS-page* resultante da eletroforese unidimensional do extrato de células

Proteínas encontradas no extrato celular

A análise do extrato celular das linhagens H-295/96 e H-802/93 foram encontradas proteínas relacionadas a patogênese e virulência, validando alguns resultados obtidos através do sequenciamento. Foram encontradas nas duas linhagens as proteínas SspA (serina v8 protease) e SspB (cisteína protease), que atuam como enzimas proteolíticas contribuindo para a colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro. Também foi encontrada nas duas linhagens a proteína AtlE referente a autolisina bifuncional, validando o resultado do sequenciamento. Além disso foram encontradas as exoproteínas SsaA1 e IsaA. O antígeno secretório estafilocócico SsaA é uma proteína imunogênica secretada para o meio extracelular que está relacionada a patogênese estafilocócica, assim como a transglicosilase IsaA, capaz de clivar o peptídeoglicano. A relação completa das proteínas encontradas no extrato celular das duas linhagens estão listadas na **Tabela S1 e S2** presente nos anexos.

Proteínas encontradas no sobrenadante

A análise do sobrenadante das linhagens H-295/96 e H-802/93 identificou a presença de modulinas solúveis em fenol (PSMs). Na linhagem H-295/96 foram encontradas as modulinas solúveis em fenol *beta 1* e *alpha*, enquanto na linhagem H-802/93 foi encontrada apenas a modulina solúvel em fenol *beta1*. Nas duas linhagens foram encontradas a cisteína protease extracelular (EcpA), autolisina bifuncional (Atl) e glutamil endopeptidase (GseA). A relação completa das proteínas encontradas no sobrenadante das duas linhagens estão listadas na **Tabela S3 e S4** presente nos anexos.

Discussão

DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade referentes a montagem dos genomas das linhagens H-295/96 e H-802/93 foram comparados com a linhagem referência ATCC 14990, indicada pelo *Genbank*. O tamanho do genoma das duas linhagens foi de 2630095 bp para H-295/96 e 2489244 bp para H-802/93, valores condizentes com o tamanho da linhagem referência (2466502 bp). O número de genes identificados em H-295/96 foi 2220 e em H-802/93 foi 2165, próximos ao número de genes da linhagem padrão (2370 genes). Da mesma forma, o conteúdo de GC das duas linhagens se manteve em conformidade com a linhagem de referência, em torno de 32%. Esses valores sugerem que o sequenciamento das duas linhagens resultou em dados concordantes quando comparados a linhagem referência ATCC 14990, e também a linhagem RP62A sequenciada por Gill em 2005⁸, que tem um tamanho de 2626530 pb, 2490 genes e conteúdo GC de 32,1%.

As duas linhagens clínicas sequenciadas apresentaram um perfil de resistência a antimicrobianos bastante semelhante entre si, composto por genes de resistência a beta-lactâmicos, gentamicina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, quinolonas e trimetropim. A imagem de saída gerada pelo *software* BRIG (*BLAST Ring Image Generator*) mostra a localização dos genes de resistência nas duas linhagens sequenciadas. Na linhagem H-295/96, os genes *ant(4')-Ib*; *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*; *ermC* e PC1 beta-lactamase (*blaZ*) estão localizados na mesma região do genoma. O mesmo ocorre com os genes *mecA*; *mecR1*; *mecI* e *gyrB*. Já os genes *fusB*, *norA* e *tet(K)* e *dfrC* encontram-se isolados e em regiões distintas ao longo do genoma.

Em *S. aureus*, a resistência a beta-lactâmicos teve início com a aquisição do gene *blaZ*, codificador de uma beta-lactamase capaz de tornar a bactéria resistente as penicilinas. Em seguida, a detecção do gene *mecA*, codificante de uma proteína de ligação a penicilina (PB2a) com afinidade reduzida para praticamente toda a classe de antibióticos beta-lactâmicos. A transcrição dos genes *blaZ* e *mecA* pode ser controlada por genes indutores (*blaR1* e *mecR1*) e repressores (*blaI* e *mecI*). A linhagem H-295/96 apresentou os três genes relacionados a resistência a metilicina, *mecA*, *mecR1* e *mecI*, enquanto em H-802/93 foi identificado apenas o gene *mecA*, sem a presença do indutor *mecR1* e repressor *mecI*. O gene *blaZ* foi encontrado nas duas linhagens. Em 2011, em estudo conduzido por Milheiriço *et al.* avaliou a variabilidade alélica do locus *bla* em linhagens de *S. aureus* com o intuito de tentar estabelecer correlações evolutivas entre os alótipos *bla* e os fenótipos de resistência a beta-lactâmicos (MRSA e MSSA), sugerindo que os genes *bla* podem exercer um papel na aquisição, estabilização e regulação do gene *mecA*, elemento central da resistência a beta-lactâmicos de “amplo espectro”.¹³⁴

Foram realizados testes fenotípicos de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de

difusão em disco, utilizando as drogas relacionadas aos genes encontrados no sequenciamento. O fenótipo de resistência a beta-lactâmicos, mediado pelo complexo *mecA*, *mecI*, *mecRI* e *blaZ* foi testado utilizando oxacilina, cefoxitina e penicilina G. A linhagem H-802/93 apresentou sensibilidade a cefoxitina, oxacilina, mesmo sendo portadora do gene *mecA*. Por outro lado, apresentou fenótipo resistente a penicilina G, corroborando com a identificação do gene *blaZ* em seu sequenciamento.

A presença do gene *mecA* na linhagem clínica de *S. epidermidis* (H-802/93), em que não foram identificados os genes *mecRI* e *mecI*, e cujo fenótipo foi sensível no teste disco-difusão sugere a ocorrência de mutações no complexo *mecI-mecRI* envolvidos na regulação da transcrição do gene *mec*.^{135,136} O surgimento de cepas sensíveis a oxacilina, fenotipicamente, porém positivas na pesquisa do gene *mecA* para PCR (*Oxacillin- susceptible MRSA - OS-MRSA*) tem intensificado a dificuldade terapêutica das infecções estafilocócicas. Essas cepas, descritas primariamente por Kampf et al. (2003), com microrganismos provenientes de três hospitais germânicos entre anos de 1995 e 1996, embora amplifiquem o gene *mecA*, ao teste fenotípico se mostram sensíveis à oxacilina, como valores de CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$.¹³⁷ Essa queda para a CIM de oxacilina não está totalmente estabelecida, pode ser explicada pela repressão ou baixa expressão do gene *mecA*, aquisição de elementos genéticos móveis como a *IS1272*, ou mutação em proteínas envolvidas na síntese de parede, como o complexo *fem XAB* e *murE* ou no complexo *mecI-mecRI* envolvidos na regulação da transcrição do gene *mec*.^{135,138,136} O fato de esse isolado apresentar um baixo valor de CIM para oxacilina faz com que os clínicos objetivem o descalonamento da terapia, como estabelecido pelos programas de manejo eficiente dos antimicrobianos (*stewardship*), ocasionando falha terapêutica, emergência de resistência e, podendo até, levar o paciente a óbito.¹³⁹

Os resultados do sequenciamento também revelaram a presença de genes de resistência aos aminoglicosídeos, mediada pelos genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa* e *ant(4')-Ib*. A linhagem H-802/93 apresentou os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-IIIa* com fenótipo resistente à gentamicina. A linhagem H-295/96 também apresentou fenótipo resistente a gentamicina, e em seu sequenciamento foi identificado os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *ant(4')-Ib*. A principal forma de resistência se deve à aquisição de genes de resistência que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que podem ser fosfotransferases (fosforilam a molécula de aminoglicosídeo a partir de ATP), acetiltransferases (acetilam a molécula a partir de acetil-CoA) ou nucleotidiltransferases (adiciona molécula de adenina, também proveniente de ATP). O *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* codifica uma enzima bifuncional que possui ambas atividades de acetilação e fosforilação da molécula do antibiótico. Esse gene é resultante da fusão de dois genes ancestrais

e desencadeia resistência a um amplo espectro de aminoglicosídeos incluindo gentamicina, tobramicina, amikacina, kanamicina. Este gene tem sido identificado em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e vários *Streptococcus* spp, bem como em *Enterococcus* spp. e pode ser localizado em transposon e plasmídeos. Mais de 90 % dos isolados clínicos que possuem resistência a este grupo, possuem este gene e menos de 10% possuem *aph(2'')-Ic*; *aph(2'')-Id*; *aph(2'')-Ib*; *ant(4')-Ia*; *aph(3'')-IIIa* e *aac(6')-Ii*.¹⁴⁰

EGMs carregando genes de resistência a antibióticos foram adquiridos por *Staphylococcus aureus* em várias ocasiões independentes. A resistência à penicilina (*blaZ*), trimetoprim (*dfrC*), eritromicina (*ermC*), clindamicina (*ermC* constitutivamente expressa) e tetraciclina (*tetK*) foram identificadas em sequências de inserção, transposons e às vezes plasmídeos em MRSA e MSSA,¹⁴¹ e nossos resultados revelam a presença concomitante desses genes em *S. epidermidis*, provavelmente refletindo as fortes pressões seletivas dentro do ambiente hospitalar e a co-colonização das superfícies da mucosa humana que favorece encontros frequentes entre essas várias espécies de micro-organismos, criando oportunidades para a aquisição horizontal de elementos genéticos móveis. Este processo resulta em alterações significativas no perfil de resistência a antimicrobianos de isolados clínicos, resultando em infecções de difícil tratamento.

