



NOVA
NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

NOVA MEDICAL
SCHOOL

itqb nova

KETLYN FLORA DE OLIVEIRA

Licenciada em Ciências Biomédicas Laboratoriais

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infeções de pele e tecidos moles

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA
Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021



NOVA
NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

NOVA MEDICAL
SCHOOL

itqb nova

KETLYN FLORA DE OLIVEIRA

Licenciada em Ciências Biomédicas Laboratoriais

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infeções de pele e tecidos moles

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA
Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021



NOVA
NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

NOVA MEDICAL
SCHOOL



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

itqb nova

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADOS A INFEÇÕES DE PELE E TECIDOS MOLES

KETLYN FLORA DE OLIVEIRA

Licenciada em Ciências Biomédicas Laboratoriais

Orientador: Sofia Santos Costa, Investigadora,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical - NOVA

Coorientador: Isabel Couto, Professora Associada,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical - NOVA

Júri:

Presidente: Rita Sobral
Professora Auxiliar, FCT-NOVA

Arguente: Susana Ferreira
Investigadora, Universidade da Beira Interior

Orientador: Sofia Santos Costa
Investigadora, Instituto de Higiene e Medicina Tropical - NOVA

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021

Apoio financeiro do projeto BIOSAFE, LISBOA-01-0145-FEDER-030713, PTCT/CAL-EST/30713/2017, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER)/ Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infeções de pele e tecidos moles

Copyright © Ketlyn Oliveira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Comunicações Científicas

Os resultados apresentados nesta Dissertação foram apresentados, em co-autoria, nas seguintes comunicações:

Artigo em revista com arbitragem científica

Ferreira C, Costa SS, Serrano M, **Oliveira K**, Trigueiro G, Pomba C, Couto I. Clonal lineages, antimicrobial resistance, and PVL carriage of *Staphylococcus aureus* associated to skin and soft-tissue infections from ambulatory patients in Portugal. *Antibiotics*. 2021; 10(4):345. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040345> [JIF (2021) = 4,639; citações: 2]

Poster em Congresso Científico Nacional

Oliveira K, Abrantes P, Ferreira C, Ribeiro R, Serrano M, Pomba C, Couto I, Costa SS. Virulence traits of *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infections in humans and animals. Poster ID 249. National Congress of Microbiology and Biotechnology MicroBiotec21. 23 a 26 de Novembro de 2021; Webconference.

Os resultados foram ainda submetidos para apresentação nas seguintes comunicações em Congressos Científicos Internacionais:

Andrade M*, **Oliveira K***, Morais C, Abrantes P, Pomba C, Rosato A, Couto I, Costa SS. Biofilm production and virulence potential of coagulase-positive staphylococci associated with animal pyoderma. Abstract submitted to 32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 23 a 26 de abril de 2022, Lisbon, Portugal.

Andrade M*, **Oliveira K***, Morais C, Abrantes P, Pomba C, Rosato AE, Couto I, Costa SS. Increased virulence potential of biofilm-producing coagulase-positive staphylococci associated with animal pyoderma. Abstract submitted to the 5th Annual Texas Medical Center AMR & Stewardship Conference, 19 a 21 de janeiro de 2022, Webconference.

* Estes autores contribuíram de igual modo para o trabalho.

**Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a
infecções de pele e tecidos moles**

Agradecimentos

A realização desta Dissertação só foi possível com a contribuição direta e indireta de diversas pessoas, em particular:

A minha orientadora, Doutora Sofia Santos Costa da Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por me guiar neste percurso e pela incansável orientação científica, sempre com rigor e paciência.

A minha coorientadora, Professora Doutora Isabel Couto da Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical pelo apoio e orientação.

A Professora Doutora Constança Pomba do Laboratório de Resistência aos Antibióticos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa por ter cedido as amostras utilizadas neste trabalho.

As colegas da Unidade de Microbiologia Médica, Carolina Ferreira e Rute Ribeiro pela contribuição de dados imprescindíveis para a análise dos resultados obtidos neste trabalho. A Investigadora Doutora Patrícia Abrantes pela essencial contribuição para a análise estatística. E as colegas Mariana Andrade, Catarina Morais, Marta Leal e Bárbara Ramos pelo companheirismo, partilha e ajuda durante este percurso.

A Comissão Científica do IX Mestrado em Microbiologia Médica, por todo o apoio prestado ao longo destes últimos dois anos.

Aos meus pais, Julio e Dayse, por terem me educado com tanto amor e seriedade e por terem lutado tanto por mim, acreditando e apoiando todos os meus sonhos. Amo vocês do fundo do meu coração e sou infinitamente grata por tudo.

A Leila e Paulo Cesar, a quem não poderia deixar de ser grata porque em muito contribuíram para que hoje estivesse onde estou e que comemoraram as minhas conquistas como se fossem as deles e que apesar de não poderem mais, por terem sido quem foram em vida, consigo saber o tamanho do orgulho que teriam de mim neste momento.

Aos meus primos e companheiros de casa que, seja com chás de camomila ou com palavras de apoio e consolo, sempre estiveram disponíveis para me ajudar durante este percurso. E a toda a minha tão querida e amada família.

Ao Health & Technology Research Center (H&TRC), minha segunda casa, e aos Professores Doutora Edna Ribeiro e Doutor Miguel Brito por me inspirarem ao longo da minha licenciatura e por terem me acolhido nos seus trabalhos de investigação e serem os melhores chefes e amigos, que alguém poderia ter. E as minhas companheiras de laboratório e amigas Catarina Ginete e Mariana Delgadinho pela parceria indispensável, por compartilharem os seus conhecimentos comigo quando precisei e por sempre me apoiarem e motivarem.

A Deus pela alegria contagiante, paz e motivação que me faz querer dar sempre o meu melhor e por poder ver habilidade e perfeição através da ciência.

"Some things have to be believed to be seen."

- Madeleine L'Engle

Resumo

A espécie *Staphylococcus aureus* causa infecções de pele e tecidos moles (SSTIs) em humanos e animais, apresentando vários fatores de virulência. Este trabalho teve como objetivo determinar a frequência de diversas características associadas a virulência em *S. aureus* associados a SSTIs em humanos ou animais de companhia, explorando a relação destas com fenótipos de resistência aos antibióticos como a resistência à meticilina (estirpes MRSA) e multirresistência (MDR). Avaliou-se ainda o potencial de virulência de estirpes representativas num modelo de infecção.

Estudaram-se 89 estirpes de *S. aureus* associadas a SSTIs, isoladas de humanos (n=34) ou animais de companhia (n=55). A tipagem do *agr* e rastreio dos genes *lukS-PV/lukF-PV*, que codificam a leucocidina PVL, foram realizados por PCR. A produção de biofilme foi avaliada pelo método de violeta de cristal. O potencial de virulência de estirpes representativas foi avaliado num modelo de infecção em *Galleria mellonella*.

A distribuição dos tipos de *agr* foi semelhante nas duas coleções, sendo os tipos *agrI* ou *agrII* predominantes. Os genes *lukS-PV/lukF-PV* foram detetados em 21% e 2% das estirpes de origem humana ou animal, respetivamente, estando associados às linhagens MRSA-ST8-*agrI*, e linhagens relacionadas com *S. aureus* suscetível à meticilina (MSSA) ST152-*agrI*, ST30-*agrIII* e ST121-*agrIV*. A produção de biofilme foi detetada em 64% das estirpes, sendo mais frequente em estirpes de origem animal do que humana, e associada a linhagens associadas exclusivamente a humanos (MRSA/MSSA-ST8-*agrI*), a animais (MSSA-ST398-*agrI*) ou a ambos (MRSA-ST22-*agrI*, MRSA/MSSA-ST5-*agrII*). Não se verificou relação estatística entre produção de biofilme, tipo de *agr*, presença de PVL ou fenótipos MRSA/MDR. O modelo de infecção em *Galleria mellonella* revelou que estirpes MRSA-ST22 produtoras de biofilme apresentam um potencial de virulência superior à estirpe de referência *S. aureus* RN4220.

Este estudo destaca a relevância dos biofilmes em linhagens de *S. aureus* associadas a SSTIs em humanos ou animais de companhia, muitas das quais associadas a fenótipos MRSA e/ou MDR. Foi ainda demonstrado o potencial de virulência destas estirpes, realçando a necessidade de uma abordagem Uma Só Saúde no estudo das infecções causadas por *S. aureus*.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*; virulência; leucocidina de Pantón-Valentine; *agr*; biofilmes; *Galleria mellonella*

Abstract

Staphylococcus aureus is an important agent of skin and soft-tissue infections (SSTIs) in humans and animals, harboring several virulence factors. This work aims to determine the occurrence of relevant traits associated with virulence in SSTI-related *S. aureus* isolated from humans or pets, exploring their relation with methicillin resistance (MRSA) and multidrug (MDR) phenotypes, and ultimately evaluating the virulence potential of representative strains in an infection model.

The study collection included eighty-nine *S. aureus* isolated from humans (n=34) or pets (n=55). *agr* typing and screening of PVL-encoding genes, *lukS-PV/lukF-PV* was performed by PCR. Biofilm production was evaluated by the crystal violet adhesion assay. The virulence potential of representative strains was evaluated in a *Galleria mellonella* infection model.

A similar distribution of *agr* types was observed in both collections, with *agrI* and *agrII* detected in >95% of all strains. Carriage of *lukS-PV/lukF-PV* was detected in 21% of human and 2% of animal isolates, being associated with MRSA-ST8-*agrI*, methicillin-susceptible (MSSA) lineages ST152-*agrI*, ST30-*agrIII* and ST121-*agrIV*. Overall, biofilm production was detected in 64% of the strains, yet more frequent in animals than in humans. This trait was detected in lineages associated solely with humans (MRSA/MSSA-ST8-*agrI*), animals (MSSA-ST398-*agrI*) or both (MRSA-ST22-*agrI*, MRSA/MSSA-ST5-*agrII*). Biofilm production, *agr* type, PVL carriage or antimicrobial resistance phenotype (MRSA/MDR) were not statistically associated. The *Galleria mellonella* infection model revealed that biofilm-producing MRSA-ST22 strains presented a higher virulence potential than the reference strain *S. aureus* RN4220.

This study highlights the relevance of biofilm in human and/or animal SSTI-related *S. aureus* lineages, many of which associated with MRSA and/or MDR phenotypes. The study also evidenced the virulence potential of these strains, strengthening the need for a One Health approach in the study of infections caused by *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; virulence; Panton-Valentine leucocidin; *agr*; biofilms; *Galleria mellonella*

**Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a
infecções de pele e tecidos moles**

Índice geral

Comunicações Científicas.....	i
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1 Características gerais.....	1
1.1.2 Relevância clínica em humanos e animais.....	2
1.1.3 Resistência aos antibióticos em <i>S. aureus</i>	3
1.1.4 Epidemiologia de <i>S. aureus</i> em humanos e animais.....	4
1.2 <i>S. aureus</i> e virulência.....	6
1.2.1 Sistema acessório regulador <i>agr</i>	6
1.2.2 Fatores de virulência.....	8
1.2.3 Leucocidina de Pantón-Valentine.....	9
1.3 Biofilmes.....	10
1.3.1 Produção de biofilmes por <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.3.2 Importância dos biofilmes em <i>S. aureus</i>	12
1.4 Relevância do tema e objetivo da Dissertação.....	12
2. Materiais e Métodos.....	15
2.1 Materiais.....	15
2.1.1 Coleções de estirpes em estudo.....	15
2.1.2 Estirpes de referência.....	21
2.1.3 Outro material biológico.....	21
2.1.4 Meios de cultura, soluções e enzimas.....	22
2.2 Métodos.....	23
2.2.1 Manutenção e crescimentos das estirpes bacterianas.....	23
2.2.2 Tipificação do sistema acessório regulador <i>agr</i>	23
2.2.3 Pesquisa dos genes <i>lukS-PV</i> e <i>lukF-PV</i>	24
2.2.4 Análise da capacidade de produção de biofilme pelo método de adesão em microplaca com coloração por Violeta de Cristal.....	25
2.2.5 Pesquisa dos genes <i>icaABD</i>	27
2.2.6 Modelo de infecção em <i>Galleria mellonella</i> para avaliação do potencial de virulência de <i>S. aureus</i>	28
2.3 Análise estatística.....	31

**Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a
infecções de pele e tecidos moles**

3. Resultados.....	33
3.1 Tipificação do sistema de regulação de virulência <i>agr</i>	33
3.2 Pesquisa dos genes <i>lukS-PV</i> e <i>lukF-PV</i> que codificam para a PVL	34
3.3 Análise da capacidade de produção de biofilme nas coleções em estudo.....	35
3.3.1 Otimização do método de adesão em microplaca com coloração de violeta de cristal...35	
3.3.2 Avaliação da produção de biofilme	37
3.3.3 Efeito do NaCl na avaliação de produção de biofilme	38
3.3.4 Pesquisa dos genes <i>icaABD</i>	39
3.4 Relação entre características fenotípicas e genotípicas das estirpes em estudo.....	40
3.5 Avaliação do potencial de virulência de estirpes representativas no modelo de infecção em <i>G. mellonella</i>	42
4. Discussão e Conclusões	47
4.1 Distribuição dos tipos de <i>agr</i> nas coleções em estudo.....	48
4.2 Presença dos genes <i>lukS-PV/lukF-PV</i> , que codificam para a PVL.....	50
4.3 Análise da produção de biofilme nas coleções em estudo	52
4.3.1 Otimização de condições experimentais.....	52
4.3.2 Avaliação da capacidade de produção de biofilme nas coleções em estudo	53
4.4 Modelo de infecção em <i>G. mellonella</i>	55
4.5 Conclusões	56
5. Referências.....	57
6. Anexos.....	71

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Características das estirpes de <i>S. aureus</i> de origem humana estudadas neste trabalho.	16
Tabela 2.2: Características das estirpes de <i>S. aureus</i> de origem animal estudadas neste trabalho....	18
Tabela 2.3: Estirpes de referência utilizadas como controlo ao longo do trabalho.	21
Tabela 2.4: Sequências nucleotídicas dos “primers” e tamanho esperado de cada amplicão	21
Tabela 2.5: Composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho.	22
Tabela 2.6: Composição e preparação dos enzimas e soluções utilizadas neste trabalho.....	22
Tabela 2.7: Esquema de classificação da produção de biofilmes.....	27
Tabela 2.8: Principais características genótípicas e fenotípicas das estirpes analisadas no modelo de infecção em <i>G. mellonella</i>	29
Tabela 3.1: Tempo de sobrevivência médio associado a cada curva de sobrevivência obtida nos ensaios de infecção com <i>G. mellonella</i>	44
Tabela 3.2: Análise estatística dos ensaios de virulência em <i>G. mellonella</i>	44
Tabela 3.3: Análise estatística dos ensaios de virulência em <i>G. mellonella</i>	46
Tabela 4.1: Quadro comparativo da caracterização molecular de estirpes PVL positivo em Portugal.	51
Tabela 6.1: Quadro resumo das características da coleção de <i>S. aureus</i> de origem humana	71
Tabela 6.2: Quadro resumo das características da coleção de <i>S. aureus</i> de origem animal.....	72

Lista de Figuras

Figura 1.1: Representação esquemática do sistema <i>agr</i>	7
Figura 1.2: Sequência polipeptídica e estrutura dos AIP codificados em <i>S. aureus</i>	8
Figura 2.1: Representação gráfica do operão <i>agr</i>	23
Figura 2.2: Representação gráfica do operão <i>lukS-PV/lukF-PV</i>	24
Figura 2.3: Esquema representativo da preparação das placas para o método de adesão com coloração de violeta de cristal	26
Figura 2.4: Representação gráfica do operão <i>icaADBC</i> e localização dos “primers” usados para identificações dos genes <i>icaABC</i>	27
Figura 2.5: Procedimento de inoculação de larva de <i>G. mellonella</i>	30
Figura 2.6: Larvas de <i>G. mellonella</i> mortas após inoculação com uma estirpe de <i>S. aureus</i>	30
Figura 3.1: Análise de produtos de PCR para tipificação molecular do sistema <i>agr</i>	33
Figura 3.2: Distribuição da frequência dos quatro tipos de <i>agr</i>	34
Figura 3.3: Análise de produtos de PCR para pesquisa dos genes <i>lukS-PV/lukF-PV</i>	35
Figura 3.4. Distribuição dos fenótipos de produção de biofilme das 89 estirpes de <i>S. aureus</i> em estudo obtidos no método de adesão em microplaca nas várias combinações em otimização	36
Figura 3.5. Distribuição dos fenótipos de produção de biofilme por <i>S. aureus</i> no total e por cada coleção estudada.....	38
Figura 3.6. Efeito do NaCl na categorização dos fenótipos de biofilme	38
Figura 3.7: Efeito do NaCl na capacidade de produção de biofilme	39
Figura 3.8: Análise de produtos de PCR para detecção dos genes <i>icaADB</i>	39
Figura 3.9: Distribuição das características genotípicas e fenotípicas por linhagem clonal	41
Figura 3.10: Curvas de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infetadas com estirpes de <i>S. aureus</i> associadas a SSTIs.....	43
Figura 3.11: Curvas de sobrevivência de um ensaio com <i>G. mellonella</i> infetadas com as três estirpes de <i>S. aureus</i> associadas a SSTIs.....	45

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AIP	Oligopéptido autoindutor, do inglês, "Autoinducing peptide"
ATCC	American Type Culture Collection
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina associados à comunidade, do inglês "Community-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> "
CC	Complexo clonal
CFU	Unidades formadoras de colônias, do inglês "Colony forming unit"
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês "Deoxyribonucleic acid"
DO	Densidade Óptica
DOc	Valor de corte da densidade óptica, do inglês, "Optical density cut-off value"
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina associados ao hospital, do inglês "Hospital-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> "
MDR	Multirresistência, do inglês, "Multidrug resistance"
MgCl ²	Cloreto de Magnésio
MGE	Elemento genético móvel, do inglês "Mobile genetic elements"
MLST	Multilocus sequence typing
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, do inglês "Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> "
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> suscetível à meticilina, "Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> "
o/n	Durante a noite, do inglês "Overnight"
PBP	Proteínas de ligação à penicilina, do inglês "Penicillin-binding proteins"
PCR	Reação de polimerase em cadeia, do inglês "Polymerase Chain Reaction"
PIA	Adesina Polissacarídica Intercelular, do inglês "Polysaccharide intercellular adhesin"
PSMs	Modulinas solúveis em fenol, do inglês "phenol-soluble modulins"
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine, do inglês "Panton-Valentine leukocidin"

**Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a
infecções de pele e tecidos moles**

SaPI	Ilhas de patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i> (SaPI), do inglês " <i>Staphylococcus aureus</i> pathogenicity islands"
SD	Desvio padrão, do inglês "Standard deviation"
ST	Sequência-tipo
ECDC	Centro Europeu de prevenção e controlo de doenças, do inglês European Centre for Disease Prevention and Control

Lista de unidades

pb	Pares de bases
Kb	Quilobase
µl	Microlitros
mM	Milimolar (10^{-3} mol/L)
µM	Micromolar (10^{-6} mol/L)
nm	Nanómetro



Introdução

1.1 *Staphylococcus aureus*

1.1.1 Características gerais

A espécie *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes patogênicos responsável por infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, quer em humanos ou em animais^{1,2}. *S. aureus* pertence à família *Staphylococcaceae* e ao gênero *Staphylococcus*³. As células de *S. aureus* têm um diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , sendo morfológicamente classificadas como cocos, de coloração Gram-positiva e que formam agrupamentos em cachos de uvas quando visualizadas ao microscópio⁴.

Em humanos, *S. aureus* é frequentemente encontrado na pele e membranas mucosas, como narinas e intestino, podendo também colonizar quase todas as partes do corpo⁴. É estimado que cerca de 20% da população seja colonizada de forma permanente por esta bactéria, enquanto 30% da população é colonizada apenas de forma transitória⁵. A colonização por *S. aureus* também tem sido reportada em animais, dos quais os animais de produção, como aves, porcos e gado, se destacam como grandes reservatórios^{2,6}. Animais de companhia, como cães e gatos, não são tipicamente colonizados por esta bactéria. No entanto, podem ser colonizados de forma transitória, a qual pode dever-se ao contato próximo com humanos ou outros animais colonizados por *S. aureus*^{2,7,8}.

A espécie *S. aureus* é distinguida de grande parte das espécies do gênero *Staphylococcus* pela produção de coagulase, uma enzima que converte fibrinogênio em fibrina e que promove a coagulação do sangue⁹. Esta característica é partilhada por outras espécies como *Staphylococcus pseudintermedius* ou *Staphylococcus coagulans*^{2,9}.

Para além da capacidade de colonizar o Homem e animais de companhia, *S. aureus* é ainda considerado um agente patogénico^{2,10}. Deste modo, a colonização por *S. aureus* pode atuar como um reservatório e contribuir para a dispersão e/ou futuras infeções^{2,10}. De facto, é estimado que 50 a 80% das estirpes infetantes coincidem com as estirpes colonizadoras, definindo as infeções por *S. aureus* como maioritariamente de origem endógena¹¹. Por consequência, a colonização por *S. aureus* representa um risco significativo para a saúde pública^{2,10}.