O gene *fusB*, responsável pela resistência a ácido fusídico, foi encontrado apenas na linhagem H-295/96. Uma alta prevalência de resistência ao ácido fusídico tem sido relatada para *S. epidermidis*. A proporção de isolados de *S. epidermidis* resistentes ao ácido fusídico a cada ano variou de 39% a 46%, maior do que em *S. aureus*, no *National Taiwan University Hospital* (NTUH), Taiwan.¹⁴² Estudos realizados por Chen et al. (2011)¹⁴³ sobre os determinantes de resistência ao ácido fusídico revelaram que a maioria dos isolados de *S. aureus* sensíveis à meticilina carregavam plasmídeos contendo o gene *fusB*. Em contraste, os genes *fusB* em isolados de *S. epidermidis* estavam localizados principalmente em ilhas de resistência relacionadas a fagos. As ilhas de resistência podem ser responsáveis pela disseminação da resistência ao ácido fusídico em *S. epidermidis* através da transferência horizontal de genes. Uma vez que *S. epidermidis* é considerado um reservatório de genes de resistência a antibióticos, a alta prevalência do gene *fusB* em linhagens de *S. epidermidis* pode aumentar a chance de disseminação da resistência ao ácido fusídico para outras espécies.

O fenótipo de resistência a fluoroquinolonas foi testado com ciprofloxacina, e as duas linhagens se mostraram sensíveis a droga. Este mecanismo de resistência é mediado pelo gene *norA* e gene *gyrB*, que foram identificados nas duas linhagens. Entretanto, ao testar o fenótipo de resistência pelo método de difusão com disco de ciprofloxacina, as linhagens apresentaram

sensibilidade. Segundo o CLSI (2021)¹⁴⁴ *Staphylococcus* spp. podem desenvolver resistência durante a terapia prolongada com quinolonas. Portanto, isolados que são inicialmente suscetíveis nos métodos fenotípicos podem se tornar resistentes dentro de 3 a 4 dias após o início da terapia. Essa evidência sugere que provavelmente os genes possam não ser expressos desde o início do tratamento *in vivo* ou durante a realização do teste de disco difusão como foi demonstrado neste estudo, o que indica a importância dos testes genotípicos para a detecção destes genes de resistência às quinolonas.

A crescente disponibilidade de genomas completos em bancos de dados tem sido uma ferramenta essencial para o estudo de fatores de virulência de *S. epidermidis*, revelando um repertório de genes codificadores de fatores de adesão, produção de biofilme, hemolisinas e exoproteínas.¹⁴⁵ Em 2019, Argemi e colaboradores publicaram uma revisão sobre a patogenômica dos ECN, descrevendo os fatores de virulência encontrados em diversos estudos de sequenciamento.¹⁴⁶ A primeira análise de fatores de virulência baseada em estudos de genoma completo foi realizada em 2003 por Zhang et al.¹⁴⁷ Este estudo analisou o genoma da linhagem referência ATCC12228, revelando a presença de diversos genes relacionados a virulência. Foram encontrados genes relacionados a aderência, como a adesinas (*sdr*), autolisina (*atl*), gene *ebh*, codificante da proteína de ligação a fibronectina e gene *ebp* (proteína de ligação a elastina). O estudo também identificou genes codificadores de enzimas, como proteases (*ssp*), lipases (*lip* e *geh*) e nuclease (*nuc*), genes de virulência relacionados a evasão imune, como o gene *cap*, além de genes relacionados a toxinas, como hemolisinas (delta e beta hemolisinas). Em 2005, Gill et al. analisaram o genoma completo da cepa RP62a de *S. epidermidis*, e identificou genes codificadores de proteases, lipases e hemolisinas (beta e delta).⁸ Um estudo realizado por Fournier et al. em 2013 analisou genes de virulência em um contexto clínico, fornecendo dados de sequenciamento de uma linhagem isolada de um paciente com endocardite. Foram encontrados 32 genes relacionados a virulência, dentre eles adesinas (*fbe*, *sdr*, *ebp* e *ebh*), proteases (*ssp*), lipases (*lip*, *geh*), beta-hemolisina (*hly*) além de genes relacionados a produção de biofilmes (*ica*).¹⁴⁸ Os resultados deste estudo são semelhantes aos encontrados por Zhang et al. (2003),¹⁴⁷ Gill et al. (2005)⁸ e Fournier et al. (2013)¹⁴⁸, pois a busca por genes de virulência em duas linhagens clínicas de *S. epidermidis* resultou na identificação de grande parte dos genes descritos por estes autores.

Além disso, muitos dos fatores de virulência encontrados nas linhagens sequenciadas podem contribuir para o estabelecimento, maturação e desmontagem do biofilme. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são considerados patógenos oportunistas e ambos possuem a capacidade de formar biofilmes robustos em diversas superfícies, sejam elas abióticas ou bióticas. No entanto, enquanto *S. aureus* dispõe de uma infinidade de mecanismos e fatores de

virulência para evadir do sistema imunológico, o potencial patogênico do *S. epidermidis* depende principalmente da formação de biofilme, mecanismo pelo qual coloniza e infecta próteses e dispositivos médicos.^{41,149}

O desenvolvimento do biofilme estafilocócico é um processo complexo que pode ser dividido em três fases principais: (1) adesão inicial, (2) produção de matriz extracelular e proliferação celular e (3) estruturação do biofilme e desprendimento celular. Inicialmente, na etapa de adesão, as bactérias se ligam a uma superfície e em seguida se multiplicam, formando microcolônias. O processo de ligação da bactéria em superfícies bióticas, ou seja, superfícies compostas pela matriz do hospedeiro, pode ser facilitado por proteínas ancoradas na parede celular bacteriana. Em *S. aureus*, muitas destas proteínas já foram amplamente descritas, como por exemplo a família de proteínas de repetição de serina-aspartato (SdrC, SdrD, e SdrE).¹⁵⁰ Em *S. epidermidis*, as principais proteínas relacionadas a adesão de biofilme em superfícies bióticas são SdrG, SdrF e SdrH, todas membros da família de proteínas de repetição de serina-aspartato.¹⁵¹ Nossos resultados mostram a presença de genes relacionados a estas proteínas nas duas linhagens clínicas. Em H-802/93 foi identificado o gene *sdrG*, enquanto na linhagem H-295/96 os três genes foram encontrados, *sdrG*, *sdrF* e *sdrH*, resultado que corrobora com resultados anteriormente publicados na literatura.^{151,43}

Além da capacidade de adesão em superfícies bióticas, *S. epidermidis* também apresenta uma notável habilidade na formação de biofilmes em superfícies abióticas, como catéteres, implantes e outros dispositivos médicos invasivos. Neste caso, a adesão inicial ocorre com o auxílio da proteína autolítica AtlE, descrita em *S. epidermidis*¹⁵² e homóloga a AtlA em *S. aureus*.^{153,154,155} Estudos demonstram que AtlA e AtlE também estão relacionadas a liberação de eDNA, componente importante da matriz extracelular de biofilmes estafilocócicos.^{156,155} O gene *atl* responsável por codificar a autolisina AtlE foi identificado nas duas linhagens clínicas sequenciadas. Além disso, foi possível validar a presença desta proteína no extrato celular das duas linhagens estudadas, através da análise proteômica.