O genoma “core”, o qual inclui os genes essenciais para o metabolismo e replicação celular e alguns genes não essenciais envolvidos em funções estruturais e de virulência, representa cerca de 70% do material genético de *S. aureus*¹¹. O genoma acessório de *S. aureus*, é muito variável e específico entre linhagens clonais, sendo constituído por elementos móveis genéticos (MGEs, do inglês, *mobile genetic elements*) como ilhas de patogenicidade, bacteriófagos, cassetes cromossómicas, transposões e plasmídeos, incluindo genes associados à virulência, evasão imunitária e resistência a antibióticos¹¹.

Técnicas de sequenciação, como MLST, têm sido utilizadas extensivamente para analisar a estrutura populacional de *S. aureus*. Estudos moleculares sugerem que as estirpes de *S. aureus* variam fenotipicamente conforme a origem do hospedeiro e que alguns complexos clonais (CCs) estão associados a hospedeiros específicos, indicando uma capacidade limitada de transmissão entre hospedeiros de diferentes espécies². No entanto, mudanças na capacidade de infeção de diferentes hospedeiros podem ocorrer e estão associadas a adaptações genéticas de *S. aureus* através de mutações ou da aquisição de MGEs².

1.1.2 Relevância clínica em humanos e animais

S. aureus pode causar uma grande variedade de infeções, desde infeções de pele e tecidos moles (SSTIs) a infeções invasivas graves como a bacteriemia, endocardite e pneumonia^{9,10}. Adicionalmente, *S. aureus* é capaz de produzir uma gama diversa de toxinas e superantígenos que podem levar a diversas toxinoses como a síndrome do choque tóxico, intoxicação alimentar estafilocócica e síndrome da pele escaldada⁹⁻¹¹.

Em humanos, as SSTIs são um dos tipos de infeção mais comuns causados por *S. aureus*. Na pele, *S. aureus* pode invadir a barreira cutânea através dos folículos pilosos, causando foliculites ou infeções mais graves como o furúnculo^{9,10}. Os furúnculos podem evoluir, ocorrendo invasão progressiva dos tecidos adjacentes com danos extensivos dos mesmos, sendo esta evolução da infeção designada por carbúnculo¹². *S. aureus* também é um importante agente causador de impetigo não bolhoso ou bolhoso, sendo este último associado à toxina A estafilocócica¹². Outra infeção de pele causada por uma toxina é a síndrome da pele escaldada originada pela toxina B estafilocócica¹².

Assim como em humanos, as infeções por *S. aureus* em animais de companhia são maioritariamente de origem endógena, e, em cães, gatos, coelhos e cavalos, manifestam-se predominantemente em infeções de pele e tecidos moles, como dermatites supurativas, abscessos, pododermatites, e mastites

^{2,13}. Porém, em cães e gatos, este agente patogénico pode também causar otites externas, infecções do trato respiratório e infecções urinárias ¹³. Estudos sugerem que as estirpes que atualmente estão associadas a animais emergiram a partir de estirpes humanas, as quais sofreram posteriormente especializações que restringiram as transmissões em sentido inverso, ou seja, animal-humano ^{2,13}.

1.1.3 Resistência aos antibióticos em *S. aureus*

A descoberta do antibiótico penicilina, em 1928, e consequente introdução na prática clínica teve um grande impacto na terapêutica de infecções por *S. aureus*, reduzindo significativamente a taxa de mortalidade associada a estas infecções ^{6,14,15}. No entanto, no início da década de 1940, foram reportados os primeiros casos de resistência à penicilina mediada pelo gene *blaZ*, que codifica para a enzima beta-lactamase BlaZ, capaz de hidrolisar o anel beta-lactâmico da penicilina ¹⁶. A progressiva disseminação de estirpes resistentes à penicilina impulsionou o desenvolvimento de novos fármacos ¹¹. Em 1959, a primeira penicilina semissintética resistente à ação de beta-lactamases, denominada metilina, foi introduzida na prática clínica. No entanto, aproximadamente um ano após a sua introdução na terapêutica, foram registados os primeiros relatos de estirpes resistentes à metilina, sendo estas estirpes designadas por *S. aureus* resistente à metilina (MRSA, do inglês, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) ⁶. Nas décadas seguintes, o registo de estirpes MRSA foi aumentando em ambiente hospitalar e, de seguida, na comunidade. Atualmente, as estirpes MRSA são um dos principais agentes patogénicos nosocomiais em todo o Mundo. Na Europa, dados do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) que reportam ao ano 2020, indicam que apesar de se verificar uma progressiva diminuição da frequência de infecções nosocomiais invasivas por MRSA, estas ainda ocorrem com taxas superior a 25% em sete dos vinte e nove países europeus com dados reportados, sendo Portugal um destes países com uma frequência de 29.7% ¹⁷.

A resistência à metilina é caracterizada pela produção de uma proteína de ligação à penicilina (PBP, do inglês, *penicillin-binding proteins*) adicional, denominada PBP2a, com baixa afinidade para as penicilinas ⁶. As enzimas PBP são responsáveis pela transglicosilação e transpeptidação do peptidoglicano da parede celular bacteriana, sendo o alvo dos antibióticos beta-lactâmicos ¹⁶. A enzima PBP2a, presente nas estirpes MRSA, é codificada pelo gene *mecA*, localizado no MGE *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), o qual pode apresentar um tamanho entre 20 a 65 Kb ^{6,11}. As estirpes MRSA são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de 5ª geração ceftarolina e ceftobiprole ⁶. As infecções por MRSA apresentam assim uma dificuldade acrescida ao tratamento, devido à escassez de alternativas terapêuticas e, a estas alternativas serem, geralmente, menos eficazes ou apresentarem mais efeitos secundários. Assim, estas infecções estão associadas a uma maior taxa de morbilidade e mortalidade ^{1,18}.

A vancomicina, um antibiótico da classe dos glicopéptidos, é atualmente a primeira linha de tratamento contra infecções causadas por MRSA ^{11,19,20}. Este antibiótico liga-se ao dipéptido D-Ala-D-Ala do lípido II precursor do peptidoglicano, impedindo a transglicosilação e transpeptidação catalisada pela PBP2

e PBP2a, e por conseguinte a biossíntese da parede celular¹⁶. Até ao momento foram descritos dois tipos de mecanismos de resistência à vancomicina. As estirpes de *S. aureus* com resistência intermédia à vancomicina (VISA) surgem, geralmente, após antibioterapia prolongada, durante a qual a pressão seletiva exercida pela vancomicina seleciona estirpes com múltiplas mutações cromossómicas, como mutações nos operões *vraRS*, *graRS*, *walkR* e no gene *rpoB*²¹. Por outro lado, as estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), apresentam o operão *vanA*, geralmente adquirido após transferência genética horizontal de um plasmídeo de *Enterococcus faecalis*¹¹. Os genes *van* codificam enzimas que afetam a biossíntese dos precursores do peptidoglicano, dando origem a dipéptidos D-Ala-D-Lac, para os quais a vancomicina tem menor afinidade¹⁶.

A resistência aos antibióticos em *S. aureus* não se limita à classe dos beta-lactâmicos e glicopéptidos. Nas últimas décadas, diversos outros antibióticos foram introduzidos na prática clínica, promovendo a emergência de estirpes resistentes, especialmente em ambiente hospitalar. Entre estes antibióticos contam-se as tetraciclina, os macrólidos, as lincosamidas, as fluoroquinolonas e o trimetoprim. Os mecanismos de resistência a estes e outros antibióticos são variados, incluindo a inativação ou modificação enzimática do antibiótico (resistência aos beta-lactâmicos, cloranfenicol e aminoglicosídeos), modificação do alvo do antibiótico (resistência às tetraciclina, macrólidos e fluoroquinolonas) e efluxo (resistência às tetraciclina e fluoroquinolonas)¹⁶.

Uma das forças motrizes da emergência e disseminação da resistência aos antibióticos é o seu uso indiscriminado na medicina humana e veterinária, assim como na comunidade e em várias indústrias como a agropecuária^{22,23}. Assim, a resistência aos antibióticos não é só observada em estirpes de origem humana, mas também animal, havendo partilha de muitos genes de resistência entre estes hospedeiros, sendo poucos aqueles que são encontrados exclusivamente em animais de companhia ou em humanos^{24,25}. A resistência à metilina tem-se tornado um problema de grande importância em animais de companhia, como cães, gatos e cavalos, sendo registada uma elevada prevalência de MRSA nestas espécies^{8,26}. A frequência crescente de infeções causadas por estirpes resistentes aos antibióticos utilizados na clínica, quer em humanos quer em animais, representa um dos maiores desafios de Saúde da atualidade.

1.1.4 Epidemiologia de *S. aureus* em humanos e animais

A espécie *S. aureus* apresenta uma estrutura populacional clonal, com algumas linhagens clonais predominantes em diferentes nichos ambientais e regiões geográficas²⁷. Desde a emergência das estirpes MRSA, até aproximadamente 1990, estas estirpes estavam principalmente limitadas ao ambiente hospitalar. Contudo, nos anos posteriores, observou-se o aparecimento de estirpes MRSA na comunidade, as quais apresentavam características genotípicas e fenotípicas distintas das primeiras^{6,11,28}. Deste modo, as estirpes MRSA foram diferenciadas em MRSA associadas a ambiente hospitalar (HA-MRSA, do inglês, *hospital-acquired MRSA*) e MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA, do inglês, *community acquired MRSA*)¹¹. As estirpes HA-MRSA estão maioritariamente associadas a

infecções invasivas, enquanto as estirpes CA-MRSA são principalmente associadas a infecções de pele e tecidos moles ¹¹. Adicionalmente, em oposição às estirpes HA-MRSA, as estirpes CA-MRSA apresentam uma menor frequência de resistência a antibióticos não beta-lactâmicos e, são geralmente caracterizadas pela sua associação à presença de genes que codificam para a leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) ¹¹.

No entanto, nas últimas duas décadas, a disseminação bidirecional das estirpes MRSA entre o ambiente hospitalar e a comunidade levou a uma partilha de estirpes entre os dois nichos ambientais e ao desvanecimento das diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA²⁹⁻³¹. Em particular, alguns clones importantes de CA-MRSA, como ST8 (USA300) nos EUA, tem invadido gradualmente o ambiente hospitalar ^{6,32}; enquanto clones HA-MRSA importantes, como ST22, têm-se tornado predominantes em infecções na comunidade em Portugal e noutros países europeus ³³⁻³⁵. Atualmente, estudos epidemiológicos recentes demonstram que as estirpes HA-MRSA que circulam a nível global pertencem predominantemente aos complexos clonais CC5, CC8, CC22 e CC88 ³⁶. Em Portugal e noutros países europeus, os clones HA-MRSA pertencem predominantemente às linhagens ST5(CC5), ST22(CC22) e ST8(CC8) ^{33,37-39}. Relativamente às estirpes CA-MRSA, as estirpes predominantes a nível mundial pertencem aos CC8, CC30, CC80, CC59 ou CC93 ³⁶, sendo o complexo clonal CC80 predominante na Europa ⁴⁰.

Por sua vez, as estirpes MSSA apresentam uma maior diversidade clonal ⁴¹. Na Europa, as estirpes MSSA de maior prevalência pertencem aos clones ST8, ST30, ST1, ST121, ST25, ST7, ST15, sendo a ST15, ST121 e ST30 as linhagens mais importantes ⁴².

Em animais de companhia, *S. aureus* é maioritariamente um colonizador transiente da pele. Devido ao contacto próximo entre estes animais e humanos, tem sido observada uma partilha de estirpes entre estes hospedeiros ³⁶. Assim, os clones predominantes em cães e gatos, como CC22 e CC5, refletem os mais frequentemente encontrados em humanos ^{36,43,44}. Em coelhos, as infecções crónicas por *S. aureus* são causadas maioritariamente pela linhagem ST121 ², a qual foi sugerida ter emergido em coelhos após um salto humano-coelho relacionado a uma mutação no gene *dltB*, que codifica para uma proteína integral de membrana com função de D-alanização dos ácidos teicóicos, processo importante na resistência a péptidos catiónicos e na virulência ⁴⁵.

Já em animais de produção, a linhagem clonal CC398 é predominante na Europa ². Tem sido sugerido que estirpes MRSA-ST398 emergiram em porcos e rapidamente se disseminaram globalmente e por diferentes espécies de hospedeiros como roedores, aves de criação, cavalos, animais de companhia e também humanos ^{2,13,46}.

1.2 *S. aureus* e virulência

1.2.1 Sistema acessório regulador *agr*

O *locus agr* foi descrito inicialmente como um elemento de regulação da expressão de proteínas extracelulares associadas à virulência ^{47,48}. Desde então, tem sido demonstrado que este sistema controla a expressão diferenciada de mais de 70 genes, grande parte dos quais envolvidos na virulência, como a PVL, alfa-toxina e modulinas solúveis em fenol (PSMs, do inglês “phenol-soluble modulins”) ⁴⁹. O sistema *agr* é um sistema *quorum sensing*, ou seja, a regulação da expressão génica ocorre através da comunicação célula-célula e é dependente da densidade celular ⁵⁰. Em *S. aureus*, o sistema *agr* é responsável pelo equilíbrio entre a expressão de fatores de virulência nas fases de colonização e invasão, tendo sido sugerido que a ativação deste sistema implica a passagem de *S. aureus* de uma fase comensal, envolvida na adesão e colonização, para uma fase invasiva de carácter patogénico ⁵⁰. Neste sentido, numa fase inicial de baixa densidade celular e baixa expressão de *agr*, para promoção da colonização dos tecidos por parte de *S. aureus* são expressas adesinas e outros componentes de superfície. Após esta fase, o consequente aumento da densidade celular induz a expressão de *agr*, que por sua vez causa a repressão da expressão das adesinas e a indução da expressão de toxinas e proteases extracelulares que promovem a degradação e consequente invasão dos tecidos ^{51,52}.

A ativação da expressão de *agr* sucede por resposta à densidade bacteriana, recorrendo a uma via de sinalização que é ativada por um oligopéptido autoindutor (AIP) (Figura 1.1) ⁵³⁻⁵⁵. O *locus agr* engloba duas unidades transcricionais divergentes, RNAII e RNAIII, cada uma sob controlo dos promotores P2 e P3, respetivamente (Figura 1.1) ^{47,56}. O operão RNAII contém quatro genes, designados por *agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA* ⁵⁷.

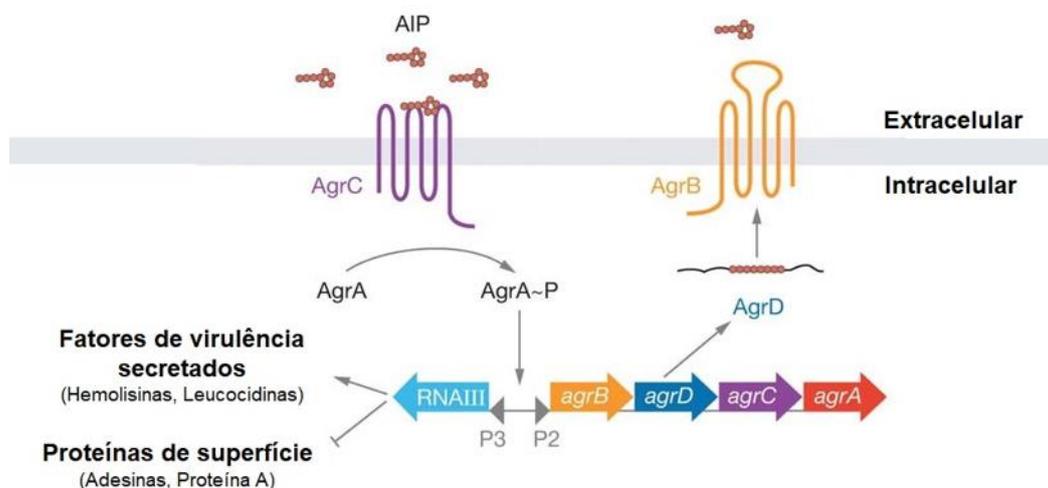


Figura 1.1: Representação esquemática do sistema *agr*, a sua via de ativação e fatores de virulência por si regulados. Adaptado de (54).

O gene *agrD* codifica para um precursor de AIP (AgrD), o qual é modificado por adição de um anel tio-lactona e por proteólise na região C-terminal e excretado pela endopeptidase transmembranar AgrB, produto de *agrB*^{54,58,59}. Uma vez excretado, o AIP sofre ainda proteólise na região N-terminal pela peptidase SspB⁶⁰, sendo posteriormente reconhecido pela cinase membrana AgrC, produto de *agrC*, à qual se liga induzindo a auto-fosforilação de AgrC num resíduo de histidina^{55,61}. A forma fosforilada de AgrC é reconhecida pela proteína reguladora de resposta específica AgrA, codificada por *agrA*, induzindo a sua ativação por fosforilação^{54,62,63}. A proteína AgrA fosforilada liga-se aos promotores P2 e P3, induzindo a expressão de RNAIII⁶⁴, um RNA regulador responsável pela repressão de adesinas de superfície e indução de toxinas, como a α -hemolisina e a PVL, entre outras, e proteases, assim como do operão RNAII, aumentando a produção de AIP^{54,62}. AgrA também regula, de forma direta, a expressão de PSMs, as quais têm uma ação lítica sobre neutrófilos e outras células do hospedeiro⁶³. Vários estudos têm apontado para um papel regulador de *agr* sobre biofilmes. Por exemplo, foi demonstrado um aumento de produção de biofilme em estirpes de *S. aureus* mutantes para o locus *agr*⁶⁵, assim como uma menor propensão para a entrada na fase de dispersão do biofilme⁶⁶. A passagem das células de um estado planctônico para um estado de vida em biofilme só ocorre se o sistema *agr* ou as enzimas envolvidas neste sistema forem inativados ou inibidos⁶⁷. Quando o sistema é inativado, a célula tem maior capacidade de aderir a superfícies e formar biofilmes e a produção de fatores de virulência, como toxinas, passam a ser produzidas a baixos níveis⁶⁷.

A análise da sequência nucleotídica do locus *agr*, demonstrou a existência de variações nas sequências de *agrB*, *agrC* e *agrD*, que originam a produção de AIPs distintos⁶⁸. Existem quatro grupos (tipos) de *agr* (*agrI*, *agrII*, *agrIII*, *agrIV*)⁵³, classificados de acordo com o anel tio-lactona do AIP que possuem (Figura 1.2)⁵⁴.

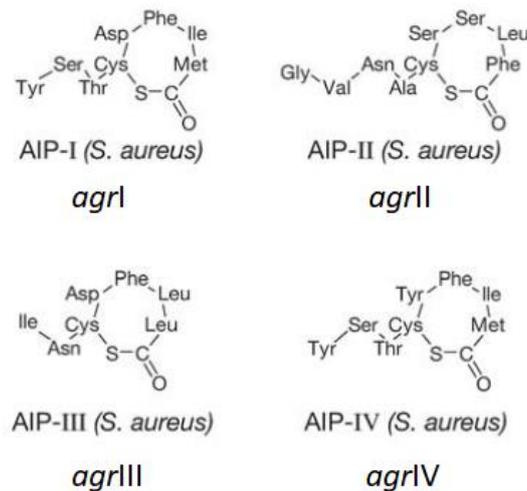


Figura 1.2: Sequência polipeptídica e estrutura dos AIP codificados em *S. aureus* por cada tipo de sistema *agr*. Adaptado de (54).

Estes AIPs apresentam diferentes especificidades de sinal, o que se traduz numa auto-ativação e inibição cruzada entre AIPs de grupos *agr* distintos, designada de “interferência bacteriana”^{50,69}. Além do AIP, o *agr* pode ser ativado por reguladores globais como SarA⁷⁰, SrrAB⁷¹ e condições ambientais como a concentração de glucose ou o pH⁷². Estudos indicam que as variantes de *agr*/AIPs não estão diretamente relacionados com a iniciação ou gravidade da infecção, mas sim com a divisão evolucionária da espécie⁵³. Assim como a formação de biofilmes parece ser uma capacidade geral da espécie, sendo possível na presença dos vários tipos de *agr*⁶⁷.

1.2.2 Fatores de virulência de *S. aureus*

S. aureus tem um genoma mais complexo que outros estafilococos não patogênicos e os seus fatores de virulência são, em grande parte, codificados em MGEs, como ilhas de patogenicidade, plasmídeos, transposões, seqüências de inserção e fagos⁷³. As ilhas de patogenicidade (SaPI) de *S. aureus* contêm aproximadamente entre 14 e 17 Kb e geralmente são constituídas por dois ou mais genes que codificam superantigénios^{11,74}, como a toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) e enterotoxinas B e C associadas ao choque tóxico e a intoxicações alimentares⁷⁴. As SaPI são mobilizadas com elevada frequência e integradas através de bacteriófagos no cromossoma de *S. aureus*¹¹. Quanto às ilhas genómicas, existem três famílias descritas em *S. aureus*, vSA α , vSA β and vSA γ ⁷⁴⁻⁷⁶, contendo *clusters* de genes que codificam para toxinas importantes como a leucocidina LukDE e diversas enterotoxinas^{11,73}. Outras toxinas importantes, como a PVL, proteínas de evasão imunitária CHIPS e SCIN, toxinas exfoliativas A e B, estafilocinase e diversas outras enterotoxinas encontram-se codificadas em bacteriófagos. Apesar da maior parte dos genes envolvidos na virulência de *S. aureus* ser encontrada

no genoma acessório, alguns fatores de virulência importantes como as PSMs e a alfa-hemolisina são codificados no genoma *core*. As PSMs são péptidos com atividade citotóxica e pro-inflamatória e que atuam sobre os biofilmes permitindo a sua dispersão^{77,78}, enquanto a alfa-hemolisina (Hla) apresenta efeito citotóxico sob uma grande variedade de células do hospedeiro⁷⁹.

A presença desses genes não é o único determinante de virulência em *S. aureus*, mutações no genoma *core*, assim como a expressão diferencial regulada por componentes de regulação como o sistema *agr* têm um papel crucial na expressão destes genes¹¹. Em particular, o sistema de regulação *agr* regula positivamente fatores de virulência secretados, como proteínas extracelulares, lipases, PSMs e toxinas de choque tóxico, e regula negativamente proteínas associadas à adesão celular,^{80,81}.

1.2.3 Leucocidina de Pantón-Valentine

A atividade leucocitotóxica de uma bactéria permite que ela sobreviva na fase inicial de uma infecção. A PVL, foi descrita em 1894 por Van de Velde, sendo associada com SSTIs, pela primeira vez, em 1932 por Pantón e Valentine⁸². De um modo geral, a PVL encontra-se associada a infecções causadas por CA-MRSA, nomeadamente SSTIs e pneumonia necrotizante, podendo, no entanto, ser também encontrada em estirpes MSSA^{83,84}. Esta proteína é uma leucotoxina composta por duas subunidades designadas de *LukS-PV* e *LukF-PV*⁸⁵. Esta toxina causa a lise de neutrófilos e, em menor extensão, de monócitos e macrófagos, através da formação de poros na membrana celular^{6,86}. A lise dos neutrófilos é mediada pela ligação de PVL aos recetores do complemento C5aR⁸⁷, causando a libertação de moléculas pró-inflamatórias, como a interleucina IL-6 e o fator de necrose tumoral α ⁸⁸. Deste modo, a PVL apresenta não só efeitos tóxicos como também imunomodulatórios.

A capacidade de uma estirpe expressar PVL depende da presença do operão *luk-PV*, que contém os genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, o qual se pode encontrar integrado no cromossoma do *S. aureus* através de bacteriófagos^{6,89}. Até ao momento, foram caracterizados, pelo menos, dez bacteriófagos da família *Siphoviridae*, contendo o operão *luk-PV*^{89,90}. Esta localização facilita a transferência horizontal do operão *luk-PV* entre *S. aureus*.

Diversos estudos epidemiológicos e dados oriundos de estudos em modelos de infeção animal suportam a associação da PVL a SSTIs adquiridas na comunidade, como doenças de pele purulentas e necrose de tecido subcutâneo^{6,89}. Para além destas infeções, tem sido também reportada uma relação entre a presença de PVL e infeções mais severas, como a artrite séptica e a pneumonia necrotizante⁸⁵. No entanto, a função desta toxina no processo de infeção é ainda controversa.

A atividade de PVL é específica de espécie hospedeira, promovendo a lise de leucócitos humanos e de coelho, mas não de ratinho ou primatas⁹¹. Esta especificidade pode justificar a contradição observada entre estudos que incidiram sobre a atividade da PVL em diferentes modelos animais. Assim, modelos murinos ou de primatas podem não ser os ideais para avaliar a função da PVL uma vez que os seus neutrófilos parecem ser resistentes à ação da PVL^{89,92,93}. De facto, estudos realizados

em modelos murinos reportaram uma ausência de relação entre a presença de PVL e severidade de infecção da pele ou pulmonar ^{94,95}.

Por outro lado, estudos realizados em modelos de infecções de pele em coelhos como o de Lipinska *et al.* mostraram que num modelo genético consistindo em estirpe selvagem e mutante isogénico “knock-out” para o operão *luk-PV*, a ausência de PVL traduz-se em lesões de pele de menor dimensão e menor nível de necrose ⁹⁶. Também num modelo de infecção de pele em coelhos, um estudo similar por Kobayashi *et al.*, contrariamente ao descrito anteriormente, não encontrou associação entre a presença de PVL e a severidade da infecção, apesar da densidade bacteriana associada a abscessos em coelhos infetados com a estirpe selvagem PVL-positivo ser significativamente superior à do mutante isogénico “knock-out” para *luk-PV*⁹⁷.

Outros estudos em modelos de infecção em coelho evidenciaram um potencial papel da PVL nos primeiros estágios de bacteriemia ⁹⁸ ou na severidade de pneumonia necrotizante ⁹⁹.

1.3 Biofilmes

1.3.1 Produção de biofilmes por *Staphylococcus aureus*

Os biofilmes são definidos como uma comunidade microbiana funcional aderida a uma superfície, biótica ou abiótica, e envolta por uma matriz produzida pelas próprias células ¹⁰⁰. A comunidade de microrganismos que vive num biofilme pode ser composta por uma única espécie, porém frequentemente apresenta uma grande diversidade espécies bacterianas e por vezes fúngicas ¹⁰¹. A formação de biofilmes num processo de infecção pode representar um agravamento muito significativo da doença, estando geralmente associada a infecções crónicas de difícil tratamento ¹⁰². É estimado que 90% das feridas crónicas contenham fungos e bactérias em biofilmes ¹⁰³. Uma das principais vantagens da vida em biofilme é a evasão ao sistema imune do hospedeiro, uma maior resistência a compostos antimicrobianos, incluindo antibióticos, que pode ser parcialmente explicada pela baixa penetração do agente na matriz do biofilme ¹⁰⁴, pela redução da taxa de crescimento e do metabolismo das células, assim como a aquisição de genes exógenos ^{104,105}

Através de microscopia eletrónica foi possível caracterizar a estrutura dos biofilmes como maioritariamente compostos por uma substância polimérica extracelular que liga as bactérias à superfície e entre si ¹⁰⁶. Esta matriz é constituída por uma mistura de polissacáridos, proteínas e ácidos nucleicos e organizada em estruturas tridimensionais atravessadas por canais que permitem a passagem de água, nutrientes e a remoção de substâncias metabólicas tóxicas ^{102,107}.

As células agregadas em biofilmes estão expostas a elevada osmolaridade, limitação de oxigénio e elevada densidade celular, fatores que influenciam a expressão génica em *S. aureus* ¹⁰⁵. Becker *et al.*

identificaram, num estudo para caracterizar diferenças na expressão de genes em *S. aureus* em populações planctônicas e em biofilmes, a sobre-expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na glicólise e fermentação e proteínas de estresse que podem ser consequência da privação de nutrientes e da limitação de oxigênio nas camadas mais baixas do biofilme ¹⁰⁴.

A formação do biofilme pode ser dividida em quatro fases: adesão a uma superfície biótica ou abiótica, acumulação, maturação e dispersão ¹⁰⁵. A formação do biofilme é iniciada com a fixação de uma bactéria inicialmente planctônica a uma superfície ¹⁰⁸. Esta adesão, num tecido ou dispositivo médico, é regulada por uma grande variedade de genes e mediada por diferentes tipos de proteínas designadas de Componentes da Superfície Microbiana que Reconhecem Moléculas Adesivas da Matriz (MSCRAMMs, do inglês “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”) ¹⁰⁹. Para além das adesinas, outras proteínas como as autolisinas AtlA e AtlE, promovem a ligação a superfícies hidrofóbicas, e os ácidos teicóicos na parede celular, apresentam igualmente um papel importante na aderência das bactérias às células do hospedeiro¹¹⁰.

Durante as fases de acumulação e maturação, as células individualmente entram numa fase de adesão irreversível e passam a produzir a matriz do biofilme ¹¹¹. A Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA, do inglês *polysaccharide intercellular adhesin*), também designada de PNAG uma vez que é constituída por um polissacarídeo N-acetil-D-glicosamina, é uma adesina importante na formação do biofilme ¹¹¹. A formação desta proteína depende do operão *icaABD* ¹¹². Este operão codifica três proteínas de membrana (IcaA, IcaD e IcaC) com atividade enzimática, e uma proteína extracelular (IcaB) ^{113,114}, e parece ser regulado por fatores importantes como IcaR, fator sigma, e sistemas de regulação como o *agr* e *sarA* ^{105,115}. Os mecanismos de regulação da formação de biofilme variam não apenas entre espécies como entre estirpes da mesma espécie ¹¹⁵.

A frequência deste operão não está bem definida entre as estirpes de *S. aureus*; embora alguns estudos tenham identificado o operão em todas as estirpes estudadas ^{116,117}, outros estudos indicam uma menor incidência ^{118,119}. Embora PIA tenha um papel importante na produção de biofilmes, algumas estirpes de *S. aureus* têm a capacidade de produzir biofilme de forma independente de *ica* “*in vivo*” e “*in vitro*” ¹⁰⁵. Uma via importante de regulação da formação de biofilmes independente de *ica* parece ser mediada pelo gene *rbf* (regulador da formação de biofilme, do inglês, “regulator of biofilm formation”) ¹²⁰. A produção de biofilme através desta via pode ser induzida pela presença de NaCl e glucose, porém não de etanol ¹²⁰. Contrariamente ao que acontece na regulação por *rbf*, a indução da transcrição de *ica* através da inibição de *icaR* (importante regulador do operão *icaABD*), acontece na presença de etanol, porém não de glucose e NaCl ¹²¹. Tal como mencionado anteriormente no ponto 1.2.1, o sistema de regulação *agr* tem um papel importante na dispersão das células do biofilme para o meio ambiente ¹¹².

1.3.2 Importância dos biofilmes em *S. aureus*

Os biofilmes podem ser definidos como um mecanismo de autodefesa, ao dificultarem a penetração de moléculas tóxicas, como antibióticos, na matriz extracelular e ao permitirem que as bactérias resistam à fagocitose por células do sistema imunitário do hospedeiro e às forças físicas do ambiente onde se encontram. Para além, disso, os biofilmes criam um ambiente favorável à troca genética intra- ou inter-espécies ¹⁰².

A formação de biofilme é essencial na patogénese de diversas infeções e tem sido associado a infeções crónicas de difícil tratamento e infeções relacionadas a dispositivos médicos como cateteres vasculares e urinários, próteses, tubos endotraqueais, lentes de contato, entre outros ^{122,123}. A formação de biofilmes pode ocorrer em qualquer tecido envolvendo complicações no tratamento de uma grande variedade de infeções, desde infeções no sistema respiratório inferior e superior, urinário e digestivo, a feridas, endocardites e osteomielites ^{122,123}. A presença de biofilme em infeções de pele tem sido demonstrada em diversos estudos como principal causa da ineficiência de tratamentos ^{124–127}. *S. aureus* geralmente produz biofilmes em tecidos danificados como dermatites, impetigo e feridas o que pode tornar estas infeções difíceis de erradicar através do tratamento com antibióticos ^{128,129}.

1.4 Relevância do tema e objetivo da Dissertação

A espécie *S. aureus* é um dos agentes patogénicos bacterianos associados a SSTIs mais relevantes em humanos e em animais de companhia. Estas infeções estão frequentemente associadas a falha terapêutica e a um caráter crónico, o que pode levar a uma maior taxa de morbidade e/ou mortalidade. Um dos fatores subjacente à cronicidade destas infeções prende-se com o potencial de virulência da estirpe de *S. aureus* infetante.

S. aureus tem ao seu dispor um variado leque de fatores de virulência que suportam a sua capacidade de invasão e de sobrevivência no hospedeiro, muitos dos quais regulados pelo sistema *agr*. Entre estes fatores, a leucocidina PVL é frequentemente relacionada com infeções SSTI. Outro fator de grande relevância para o potencial de cronicidade e de falha terapêutica de SSTIs é a capacidade de produção de biofilmes por esta espécie.

O trabalho desenvolvido nesta Dissertação tem como objetivos a determinação da frequência de ocorrência de PVL e da produção de biofilmes por estirpes de *S. aureus* associadas a SSTIs em humanos e animais de companhia e a associação destes fatores com um maior potencial de virulência destas estirpes.

Pretende-se neste trabalho (i) identificar os tipos de *agr* das estirpes em estudo; (ii) determinar a frequência dos genes *lukS-PV/lukF-PV*, que codificam para a PVL; (iii) caracterizar a capacidade de produção de biofilme das estirpes em estudo; (iv) determinar a ocorrência dos genes *icaADB*; (v) estabelecer associações entre estas características fenotípicas e genotípicas com os perfis de

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

resistência das estirpes e as suas linhagens clonais, previamente estabelecidos. Por fim, pretende-se ainda avaliar o potencial de virulência de estirpes representativas de características de interesse (por exemplo, produção de biofilme, linhagem clonal) num modelo de infeção de *Galleria mellonella*.

É esperado que os resultados gerados neste trabalho contribuam para um melhor conhecimento do arsenal de virulência de *S. aureus* associados a SSTIs em humanos e animais de companhia em Portugal, numa perspetiva Uma Só Saúde.

2

Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Coleções de estirpes em estudo

Este trabalho incidiu em duas coleções de *Staphylococcus aureus*, num total de 89 estirpes, recolhidas de infecções de pele e tecidos moles em humanos ou animais. Ambas as coleções foram cedidas pela Professora Doutora Constança Pomba da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV/UL) no âmbito do Projeto BIOSAFE (Ref. LISBOA-01-0145-FEDER-030713, PTDC/CAL-EST/30713/2017).

A coleção de origem humana engloba 34 estirpes recolhidas num laboratório de diagnóstico na comunidade, em Lisboa, entre Fevereiro e Junho de 2014. A coleção de origem animal inclui 55 estirpes obtidas pelo Laboratório de Resistência aos Antibióticos da FMV/UL, entre 1999 e 2018, e por um laboratório privado de diagnóstico veterinário, em Lisboa, de 2017 a 2018. Esta coleção inclui 29 estirpes recolhidas de cães, 19 de gatos, cinco de coelhos, uma de cavalo e ainda uma estirpe de origem desconhecida. A origem do material biológico e ano de colheita das estirpes de origem humana e veterinária estão descritas nas Tabela 2.1 e Tabela 2.2, respetivamente.

Ambas as coleções foram previamente caracterizadas relativamente ao perfil de suscetibilidade a compostos antimicrobianos e às linhagens clonais (Tabela 2.1 e Tabela 2.2)¹³⁰⁻¹³².

A coleção de origem humana é constituída por estirpes maioritariamente pertencentes às linhagens clonais ST5 (20,6%), ST22 (14,7%) e ST8 (14,7%). Relativamente ao perfil de resistência, 44,1% (15/34) das estirpes apresentam um fenótipo MDR e 44,1% (15/34) são MRSA, das quais 12 apresentam simultaneamente fenótipo MDR¹³⁰.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

Tabela 2.1: Características das estirpes de *S. aureus* de origem humana estudadas neste trabalho.

Estirpe	Material biológico	Mês da Colheita	Perfil de resistência¹³³	Linhagem clonal ST (CC)¹³²
BIOS-H1	Exsudado de úlcera	Março 2014	MSSA não-MDR	72 (8)
BIOS-H2 (a)	Pus da perna direita	Março 2014	MSSA não-MDR	152 (152)
BIOS-H3 (a)	Pus da perna esquerda	Março 2014	MSSA não-MDR	152 (152)
BIOS-H4 (b)	Exsudado de ferida da perna esquerda	Abril 2014	MSSA MDR	25 (25)
BIOS-H5 (c)	Axila direita	Fevereiro 2014	MRSA não-MDR	8 (8)
BIOS-H6 (c)	Axila esquerda	Fevereiro 2014	MRSA não-MDR	8 (8)
BIOS-H7	Exsudado de ferida	Mai 2014	MSSA MDR	105 (5)
BIOS-H8	Exsudado de joelho	Mai 2014	MRSA MDR	105 (5)
BIOS-H9	Exsudado de úlcera	Abril 2014	MSSA MDR	6531(5)
BIOS-H10	Exsudado da perna	Junho 2014	MRSA MDR	105 (5)
BIOS-H11	Exsudado da perna	Fevereiro 2014	MSSA MDR	105 (5)
BIOS-H12	Exsudado de ferida do joelho	Mai 2014	MSSA não-MDR	278 (45)
BIOS-H13	Exsudado de ferida da perna	Fevereiro 2014	MRSA não-MDR	8 (8)
BIOS-H14	Axila esquerda	Junho 2014	MRSA MDR	8 (8)
BIOS-H16	Pus da perna	Março 2014	MRSA MDR	22 (22)
BIOS-H17 (d)	Orelha	Junho 2014	MSSA não-MDR	7 (7)
BIOS-H18 (d)	Anca	Junho 2014	MSSA não-MDR	7 (7)
BIOS-H19	Exsudado de tíbia	Março 2014	MRSA MDR	105 (5)
BIOS-H20	Ferida da perna direita	Junho 2014	MSSA não-MDR	15 (15)
BIOS-H21	Ferida do pé esquerdo	Junho 2014	MSSA não-MDR	8 (8)
BIOS-H22	Exsudado de ferida	Abril 2014	MSSA não-MDR	105 (5)

a - e: isolados do mesmo indivíduo; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

Tabela 2.1. Continuação.

Estirpe	Material biológico	Mês da Colheita	Perfil de resistência	Linhagem clonal ST (CC)
BIOS-H23	Exsudado de joelho	Março 2014	MRSA MDR	105 (5)
BIOS-H24 ^(b)	Exsudado de ferida da perna direita	Abril 2014	MSSA não-MDR	25 (25)
BIOS-H25	Exsudado de ferida	Abril 2014	MSSA não-MDR	6564
BIOS-H26 ^(e)	Exsudado de escara	Abril 2014	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-H27 ^(e)	Exsudado de escara	Abril 2014	MRSA MDR	22 (22)
BIOS-H28	Exsudado de úlcera	Março 2014	MSSA não-MDR	5 (5)
BIOS-H29	Exsudado de ferida do pé	Mai 2014	MSSA não-MDR	15 (15)
BIOS-H30	Exsudado de ferida	Junho 2014	MSSA não-MDR	97 (97)
BIOS-H31	Exsudado de dedo do pé	Mai 2014	MRSA MDR	22 (22)
BIOS-H32	Exsudado de pé	Mai 2014	MSSA não-MDR	30 (30)
BIOS-H33	Ferida da perna	Fevereiro 2014	MRSA MDR	5 (5)
BIOS-H34	Exsudado de ferida	Abril 2014	MRSA MDR	22 (22)
BIOS-H35	Exsudado de unha	Abril 2014	MRSA MDR	5 (5)

a - e: isolados do mesmo indivíduo; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal.

A coleção de origem animal é constituída maioritariamente por estirpes pertencentes às linhagens clonais ST22 (45,5%), ST5 (12,7%) e ST398 (9,1%). A frequência de estirpes MDR é de 9,0% (8/89), enquanto a frequência de estirpes MRSA é de 34,8% (31/89), cinco das quais apresentando simultaneamente um fenótipo MDR ¹³¹.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

Tabela 1.2: Características das estirpes de *S. aureus* de origem animal estudadas neste trabalho.

Estirpe	Material biológico	Hospedeiro	Ano da Colheita	Perfil de resistência ¹³¹	Linhagem clonal ST (CC) ¹³²
BIOS-V4	Exsudado cutâneo	Cão	2013	MRSA MDR	398 (398)
BIOS-V5	Exsudado cutâneo	Cão	2014	MRSA Não-MDR	22 (22)
BIOS-V6	Exsudado cutâneo	Cão	2014	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V19	Exsudado cutâneo	Gato	2012	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V20	Exsudado cutâneo	Gato	2012	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V21	Exsudado cutâneo	Gato	2014	MSSA não-MDR	97 (97)
BIOS-V22	Exsudado cutâneo	Gato	2012	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V30	Exsudado cutâneo	Cão	2014	MRSA MDR	22 (22)
BIOS-V31	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MSSA não-MDR	188 (1)
BIOS-V60	Exsudado cutâneo	Cavalo	2001	MSSA não-MDR	816
BIOS-V61	Exsudado cutâneo	Cão	2003	MSSA não-MDR	5 (5)
BIOS-V62	Exsudado cutâneo	Gato	2005	MSSA não-MDR	15 (15)
BIOS-V63	Exsudado de zona podal	Cão	2008	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V70	Exsudado cutâneo	Cão	2015	MRSA não-MDR	5 (5)
BIOS-V74 ^(a)	Líquido pústula	Cão	2003	MSSA não-MDR	5 (5)
BIOS-V75	Exsudado cutâneo	Cão	2005	MSSA não-MDR	72 (8)
BIOS-V76	Exsudado cutâneo	Gato	2012	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V85 ^(a)	Líquido pústula	Cão	2003	MSSA não-MDR	5 (5)

a - d: isolados do mesmo animal; D: Origem desconhecida; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à metilicina; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

Tabela 2.2. Continuação.