Após a adesão das células individuais na superfície, estas começam a se proliferar, dando início a formação das microcolônias. A partir de então, as bactérias começam a produzir a substância polimérica extracelular (EPS), também chamada de matriz de biofilme autoproduzido, composta por polissacarídeos, proteínas, ácidos teicóicos e eDNA. A variação da composição da EPS divide os biofilmes estafilocócicos em duas categorias: biofilmes constituídos por uma matriz polissacarídica e biofilmes com matriz proteica.^{157,158} A adesina intercelular polissacarídica (PIA) é o principal componente dos biofilmes estafilocócicos dependentes de polissacarídeos, e sua produção é dependente do operon de adesão intracelular (*ica*). O operon *ica* compreende

quatro genes dispostos na seguinte ordem: *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, além de um repressor *icaR*, que regula a transcrição do operon.^{159,160} Um estudo conduzido por Gerke et al. em 1998 demonstrou que *IcaA* bem como *IcaD* são essenciais para a síntese de PIA.¹⁶¹

Os resultados do sequenciamento da linhagem H-295/96 mostram a presença dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaR*, enquanto *icaD* não foi identificado. A linhagem H-802/93 não apresentou genes do operon *icaADBC*. Em relação aos resultados da proteômica, também não foram encontradas proteínas relacionadas ao operon *icaADBC* em nenhuma das linhagens clínicas. Entretanto, os estafilococos também podem produzir biofilmes cuja matriz é constituída principalmente por proteínas, ou seja, são biofilmes que não dependem da expressão dos genes *ica* para sua formação. Estes biofilmes de matriz proteica já foram observados em linhagens clínicas de *S. epidermidis*.¹⁶²

Durante seu crescimento e maturação, o biofilme passa a ter uma estrutura tridimensional, que é moldada pela atividade de diferentes enzimas. Os estafilococos produzem um vasto repertório de exoenzimas que atuam neste processo, interagindo com componentes específicos da matriz do biofilme. Algumas destas proteínas foram descritas em *S. aureus*, como por exemplo as proteases de cisteína SspB e ScpA e a protease V8 (SspA).^{163,164} Em *S. epidermidis*, foram descritas três proteases: SepA, Esp e a cisteína protease EcpA.^{165,166} Foram identificados, nas duas linhagens de *S. epidermidis* sequenciadas neste estudo, os genes codificadores da serina V8 protease SspA (gene *sspA*), cisteína protease SspB (gene *sspB*), anteriormente descritas em *S. aureus*.^{163,164} Além da presença dos genes, a técnica de proteômica foi capaz de identificar a presença destas proteínas nas duas linhagens através da análise do extrato celular.

Por fim, a comunidade do biofilme sofre um processo de desmontagem, também chamado de fase de êxodo, que leva à disseminação de células estafilocócicas para outros locais do corpo. As enzimas mais importantes nesta fase são as cisteína-proteases secretadas (estafopainas), serina-protease V8 (SspA) e nuclease (Nuc), que atuam na degradação da matriz do biofilme. A termonuclease (TNase), codificada pelo gene *nuc*, é uma DNase termoestável específica que leva à degradação do eDNA contido na matriz, permitindo a liberação de uma subpopulação de células do biofilme.¹⁶⁷ Neste estudo, as duas linhagens sequenciadas apresentaram o gene *nuc*, responsável por codificar a termonuclease. As modulinas solúveis em fenol (PSMs) também tem grande importância nesta fase, atuando na ruptura do biofilme e subsequente disseminação de células estafilocócicas *in vivo*.^{168,169,170} A análise proteômica dos sobrenadantes das linhagens clínicas identificou a presença da PSM beta-1 em H-295/96 e H-802/93.

A destruição dos tecidos do hospedeiro é um evento importante nas infecções estafilocócicas, pois além de promover a disseminação bacteriana, ainda permite a aquisição de nutrientes

por estes microorganismos. Os estafilococos podem produzir algumas exoproteínas que auxiliam neste processo, como as proteases, lipases, nucleases e collagenases, capazes de converter componentes teciduais do hospedeiro em nutrientes. Este processo facilita o crescimento e invasão dos microorganismos, por isso essas moléculas são consideradas potenciais fatores de virulência que contribuem para a patogênese estafilocócica.^{171,172} Neste contexto, além das proteases anteriormente citadas, SspA e SspB, as linhagens clínicas sequenciadas neste estudo também apresentaram genes relacionados a lipases (*geh* e *lip*).

Os resultados da proteômica mostraram a presença da cisteína protease EcpA, uma protease extracelular capaz de degradar IgA e IgM humana, albumina sérica, fibrinogênio e fibronectina.¹⁷³ A degradação das imunoglobulinas pela EcpA sugere um mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Já as modificações proteolíticas da albumina, fibronectina e fibrinogênio (que revestem a superfície dos dispositivos médicos), realizadas pela EcpA, promovem a adesão eficiente de *S. epidermidis* ao plástico de dispositivos médicos, o que a torna um fator importante para a colonização da espécie nestes dispositivos.^{174,175}

O sequenciamento mostrou a presença da toxina beta-hemolisina nas duas linhagens clínicas de *S. epidermidis* estudadas. Se trata de uma toxina hemolítica bastante descrita em *S. aureus*. As hemolisinas são polipeptídeos capazes de lisar glóbulos vermelhos e estão divididos em diferentes classes, de acordo com sua estrutura e mecanismo de ação. A alfa-hemolisina e gama-hemolisina provocam a morte da célula por meio da formação de poros na membrana. Já a beta-hemolisina (Hlb), também conhecida como esfingomielinase é uma toxina que, diferente das anteriores, não é capaz de formar poros na membrana, mas possui atividade hemolítica devido a sua capacidade de hidrolisar a esfingomielina, que é um lipídeo da membrana plasmática, causando morte celular resultante da modificação da fluidez da membrana plasmática da célula hospedeira, e consequente desestabilização da estrutura da bicamada.⁶⁹

Destacamos a importância de novos estudos de sequenciamento do genoma de isolados clínicos a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na transferência gênica e evolução da virulência estafilocócica, além da necessidade de vigilância contínua para detectar estas novas linhagens recombinantes que podem causar infecções graves e de difícil tratamento.



Conclusões

CONCLUSÕES

- Os parâmetros de qualidade referentes a montagem dos genomas das duas linhagens de *S. epidermidis* estudadas através de sequenciamento de nova geração foi similar a linhagem referência utilizada para comparação.
- A análise do genótipo de resistência antimicrobiana mostrou a presença de vários genes de resistência nas duas linhagens analisadas, revelando a importância dos testes genotípicos para a determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, uma vez que resultados falsos sensíveis podem ser detectados nos testes fenotípicos utilizados na rotina.
- Os resultados indicam a presença de genes e proteínas essenciais no desenvolvimento do biofilme estafilocócico.
- As infecções nosocomiais causadas por *S. epidermidis* evidenciaram a necessidade de aprofundar os estudos de fatores de virulência desta espécie. Para tal, o sequenciamento do genoma e proteoma tem se mostrado ferramentas bastante úteis, pois permitem a identificação destes genes e a realização de estudos comparativos utilizando os dados de diversas linhagens disponíveis em bancos de dados. Os dados gerados neste estudo através do sequenciamento do genoma e proteoma das linhagens clínicas H-802/93 e H-295/96 podem ser depositados em bancos de dados públicos, ampliando o conhecimento do genoma de *S. epidermidis*.
- A presença de genes relacionados a resistência a antimicrobianos em linhagens de *S. epidermidis* ressalta a atuação de *S. epidermidis* como reservatórios destes genes, capazes de transferi-los para outras bactérias potencialmente patogênicas e mais virulentas, como por exemplo *S. aureus* promovendo o surgimento de clones multirresistentes. A co-existência de *S. aureus* e *S. epidermidis* em nichos ecológicos sobrepostos favorece a transferência horizontal de genes entre as duas espécies, resultando no surgimento de clones patogênicos e multirresistentes.
- Destacamos a importância de novos estudos de sequenciamento do genoma de isolados clínicos a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na transferência gênica e evolução da virulência estafilocócica, além da necessidade de vigilância contínua para detectar estas novas linhagens recombinantes que podem causar infecções graves e de difícil tratamento.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* - The “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(8): 555–67.
2. Li M, Du X, Villaruz A, Diep BA, Wang D, Song Y et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med*. 2012; 18(5): 816-19.
3. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020; 70(11): 5607-12.
4. Hudome SM, Fisher MC. Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis*. 2001; 14(3): 303–7.
5. Dong Y, Speer CP, Glaser K. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence*. 2018; 9(1): 621-33.
6. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(5): 414–24.
7. Otto M. Community-associated MRSA: What makes them special? *Int J Med Microbiol*. 2013; 303(6–7): 324–30.
8. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*. 2005; 187(7): 2426–38.
9. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 1998; 29(2): 527–43.
10. Ruzin A, Lindsay J, Novick RP. Molecular genetics of SaPI1 - a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2001; 41(2): 365–77.
11. Madhusoodanan J, Seo KS, Remortel B, Park JY, Hwang SY, Fox LK, et al. An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol*. 2011; 193(8): 1854–62.
12. Massey RC, Horsburgh MJ, Lina G, Höök M, Recker M. The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4(12): 953–8.
13. Fox LK, Besser TE, Jackson SM. Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1996; 209(6): 1143–6.
14. Lotter LP, Genigeorgis CA. Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. *Appl Microbiol*. 1975; 29(2):152–8.

15. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian J Microbiol.* 2006; 37(1): 70–4.
16. Cunha MLRS, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol Immunol.* 2007; 51(4): 381–90.
17. Calsolari RAO, Pereira VC, Araújo Júnior JP, Cunha MLRS. Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiol Immunol.* 2011; 55(6): 394–407.
18. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(1): 16–34.
19. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science.* 1990; 248(4956): 705–11.
20. Bremell T, Tarkowski A. Preferential induction of septic arthritis and mortality by superantigen-producing *Staphylococci*. *Infect Immun.* 1995; 63(10): 4185–7.
21. Tarkowski A, Wagner H. Arthritis and sepsis caused by *Staphylococcus aureus*: Can the tissue injury be reduced by modulating the host's immune system? *Mol Med Today.* 1998; 4(1): 15–8.
22. Berger S, Kunerl A, Wasmuth S, Tierno P, Wagner K, Brügger J. Menstrual toxic shock syndrome: case report and systematic review of the literature. *Lancet Infect Dis.* 2019; 19 (9): e313–21.
23. Lattar SM, Tuchscher LPN, Centrón D, Becker K, Predari SC, Buzzola FR, et al. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis in Argentina and clonal distribution of the *cap5(8)* genes and of other selected virulence genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(10): 2559–66.
24. Zhang N, Gevaert P, van Zele T, Perez-Novo C, Patou J, Holtappels G, et al. An update on the impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis. *Rhinology.* 2005; 43(3): 162–8.
25. Hennekinne JA, Ostyn A, Guillier F, Herbin S, Prufer AL, Dragacci S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins (Basel).* 2010; 2(8): 2106–16.
26. Bayles KW, Iandolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol.* 1989; 171(9): 4799–806.
27. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougél C, et al. A highly prevalent operon of enterotoxin gene forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2001; 166(1): 669–77.
28. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins (Basel).* 2018; 10(6): 252.

29. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of panton-valentine leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999; 29(5): 1128–32.
30. Miles G. Subunit composition of a bicomponent toxin: Staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. Protein Sci. 2002; 11(4): 894–902.
31. Aman MJ, Karauzum H, Bowden MG, Nguyen TL. Structural model of the pre-pore ring-like structure of panton-valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. J Biomol Struct Dyn. 2010; 28(1): 1–12.
32. Yamashita K, Kawai Y, Tanaka Y, Hirano N, Kaneko J, Tomita N, et al. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal -hemolysin reveals the barrel pore formation mechanism by two components. Proc Natl Acad Sci. 2011; 108(42): 17314–9.
33. Yoong P, Torres VJ. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. Curr Opin Microbiol. 2013; 16(1): 63–9.
34. Gravet A, Colin DA, Keller D, Giradot R, Monteil H, Prévost G. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. FEBS Lett. 1998; 436(2): 202–8.
35. Morinaga N, Kaihou Y, Noda M. Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. Microbiol Immunol. 2003; 47(1): 81–90.
36. Seilie ES, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. Semin Cell Dev Biol. 2017; 72: 101–16.
37. Alonzo III F, Benson MA, Chen J, Novick RP, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* leukocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth *in vivo*. Mol Microbiol. 2012; 83(2): 423–35.
38. Alonzo III F, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszkowski DG, et al. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. Nature. 2013; 493(7430): 51–5.
39. Liu C, Chen Z, Sun Z, Feng X, Zou M, Cao W, et al. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. J Microbiol Immunol Infect. 2015; 48(5): 490–6.
40. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying panton-valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. 2003; 9(8): 978–84.
41. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol. 2005; 3(12): 948–58.
42. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. Microbiol Mol Biol Rev. 2020; 84(3): e00026–19.
43. Foster TJ. The MSCRAMM family of cell-wall-anchored surface proteins of gram-positive cocci. Trends Microbiol. 2019; 27(11): 927–41.

44. Otto M. Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiol Rev.* 2014; 38(6): 1250-70.
45. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 2007; 153(Pt 7): 2083-92.
46. Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, et al. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2011; 6(11): e26714.
47. Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, Arciola CR. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs.* 2011; 34(9): 824-31.
48. Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide inter-cellular adhesin. *J Biol Chem.* 1998; 273:18586–93.
49. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322:207-28.
50. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2020; 84(3): e00026-19.
51. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74: 470-76.
52. Seilie ES, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Semin Cell Dev Biol.* 2017; 72: 101-16.
53. Cunha MLRS, Rugolo LM, Lopes CA. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101(6): 661-8.
54. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins (Basel).* 2018; 10(6): 252.
55. Glenny AT, Stevens MF. Staphylococcus toxins and antitoxins. *J Pathol.* 1935; 40: 201-10.
56. Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh SL, Eisner W, Novick RP. Nucleotide sequence: The beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17:3305.
57. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13:16-34.
58. Flores-Díaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, Alape-Girón A, Flieger A. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80(3): 597-628.
59. Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, Bayles KW, et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(32): 14407-12.

60. Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: Isolation and characterization. J. Exp. Med. 1999; 189: 907-18.
61. Porayath C, Suresh MK, Biswas R, Nair BG, Mishra N, Pal S. Autolysin mediated adherence of *Staphylococcus aureus* with fibronectin, gelatin and heparin. Int J Biol Macromol. 2018; 110:179-84.
62. Clarke SR, Harris LG, Richards RG, Foster SJ. Analysis of Ebh, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2002; 70(12): 6680-7.
63. Park PW, Rosenbloom J, Abrams WR, Rosenbloom J, Mecham RP. Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 1996; 271(26):15803-9.
64. von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis. 2002; 2(11): 677-85.
65. Kord M, Ardebili A, Jamalan M, Jahanbakhsh R, Behnampour N, Ghaemi EA. Evaluation of biofilm formation and presence of Ica genes in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. Osong Public Health Res Perspect. 2018; 9(4): 160-66.
66. Dubin G. Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors. Acta Biochim Pol. 2003; 50(3): 715-24.
67. Rosenstein R, Götz F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. Biochimie. 2000; 82(11): 1005-14.
68. Burts ML, Williams WA, DeBord K, Missiakas DM. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(4): 1169-74.
69. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? Front Cell Infect Microbiol. 2012; 2:12.
70. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance [Internet]. WHO 2014 AMR Report. 2014. p. 1–8. Disponível em: http://www.who.int/drugresistance/documents/AMR_report_Web_slide_set.pdf
71. Natoli S, Fontana C, Favaro M, Bergamini A, Testore GP, Minelli S, et al. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. BMC Infect Dis. 2009; 9(1): 83.
72. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol Rev. 1987; 51(1): 88-134.
73. Massidda O, Mingoia M, Fadda D, Whalen MB, Montanari MP, Varaldo PE. Analysis of the beta-lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: focus on *bla* complex genes and cadmium resistance determinants *cadD* and *cadX*. Plasmid. 2006; 55(2):114-27.

74. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 1549-55.
75. Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005; 69(4): 585-607.
76. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32(2): 234-58.
77. Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2' production. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40(12): 2680-5.
78. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, Holland TL, Fowler VG Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*. 2019; 17(4): 203-18.
79. Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*. 2007; 2(3): 323-34.
80. Ito H, Yoshida H, Bogaki-Shonai M, Niga T, Hattori H, Nakamura S. Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38(9): 2014-23.
81. Lekshmi M, Ammini P, Adjei J, Sanford LM, Shrestha U, Kumar S, et al. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. *AIMS Microbiol*. 2018; 4(1):1-18.
82. Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37(1): 128-9.
83. Buonerba F, Lepri S, Goracci L, Schindler BD, Seo SM, Kaatz GW, et al. Improved potency of indole-based NorA efflux pump inhibitors: From serendipity toward rational design and development. *J Med Chem*. 2017; 60:517-23.
84. Zimmermann S, Tuchscher L, Rödel J, Löffler B, Bohnert JA. Optimized efflux assay for the NorA multidrug efflux pump in *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods*. 2017; 142: 39-40.
84. Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev*. 1992; 5(4): 387-99.
85. Yılmaz Ç, Özcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochem Pharmacol*. 2017; 133: 43-62.
86. Arenz S, Wilson DN. Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016; 6(9): a025361
87. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular

- biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65(2): 232-60
88. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev.* 1996; 19(1):1-24.
 89. Schwarz S, Roberts MC, Werckenthin C, Pang Y, Lange C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Vet Microbiol.* 1998; 63(2-4): 217-27
 90. Malik S, Peng H, Barton MD. Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs. *J Appl Microbiol.* 2005; 99(6): 1283-93.
 91. van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.* 2011; 2:203.
 92. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(9): 3115-21.
 93. Perumal N, Murugesan S, Krishnan P. Distribution of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. *Indian J Med Microbiol.* 2016; 34(3): 350-2.
 94. Hauschild T, Sacha P, Wieczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Tryniszewska E. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Białystok, Poland. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008; 46(2): 225-8.
 95. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010; 13(6): 151-71.
 96. Klingenberg C, Sundsfjord A, Rønnestad A, Mikalsen J, Gaustad P, Flaegstad T. Phenotypic and genotypic aminoglycoside resistance in blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci from a single neonatal intensive care unit, 1989-2000. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(5): 889-96.
 97. McLaws F, Chopra I, O'Neill AJ. High prevalence of resistance to fusidic acid in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(5): 1040-3.
 98. O'Neill AJ, Chopra I. Molecular basis of *fusB*-mediated resistance to fusidic acid in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2006; 59(2): 664-76.
 99. O'Neill AJ, McLaws F, Kahlmeter G, Henriksen AS, Chopra I. Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(5): 1737-40.
 100. Yazdankhah SP, Asli AW, Sørum H, Oppegaard H, Sunde M. Fusidic acid resistance, mediated by *fusB*, in bovine coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(6): 1254-6.
 101. Mikłasińska-Majdanik M. Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10(11): 1406.
 102. Feßler AT, Wang Y, Wu C, Schwarz S. Mobile macrolide resistance genes in

staphylococci. *Plasmid*. 2018; 99: 2-10.

103. Bermingham A, Derrick JP. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *Bioessays*. 2002; 24(7): 637-48.

104. Sabol KE, Echevarria KL, Lewis JS 2nd. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: new bug, old drugs. *Ann Pharmacother*. 2006; 40(6): 1125-33.

105. Vickers AA, Potter NJ, Fishwick CW, Chopra I, O'Neill AJ. Analysis of mutational resistance to trimethoprim in *Staphylococcus aureus* by genetic and structural modelling techniques. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63(6): 1112-7.

106. Chen J, Novick RP. Phage-Mediated Intergeneric Transfer of Toxin Genes. *Science*. 2009; 323(5910): 139-41.

107. Novick R. Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*. 2003; 49(2): 93-105.

108. Novick RP, Subedi A. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem Immunol Allergy*. 2007; 93: 42-57.

109. Hiramatsu K, Watanabe S, Takeuchi F, Ito T, Baba T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. 2004; 22(SUPPL. 1): S5-8.

110. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat*. 2003; 6(1): 41-52.

111. Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol*. 2007; 189(6): 2540-52.

112. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 1549-55.

113. Baig S, Johannesen TB, Overballe-Petersen S, Larsen J, Larsen AR, Stegger M. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2018; 61:74-76.

114. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007; 13(3): 222-35.

115. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of Staphylococcal cassette chromosome mec identified in community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(4):1147-52.

116. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V Staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(7): 2637-51.

117. Yao D, Yu FY, Qin ZQ, Chen C, He SS, Chen ZQ, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). BMC infectious diseases. 2010; 10:133.
118. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol. 2002; 40(11): 4289-94.
119. Portillo BC, Moreno JE, Yomayusa N, Alvarez CA, Cardozo BE, Pérez JA, et al. Molecular epidemiology and characterization of virulence genes of community-acquired and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Colombia. Int J Infect Dis. 2013; 17(9): e744-9.
120. Pérez-Losada M, Browne EB, Madsen A, Wirth T, Viscidi RP, Crandall KA. Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. Infect Genet Evol. 2006; 6(2): 97-112.
121. Zecconi A, Scali F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunol Lett. 2013; 150(1-2): 12-22.
122. Cherkasov A, Hsing M, Zoraghi R, Foster LJ, See RH, Stoyanov N, et al. Mapping the protein interaction network in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Proteome Res. 2011; 10(3): 1139–50.
123. Mazzeo MF, Sorrentino A, Gaita M, Cacace G, Di Stasio M, Facchiano A, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(2): 1180-9.
124. Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P. Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. Anal Methods. 2010; 2(12):1941-47
125. Goulart VAM, Resende RR. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. Nanocell News. 2013; 1(3): 1-6.
126. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. Annu Rev Biomed Eng. 2009; 11: 49-79.
127. Gary W. Procop, Deirdre L. Church, Geraldine S. Hall, William M. Janda, Elmer W. Koneman, et al. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. 7a Ed. Guanabara Koogan; 2018.
128. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. J Clin Microbiol. 1996; 34(12): 2888–93.
129. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; approved standard, Edition T, editor. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009. 76 p.
130. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI

supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. 258p

131. Bradford MM. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248-254.

132. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).

133. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, et al. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. *Nature protocols*. 2016; 11(1): 102-117.

134. Milheirico C, Portelinha A, Krippahl L, de Lencastre H, Oliveira DC. Evidence for a purifying selection acting on the β -lactamase locus in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*. 2011; 11: 76.

135. Kamberović F, Ibrahimagić A, Uzunović S, Budimir A, Rijnders MI, Stobberingh EE. *mecA*-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *J Chemother*. 2015; 27(6):330-6.

136. Pournaras S, Sabat AJ, Grundmann H, Hendrix R, Tsakris A, Friedrich AW. Driving Forces of mechanisms regulating oxacillin-resistance phenotypes of MRSA: Truly oxacillin-susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates also Exist. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(16): 2048-53.

137. Chung M, Kim CK, Conceição T, Aires-De-Sousa M, De Lencastre H, Tomasz A. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2A by oxacillin-susceptible/*mecA*-positive MRSA strains from Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(10): 2804-9.

138. Kobayashi N, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of insertion sequence-like element IS1272 and its position relative to methicillin resistance genes in clinically important *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(11): 2780-2.

139. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, Nagasawa Z, Otsuka Y, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother*. 2007; 13(2): 79-86

140. Klingenberg C, Sundsfjord A, Rønnestad A, Mikalsen J, Gaustad P, Flaegstad T. Phenotypic and genotypic aminoglycoside resistance in blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci from a single neonatal intensive care unit, 1989-2000. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(5): 889-96.

141. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(18): 3057-71.

142. Chen HJ, Hung WC, Tseng SP, Tsai JC, Hsueh PR, Teng LJ. Fusidic acid resistance determinants in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 ; 54(12): 4985-91.

143. Chen HJ, Tsai JC, Hung WC, Tseng SP, Hsueh PR, Teng LJ. Identification of *fusB*-mediated fusidic acid resistance islands in *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(12): 5842-5849.
144. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 31st ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-104-8 [Print]; ISBN 978-1-68440-105-5 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2021
145. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27(4): 870-926.
146. Argemi X, Hansmann Y, Prola K, Prévost G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(5): 1215.
147. Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol*. 2003; 49(6): 1577-93.
148. Fournier PE, Gouriet F, Gimenez G, Robert C, Raoult D. Deciphering genomic virulence traits of a *Staphylococcus epidermidis* strain causing native-valve endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(5): 1617-21.
149. Le KY, Park MD, Otto M. Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Front Microbiol*. 2018; 9:359.
150. Zhang Y, Wu M, Hang T, Wang C, Yang Y, Pan W, Zang J, Zhang M, Zhang X. *Staphylococcus aureus* SdrE captures complement factor H's C-terminus via a novel 'close, dock, lock and latch' mechanism for complement evasion. *Biochem J*. 2017; 474(10): 1619-31.
151. McCrea KW, Hartford O, Davis S, Eidhin DN, Lina G, Speziale P, et al. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading)*. 2000; 146 (Pt 7): 1535-46.
152. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. Evidence for autolysin mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol*. 1997; 24:1013-24.
153. Biswas R, Voggu L, Simon UK, Hentschel P, Thumm G, Götz F. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol*. 2006; 259: 260-268.
154. Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun*. 2011; 79: 1153-65.
155. Bose JL, Lehman MK, Fey PD, Bayles KW. Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation. *PLoS One*. 2012; 7:e42244.
156. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. 2007; 153: 2083-92.