Isolado	Material biológico	Hospedeiro	Ano da Colheita	Perfil de resistência	Linhagem clonal ST (CC)
BIOS-V118	Exsudado cutâneo	Cão	2007	MRSA não-MDR	6535 (5)
BIOS-V128	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MSSA não-MDR	5 (5)
BIOS-V129	Exsudado cutâneo	Coelho	2003	MSSA não-MDR	121
BIOS-V147	Exsudado cutâneo	Coelho	2017	MSSA não-MDR	398 (398)
BIOS-V150	Exsudado cutâneo	Cão	2017	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V151	Exsudado cutâneo	Gato	2017	MSSA MDR	398 (398)
BIOS-V153	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA MDR	105 (5)
BIOS-V154	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V155 ^(b)	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V156	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MSSA não-MDR	6565 (1)
BIOS-V157	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA não-MDR	6566 (8)
BIOS-V158	Exsudado cutâneo	Gato	2017	MSSA não-MDR	7 (7)
BIOS-V159	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V160	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MRSA não-MDR	5 (5)
BIOS-V161	Exsudado cutâneo	Coelho	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V168	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MSSA não-MDR	72 (8)
BIOS-V172	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MSSA não-MDR	5 (5)
BIOS-V178	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MSSA MDR	398 (398)
BIOS-V183	Exsudado cutâneo	Cão	2017	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V184 ^(b)	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V185	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA não-MDR	22 (22)

a - d: isolados do mesmo animal; D: Origem desconhecida; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à metilicina; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

Tabela 2.2. Continuação.

Isolado	Material biológico	Hospedeiro	Ano da Colheita	Perfil de resistência	Linhagem clonal ST (CC)
BIOS-V186	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA MDR	22 (22)
BIOS-V187	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V200 ^(c)	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V201 ^(c)	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V202	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V203	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MSSA não-MDR	398 (398)
BIOS-V204 ^(d)	Exsudado cutâneo	Coelho	2017	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V245	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MSSA não-MDR	1 (1)
BIOS-V250	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MSSA não-MDR	1 (1)
BIOS-V255	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA MDR	105 (5)
BIOS-V257	Exsudado cutâneo	Gato	2017	MSSA não-MDR	15 (15)
BIOS-V258 ^(d)	Exsudado cutâneo	Coelho	2017	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V279	Exsudado cutâneo	Gato	2018	MSSA não-MDR	72 (8)
BIOS-V295	Exsudado cutâneo	D	2018	MSSA não-MDR	72 (8)
BIOS-V296	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA não-MDR	22 (22)
BIOS-V300	Exsudado cutâneo	Cão	2018	MRSA MDR	22 (22)

a - d: isolados do mesmo animal; D: Origem desconhecida; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à metilicina; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal.

2.1.2 Estirpes de referência

Neste trabalho foram utilizadas estirpes de referência que serviram de controle nos vários ensaios experimentais realizados, as quais estão descritas na Tabela 2.3.

Tabela 2.2: Estirpes de referência utilizadas como controle ao longo do trabalho.

Estirpe	Genótipo de interesse	Referência
<i>S. aureus</i> USA300 NE1034	<i>lukS-PV</i> ⁺ ; <i>lukF-PV</i> ⁺	134,135
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213™	<i>lukS-PV</i> ⁻ ; <i>lukF-PV</i> ⁻	136
<i>S. aureus</i> COL	<i>agrI</i>	76
<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™	<i>agrIII</i>	137
<i>S. aureus</i> RN4220	<i>ica</i> ⁺	138
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 35984™	<i>ica</i> ⁺	76
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 12228™	<i>ica</i> ⁻	139

2.1.3 Outro material biológico

Ao longo do trabalho foi utilizado DNA total de cada estirpe previamente extraído pelo método de fervura¹⁴⁰, diluído 1:10 e mantido a -20 °C. Para a estimativa do peso molecular dos amplicões obtidos nos vários protocolos de reação de polimerase em cadeia (PCR, do inglês “polymerase chain reaction”) foram utilizados os marcadores GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Os “primers” utilizados (Invitrogen, Waltham, EUA) foram rececionados liofilizados, sendo reconstituídos com água ultra-pura (tipo I) Milli-Q®, estéril, de modo a obter uma solução “stock” a 100 µM. As soluções de trabalho dos “primers” foram preparadas a 20 µM em água ultra-pura (tipo I) estéril. Os “primers” utilizados estão descritos na Tabela 2.4.

Tabela 2.3: Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados e tamanho esperado de cada amplicão.

“Primers”	Alvo	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Amplicão (pb)	Referência
<i>lukSF_Fw</i>	<i>lukS-PV</i>	CATTAGGTAATGTCTGG	431	Este trabalho
<i>lukSF_Rv</i>	<i>lukF-PV</i>	GCATCAACTGTATTGGAT		
<i>pan_agr_SA_Fw</i>		ATGCACATGGTGCACATGC		53
<i>agr_I_SA_Rv</i>	<i>agrI</i>	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	439	53
<i>agr_II_SA_Rv</i>	<i>agrII</i>	TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572	53
<i>agr_III_SA_Rv</i>	<i>agrIII</i>	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	321	53
<i>agr_IV_SA_Rv</i>	<i>agrIV</i>	CGATAATGCCGTAATACCCG	657	53
<i>icaAD_SA_FW</i>	<i>icaADB</i>	AGT TCT TGT CGC ATT TCC AA		Este trabalho
<i>icaAD_SA_Rv</i>		CAC GAT TCT CTT CCT CTC TGC		

pb: pares de base; Fw: “Forward”; Rv: “Reverse”

2.1.4 Meios de cultura, soluções e enzimas

Os meios de cultura e soluções utilizados ao longo do trabalho foram preparados com água desmineralizada e autoclavados a 121°C por 15 minutos, à exceção dos casos assinalados. A composição dos meios de cultura utilizados ao longo do trabalho estão descritas na Tabela 2.5.

Tabela 2.4: Composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho.

Meio de cultura ¹	Composição
“Tryptic Soya Agar” (TSA)	15 g/L de peptona de caseína; 3 g/L de peptona de soja; 5 g/L de cloreto de sódio; 15 g/L de agar; pH 7,3 ± 0,2 a 25°C
“Tryptic Soya Broth” (TSB)	17 g/L de peptona de caseína; 3 g/L de peptona de soja; 5 g/L de cloreto de sódio; 2,5 g/L de fosfato dipotássico de hidrogénio; 2,5 g/L de glucose; pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

1 Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido

A composição e preparação de soluções e enzimas utilizadas ao longo do trabalho estão descritas na Tabela 2.6.

Tabela 2.5: Composição e preparação dos enzimas e soluções utilizadas neste trabalho.

Soluções	Composição da solução “stock” e solução de trabalho
Cloreto de Magnésio ¹	Solução “stock” comercial a 50 mM. Solução de trabalho a 25 mM, preparada por diluição com água ultra-pura (tipo I) Milli-Q® estéril.
Desoxirribonucleótidos (dNTPs) ¹	Solução “stock” comercial a 25 mM. Solução de trabalho a 2,5 mM, preparada por diluição com água ultra-pura (tipo I) Milli-Q® estéril
NZY Taq II polimerase ¹	Solução “stock” comercial 5 U/μl. Pronta a utilizar.
Tampão TaqII polimerase ¹	Solução “stock” a 10X. Pronta a utilizar.
Tampão tris-acetato EDTA (TAE)	Solução “stock” a 50X. 2 M Trizma Base ² ; 5 mM EDTA ² , pH 8,0 ajustado com ácido acético ³ . Solução de trabalho a 1X, preparada por diluição com água desmineralizada.
Tampão fosfato salino (PBS) ²	10 mM tampão fosfato; 2,7 mM de cloreto de potássio (KCl); 137 mM de cloreto de sódio (NaCl); pH 7,4 ± 0,2.
Soro Fisiológico	Solução de NaCl³ a 0,85% (p/v) 8,5 g/L de cloreto de sódio em água desmineralizada
Glucose ²	Solução a 20% (p/v). 2 g/L de glucose em água Milli-Q® estéril. Filtrada com filtro ⁴ 0,22 μm.
Violeta de Cristal ²	Solução a 0,1% (p/v). 1 g/L de Violeta de Cristal em água desmineralizada. Solução filtrada com papel de filtro qualitativo.
Acido acético glacial ³	Solução a 33% (v/v). Solução de trabalho preparada por diluição com água desmineralizada.

1 NZYTech, Lisboa, Portugal; 2 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; 3 Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha; 4 Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha

2.2 Métodos

2.2.1 Manutenção e crescimentos das estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas, armazenadas a -80 °C em meio TSB suplementado com glicerol a 10% (v/v), foram recuperadas em placas de isolamento em meio TSA por incubação a 37 °C durante a noite. Para obter culturas em meio líquido, foram transferidas colônias isoladas para meio TSB e este foi incubado a 37 °C, sob agitação, durante 18 horas.

2.2.2 Tipificação do sistema acessório regulador *agr*

A tipificação do “locus” *agr* foi realizada através da técnica de multiplex PCR, de acordo com o protocolo estabelecido por Lina *et al.* ⁵³, no qual é utilizado um “primer forward” e quatro “primers reverse” que dão origem a amplicões de tamanhos diferentes conforme o tipo de *agr* da estirpe em estudo (Figura 2.1).

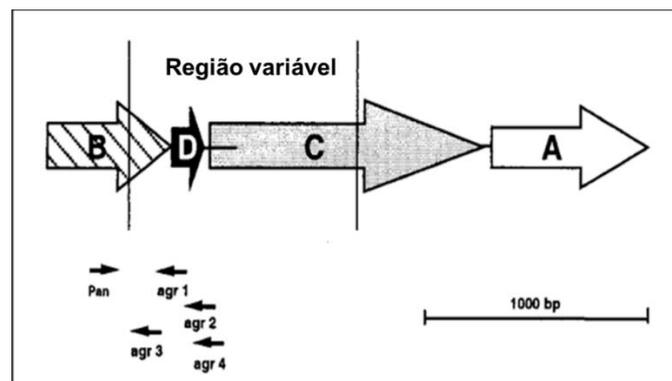


Figura 2.1: Representação gráfica do operão *agr* e da localização dos “primers” usados neste trabalho para identificação dos quatro tipos de *agr* em *S. aureus*. Adaptado de (140).

Cada reação de PCR foi preparada num volume final de 25 µl, contendo 1X tampão NZY*Taq* II (NZYTech), 1,75 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada “primer” (*agr*_I_SA_Rv, *agr*_II_SA_Rv, *agr*_III_SA_Rv, *agr*_IV_SA_Rv, pan_*agr*_SA_Fw, Tabela 2.4), 0,03 U/µl da enzima NZY*Taq* Polimerase II (NZYTech), 2,5 µl de DNA total diluído 1:10 e água ultra-pura (tipo I) estéril para perfazer o volume.

O programa de amplificação consistiu num passo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 segundos, emparelhamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos. Após os 35 ciclos foi feito um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os DNAs das estirpes *S. aureus* COL e *S. aureus* ATCC25923 foram usados como controlo de amplificação do tipo *agr*I e *agr*III, respetivamente. Como controlo da reação foi utilizada água ultra-pura

(tipo I) Milli-Q® estéril de forma a detetar possíveis contaminações das soluções utilizadas. Por indisponibilidade de controlos para os tipos *agrII* e *agrIV*, foram selecionados produtos de amplificação dos isolados BIOS-H20 e BIOS-V129, com tamanho correspondente ao tamanho esperado para *agrII* (572 pb) e *agrIV* (657 pb), respetivamente. Estes produtos foram purificados utilizando o kit NZYGelpure (NZYTech) de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram enviados para sequenciação na empresa STAB-Vida (Caparica, Portugal). As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas com o programa SnapGene (versão 6; <https://www.snapgene.com/>) e com o programa Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Após confirmação da amplificação correta dos amplicões, estas amostras foram usadas em diante como controlos.

Os produtos de PCR amplificados e purificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão TAE 1 X durante 60 minutos a 90 volts, usando GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) como marcador de pesos moleculares. Os géis foram corados com 2 µL de GreenSafe Premium (NZYTech) de acordo com as instruções do fabricante e fotodocumentados num transiluminador BioRad Gel-Doc XR System (Bio-Rad, Hercules, EUA).

2.2.3 Pesquisa dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*

A pesquisa dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, os quais codificam para a leucocidina PVL foi realizada através da técnica de PCR (Figura 2.2). Cada reação de PCR foi preparada num volume final de 25 µl, contendo 1X tampão NZYtaq II (NZYTech), 1,75 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada “primer” (*lukSF_Fw*, *lukSF_Rv*), 0,03 U/µl do enzima NZYtaq Polimerase II (NZYTech), 2,5 µl de DNA total diluído 1:10 e água ultra-pura (tipo I) estéril para perfazer o volume.

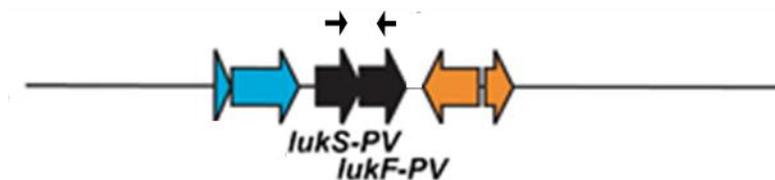


Figura 2.2: Representação gráfica do operão *lukS-PV/lukF-PV* e da localização dos “primers” usados para amplificação de um fragmento interno ao operão. Adaptado de (141).

O programa de amplificação consistiu num passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, emparelhamento dos “primers” a 45 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C durante 30 segundos. Após os 35 ciclos foi feito um passo de extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Foi utilizado como controlo positivo o DNA total da estirpe *S. aureus* USA300 NE1034 e como controlo negativo o DNA total da estirpe *S. aureus* ATCC29213. Como controlo da reação foi utilizado água Milli-Q® estéril de forma a detetar possíveis contaminações das soluções utilizadas. Para confirmação da

especificidade do PCR, um dos produtos de amplificação foi purificado com o NZYGelpure (NZYTech) e sequenciado (STAB-Vida).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (NZYTech) a 1% (p/v) em tampão TAE 1 X durante 30 minutos a 90 volts, usando GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) como marcador de pesos molecular. Os géis foram corados com 2 μ L de GreenSafe Premium (NZYTech) de acordo com as instruções do fabricante e fotodocumentados num transiluminador Bio-Rad Gel-Doc XR System (Bio-Rad).

Estirpes onde os genes *lukS-PV/lukF-PV* foram encontrados foram consideradas PVL-positivo.

2.2.4 Análise da capacidade de produção de biofilme pelo método de adesão em microplaca com coloração por Violeta de Cristal

A avaliação da capacidade de produção de biofilmes pelas estirpes em estudo foi realizada através do ensaio de adesão em microplaca com coloração de violeta de cristal ¹⁴¹. De modo a otimizar as condições de produção de biofilme, o ensaio foi realizado testando dois tipos de placas de fundo plano: placas de poliestireno (ROTILABO[®], Ref^a 9293.1, Boettger, Alemanha) e placas de poliestireno tratadas para cultura celular (Ref^a 4430100, Orange Scientific, Bélgica). A produção de biofilme foi também avaliada em dois meios de cultura, nomeadamente, (i) TSB suplementado com 1% de glucose e (ii) suplementado adicionalmente com 3% de NaCl.

A partir de uma placa de isolamento fresca em TSA, foram transferidas 2 a 3 colónias isoladas de cada estirpe em estudo para 5 mL de meio TSB, seguido de incubação de aproximadamente 18 horas (o/n), sem agitação. A partir de cada cultura líquida foi preparada uma suspensão celular em meio TSB, ajustada a uma densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) entre 0,05 e 0,09, equivalente a 5×10^7 a 1×10^8 CFU/ml. Para confirmar a concentração celular das suspensões celulares, foram efetuadas diluições seriadas 1:10 até 10^{-6} em tampão fosfato salino (PBS). Alíquotas de 0.1 mL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas em meio TSA e as placas incubadas o/n a 37°C para posterior contagem das colónias resultantes e determinação da CFU/mL. Após este procedimento, a suspensão celular foi diluída 1:100 no meio de cultura a ser usado no ensaio (TSB suplementado com 1% de glucose ou TSB suplementado com 1% de glucose e 3% de NaCl).

As placas de 96 poços foram preparadas de acordo com o esquema representativo da Figura 2.3. A cada poço das microplacas, à exceção dos poços do controlo negativo “CN” e do branco “B”, foram adicionados 200 μ l de cada suspensão celular e estas foram incubadas a 37°C, sem agitação, por 24 horas. Para cada placa, foram introduzidos os seguintes controlos: controlo negativo, 200 μ l de meio TSB suplementado; controlos positivos de produção de biofilme, *S. epidermidis* ATCC[®]35984[™] e *S. aureus* RN4220; controlo negativo da produção de biofilme, *S. epidermidis* ATCC[®]12228[™]; assim como um branco (ácido acético a 33%). Cada condição foi testada em quatro réplicas em cada ensaio.

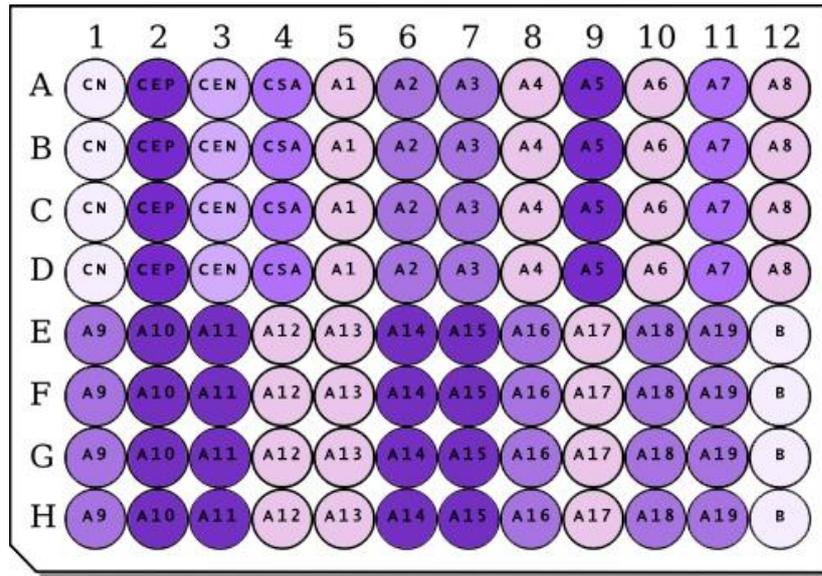


Figura 2.3: Esquema representativo da preparação das placas para o método de adesão com coloração de violeta de cristal. CN: Controlo negativo (TSB suplementado); CEP: Controlo positivo (*S. epidermidis* ATCC® 35984™); CEN: Controlo estirpe negativa (*S. epidermidis* ATCC® 12228™); CSA: Controlo positivo *S. aureus* (*S. aureus* RN4220); A: Estirpes em estudo; B: Branco (ácido acético glacial 33%).

Após a incubação por 24 horas, foi avaliado o crescimento bacteriano por leitura da DO_{600} num aparelho Synergy^{HT} (Biotek, Winooski, EUA). Posteriormente, os conteúdos de cada poço foram removidos com auxílio de uma micropipeta e os poços foram lavados, três vezes, com 100 μ L de PBS para remover as células não aderentes. As células aderentes foram de seguida fixadas por incubação com metanol a 99% (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) durante 20 minutos. A seguir, o metanol foi removido e as placas foram colocadas a secar ao ar em posição invertida, durante a noite, à temperatura ambiente.

A biomassa associada ao biofilme aderente formado em cada poço foi corada com 150 μ L de violeta de cristal a 0.1% (p/v) durante 15 minutos à temperatura ambiente. O corante foi retirado com auxílio de micropipeta e as placas foram lavadas por imersão em água desmineralizada (três imersões em dois banhos de água) e colocadas a secar ao ar em posição invertida e à temperatura ambiente. Uma vez secas, o violeta de cristal associado à biomassa foi solubilizado com ácido acético a 33% durante 30 minutos e à temperatura ambiente. A cada poço correspondente ao branco foram adicionados 200 μ L de ácido acético a 33% (branco). A densidade ótica a 570 nm (DO_{570}) de cada poço foi registada através da média dos valores da área do poço num leitor de placas Synergy^{HT}.

Os resultados foram obtidos com recurso ao software BioTek Gen5 e analisados conforme os passos descritos abaixo para permitir a categorização dos fenótipos de produção de biofilme¹⁴².

1. O valor da DO_{570} do branco (ácido acético a 33%) foi subtraído a todos os valores de DO_{570} obtidos nos controlos e estirpes em estudo.
2. Foi calculado o valor da média e desvio padrão (SD) das réplicas da DO_{570} registada para o controlo negativo (TSB).