157. O’Gara JP. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. 2007; 270: 179-88.
158. Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, Geoghegan JA. Protein-based biofilm matrices in staphylococci. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4: 171.
159. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun. 1999; 67: 5427-33.
160. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol. 1996; 20: 1083-91.
161. Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J Biol Chem. 1998; 273: 18586-93.
162. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. Mol Microbiol. 2005; 55(6): 1883-95.
163. Rice K, Peralta R, Bast D, de Azavedo J, McGavin MJ. Description of staphylococcus serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. Infect Immun. 2001; 69: 159-69.
164. Golonka E, Filipek R, Sabat A, Sinczak A, Potempa J. Genetic characterization of staphopain genes in *Staphylococcus aureus*. Biol Chem. 2004; 385: 1059-67.
165. Dubin G, Chmiel D, Mak P, Rakwalska M, Rzychon M, Dubin A. Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. Biol Chem. 2001; 382: 1575-82.
166. Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and hostpathogen interaction. J Bacteriol. 2013; 195: 1645-55.
167. Lister JL, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4: 178.
168. Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach TH, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109: 1281-86.
169. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nat Rev Microbiol. 2013; 11: 667-73.
170. Le KY, Villaruz AE, Zheng Y, He L, Fisher EL, Nguyen TH, et al. Role of phenol-soluble modulins in *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and infection of indwelling medical devices. J Mol Biol. 2019; 431: 3015-27.
171. Dubin G. Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. Biol Chem. 2002; 383(7-8):

1075-86.

172. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert M: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microb. 2000; 13: 16-34

173. Sloat N, Thomas M, Marre R, Gattermann S. Purification and characterisation of elastase from *Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol. 1992; 37(3): 201-5.

174. Dubin G. Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors. Acta Biochim Pol. 2003; 50(3): 715-24.

175. Martínez-García S, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, Cancino-Díaz JC. Extracellular proteases of *Staphylococcus epidermidis*: roles as virulence factors and their participation in biofilm. Apmis. 2018; 126(3): 177–85

Anexos

ANEXOS

Tabela S1: Proteínas encontradas no extrato celular da linhagem clínica H-295/96.

Acesso UNIPROT	Massa (Da)	Proteína	Gene
Q5HL21	32954,9	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	<i>fda</i>
Q5HRK4	43112,5	Elongation factor Tu	<i>tuf</i>
Q5HQ75	35253,3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	<i>pdhB</i>
Q5HNJ5	18393,4	Putative universal stress protein SERP1273	SERP1273
Q5HN75	30794,4	Glutamyl endopeptidase	<i>gseA</i>
Q5HQ73	49646,5	Dihydrolipoyl dehydrogenase	<i>pdhD</i>
Q5HQB9	148165,2	Bifunctional autolysin	<i>atl</i>
Q5HQQV0	47199,8	Enolase	<i>eno</i>
Q5HQ76	41286,8	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	<i>pdhA</i>
Q5HP72	9602,2	DNA-binding protein HU	<i>hup</i>
Q5HL49	24514,5	Probable transglycosylase IsaA	<i>isaA</i>
Q5HQQV4	36150,3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	<i>gapA1</i>
Q5HKG6	27882,1	Diacetyl reductase [(S)-acetoin forming]	<i>butA</i>
Q5HM00	22595	50S ribosomal protein L4	<i>rplD</i>
Q5HP69	43324	30S ribosomal protein S1	<i>rpsA</i>
Q5HQ74	46915,8	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	<i>pdhC</i>
Q5HRK5	76810,1	Elongation factor G	<i>fusA</i>
Q5HQ20	4623,4	Phenol soluble modulin beta 1	SERP0737
Q5HM20	23989,2	Adenylate kinase	<i>adk</i>
Q5HQ19	4618,4	Phenol soluble modulin beta 1	SERP0738
Q5HMY1	57695,7	60 kDa chaperonin	<i>groL</i>
Q5HRL2	12624,6	50S ribosomal protein L7/L12	<i>rplL</i>
Q2G0N1	76546	Elongation factor G - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>fusA</i>
Q5HRZ5	11710	30S ribosomal protein S6	<i>rpsF</i>
Q5HLI2	29381,1	Amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein	SERP2005

Q5HM26	13636,4	50S ribosomal protein L17	<i>rplQ</i>
Q5HNJ9	15148,3	Universal stress protein family	SERP1269
P48940	41818,4	Trans-sulfuration enzyme family protein	SERP0095
Q5HQV2	27332,8	Triosephosphate isomerase	<i>tpiA</i>
Q5HM82	25850,7	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-type	<i>deoD</i>
Q5HLF5	37629,4	Alcohol dehydrogenase	SERP2032
Q5HLZ8	11551,3	30S ribosomal protein S10	<i>rpsJ</i>
P48940	17765,4	30S ribosomal protein S7- <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>rpsG</i>
Q5HMP3	56801,1	Bifunctional AAC/APH	<i>aacA-aphD</i>
Q5HMZ4	48873	Aminotransferase, putative	SERP1481
Q5HN41	19547,3	Bacterial non-heme ferritin	<i>ftnA</i>
Q5HKJ8	40027,1	Glycerol dehydrogenase	<i>gldA</i>
Q5HKF6	44655,4	Extracellular cysteine protease	<i>ecpA</i>
Q5HPT5	29758,5	30S ribosomal protein S2	<i>rpsB</i>
Q5HM38	36511,3	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase	<i>lacD</i>
Q5HPE0	7328,6	Cold shock protein CspA	<i>cspA</i>
Q5HPK8	58158,2	Catalase	<i>kata</i>
Q5HQ86	9488,7	Histidine-containing protein	<i>ptsH</i>
Q5HPM6	7464,8	Uncharacterized protein - <i>Staphylococcus epidermidis</i> (strain ATCC 35984 / RP62A)	SERP0884
Q5HPB5	18106,5	PTS system glucose-specific EIIA component	<i>crr</i>
Q5HRL3	17763,2	50S ribosomal protein L10	<i>rplJ</i>
Q5HRY2	54635,7	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	<i>ahpF</i>
Q5HMB7	54691,3	ATP synthase subunit alpha	<i>atpA</i>
Q5HP42	52183,2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	<i>gnd</i>
Q5HN91	13388,5	UPF0342 protein SERP1381	SERP1381
Q5HL33	26232,7	Alpha-acetolactate decarboxylase	<i>budA</i>
Q5HQ92	67657,9	67 kDa Myosin-crossreactive antigen	SERP0663
Q5HRY1	21068,4	Alkyl hydroperoxide reductase C	<i>ahpC</i>
Q2FXQ7	46250,8	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	<i>clpX</i>
Q5HLD1	32385,7	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>gtab</i>

Q5HNT3	10135,1	UPF0297 protein SERP1181	SERP1181
Q5HRF8	29504,5	Coproheme decarboxylase	<i>chdC</i>
Q5HNZ5	22690,3	Superoxide dismutase [Mn/Fe]	<i>sodA</i>
Q5HRX5	15101,4	UPF0355 protein SERP0066	SERP0066
Q5HN82	22677,4	Glucosamine-6-phosphate isomerase family protein	SERP1390
Q5HLV2	27876,7	Staphylococcal secretory antigen SsaA PE=3 SV=1	<i>ssaA1</i>
Q5HLZ9	23636,3	50S ribosomal protein L3	<i>rplC</i>
Q5HR90	64162,3	ABC transporter, ATP-binding/permease protein	<i>abcA</i>
Q5HMA2	9754,8	50S ribosomal protein L31	<i>rpmE2</i>
Q5HP71	36078,5	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	<i>gpsA</i>
Q5HLM6	24077,3	Uncharacterized lipoprotein SERP1959	SERP1959
Q2FZ28	52264,4	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>hslU</i>
Q2FW20	14804	30S ribosomal protein S8	<i>rpsH</i>
Q5HQ29	11417,8	Thioredoxin	<i>trxA</i>
Q2FWF0	51350,2	ATP synthase subunit beta - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>atpD</i>
Q2FZZ2	38167,4	Methionine import ATP-binding protein MetN 2 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>metN2</i>
Q5HRS2	11829,9	Uncharacterized protein	SERP0121
Q5HQ60	69172,3	50S ribosomal subunit assembly factor BipA	<i>bipA</i>
Q2FW66	19161,7	Alkaline shock protein 23 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>asp23</i>

Tabela S2: Proteínas encontradas no extrato celular da linhagem clínica H-802/93.