3. Foi calculado o valor de corte **ODc**, equivalente a **ODc = média da DO₅₇₀ do controlo negativo + (3× SD do controlo negativo)** – este valor é específico para cada placa. Valores negativos de ODc foram considerados como zero.
4. Foi calculado o valor da média e SD das réplicas da DO₅₇₀ registada para cada estirpe em estudo.
Para minimizar o efeito da variabilidade intra-ensaio, para cada estirpe, o ensaio foi validado somente quando SD ≤ 15% do valor da média de OD₅₇₀.
5. A cada valor de média de DO₅₇₀ foi subtraído o valor de ODc, obtendo-se assim o valor de DO₅₇₀ final (DO_{final}) para cada estirpe.
6. As estirpes foram divididas em quatro categorias, comparando o valor de DO_{final} de cada estirpe com o valor de corte como indicado na Tabela 2.7.

Tabela 2.6: Esquema de classificação da produção de biofilmes de acordo com Stepanovic *et al.*¹⁴².

Fórmula	Categoria
$DO_{final} \leq ODc$	Não produtor (-)
$ODc < DO_{final} \leq 2 \times ODc$	Produtor fraco (+);
$2 \times ODc < DO_{final} \leq 4 \times ODc$	Produtor moderado (++)
$4 \times ODc < DO_{final}$	Produtor forte (+++).

DO= densidade ótica; ODc= valor de corte

Para minimizar o efeito da variabilidade inter-ensaio, os ensaios foram realizados, pelo menos, em duplicado, e o fenótipo final de cada estirpe apenas foi validado quando se observou concordância (i) na categorização do fenótipo e, (ii) quando SD ≤ 20% do valor da média dos ensaios.

2.2.5 Pesquisa dos genes *icaADB*

A pesquisa de genes presentes no operão *ica* foi realizada através da técnica de PCR. Foram desenhados “primers” que produzissem um amplicão contendo a região terminal 3’ do gene *icaA*, a totalidade do gene *icaD* e a região terminal 5’ do gene *icaB*, conforme indicado na Figura 2.4. Cada reação de PCR foi preparada num volume final de 25 µl, contendo 1X tampão NZY Taq II (NZY Tech), 1,75 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada “primer” (*icaABCD_Fw*, *icaABCD_Rv*), 0,03 U/µl do enzima NZY Taq Polimerase II), 2,5 µl de DNA total diluído 1:10 e água ultra-pura Tipo I para perfazer o volume.

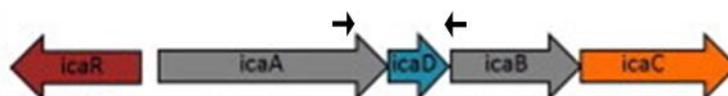


Figura 2.4: Representação gráfica do operão *icaADB* e localização dos “primers” usados para identificações dos genes *icaADB*. Adaptado de (144).

Foi utilizado como controlo positivo o DNA da estirpe *S. aureus* RN4220. Como controlo da reação foi utilizado água Milli-Q® estéril de forma a detetar possíveis contaminações das soluções utilizadas.

O programa de amplificação consistiu num passo de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, emparelhamento dos "primers" a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. Após os 30 ciclos foi feito um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Para confirmação da especificidade do PCR, um dos produtos de amplificação foi purificado com o kit NZYGelpure (NZYTech) e sequenciado (STAB-Vida).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (NZYTech) a 1% (p/v) em tampão TBE 0,5 X durante 45 minutos a 80 volts, usando GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) como marcador de pesos molecular. Os géis foram corados com 2 µL de GreenSafe Premium (NZYTech) de acordo com as instruções do fabricante e fotodocumentados num transiluminador Bio-Rad Gel-Doc XR System (Bio-Rad).

2.2.6 Modelo de infeção em *Galleria mellonella* para avaliação do potencial de virulência de *S. aureus*

A utilização de um modelo de infeção em insetos apresenta diversas vantagens em comparação aos estudos tradicionais em mamíferos. O protocolo de infeção em *G. mellonella*, comumente designada por "larva da cera" ou "larva do mel", não envolve as limitações éticas e o custo elevado dos modelos de infeção tradicionais, as larvas são facilmente manipuláveis, podem ser mantidas a 37°C e não necessitam de anestesia ^{143,144}.

Vários estudos têm estabelecido uma boa correlação entre a patogenicidade de diversos agentes patogénicos bacterianos quer em modelos de infeção em *G. mellonella* quer em modelos de infeção em mamíferos, corroborando o crescente interesse neste modelo de infeção larval ¹⁴⁴. *G. mellonella* apresenta um sistema imunitário inato semelhante ao dos mamíferos, com resposta celular e humoral bem desenvolvida, incluindo a produção de péptidos antimicrobianos. Os hemócitos presentes na hemolinfa de *G. mellonella* tem uma função semelhante aos macrófagos e neutrófilos humanos, realizando a fagocitose e a degradação do agente patogénico invasor ^{143,144}.

Deste modo, este foi o modelo escolhido para avaliar o potencial de virulência de estirpes de *S. aureus* associadas a SSTIs em humanos ou animais. Para tal, foram selecionadas duas estirpes pertencentes à linhagem clonal ST22, predominante nas coleções de origem animal e humana. Para além deste critério, foi tida em conta a apresentação de fenótipo de produção de biofilme e perfil de resistência aos antibióticos relevante. As principais características das estirpes selecionadas estão descritas na Tabela 2.8.

Tabela 2.7: Principais características genotípicas e fenotípicas das estirpes analisadas no modelo de infecção em *G. mellonella*.

Estirpe	Origem	ST (CC)	Biofilme	Perfil de resistência
BIOS-V204	Animal	22 (22)	Produtor Forte	MRSA - MDR
BIOS-H31	Humana	22 (22)	Produtor Forte	MRSA - não-MDR

Preparação das larvas

As larvas foram adquiridas, em vários lotes distintos, numa empresa que comercializa alimento vivo para animais exóticos (*G. mellonella* é comercializada como alimento de diversas espécies de pássaros e répteis). Os ensaios foram realizados na fase larval tardia de *G. mellonella*¹⁴⁴. Após receção das larvas, estas foram submetidas a dois períodos de aclimatização: 24 horas a temperatura ambiente após o transporte para o laboratório, seguidas de 24 horas a 37°C para aclimatização à temperatura do ensaio¹⁴⁵.

Cada ensaio foi constituído por dois grupos controlo, (i) sem manipulação e (ii) injeção com PBS e dois grupos de estudo, (iii) injeção da estirpe em estudo a 10⁵ CFU/larva e (iv) a 10⁷ CFU/larva. Para cada grupo foram escolhidas 10 larvas saudáveis semelhantes tendo em conta o peso e tamanho (225-300 mg e 20-30 cm), uniformidade da cor (sem melanização) e presença de motilidade. Cada grupo de larvas foi pesado, e o peso médio das larvas determinado.

Preparação do inóculo bacteriano

As estirpes de interesse seleccionadas foram inoculadas em meio TSA e incubadas a 37°C por 24 horas. Foram transferidas 2/3 colónias isoladas para 5 ml de meio TSB e incubadas a 37°C por 18 horas. Após incubação, o volume total da cultura foi transferido para um tubo falcon de 15 mL e centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos. O sedimento bacteriano foi recuperado e lavado duas vezes com PBS. A suspensão celular foi ajustada a uma densidade ótica correspondente a aproximadamente 5x10⁸ CFU/mL (DO₆₀₀ entre 0.27 e 0.3, determinada previamente para cada uma das estirpes). Esta suspensão foi diluída 1:100 em PBS de modo a se obter uma segunda suspensão com 5x10⁶ CFU/mL. Para confirmação da concentração celular do inóculo foram efetuadas diluições seriadas 1:10 em PBS e alíquotas de 0,1 ml foram plaqueadas em TSA para determinação de CFU/mL.

Infeção das larvas com as estirpes de interesse

Após a preparação e aclimatização das larvas, cada larva foi colocada num dispositivo de contenção, adaptado de Fredericks *et al.* ¹⁴⁵, para minimizar possíveis danos ao experimentador causados durante a injeção. Com uma agulha de insulina foi injetado, numa das patas falsas traseiras, 20 µl/larva de PBS ou de uma das suspensões bacterianas preparadas, como demonstrado na Figura 2.5.



Figura 2.5: Procedimento de inoculação de larva de *G. mellonella*.

Os grupos de larvas foram colocados em contentores distintos com orifícios na tampa para entrada de ar e com alimento (aparas de cera), para não causar oscilações no sistema imune celular e humoral ¹⁴⁶. A sobrevivência das larvas em cada grupo foi observada a cada 24 horas após a infeção, por um período de 7 dias. Uma larva foi considerada morta quando não responsiva ao toque ¹⁴⁵ (Figura 2.6). Todas as larvas mortas foram colocadas num tubo falcon de 50 mL, e este selado e colocado num contentor para incineração. No final de cada ensaio, as larvas sobreviventes foram transferidas para um tubo falcon de 50 mL, e este selado e colocado a -20°C num contentor secundário, por pelo menos, 24 horas, período após o qual foi colocado em contentor para incineração.



Figura 2.6: Larvas de *G. mellonella* mortas após inoculação com uma estirpe de *S. aureus*.

2.3 Análise estatística

Os dados genotípicos (tipo de *agr*, presença dos genes *lukS-PV/lukF-PV* que codificam para a PVL) e fenotípicos (produção de biofilme, fenótipo MRSA/MSSA e MDR/não-MDR) obtidos no decurso do trabalho foram comparados através do teste estatístico de qui-quadrado, usando o software SPSS v26.0 (SPSS® Statistical Software, NY, EUA).

A análise de curvas de sobrevivência relativas aos ensaios de infecção em *G. mellonella* foi realizada com recurso ao método de Kaplan-Meier, o qual analisa dados de sobrevivência obtidos até à ocorrência de um dado evento, neste caso a morte da larva. O evento é monitorizado em tempos definidos (a cada 24 horas pós-infecção), sendo possível calcular o tempo médio de sobrevivência das larvas em cada condição testada e a probabilidade de sobrevivência a cada ponto de monitorização. A comparação das curvas de sobrevivência das estirpes com o controlo (PBS) ou entre si foi realizada através do método de “Logrank” (Mantel–Cox). A análise foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0.05$) em todas as análises estatísticas realizadas neste trabalho.

3

Resultados

3.1 Tipificação do sistema de regulação de virulência *agr*

Todas as estirpes em estudo foram objeto de tipificação molecular do sistema *agr* por PCR, de acordo com a abordagem descrita por Lina *et al.*, ilustrada na Figura 2.1 na seção 2.2.2⁵³. A Figura 3.1 mostra um resultado representativo da aplicação desta abordagem. No total das duas coleções, das 89 estirpes de *S. aureus* analisadas, 59 (66,3%) foram classificadas com o tipo *agrI*, 26 estirpes (29,2 %) com *agrII* e três estirpes (3,4 %) com *agrIII*. Apenas uma estirpe (1,1 %) foi identificada como apresentando o tipo *agrIV*.

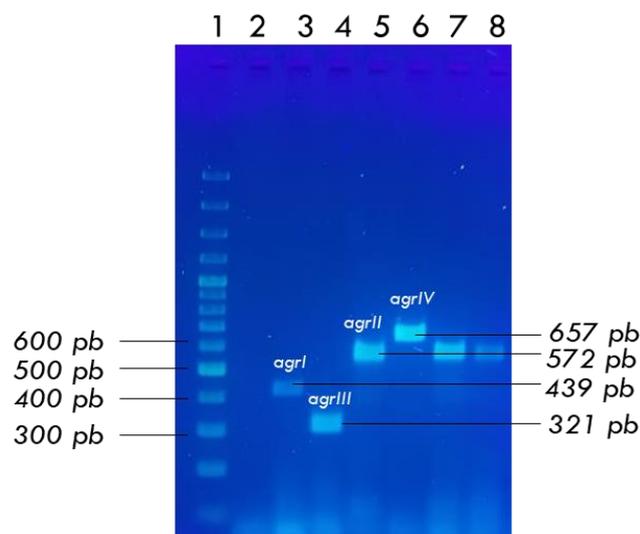


Figura 3.1: Análise de produtos de PCR para tipificação molecular do sistema *agr* por eletroforese em gel de agarose. 1: marcador GeneRuler 100 pb Plus Ladder; 2: controle negativo (água); 3: Controle *S. aureus* COL (*agrI*); 4: Controle *S. aureus* ATCC 25923 (*agrIII*); 5: BIOS-H7 (*agrII*); 6: BIOS-V129 (*agrIV*); 7: BIOS-H8 (*agrII*); 8: BIOS-H9 (*agrII*).

A distribuição dos tipos de *agr* mostrou ser semelhante nas duas coleções (Figura 3.2). O tipo *agrI* foi o tipo predominante, presente em 20 estirpes (58.8%, 20/34) de origem humana e 39 estirpes (70.9%, 39/55) de origem animal. O segundo tipo de *agr* mais frequente em ambas as coleções foi *agrII*, presente em 13 estirpes (38.2%, 13/34) de origem humana e 13 estirpes (23.6%, 13/55) de origem animal; enquanto o tipo *agrIII* foi identificado apenas numa estirpe (2.9%, 1/34) de origem humana e em duas estirpes (3.6%, 2/55) de origem animal. Por fim, o tipo *agrIV* foi apenas detetado numa estirpe (1.8%, 1/55) de origem animal.

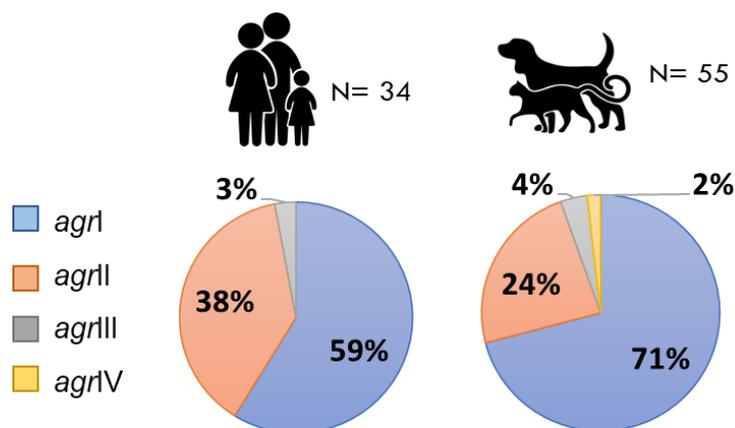


Figura 3.2: Distribuição da frequência dos quatro tipos de *agr* nas coleções de *S. aureus* origem humana e animal.

Analisando a coleção de origem animal e considerando as várias espécies animais hospedeiras, das 29 estirpes de origem canina, 19 (65.5%) foram classificadas com o tipo *agrI*, oito estirpes (27.6%) foram identificadas com *agrII* e duas estirpes (6.9%) com *agrIII*. Das 19 estirpes de origem felina, 15 (78.9%) pertencem ao *agrI*, enquanto quatro estirpes (21.1%) foram classificadas com o tipo *agrII*. Das cinco estirpes isoladas de coelho, quatro (80.0%) pertencem ao tipo *agrI* e apenas uma estirpe (20.0%) pertence ao tipo *agrIV*. A única estirpe de origem equina pertence ao *agrII*, enquanto a estirpe de origem desconhecida apresenta um tipo *agrI*.

A associação entre a distribuição dos tipos de *agr*, fenótipos de resistência e linhagens clonais é descrita na subseção 3.4 dos Resultados.

3.2 Pesquisa dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* que codificam para a PVL

A presença dos genes que codificam para a PVL foi determinada pela amplificação por PCR de um fragmento abrangendo a região terminal 3' do gene *lukF-PV* e a região terminal 5' do gene *lukS-PV*, conforme ilustrado na Figura 2.2 da seção 2.2.3. Na Figura 3.3 encontra-se uma imagem representativa de resultados obtidos durante a pesquisa destes genes.

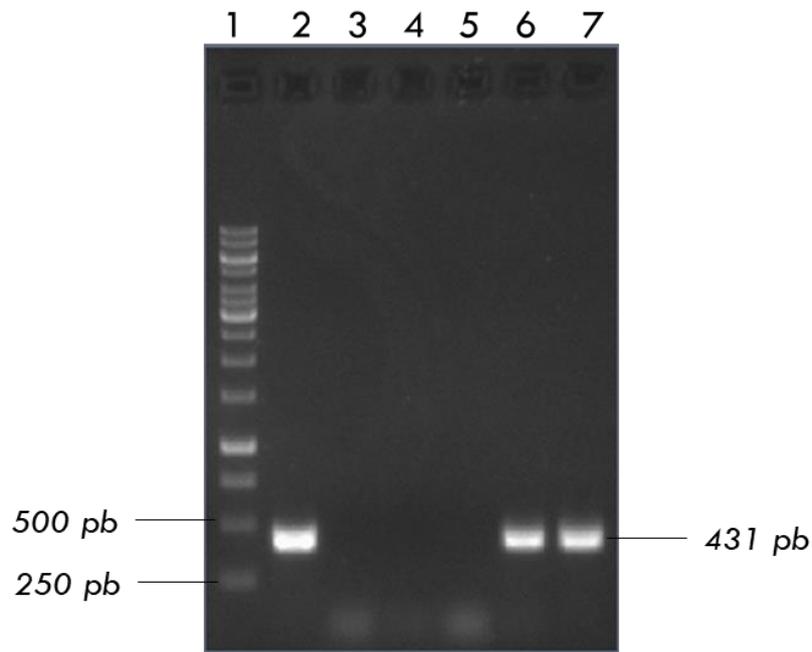


Figura 3.3: Análise de produtos de PCR para pesquisa dos genes *lukS-PV/lukF-PV* através de eletroforese em gel de agarose. 1: marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 2: *S. aureus* USA300 NE1034 (PVL+); 3: *S. aureus* ATCC29213 (PVL-); 4: BIOS-H1 (PVL-); 5: BIOS-H4 (PVL-); 6: BIOS-H5 (PVL+); 7: BIOS-H6 (PVL+).

Os genes *lukS-PV/lukF-PV* foram detetados em oito (9.0%) das 89 estirpes de *S. aureus* em estudo, sendo estas classificadas como PVL-positivo. Relativamente à coleção de estirpes de origem humana, sete das 34 estirpes (20.6%) possuem os genes *lukS-PV/lukF-PV*, enquanto na coleção de origem animal apenas uma das 55 estirpes (1.8%) apresentou estes genes.

A associação entre a distribuição de PVL, tipos de *agr*, fenótipos de resistência e linhagens clonais é explorada na subseção 3.4 dos Resultados.

3.3 Análise da capacidade de produção de biofilme nas coleções em estudo

3.3.1 Otimização do método de adesão em microplaca com coloração de violeta de cristal

Neste trabalho, a capacidade de produção de biofilme foi avaliada pelo método de adesão em microplaca com coloração de violeta de cristal, como descrito por Stepanovic *et al.*^{141,142}. Este método foi executado testando-se dois tipos de microplacas. Embora o material de produção de ambas as placas em teste seja o poliestireno, um dos tipos de placa (placas de cultura celular) é tratado para promover a adesão celular ao plástico. Todas as 89 estirpes foram testadas nos dois tipos de microplacas e, adicionalmente, em meio TSB suplementado com 1% de glucose ou com 1% glucose e 3% de NaCl.

A distribuição dos fenótipos de produção de biofilme obtidos para as 89 estirpes de *S. aureus* nas várias combinações testadas encontra-se representada na Figura 3.4. O teste em microplacas de poliestireno revelou que, em TSB suplementado com 1% glucose, 16 estirpes (18.0%) foram classificadas como não produtor de biofilme, enquanto 45 estirpes (50.6%) foram categorizadas como produtor fraco, 18 (20.2%) como produtor moderado e 10 estirpes (11.2%) como produtor forte. Já em TSB suplementado com 1% de glucose e 3% de NaCl, 20 (22.5%) estirpes foram classificadas como não produtor de biofilme, enquanto 33 estirpes (37.1%) foram categorizadas como produtor fraco, 25 (28.1%) como produtores moderados e 11 (12.4%) como produtores fortes.

Nos ensaios em que foram usadas microplacas para cultura celular, em TSB suplementado com 1% glucose, 26 estirpes (29.2%) foram classificadas como não produtor de biofilme, 27 estirpes (30.3%) como produtor fraco, 13 (14.6%) como produtor moderado e 23 estirpes (25.8%) como produtor forte. O crescimento em meio TBS suplementado com 1% glucose e 3% de NaCl, indicou 20 estirpes (22.5%) como não produtoras de biofilme, enquanto 32 estirpes (36.0%) foram categorizadas como produtores fracos, 16 (18.0%) como produtores moderados e 21 estirpes (23.6%) como produtores fortes (Figura 3.4).

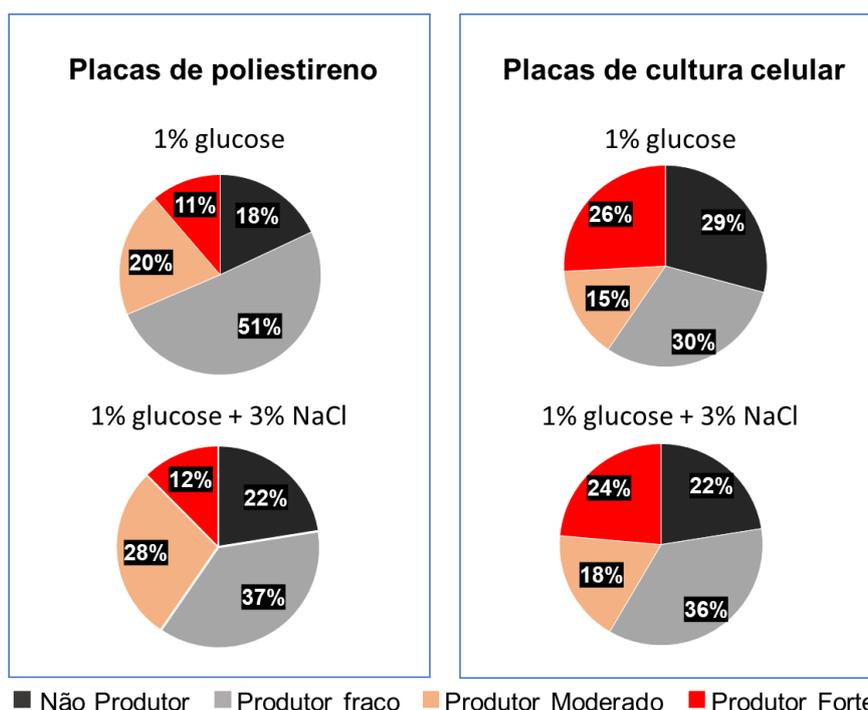


Figura 3.4 Distribuição dos fenótipos de produção de biofilme das 89 estirpes de *S. aureus* em estudo obtidos no método de adesão em microplaca nas várias combinações em otimização: tipo de placa e meio de crescimento.

O controlo positivo *S. epidermidis* ATCC35984 (*ica*⁺, produtor de biofilme)^{147,148} foi categorizado como produtor forte em todos os ensaios e para todas as condições testadas. Por outro lado, o controlo positivo *S. aureus* RN4220, descrito como produtor de biofilme na literatura¹⁴⁹, apresentou um comportamento variável, sendo categorizado como produtor nos ensaios com placas de cultura celular

e como não produtor/produtor em placas de poliestireno. Contrariamente ao expectável, o controlo negativo *S. epidermidis* ATCC12228 (*ica*), descrito como não produtor de biofilmes na literatura^{147,150,151}, foi tão categorizado como produtor como não produtor ao longo dos ensaios, independentemente das condições testadas.

De acordo com estes resultados, foi considerada como condição ótima para a avaliação da produção de biofilme, a utilização de placas de cultura celular, uma vez que permitem maior deteção de produtores fortes e uma melhor diferenciação entre as diferentes categorias (por exemplo, produtores fortes vs. não produtores).

3.3.2 Avaliação da produção de biofilme

A distribuição das estirpes de *S. aureus* foi inicialmente feita em quatro categorias diferentes de capacidade de produção de biofilme (não produtor, produtor fraco, produtor moderado e produtor forte), de acordo com os critérios de Stepanovic *et al.*, 2007¹⁴², tendo em conta os dados obtidos a partir dos ensaios efetuados com as microplacas de cultura celular, independentemente do meio de crescimento. No entanto, de uma forma geral, foram observadas gamas similares ou sobrepostas de valores de produção de biofilme entre produtores fracos e não produtores. Deste modo, para a análise final dos dados, as categorias não produtor/produtor fraco foram agregadas na classificação **Não Produtor**, enquanto as categorias produtor moderado/produtor forte foram agregadas como **Produtor**. Uma estirpe foi considerada como Produtor, se apresentasse produção moderada ou forte em pelo menos um dos meios de crescimento testados.

No total das duas coleções de *S. aureus*, 57 estirpes (64.0%, 57/89) foram classificadas como Produtores de biofilme, das quais 18 (53.0%, 18/34) eram de origem humana e 39 (70.9%, 39/55) eram de origem animal (Figura 3.5).

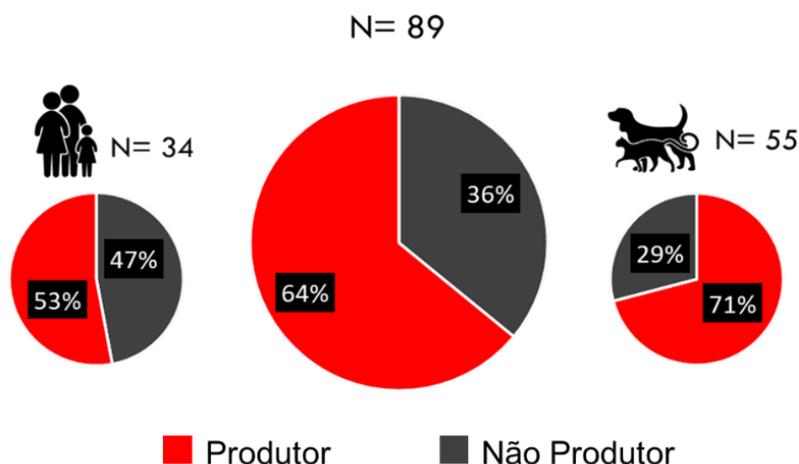


Figura 3.5. Distribuição dos fenótipos de produção de biofilme por *S. aureus* no total e por cada coleção estudada.

A associação entre os fenótipos de produção de biofilme e tipos de *agr*, linhagens clonais e fenótipos de resistência a antibióticos é explorada na subseção 3.4 dos Resultados.

3.3.3 Efeito do NaCl na avaliação de produção de biofilme

Uma vez categorizadas as estirpes de acordo com os fenótipos de produção de biofilme, avaliou-se o efeito da suplementação de TSB com 3% NaCl, um fator reconhecido como indutor de biofilmes em vários estudos^{66,105,152,153}. Assim, das 89 estirpes em estudo, 18.0% (16/89) são capazes de produzir biofilme simultaneamente nas duas condições de suplementação testadas, enquanto 46.1% (41/89) das estirpes apresentou produção variável de acordo com a suplementação do meio de cultura. Entre estas estirpes com comportamento variável, 23.6% (21/89) estirpes só foram categorizadas como Produtor na presença de NaCl, enquanto 22.5% (20/89) estirpes só foram categorizadas como Produtor na ausência de NaCl. Estes resultados indicam um impacto significativo da suplementação de TSB na categorização das estirpes e, por conseguinte, na deteção de produção de biofilme em *S. aureus* (Figura 3.6).



Figura 3.6. Efeito do NaCl na categorização dos fenótipos de biofilmes das estirpes de *S. aureus* em estudo (n=89).

O efeito do NaCl foi observado não só na categorização (não produtor/produtor) das estirpes, mas também dentro de cada categoria. Na Figura 3.7, destacam-se estirpes que registaram variações significativas de DO_{final} na presença de NaCl, quer por aumento da produção de biofilme (BIOS-H18, BIOS-V151) quer por diminuição do biofilme (BIOS-V150, BIOS-V245).

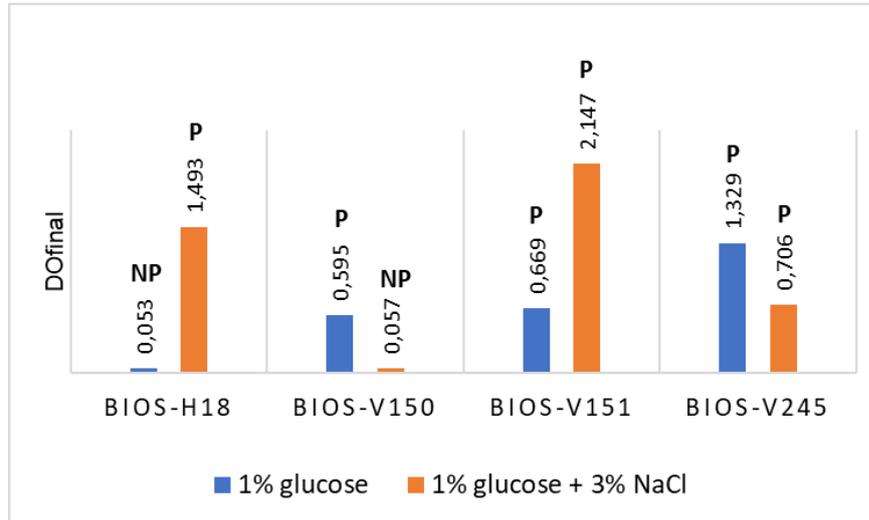


Figura 3: Efeito do NaCl na capacidade de produção de biofilme. NP: Não Produtor; P: Produtor.

3.3.4 Pesquisa do operão *icaABCD*

A pesquisa do operão *icaABCD* foi realizada através da amplificação de um fragmento contendo a região terminal 3' do gene *icaA*, a totalidade do gene *icaD* e a região terminal 5' do gene *icaB* (Figura 2.4). Neste estudo, a presença dos genes *ica* foi identificada em todas as estirpes de origem humana ou veterinária (Figura 3.8).

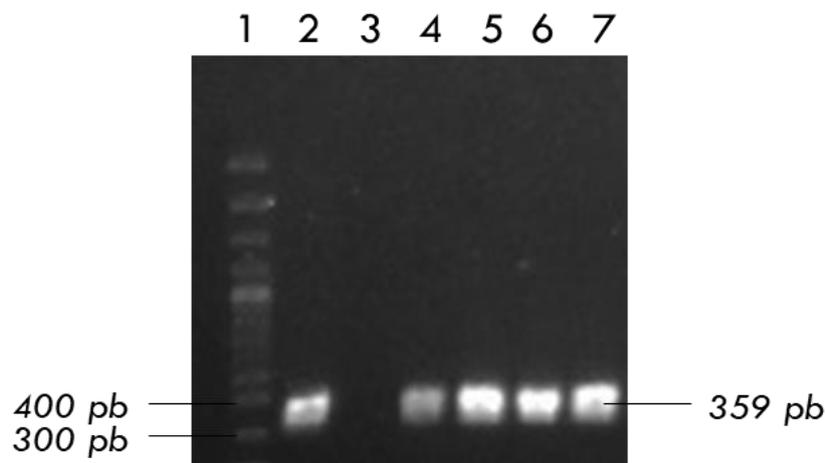


Figura 3.8: Análise de produtos de PCR para detecção dos genes *icaABC* por eletroforese em gel de agarose. 1: marcador GeneRuler 100 pb Plus Ladder; 2: controle *S. aureus* RN4220; 3: controle negativo (água); 4: BIOS-V4 (*ica+*); 5: BIOS-V5 (*ica+*); 6: BIOS-V6 (*ica+*); 7: BIOS-V19 (*ica+*).

3.4 Relação entre características fenotípicas e genotípicas das estirpes em estudo

Foram efetuadas análises estatísticas para explorar possíveis relações entre as diversas características fenotípicas e genotípicas das estirpes caracterizadas neste trabalho, em conjunto com a informação prévia, relativamente às linhagens clonais e perfis de resistência aos antibióticos.

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a produção de biofilme e as linhagens clonais ST ($X^2=17.863$, $p=0.909$) ou os complexos clonais ($X^2=14.037$, $p=0.605$) considerando o total das estirpes estudadas, apenas estirpes de origem humana (ST: $X^2=15.077$, $p=0.458$; CC: $X^2=11.790$, $p=0.495$), ou apenas estirpes de origem animal. (ST: $X^2=10.608$, $p=0.876$; CC: $X^2=8.462$, $p=0.625$).

Também não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a produção de biofilme e os fenótipos MRSA/MSSA ($X^2=0.417$, $p=0.518$) ou MDR/não-MDR ($X^2=0.322$, $p=0.571$) para o total das estirpes estudadas, estirpes de origem humana (MRSA/MSSA: $X^2=0.537$, $p=0.464$; MDR/não-MDR: $X^2=1.025$, $p=0.311$), ou estirpes de origem animal (MRSA/MSSA: $X^2=3.186$, $p=0.074$; MDR/não-MDR: $X^2=0.535$, $p=0.734$).

De igual forma, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a produção de biofilmes e os tipos de *agr* para o total das estirpes estudadas ($X^2=2.501$, $p=0.713$), estirpes de origem humana ($X^2=1.163$, $p=0.856$), ou estirpes de origem animal ($X^2=3.291$, $p=0.462$).

Apesar da falta de associação estatística, analisou-se a distribuição destas várias características com o auxílio do algoritmo goeBURST, que analisa relações filogenéticas com base no ST, e do software PhyloViZ Online que permite analisar graficamente estas relações interligando-as com outras características de interesse. Assim, na Figura 3.9, encontra-se representadas as várias linhagens clonais presentes nas coleções em estudo, assim como as suas características fenotípicas (produção de biofilme, resistência aos antibióticos, hospedeiro) e genotípicas (tipo de *agr*, PVL-positivo).

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

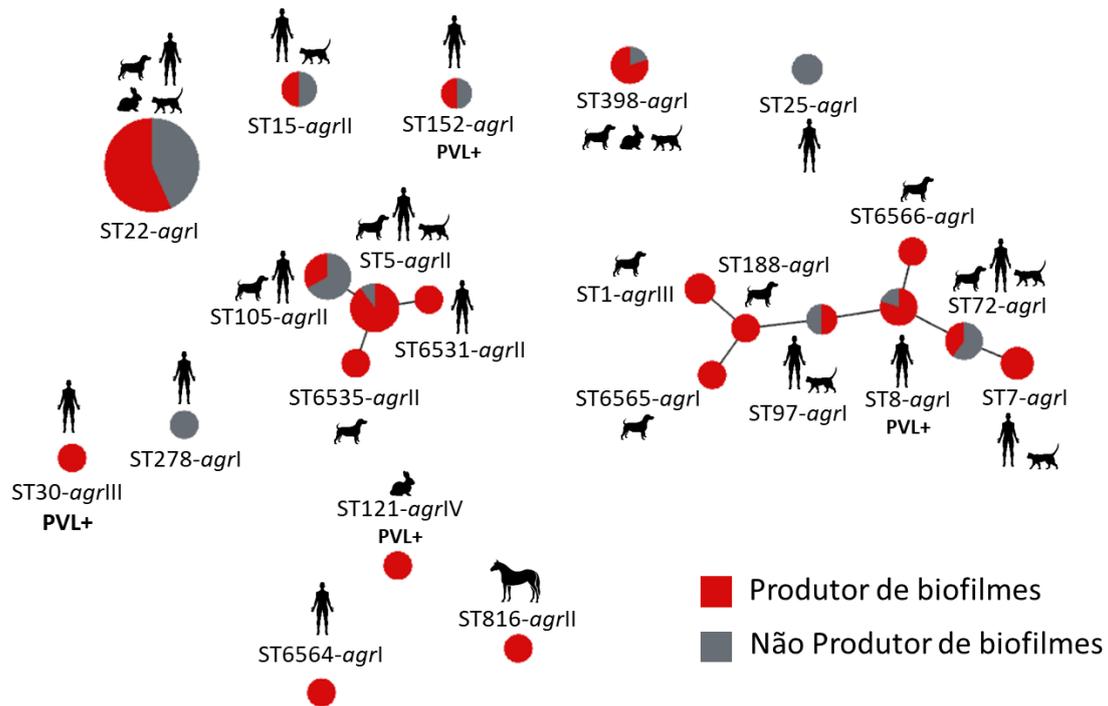


Figura 3.9: Distribuição das características genóticas e fenotípicas por linhagem clonal. Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no software PhyloViz Online (www.phyloViz.net).

Relação entre tipo de *agr* e linhagem clonal

Estudos prévios mostraram que a variabilidade alélica de *agr* está associada às linhagens clonais e mesmo a complexos clonais de *S. aureus*, de forma independente ao hospedeiro¹⁵⁴. Como esperado, esta relação foi igualmente verificada neste trabalho, estando cada ST associado a um único tipo de *agr*. Assim, as estirpes com *agrI* pertencem às linhagens ST22 (CC22), ST8 e ST72 (ambos CC8) e a ST398 (CC398). Por sua vez, as estirpes com *agrII* pertencem às linhagens do complexo clonal CC5 (ST5, ST105), ST15 (CC15) e ao ST816, oriundo de um cavalo. Já o tipo *agrIII* encontrou-se associado à linhagem ST30 (CC30) e ST1 (CC1). A única estirpe apresentando *agrIV* pertence ao ST121. Este trabalho permitiu ainda atribuir tipos de *agr* a linhagens clonais que foram descritas pela primeira vez nestas coleções, nomeadamente, assignando o tipo *agrI* a ST6566 (CC8) e ST6564, e o tipo *agrII* a ST6531(CC5) e ST6535(CC5). Apesar da relação entre tipo de *agr* e ST, ser geralmente estendida a complexos clonais, encontrou-se uma exceção no CC1, salientando-se que o tipo *agrI* foi atribuído a ST188 e ST6565, e portanto divergindo de ST1-*agrIII*.

Relação entre presença de PVL, linhagem clonal e resistência à meticilina

Na coleção de origem humana, foram detetadas sete estirpes PVL-positivo, das quais quatro são MRSA e pertencem à linhagem clonal ST8-*agrI* e as três restantes são MSSA, pertencendo duas à linhagem clonal ST152-*agrI* e uma à linhagem ST30-*agrIII*. A única estirpe PVL-positivo de origem animal (coelho) é MSSA e pertence à linhagem clonal ST121-*agrIV*.

Relação entre produção de biofilme, linhagem clonal e perfil de resistência a antibióticos

A análise da Figura 3.9 revela ainda que, de um modo geral, a produção de biofilme se encontra associada às linhagens clonais predominantes nas coleções em estudo. Em particular, a produção de biofilme foi registada na maior parte das estirpes MRSA/MSSA-ST8-*agrI* (3/4 estirpes) associadas exclusivamente aos humanos, e a MSSA-ST398-*agrI* (4/5 estirpes) associadas exclusivamente a animais. A produção de biofilme foi ainda observada em linhagens clonais predominantes presentes nos vários hospedeiros, nomeadamente associadas a humanos e animais como as MRSA-ST22-*agrI* (57%, 17/30 estirpes) e MRSA/MSSA-ST5-*agrII* (90%, 9/10 estirpes).

3.5 Avaliação do potencial de virulência de estirpes representativas no modelo de infeção em *G. mellonella*

O modelo de infeção larval de *G. mellonella* tem sido aplicado para a avaliação de virulência de diversos agentes patogénicos bacterianos^{143,144}. Neste trabalho, este modelo foi aplicado para averiguar se estirpes de *S. aureus* associadas a SSTIs em humanos e animais apresentam um maior potencial de virulência do que uma estirpe produtora de biofilme, *S. aureus* RN4220. Para estes ensaios, foram escolhidas duas estirpes: BIOS-V204, estirpe MRSA não-MDR, isolada de um coelho¹³¹; e BIOS-H31, estirpe MRSA-MDR de origem humana¹³⁰. Ambas as estirpes são produtoras de biofilme e pertencem à linhagem clonal ST22, predominante em ambas as coleções^{130,131}.

Os ensaios de infeção em *G. mellonella* foram realizados testando-se dois inóculos para cada estirpe, 10^5 CFU/larva e 10^7 CFU/larva, próximos da gama de valores usada noutros estudos similares^{155–158}. Os ensaios incluíram ainda controlos nos quais as larvas foram inoculadas com igual volume de PBS ou não inoculadas (sem manipulação). Cada ensaio foi efetuado, pelo menos, em duplicado.

Após a infeção, a mortalidade das larvas foi avaliada a cada 24 horas, durante um período de sete dias. Uma larva foi considerada morta quando não respondia ao toque, sendo este evento geralmente acompanhado de forte melanização das larvas¹⁴⁵. Nos painéis A e B da Figura 3.10, encontram-se ilustradas as curvas de sobrevivência das larvas ao longo do tempo após inoculação com cada uma das estirpes em estudo, em dois ensaios independentes. Estas curvas mostram um aumento da morte de larvas após a inoculação com *S. aureus*, independentemente da estirpe infetante, sendo esta mais evidente com o inóculo superior (10^7 CFU/larva). A morte de larvas foi igualmente observada nos controlos dos vários ensaios efetuados, mas em número consideravelmente menor e de forma mais espaçada no tempo.

A análise das curvas de sobrevivência foi efetuada pelo método de Kaplan-Meier, o qual analisa dados de sobrevivência obtidos até à ocorrência de um dado evento, neste caso a morte de larva. A partir destes dados, é estimada a probabilidade de sobrevivência (ou fração de sobrevivência) a cada tempo

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

de monitorização, assim como o tempo de sobrevivência médio, sendo estes parâmetros ilustrados em função do tempo. Esta análise foi efetuada para cada estirpe, tendo em conta os dois ensaios independentes, apresentando-se estas as curvas de sobrevivência no painel C da Figura 3.10.