Acesso UNIPROT	Massa (Da)	Proteína	Gene
Q5HRK4	43112,5	Elongation factor Tu	<i>tuf</i>
Q2G0N0	43058,6	Elongation factor Tu - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>tuf</i>
Q5HPE0	7328,6	Cold shock protein CspA	<i>cspA</i>

Q5HRY1	21068,4	Alkyl hydroperoxide reductase C	<i>ahpC</i>
Q5HM32	14618,8	30S ribosomal protein S9	<i>rpsI</i>
Q5HRL3	17763,2	50S ribosomal protein L10	<i>rplJ</i>
Q5HM00	22595	50S ribosomal protein L4	<i>rplD</i>
Q5HRK5	76810,1	Elongation factor G	<i>fusA</i>
Q5HRH7	22311,7	3-hexulose-6-phosphate synthase	SERP0216
Q5HL21	32954,9	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	<i>fda</i>
Q5HP69	43324	30S ribosomal protein S1	<i>rpsA</i>
Q5HQ76	41286,8	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	<i>pdhA</i>
Q5HKL9	36866	Acetoin dehydrogenase, E1 component, beta subunit	SERP2325
Q5HNJ6	40151,8	Alanine dehydrogenase	<i>ald</i>
Q2FYG2	9602,2	DNA-binding protein HU, putative - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_01490
Q5HQ73	49646,5	Dihydrolipoyl dehydrogenase	<i>pdhD</i>
Q5HQB9	148165,2	Bifunctional autolysin	<i>atl</i>
Q5HNJ9	15148,3	Universal stress protein family	SERP1269
Q5HK07	48847,8	Serine--tRNA ligase	<i>serS</i>
Q5HQV0	47199,8	Enolase	<i>eno</i>
Q5HRP1	33113,1	Cysteine synthase	<i>cysK</i>
Q5HL31	34062,6	L-lactate dehydrogenase	<i>ldh</i>
Q5HQR3	14202,8	Glycine cleavage system H protein	<i>gcvH</i>
Q5HRL2	12624,6	50S ribosomal protein L7/L12	<i>rplL</i>
Q5HQV4	36150,3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	<i>gapA1</i>
Q5HLU4	34696,9	Putative 2-hydroxyacid dehydrogenase SERP1888	SERP1888
Q5HKL7	48879,8	Dihydrolipoyl dehydrogenase	SERP2327
Q5HNW6	66087,7	Chaperone protein DnaK	<i>dnaK</i>
Q5HPT4	32472,6	Elongation factor Ts	<i>tsf</i>
Q5HQ75	35253,3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	<i>pdhB</i>
Q5HKG6	27882,1	Diacetyl reductase [(S)-acetoin forming]	<i>butA</i>
Q5HNZ5	22690,3	Superoxide dismutase [Mn/Fe]	<i>sodA</i>

Q2G2A5	35206,1	Pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, pyruvate dehydrogenase beta subunit, putative <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_01041
Q5HKM3	18741,6	Immunodominant antigen B	SERP2321
Q5HRF7	35061,1	Phosphate acetyltransferase	<i>pta</i>
Q5HM24	13869,4	30S ribosomal protein S11	<i>rpsK</i>
Q5HN91	13388,5	UPF0342 protein SERP1381	SERP1381
Q2FZ21	20322,6	Ribosome-recycling factor - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>frr</i>
Q5HM38	36511,3	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase	<i>lacD</i>
Q2G2A3	49432,5	Dihydrolipoyl dehydrogenase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_01043
P0A0F8	15569,4	50S ribosomal protein L15 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>rplO</i>
Q5HLV2	27876,7	Staphylococcal secretory antigen SsaA	<i>ssaA1</i>
Q5HQ86	9488,7	Histidine-containing protein	<i>ptsH</i>
Q2G028	47069,8	Enolase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>eno</i>
Q5HNP4	11268	50S ribosomal protein L21	<i>rplU</i>
Q5HQ74	46915,8	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	<i>pdhC</i>
Q5HNM8	48684	Trigger factor	<i>tig</i>
Q5HNJ2	18267,3	Thiol peroxidase	<i>tpx</i>
Q5HQP3	33182,8	Uncharacterized protein SERP0556	SERP0556
Q5HNK7	62976	Pyruvate kinase	<i>pyk</i>
Q5HMP4	48873	Aminotransferase	SERP1481
Q5HNU0	17739,9	Transcription elongation factor GreA	<i>greA</i>
Q5HRL4	24994,1	50S ribosomal protein L1	<i>rplA</i>
Q5HNJ5	18393,4	Putative universal stress protein SERP1273	SERP1273
Q5HPT5	29758,5	30S ribosomal protein S2	<i>rpsB</i>
Q5HRK6	17765,4	30S ribosomal protein S7	<i>rpsG</i>
Q5HL49	24514,5	Probable transglycosylase IsaA	<i>isaA</i>
Q5HKT5	28023,4	Acetoin(diacetyl) reductase	SERP2257

Q5HNZ8	5847,9	50S ribosomal protein L33 1	<i>rpmG1</i>
Q5HMB9	51506,1	ATP synthase subunit beta	<i>atpD</i>
Q5HM14	19634,3	50S ribosomal protein	<i>rplF</i>
Q5HLZ8	11551,3	30S ribosomal protein S10	<i>rpsJ</i>
Q5HMZ0	10261,4	10 kDa chaperonin	<i>groS</i>
Q5HM17	6688,8	50S ribosomal protein L30	<i>rpmD</i>
Q2FZG4	41338,8	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>pdhA</i>
Q5HM20	23989,2	Adenylate kinase	<i>adk</i>
Q5HM26	13636,4	50S ribosomal protein L17	<i>rplQ</i>
Q5HQJ9	49659	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>pgi</i>
Q5HPJ9	72875,3	Transketolase	<i>tkt</i>
Q5HM47	18659,4	Alkaline shock protein 23	<i>asp23</i>
Q5HN59	18667,5	Uncharacterized protein SERP1413	SERP1413
Q5HQ06	41367,8	Cell division protein FtsZ	<i>ftsZ</i>
Q2FXW0	10279,1	UPF0297 protein SAOUHSC_01721 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_01721
Q5HM05	24156	30S ribosomal protein S3	<i>rpsC</i>
Q5HPU5	41980,8	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta sucC	<i>sucC</i>
Q5HMZ1	57695,7	60 kDa chaperonin groL	<i>groL</i>
Q2G032	36240,3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_00795
Q5HMA2	9754,8	50S ribosomal protein L31 type B	<i>rpmE2</i>
Q5HRE9	35136	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family	SERP0244
Q5HPV3	10335,6	30S ribosomal protein S16	<i>rpsP</i>
Q5HM07	8067,4	50S ribosomal protein L29	<i>rpmC</i>
Q5HLZ9	23636,3	50S ribosomal protein L3	<i>rplC</i>
Q5HN34	52749,7	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	<i>gatA</i>
Q5HKJ4	37509,8	Ornithine carbamoyltransferase	<i>arcB-2</i>
Q5HMB1	23013,1	Uracil phosphoribosyltransferase	<i>upp</i>
Q5HQV2	27332,8	Triosephosphate isomerase	<i>tpiA</i>

Q5HMP3	56801,1	Bifunctional AAC/APH	<i>aacA-aphD</i>
Q5HPT7	28710,2	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY	<i>codY</i>
Q5HRL5	14889,9	50S ribosomal protein L11	<i>rplK</i>
Q2FW08	10580,6	50S ribosomal protein L23 <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>rplW</i>
Q5HM25	34946,1	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	<i>rpoA</i>
Q5HM52	37081,8	Iron compound ABC transporter, iron compound-binding protein	SERP1777
Q5HRJ8	40152,4	Probable branched-chain-amino-acid aminotransferase	<i>ilvE</i>
Q5HQQ2	28182,3	FeS assembly ATPase SufC	<i>sufC</i>
Q2FW18	20235,7	50S ribosomal protein L5 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>rplE</i>
Q5HP20	20563,3	Elongation factor P	<i>efp</i>
Q5HM23	13691,5	30S ribosomal protein S13	<i>rpsM</i>
Q5HM86	44428,5	Phosphopentomutase	<i>deoB</i>
Q2FXZ9	35141,7	UPF0365 protein SAOUHSC_01676 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_01676
Q5HNNH0	18003,4	UPF0478 protein SERP1299	SERP1299
Q5HP99	23915,4	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein	SERP1014
Q5HPB5	18106,5	PTS system glucose-specific EIIA component	<i>crr</i>
Q5HQ29	11417,8	Thioredoxin	<i>trxA</i>
Q5HNNW1	9317,1	30S ribosomal protein S20	<i>rpsT</i>
Q2G1P3	67587,7	Uncharacterized protein - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_00061
Q5HNI5	23073,1	30S ribosomal protein S4	<i>rpsD</i>
Q5HKG4	111459,5	NADH: flavin oxidoreductase/fumarate reductase, flavoprotein subunit	SERP2381
Q5HNL1	46572	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>icd</i>
Q5HS59	30936,2	Aminoglycoside 3'-phosphotransferase	<i>aphA</i>
Q5HNNH3	36424,9	Catabolite control protein A	<i>ccpA</i>
Q5HRD6	36409,7	Alcohol dehydrogenase	<i>adh</i>
Q5HLF5	37629,4	Alcohol dehydrogenase	SERP2032