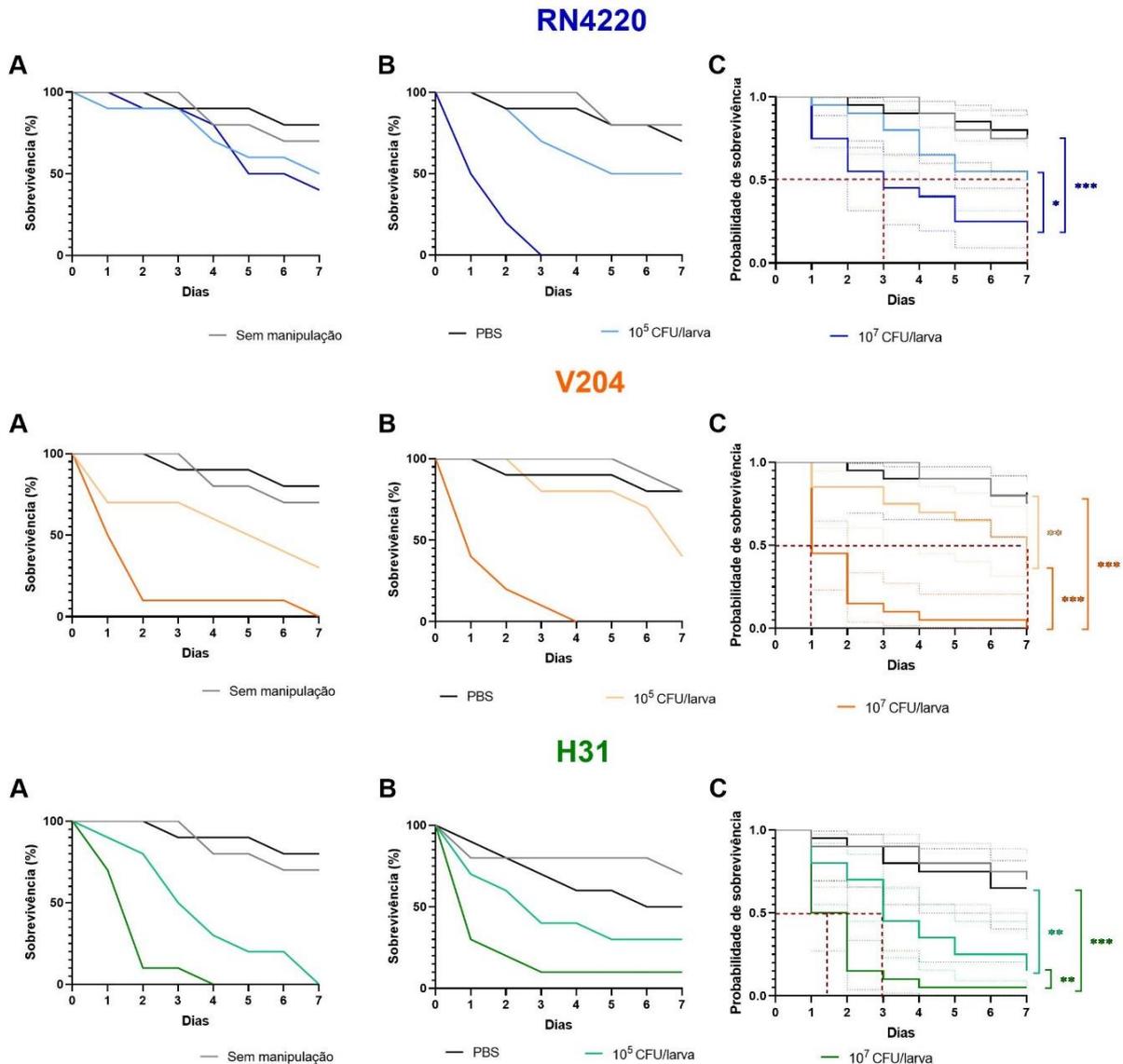


Figura 3.10: Curvas de sobrevivência de *G. mellonella* infetadas com estirpes de *S. aureus* associadas a SSTIs. Percentagem de sobrevivência de *G. mellonella* infetadas com as estirpes RN4220, BIOS-V204 e BIOS-H31 obtidas em dois ensaios independentes (**A e B**). Probabilidades de sobrevivência de *G. mellonella* infetadas com *S. aureus* (**C**); as linhas pontilhadas coloridas representam o intervalo de confiança a 95% estimado para cada curva de sobrevivência; as linhas a tracejado vermelho representam o tempo médio de sobrevivência associado a cada curva de sobrevivência. As comparações estatisticamente significativas entre curvas de sobrevivência encontram-se assinaladas como $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

A análise das curvas de sobrevivência ilustradas na Figura 3.10-C mostra que as três estirpes reduziram significativamente a sobrevivência das larvas, quando comparadas com o controlo (PBS), com exceção da estirpe *S. aureus* RN4220 com o inóculo a 10^5 CFU/larva. Este efeito reflete-se no tempo de sobrevivência médio (Figura 3.10-C, Tabela 3.1), o qual é inferior para *G. mellonella* infetada com cada uma das estirpes, independentemente do inóculo, relativamente ao controlo PBS.

Tabela 3.1: Tempo de sobrevivência médio ($t_{\text{médio}}$) associado a cada curva de sobrevivência obtida nos ensaios de infeção com *G. mellonella*.

	PBS	RN4220		BIOS-V204		BIOS-H31	
			10^5	10^7	10^5	10^7	10^5
$t_{\text{médio}}$ (dias)	> 7*	7	3	7	1	3	1,5

* Resultado idêntico em cada ensaio.

A comparação entre as curvas de sobrevivência obtidas para as três estirpes em estudo em relação ao controlo PBS foi efetuada pelo teste “log rank” ou de Mantel-Cox (Tabela 3.2 e Tabela 3.3). Foram encontradas associações estatisticamente significativas quando comparadas as várias curvas de sobrevivência indicando que as três estirpes de *S. aureus* apresentam uma maior letalidade em relação ao controlo PBS, à exceção da estirpe *S. aureus* RN4220 a 10^5 CFU/larva. Adicionalmente, para todas as estirpes testadas, verificou-se uma associação estatística significativa entre um maior inóculo e letalidade de *G. mellonella*. Os valores de significância para as três estirpes estão descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Análise estatística dos ensaios de virulência em *G. mellonella* (ensaos duplicados independentes)

	RN4220 CFU/larva		BIOS-V204 CFU/larva		BIOS-H31 CFU/larva	
	10^5	10^7	10^5	10^7	10^5	10^7
PBS	$p=0,0897$	$p=0,0001$	$p=0,0059$	$p<0,0001$	$p=0,0011$	$p<0,0001$
10^5 CFU/larva	nd	$p=0,0222$	nd	$p<0,0001$	nd	$p<0,0051$

nd: não determinado

Para uma comparação do potencial de virulência entre as três estirpes, foi apenas considerado o ensaio em que as três estirpes foram testadas em simultâneo. Os resultados da probabilidade de sobrevivência para cada estirpe/inóculo nesse ensaio estão descritos na Figura 3.11.

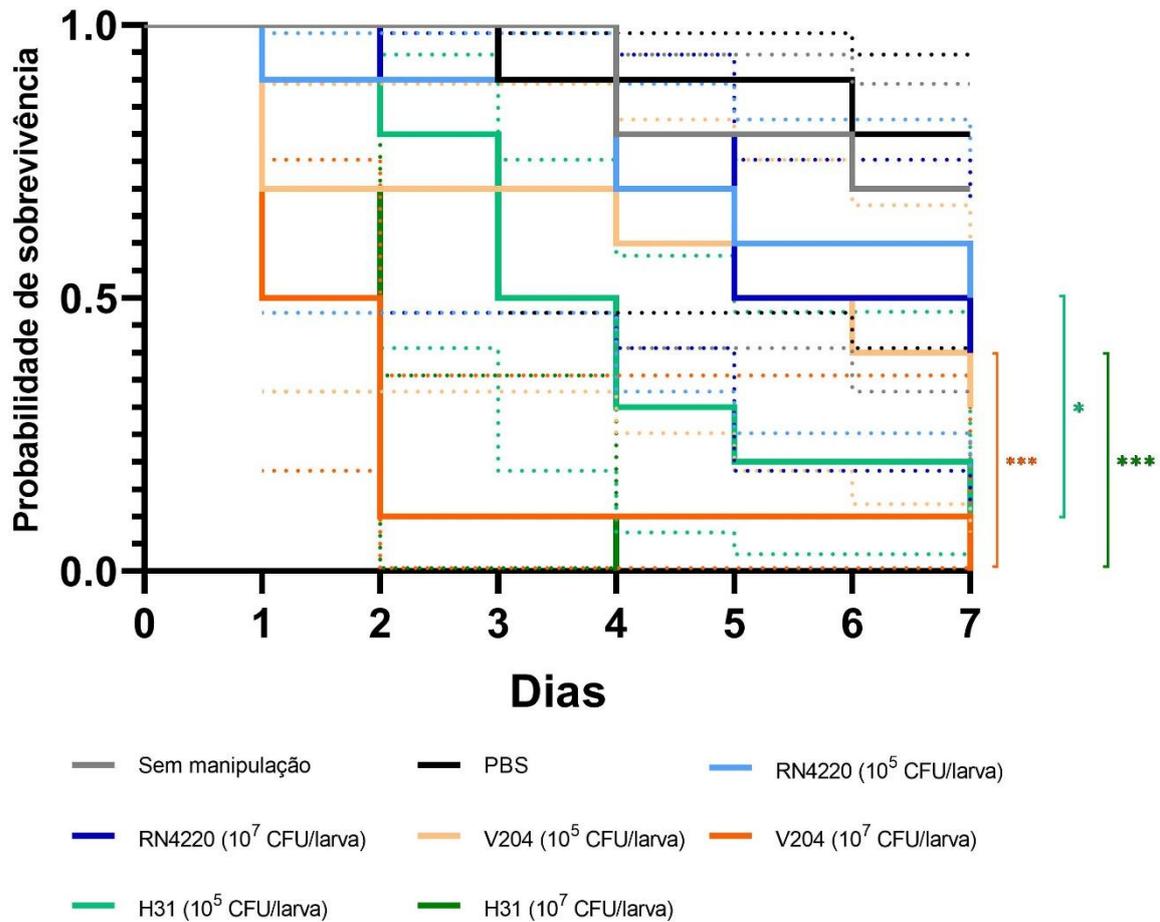


Figura 3.11: Curvas de sobrevivência de um ensaio com *G. mellonella* infectadas com as três estirpes de *S. aureus* associadas a SSTIs. Percentagem de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com as estirpes RN4220, BIOS-V204 e BIOS-H31 obtidas num ensaio. As linhas pontilhadas coloridas representam o intervalo de confiança a 95% estimado para cada curva de sobrevivência. As comparações estatisticamente significativas entre curvas de sobrevivência encontram-se assinaladas como $p < 0,05$ (*) e $p < 0,001$ (***)

Tal como observado anteriormente, todas as estirpes apresentaram um impacto negativo na sobrevivência de *G. mellonella*. Comparando as curvas de sobrevivência entre as três estirpes em estudo (considerando apenas inóculos equivalentes), foi possível verificar que a estirpe de origem animal BIOS-V204 apresenta uma letalidade significativamente superior a *S. aureus* RN4220, mas apenas para o inóculo a 10⁷ CFU/larva. Por sua vez, a estirpe de origem humana BIOS-H31 promoveu uma letalidade superior a RN4220, independentemente do inóculo testado. Por outro lado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a letalidade de *G. mellonella* quando infectadas com BIOS-V204 ou BIOS-H31. Os valores de significância das análises estatísticas realizadas encontram-se descritos na Tabela 3.3.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a
infecções de pele e tecidos moles

Tabela 3.3: Análise estatística dos ensaios de virulência em *G. mellonella* (ensaio em paralelo)

	CFU/larva	V204, CFU/larva		H31, CFU/larva	
		10 ⁵	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁷
RN4220	10 ⁵	<i>p</i> = 0,3502	nd	<i>p</i> = 0,0108	nd
	10 ⁷	nd	<i>p</i> = 0,0006	nd	<i>p</i> <0,0001
V204	10 ⁵	---	nd	<i>p</i> = 0,1480	nd
	10 ⁷	nd	---	nd	<i>p</i> = 0,8116

nd: não determinado

Em suma, estes resultados sugerem um potencial de virulência superior das estirpes de *S. aureus* associadas a SSTIs quando comparadas com uma estirpe de referência. Este potencial de virulência superior poderá dever-se a características genotípicas da linhagem clonal ST22-*agrI*.

4

Discussão e Conclusões

A espécie *S. aureus* é um dos principais agentes de infecção de pele e tecidos moles em humanos e em animais de companhia, como cães e gatos ^{1,2}. Esta espécie destaca-se como uma problema global de saúde pública devido à elevada capacidade de adaptação genética e à emergência e disseminação de estirpes resistentes aos antibióticos ¹⁶. Para além da problemática da resistência, *S. aureus* possui um vasto arsenal de fatores de virulência que desempenham um papel importante na patogénese deste agente ⁷³.

Várias características de *S. aureus* contribuem para o potencial de virulência, podendo estas ser específicas de linhagens clonais ¹⁵⁹. O sistema acessório regulador *agr* é um sistema *quorum-sensing*, ou seja, é ativado mediante um aumento da densidade populacional, que regula diretamente a expressão de diversos fatores de virulência ^{50,62}, como leucocidinas e toxinas, e que atua de forma indireta noutras características como a formação de biofilme ^{66,67}. Um dos fatores cuja expressão depende de *agr* é a PVL, a qual tem sido associada a SSTIs humana na comunidade ⁹¹. O papel de PVL para o processo de infecção é ainda controverso, havendo estudos contraditórios quanto à sua contribuição para infecções de pele ⁸⁹. Os biofilmes desempenham igualmente um papel importante na virulência de *S. aureus* e também na resistência aos antibióticos, estando associados a infecções de carácter crónico e resilientes à terapêutica.

Nesta dissertação pretendeu-se avaliar o potencial de virulência de estirpes de *S. aureus* associadas a SSTIs em humanos e em animais de companhia, relacionando estas características entre si e com as linhagens clonais e perfis de resistência aos antibióticos, de modo a se compreender o que contribui para o seu sucesso como agentes patogénicos nestes hospedeiros, num contexto de Uma Só Saúde.

Para atingir este objetivo foram estudadas duas coleções de *S. aureus* associadas a SSTIs em humanos e animais de companhia previamente caracterizadas quanto às linhagens clonais circulantes ¹³² e quanto aos perfis de resistência aos antibióticos ^{130,131}. A coleção de origem humana é constituída

maioritariamente por estirpes das linhagens clonais ST105, ST22 e ST8, das quais 44.1% são MDR, 44.1% MRSA e 35.3% são simultaneamente MDR e MRSA. A coleção de origem animal é constituída maioritariamente por estirpes das linhagens clonais ST22, ST5, ST398, das quais 9.0% são MDR, 34.8% são MRSA e 6.0% são simultaneamente MDR e MRSA.

Ambas as coleções foram sujeitas à tipificação do tipo de *agr* e avaliação de formação de biofilme. Os genes *lukS-PV/lukF-PV* e *icaADB* que codificam para a PVL e participam no processo de formação de biofilmes, respetivamente, foram pesquisados por PCR. Posteriormente, estirpes com características de interesse (produção de biofilme, linhagem clonal, resistência aos antibióticos) foram selecionadas para avaliar o seu potencial de virulência num modelo de infeção de *G. mellonella*.

4.1 Distribuição dos tipos de *agr* nas coleções em estudo

O sistema *agr* foi reconhecido como um regulador de virulência após demonstração em diversos modelos animais de que mutações neste operão apresentavam um efeito atenuador da virulência de *S. aureus*^{160,161}. Estes estudos demonstraram que a inativação do *locus agr* não elimina a capacidade de colonização e de infeção de *S. aureus*, mas reduz a incidência e a severidade da infeção¹⁶⁰.

Diversos estudos têm estabelecido relações entre o tipo de *agr* apresentado por uma estirpe e a capacidade de promover um tipo de infeção específico. Em particular, estirpes com tipo *agrI* e *agrII* têm sido associadas a endocardites¹⁵⁹, *agrIII* a síndrome do choque tóxico e a estirpes CA-MRSA^{159,162} e o tipo *agrIV* tem sido relacionado com toxinoses, como a síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso¹⁵⁹. A relação entre tipo de *agr* e perfil de resistência aos antibióticos tem sido também explorada, com alguns estudos a indicar uma associação entre os tipos *agrI* e *agrII* e a suscetibilidade reduzida a glicopéptidos^{163,164}.

Até ao início deste trabalho não tinha sido estabelecida uma relação entre infeções de pele e o tipo de *agr* das estirpes infetantes, tendo se verificado que nas coleções em estudo nesta Dissertação, associadas a SSTIs, o tipo *agrI* foi o mais frequente.

Contudo, estudos filogenéticos sugerem que as associações acima descritas refletem a diversificação de *agr* como um evento na história evolutiva de *S. aureus* que precedeu a emergência dos polimorfismos explorados nos esquemas de tipificação de MLST¹⁵⁴. Assim, existe uma relação entre os variantes alélicos de *agr* e as linhagens clonais, a qual pode ser estendida aos fatores de virulência por elas apresentados^{154,159}.

A coleção de origem humana estudada engloba estirpes associadas a SSTIs recolhidas num contexto ambulatorio na região de Lisboa em 2014, sendo esperado que a distribuição dos tipos de *agr* refletisse as linhagens clonais predominantes na comunidade. Estudos epidemiológicos conduzidos em Portugal têm mostrado uma elevada prevalência de estirpes HA-MRSA na comunidade, devido à disseminação dessas estirpes a partir de ambientes hospitalares^{33,39,165-167}. Um exemplo de uma possível via de

disseminação será a rede de transportes públicos que servem unidades hospitalares^{39,165}. Em particular, estudos efetuados num espaço temporal próximo ao da coleção aqui estudada, revelaram uma predominância das linhagens CC5 e CC22 quer na comunidade quer em ambiente hospitalar^{33,167}. A caracterização molecular prévia das estirpes aqui estudadas revelou que estas eram também as linhagens predominantes nessa coleção¹³². Os tipos de *agr* associados a estas linhagens são *agrI* (CC22) e *agrII* (CC5). De facto, e tal como esperado, a tipificação molecular do *agr* das estirpes de origem humana mostrou uma maior frequência de *agrI* e *agrII*.

Na coleção de amostras de origem animal, os tipos *agrI* e *agrII* foram igualmente os predominantes, estando *agrI* associado aos complexos clonais CC22, CC8 e CC398, e *agrII* ao complexo clonal CC5. Nesta coleção, os tipos de *agr* menos frequentes, *agrIII* e *agrIV*, encontraram-se associados às linhagens ST1(1) e ST121, respetivamente. Esta distribuição de tipos de *agr* em estirpes animais pode refletir a partilha de *S. aureus* entre humanos e estes hospedeiros na comunidade. De facto, vários estudos sugerem que o contato próximo entre humanos e animais de companhia e o crescente número de lares domésticos que incluem tais animais crie, cada vez mais, oportunidades de troca e partilha de estirpes das linhagens de *S. aureus* mais frequentes na comunidade, e por conseguinte, das características a si associadas (tipo de *agr*, presença de fatores de virulência, resistência aos antibióticos)¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

Como reportado noutros estudos epidemiológicos, os tipos de *agr* encontram-se associados a linhagens clonais específicas^{171,172}. Tal foi verificado neste trabalho, estando todos os complexos clonais presentes nestas coleções associados a um único tipo de *agr*, com exceção das linhagens do complexo clonal CC1, para o qual estirpes ST1 apresentam *agrIII*, enquanto estirpes ST188 e ST6565 pertencem ao *agrI*. Esta associação corrobora com o que se encontra descrito na literatura, que sugerem que as diferenças observadas para o CC1 podem ser explicadas por a linhagem ST188 divergir significativamente de outras linhagens do CC1¹⁷³. Para além disso, foi igualmente observada a relação entre tipo de *agr* e linhagem clonal, tendo ainda sido possível atribuir o tipo *agrI* à linhagem clonal ST6564, descrita pela primeira vez nesta coleção¹³².

Embora a vantagem seletiva conferida por determinadas combinações de fatores de virulência não seja clara, a emergência de um número limitado de clones sugere que estes tenham maior potencial para se estabelecer e disseminar na população. A elevada prevalência de determinadas linhagens clonais e suas características particulares pode refletir a capacidade que um microrganismo tem de competir com outras bactérias que colonizam o hospedeiro⁶⁸ ou de evasão às defesas do hospedeiro¹⁷⁴. Um estudo realizado por Mullarky *et al.* demonstra que os genótipos de *agr* prevalentes em ambas as coleções estudadas, *agrI* e *agrII*, contribuem de forma mais significativa para a evasão do sistema imunitário primário¹⁷⁴.