Q5HRU7	41818,4	Trans-sulfuration enzyme family protein	SERP0095
Q5HNP6	10292,5	50S ribosomal protein L27	<i>rpmA</i>
Q5HMB7	54691,3	ATP synthase subunit alpha	<i>atpA</i>
Q5HNM9	46348,8	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	<i>clpX</i>
Q5HLD1	32385,7	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>gtbB</i>
Q5HRX5	15101,4	UPF0355 protein SERP0066	SERP0066
Q5HPZ0	46748,2	Dihydroorotase	<i>pyrC</i>
Q5HM57	10005,1	UPF0457 protein SERP1772	SERP1772
Q5HPT8	52403,5	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	<i>hslU</i>
Q5HLW1	62027,9	Urease subunit alpha	<i>ureC</i>
Q2FWN4	57610,6	60 kDa chaperonin - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>groL</i>
Q5HKD6	55583	Probable malate: quinone oxidoreductase 3	<i>mqa3</i>
Q5HRX2	52571,3	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	<i>guaB</i>
Q5HMB8	31909,1	ATP synthase gamma chain	<i>atpG</i>
Q5HM31	16307,4	50S ribosomal protein L13	<i>rplM</i>
Q5HL32	60868,1	Acetolactate synthase, catabolic	<i>budB</i>
Q5HLF8	35357,2	Amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein	SERP2029
Q5HP93	82339,7	DD-transpeptidase	<i>pbp2</i>
Q5HQR8	15324,6	Organic hydroperoxide resistance protein-like 1	SERP0480
Q5HNL7	37067,1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	<i>gapA2</i>
Q5HLM6	24077,3	Uncharacterized lipoprotein SERP1959	SERP1959
Q5HM02	30176,5	50S ribosomal protein L2	<i>rplB</i>
Q5HL22	50046	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	SERP2165
Q5HMB0	45194,9	Serine hydroxymethyltransferase	<i>glyA</i>
Q5HND3	25661,3	Transaldolase	<i>tal</i>
Q5HKF6	44655,4	Extracellular cysteine protease ecpA	<i>ecpA</i>
Q5HRZ4	18650,9	Single-stranded DNA-binding protein	<i>ssb</i>
Q5HPV0	13311,5	50S ribosomal protein L19	<i>rplS</i>
Q5HQM1	44138,8	Type II NADH: quinone oxidoreductase	SERP0527

Q2FW10	10590,6	30S ribosomal protein S19 <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47) rpsS	<i>rpsS</i>
Q5HRP4	20154,6	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	<i>hpt</i>
Q5HRZ5	11710	30S ribosomal protein S6	<i>rpsF</i>
Q5HP42	52183,2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	<i>gnd</i>
Q5HM94	20765,2	Probable DNA-directed RNA polymerase subunit delta	<i>rpoE</i>
Q5HPK7	5924	50S ribosomal protein L33	<i>rpmG2</i>
Q5HM97	30845,6	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>fba</i>
Q5HRQ5	35297,5	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	<i>prs</i>
Q2FZH5	63161,3	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_01029
Q5HRC7	33308,6	Iron compound ABC transporter, iron compound-binding protein	SERP0266
Q5HRM8	90938,4	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC	<i>clpC</i>
Q5HQE9	19510,9	Putative phosphoesterase SERP0604	SERP0604
Q5HM22	4270,4	50S ribosomal protein L36	<i>rpmJ</i>
Q5HQP3	42695,2	Phosphoglycerate kinase	<i>pgk</i>
Q5HQ63	24070,1	UPF0637 protein SERP0693	SERP0693
Q5HNW5	24002,6	Protein GrpE	<i>grpE</i>
Q5HP27	13226	Alkaline shock protein 23	SERP1086
Q5HQ79	8711,3	DNA-directed RNA polymerase subunit epsilon	<i>rpoY</i>
Q5HL19	56299,6	Probable malate: quinone oxidoreductase 4	<i>mqa4</i>
Q5HLF6	47654,6	Amino acid ABC transporter, ATP-binding protein	SERP2031
Q2FZY5	46571,5	Probable cysteine desulfurase <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_00849
Q2FXV0	12741,6	Uncharacterized protein: <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOUHSC_01732
Q5HMP6	37136,3	Thymidylate synthase	<i>thyA1</i>
Q5HRG7	29820,9	Putative pyridoxine kinase	<i>pdxK</i>
Q5HM35	15565,7	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA	<i>lacA</i>
Q5HRQ4	24003	50S ribosomal protein L25	<i>rplY</i>

Q5HP32	17098,9	Arginine repressor	<i>argR</i>
O07325	52884,2	Cell division protein FtsA - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>ftsA</i>
Q5HQ00	24877,4	Cell-division initiation protein	SERP0757
Q5HLA3	54195,5	Putative aldehyde dehydrogenase AldA	<i>aldA</i>
Q5HQ62	30658,9	Inositol monophosphatase family protein	SERP0694
Q2FZ82	104801,7	Isoleucine--tRNA ligase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>ileS</i>
Q5HRN5	31914,2	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	<i>pdxS</i>
Q5HMP7	18431,5	Dihydrofolate reductase	<i>folA-2</i>

Tabela S3: Proteínas encontradas no sobrenadante da linhagem clínica H-295/96.

Acesso UNIPROT	Massa (Da)	Proteína	Gene
Q5HQ20	4623,4	Phenol soluble modulín beta 1	SERP0737
Q5HQ19	4618,4	Phenol soluble modulín beta 1	SERP0738
Q5HKF6	44655,4	Extracellular cysteine protease	<i>ecpA</i>
Q5HQB9	148165,2	Bifunctional autolysin	<i>atl</i>
Q5HN75	30794,4	Glutamyl endopeptidase	<i>gseA</i>
Q5HMT8	18538,4	Uncharacterized protein	SERP1540
Q5HRK4	43112,5	Elongation factor Tu	<i>tuf</i>
Q5HKM3	18741,6	Immunodominant antigen B	SERP2321
Q2FV17	33016,1	Fructose-bisphosphate aldolase class 1 <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>fda</i>
Q5HRV9	2440,4	Phenol soluble modulín alpha	SERP0083
Q2G2A3	49432,5	Dihydrolipoyl dehydrogenase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOU-HSC_01043
Q5HM20	23989,2	Adenylate kinase	<i>adk</i>
Q5HNZ5	22690,3	Superoxide dismutase [Mn/Fe]	<i>sodA</i>
Q5HQ74	46915,8	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	<i>pdhC</i>

Q2FW66	19161,7	Alkaline shock protein 23 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>asp23</i>
Q5HQ75	35253,3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	<i>pdhB</i>
Q5HNNW6	66087,7	Chaperone protein DnaK	<i>dnaK</i>
Q2G2Q0	99272,1	DNA gyrase subunit A - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	<i>gyrA</i>
Q5HRB9	14703,7	Staphylococcal accessory regulator A	<i>sarA</i>
Q5HM26	13636,4	50S ribosomal protein L17	<i>rplQ</i>
Q2G1U8	59131,8	ZinT domain-containing protein - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOU-HSC_02690

Tabela S4: Proteínas encontradas no sobrenadante da linhagem clínica H-802/93.

Acesso UNIPROT	Massa (Da)	Proteína	Gene
Q5HQ20	4623,4	Phenol soluble modulín beta 1	SERP0737
Q5HQB9	148165,2	Bifunctional autolysin	<i>atl</i>
Q5HNZ5	22690,3	Superoxide dismutase [Mn/Fe]	<i>sodA</i>
Q5HN75	30794,4	Glutamyl endopeptidase	<i>gseA</i>
Q5HKM3	18741,6	Immunodominant antigen B	SERP2321
Q5HKF6	44655,4	Extracellular cysteine protease	<i>ecpA</i>
Q2G1U8	59131,8	ZinT domain-containing protein - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325 / PS 47)	SAOU-HSC_02690
Q5HQ19	4618,4	Phenol soluble modulín beta 1	SERP0738