4.2 Presença dos genes *lukS-PV/lukF-PV*, que codificam para a PVL

Neste estudo, os genes *lukS-PV/lukF-PV* foram detetados em 9,0% (8/89) das estirpes de *S. aureus* analisadas, sendo estas classificadas como PVL-positivo. A presença destes genes mostrou ser mais frequente em estirpes de origem humana (20.6%) do que de origem animal (1.8%). Quando analisamos as amostras de origem humana, a frequência destes genes é semelhante à descrita por Conceição *et al.* (34%), num estudo em Portugal, compreendendo amostras humanas recolhidas de exclusivamente de SSTIs num contexto de ambulatório¹⁷⁵. A presença de PVL (*lukS-PV/lukF-PV*) está fortemente associada a SSTIs, como evidenciado por diversos estudos epidemiológicos conduzidos em diversas regiões geográficas, incluindo Portugal ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Em particular, esta evidência é mais acentuada em estirpes CA-MRSA, as quais aquando da sua emergência apresentavam quase invariavelmente este fator de virulência ⁹²

A PVL mostrou estar associada a necrose tecidual, podendo contribuir substancialmente para a furunculose ¹⁷⁸. Tem sido também demonstrado o seu impacto a nível das infeções pulmonares, como pneumonias necrotizantes em indivíduos jovens e saudáveis ¹⁷⁹.

Casos clínicos fatais de bacteriemia e pneumonia necrotizante têm sido reportados em indivíduos com histórico de SSTIs recorrentes ou contato próximo com outros indivíduos com este tipo de infeções ¹⁸⁰. Em particular, um historial de infeções superficiais, como furunculoses ¹⁸¹⁻¹⁸³, abscessos ^{183,184} e pápulas ¹⁸⁵, tem sido indicado como um fator de risco significativo para infeções graves e invasivas, como bacteriemia e pneumonia necrotizante por *S. aureus*.

Um estudo global conduzido por Rasigade *et al.*, revelou uma associação de PVL com estirpes das linhagens ST30, ST121, ST1, ST5, ST8 e ST80, sendo a PVL encontrada num número mais restrito de linhagens MRSA do que MSSA ¹⁸⁶. Em concordância com o demonstrado por Rasigade *et al.*, na coleção de estirpes de origem humana, os genes *lukS-PV/lukF-PV* foram detetados em estirpes MRSA pertencentes exclusivamente ao clone ST8 (CC8), enquanto já em estirpes MSSA foi detetado nas linhagens ST152 (CC152) e ST30 (CC30).

A exclusividade de estirpes MRSA-PVL-positivo em estudos realizados em Portugal também foi associada a linhagem clonal ST8 (CC8) por Tavares *et al.* ou a linhagem ST80 por Conceição *et al.* ^{33,175}. A Tabela 4.1 apresenta um resumo comparativo das principais características destes e outros estudos realizados em Portugal em estirpes de origem humana que reportam a frequência de estirpes de *S. aureus* PVL-positivo.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

Tabela 4.1: Quadro comparativo da caracterização molecular de estirpes PVL positivo em Portugal

Estirpes PVL+ Prevalência /ST(CC)	Tipo de infecção	Infeções na comunidade/ nosocomial	Localização e data de colheita	Referência
20.6%				
ST8 ST152 ST30	SSTIs	Infeções adquiridas na Comunidade	Lisboa 2014	Este estudo
36.8%				
ST30 ST5 ST152 ST1 ST80	SSTIs	Infeções adquiridas na Comunidade	Lisboa 2005-2006	175
3.2%				
ST8 ST121 ST1 ST2290 ST36 ST5	Infeções e colonizações	Infeções adquiridas na Comunidade	Norte, centro e sul de Portugal 2009-2010	33
Ausência de PVL	SSTIs	Infeções adquiridas na Comunidade	Norte e sul de Portugal 2010-2011	166
Ausência de PVL	Infeções e colonizações	Infeções nosocomiais	Lisboa, Porto, Braga, Coimbra e Portimão 2006	187
Ausência de PVL	Infeções	Infeções nosocomiais	Norte, centro e sul de Portugal 1993-2010	166

SSTIs: Infecções de pele e tecidos moles; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal.

Relativamente à coleção de origem animal, a única estirpe apresentando os genes *lukS-PV/lukF-PV* pertence à linhagem MSSA-ST121 e foi isolada de um coelho. Infecções em coelhos, por estirpes pertencentes a esta linhagem são muito frequentes ², como demonstrado num estudo realizado por Viana *et al.*, que incluía 178 coelhos com mastite crónica, em que 93,2% das estirpes infetantes pertenciam a ST121 ¹⁸⁸. Foi proposto que esta linhagem clonal tenha surgido em coelhos após transmissão humano-coelho, hospedeiro ao qual se adaptou após aquisição de uma mutação no gene

dltB, que codifica para uma proteína integral de membrana com função de D-alanização dos ácidos teicóicos, processo importante na resistência a péptidos catiónicos e na virulência ⁴⁵.

Vancraeynest *et al.* reportam que a maior parte das estirpes de elevada virulência em coelhos pertencem à linhagem ST121, evidenciando o risco da transmissão humano-animal na saúde animal ¹⁸⁹. Embora a coleção de amostras de origem humana analisada neste trabalho não incluía nenhuma estirpe desta linhagem, ela foi previamente descrita em infecções associadas à comunidade em Portugal num estudo realizado por Tavares *et al.*, como indicado na tabela 4.1.

No entanto, num estudo realizado em isolados com origem em coelhos de Portugal e Espanha não foram encontradas estirpes PVL positivo ¹⁹⁰.

A ausência de PVL em estirpes de *S. aureus* associadas a colonizações e infecções foi descrita em estudos realizados com amostras isoladas de cães ¹⁹¹⁻¹⁹³ e gatos ^{192,193} em Portugal.

Neste estudo não foram encontradas associações significativas entre o tipo de *agr* e a presença de PVL. Para além da possível associação entre PVL e linhagem clonal (ST-*agr*), seria de interesse perceber se há variação na produção de PVL consoante o tipo de *agr*. Para tal, são necessários estudos adicionais que comparem a expressão de PVL em diferentes *background* genéticos no que se refere a tipo de *agr*, para compreender se os variantes alélicos de *agr* influenciam de modo semelhante ou diferencial a expressão de *lukS-PV/lukF-PV*.

4.3 Análise da produção de biofilme nas coleções em estudo

4.3.1 Optimização de condições experimentais

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas ou adaptadas para estudar a produção de biofilmes. O método de violeta de cristal foi demonstrado como um método relevante para quantificar a biomassa total do biofilme ^{194,195}. Embora o protocolo incluía várias etapas, é uma metodologia relativamente fácil de ser realizada, de baixo custo, tendo como principais vantagens a versatilidade relativamente ao número de amostras e de condições que podem ser testadas simultaneamente ^{196,197}.

No entanto, este método tem como desvantagens não diferenciar células vivas de células mortas, a falta de padronização e a existência de muitas variáveis experimentais que podem causar variabilidade nos resultados, como temperatura, tempo de incubação e composição do meio de cultura ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Adicionalmente, as etapas de lavagem das placas, quando não realizadas de forma adequada, podem causar viés na estimativa da biomassa total do biofilme ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Estas últimas desvantagens evidenciam a importância de estudos de otimização para identificação das melhores condições experimentais, reduzindo a variabilidade de resultados, aumentando a reprodutibilidade e facilitando a comparação intra- e inter-laboratorial de resultados.

Apesar de não serem compreendidos todos os mecanismos envolvidos na regulação dos biofilmes, tem sido demonstrado que para ser possível a quantificação da capacidade de produção de biofilme “*in vitro*” é necessário suplementar o meio de crescimento com glucose e/ ou outros compostos, como o NaCl ^{142,200,201}.

Desta forma, a maior parte dos estudos realizados para avaliar a capacidade de produção de biofilme em *S. aureus* envolvem a suplementação dos meios de cultura com glucose e NaCl ^{66,105,152,153,202}.

A presença de glucose no meio de crescimento induz a secreção de metabolitos ácidos, diminuindo o pH extracelular ^{72,203} e, indiretamente inibindo a expressão de RNAlII ^{72,203}, o qual está associado a uma repressão da expressão de adesinas de superfície ^{54,62}, garantindo assim condições que promovem a produção de biofilme. A presença de NaCl implica um aumento na osmolaridade no meio, que pode induzir uma maior expressão do operão *ica* e consequente maior produção de biofilme ²⁰⁴. Como exemplo, o fator *rbf* parece controlar a produção de biofilme como resposta ao NaCl numa concentração de NaCl superior a 1.6% mas não em concentrações inferiores a esta, indicando que vários fatores estão envolvidos neste processo ¹²⁰.

4.3.2 Avaliação da capacidade de produção de biofilme nas coleções em estudo

A produção de biofilmes por *S. aureus* é um dos principais fatores que contribuem para a falha terapêutica e infecções recorrentes ^{103,104}, incluindo infecções de pele e tecidos moles ^{103,205,206}. Smith *et al.* descreveram que, em humanos, os isolados recolhidos de pele apresentavam maior capacidade de produção de biofilmes do que isolados recolhidos de outros locais do corpo ²⁰⁵. Por sua vez, Kwiecinski *et al.* sugerem que a produção de biofilmes por *S. aureus* é um comportamento universal, cuja detecção depende do meio em que a bactéria se encontra ²⁰⁷.

No presente estudo, a produção de biofilme foi uma característica frequente das estirpes associadas a humanos (53%) ou animais (71%). Foi também observado que apenas 9% das estirpes de origem humana e 24% das estirpes de origem animal foram classificadas como produtoras de biofilme na ausência ou presença de NaCl, demonstrando que para a maior parte das estirpes, a produção de biofilme é dependente das condições do meio. De um modo geral, as estirpes de origem animal mostraram uma melhor capacidade de produção de biofilme na ausência de NaCl (33% produtores de biofilme na ausência de NaCl vs. 15% na presença de NaCl). Em oposição, as estirpes de origem humana apresentaram maior frequência de produção de biofilme na presença de NaCl (6% na ausência de NaCl vs. 38% na presença de NaCl). O efeito do NaCl na produção de biofilme pode ser observado não só na categorização das estirpes, mas também no nível de biofilme produzido (valor de DO_{final}), tendo sido registada a mesma proporção de estirpes para as quais aumentou ou diminuiu a produção de biofilme (Figura 3.6).

A variação provocada pela suplementação do meio com NaCl pode estar relacionada com o estímulo da transcrição génica ou do metabolismo celular, que podem variar nas diferentes estirpes²⁰⁸.

De facto, uma fração significativa das estirpes para as quais se registou um aumento da formação de biofilme com NaCl, resultando em variação da categorização não produtor/produzidor, pertencem aos complexos clonais CC5 (21%) e CC8 (21%), enquanto a maioria das estirpes que sofreu redução do seu biofilme na presença de NaCl pertence ao CC22.

De acordo com a literatura, a capacidade de produzir biofilmes não parece estar relacionada com a resistência à metilina ^{205,209}. Suportando estes estudos, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a produção de biofilme e estirpes MRSA, independentemente da origem da coleção. A mesma falta de associação se verificou para produção de biofilme e multirresistência.

No entanto, foi possível observar, entre as estirpes com variação na categorização, uma maior tendência das estirpes MSSA para produzir biofilmes apenas na presença de NaCl (12 de 19 estirpes) em relação às estirpes MRSA (9 de 22 estirpes). Outros estudos têm evidenciado um maior efeito do NaCl sob estirpes MSSA, apesar de esse efeito parecer ser dependente de concentração. Em particular, Sugimoto *et al.* demonstraram que uma concentração de 4% de NaCl induziu a formação de biofilme por estirpes MSSA ¹⁴⁹. No entanto, no estudo de Lade *et al.*, esta relação não foi observada na presença de 1 e 2% de NaCl ²⁰².

Esta discrepância possivelmente reflete as diferentes concentrações de NaCl utilizadas e estas observações poderão ser parcialmente explicadas pelo estudo de O'Neill *et al.*, o qual sugere que, em estirpes MSSA, o mecanismo de formação de biofilme dependente de *ica*, e sob regulação do regulador global SarA, o NaCl tem um papel importante ²¹⁰. Assim, estirpes MSSA sofreriam um maior impacto por variações na concentração de NaCl do que estirpes MRSA (para as quais a formação de biofilme pela via independente de *ica* parece ser importante).

O operão *ica* foi encontrado em todos os isolados, o que coincide com o descrito por outros estudos ^{117,211}. No entanto, outros estudos apresentaram uma menor frequência de *ica*, na ordem dos 61% ¹¹⁸. Esta discrepância pode ser explicada devido à divergência nucleotídica entre os “primers” utilizados, desenhados com base na sequência do operão *icaADBC* da estirpe *S. epidermidis* RP62A²¹².

Neste estudo não foram encontradas associações significativas entre os tipos de *agr* e a classificação de não produtor ou produtor de biofilme. No entanto, esta associação é controversa na comunidade científica. Alguns estudos, assim como este, não encontraram relação entre a produção de biofilmes e o tipo de *agr*^{213,214}. Porém, outros estudos sugerem que uma maior produção de biofilmes poderá estar associada ao *agrIII*^{215,216} ou ao *agrII*^{217,218}. Por sua vez, o tipo *agrI* já foi associado a uma menor capacidade de formação de biofilme ²¹⁹.

Uma das principais limitações destes estudos, que podem estar na origem da ausência de associação entre tipo de *agr* e produção de biofilme ou que levam a associações a *agr* diferentes é a análise de coleções com prevalência dos tipos de *agr* muito diversificada. De forma a contornar esta limitação, devem ser considerados estudos com amostragem significativa dos quatro tipos de *agr* para melhor compreensão do impacto do *agr* na capacidade de formação de biofilmes.

Neste estudo, as linhagens clonais de maior relevância, tanto em infecções de origem humana como animal (ST8, ST398, ST22 e ST5), apresentaram elevada prevalência de estirpes capazes de produzir biofilme, com 57% a 90% de estirpes classificadas como produtor refletindo o potencial destas linhagens para originar infecções crônicas associadas a produção de biofilmes.

4.4 Modelo de infecção em *G. mellonella*

O modelo de infecção em *G. mellonella* tem sido utilizado para o estudo de *S. aureus* no âmbito da eficácia de agentes antimicrobianos e do seu potencial de virulência, assim como alterações deste potencial em consequência de mutações específicas¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.

Estes estudos seguem uma metodologia relativamente padronizada, com inóculos entre os 10⁵ e 10⁷ CFU/larva, dois grupos controlos (sem manipulação e com injeção de PBS), *G. mellonella* em estado larval tardio e injeção do inoculo numa das patas falsas traseiras¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. As principais variações entre estudos ocorrem nas temperaturas pré-ensaio, com temperaturas de armazenamento desde de 4^o C a 48^o C, e no número de larvas por grupo de estudo, com a utilização de 15 a 30 larvas por grupo¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.

Apesar das vantagens de rapidez, custos, e a nível ético, uma vez que permite a redução da experimentação em modelos de mamíferos, o modelo de infecção em *G. mellonella* ainda não se encontra tão bem estabelecido, e não estão estabelecidos métodos para geração de mutações ou acesso a bibliotecas de microarrays ou RNA de interferência¹⁴³. Outra grande desvantagem é a existência limitada de centros especializados na venda de *G. mellonella* para fins de investigação. Desta forma as larvas utilizadas em muitos estudos são compradas em fornecedores especializados na criação desta espécie para alimento de répteis¹⁴³, o que implica diferenças genotípicas e condições de criação e manutenção não controladas, que podem influenciar a suscetibilidade a infecções¹⁴³.

Mesmo após a compra, as condições de manutenção e os procedimentos científicos podem variar entre laboratórios. Parâmetros como a temperatura, fonte de luz e alimentação, podem influenciar os resultados obtidos nestes ensaios^{146,220,221}.

A utilização deste modelo para selecionar estirpes e/ou agente antibacterianos pode contribuir significativamente para a redução da experimentação em modelos de mamíferos.

A análise das curvas de sobrevivência mostra que existe uma redução significativa no número de larvas quando infetadas com *S. aureus*, independentemente da estirpe, em comparação aos controlos sem manipulação ou inoculadas apenas com PBS. Este processo infeccioso foi identificado através da observação de melanização nas larvas, sinal importante que indica processo infeccioso em insetos¹⁴³. Adicionalmente, Peleg *et al.*, através da inoculação de células mortas de *S. aureus*, demonstrou que a mortalidade observada neste modelo não ocorre por reações não infecciosas¹⁵⁶.

A mortalidade muito reduzida e espaçada no tempo observada no controlo com PBS permite garantir que a mortalidade observada com as estirpes em estudo não resulta de lesões provocadas pela

inoculação da larva. Apesar de existirem outros métodos para induzir infecção nestes organismos, como a aplicação tópica ou através da alimentação, a injeção direta tem vantagens importantes, como o controlo do tempo de infecção e a dosagem do agente patogénico em estudo¹⁴⁵.

A análise das curvas de sobrevivência e dos testes aplicados também demonstra uma associação entre a letalidade e a concentração do inóculo injetado, com um aumento significativo do número de mortes com inoculação com 10^7 CFU/larva, comparativamente ao inóculo com 10^5 . Este comportamento foi também observado neste modelo de infecção por Desbois e Coote ¹⁵⁵.

Através da comparação num ensaio paralelo entre a estirpe RN4220 e as estirpes clínicas, BIOS-H31/MRSA-ST22-*agrI* (origem humana) e BIOS-V204/MRSA-ST22-*agrI* (origem animal), foi possível observar uma letalidade significativamente superior por parte das estirpes clínicas em comparação à estirpe RN4220. O elevado potencial de virulência identificado nestas estirpes reflete o sucesso das mesmas em SSTIs.

4.5 Conclusões

Através deste estudo foi possível analisar fatores de virulência importantes em linhagens clonais associadas a SSTIs em humanos e animais de companhia.

Em suma, tanto em amostras de origem humana como animal as estirpes associadas a SSTIs apresentam maioritariamente sistema de regulação *agrI* ou *agrII*. A tipagem deste sistema de regulação demonstrou que os tipos de *agr* estão associados a linhagens clonais específicas. A presença da leucotoxina PVL foi encontrada com maior frequência em amostras de origem humana, estando associada exclusivamente à linhagem clonal ST8-*agrI* em estirpes MRSA e a uma maior diversidade de linhagens clonais (ST152-*agrI*, ST30-*agrIII* e ST121-*agrIV*) em estirpes MSSA. Adicionalmente, foi demonstrado que *S. aureus* associadas a SSTIs são maioritariamente capazes de produzir biofilmes e que a suplementação do meio de cultura com NaCl tem efeito divergente em diferentes estirpes.

Através do modelo de infecção em *G. mellonella* foi possível verificar um elevado potencial de virulência de estirpes da linhagem ST22-*agrI*, linhagem mais prevalente em ambas as coleções em estudo. A conjugação destes resultados com a elevada capacidade de produção de biofilmes e fenótipos de resistência MRSA/MDR, podem potenciar infecções com carácter crónico e associadas a falha terapêutica. A possível circulação destas estirpes entre humanos e animais aumenta esta preocupação e evidencia a necessidade de uma abordagem Uma Só Saúde no estudo das infecções causadas por *S. aureus*.

Referências

- 1 Ortwine JK, Bhavan K. Morbidity, mortality, and management of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia in the USA: update on antibacterial choices and understanding. *Hosp Pract (1995)* 2018; **46**: 64–72.
- 2 Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR. *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiol Spectr* 2019; **7**. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019.
- 3 Parte AC. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; **68**: 1825–1829.
- 4 Becker K, Skov RL, von Eiff C. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS *et al.* (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 2015 doi:https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch21.
- 5 Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 751–762.
- 6 Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018; **31**:e00020-18. doi:10.1128/CMR.00020-18.
- 7 Pantosti A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. *Front. Microbiol.* 2012; **3**: 127.
- 8 Loeffler A, Lloyd DH. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiol Infect* 2010; **138**: 595–605.
- 9 Wilson BA, Winkler ME, Ho BT. The Gram-Positive Opportunistic Pathogens. In: *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. ASM Press, 2019 doi:10.1128/9781555819415.
- 10 Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VGJ. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 603–661.
- 11 Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 2019; **17**: 203–218.
- 12 Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbial Diseases of the Skin and Eyes. In: *Microbiology: An Introduction*. Pearson, 2010.
- 13 Peton V, Le Loir Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2014; **21**: 602–615.
- 14 Neushul P. Science, Government and the Mass Production of Penicillin. *J Hist Med Allied Sci*

- 1993; **48**: 371–395.
- 15 Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J* 2015; **56**: 366–367.
- 16 Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev* 2017; **41**: 430–449.
- 17 WHO Regional Office for Europe and European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2020 data. Executive Summary. 2021.
- 18 Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care* 2017; **21**: 211.
- 19 Brown NM, Brown EM. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**: 1377–1378.
- 20 Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti F *et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European. *Eur Heart J* 2015; **36**: 3075–3128.
- 21 Sobral R, Tomasz A. The Staphylococcal Cell Wall. *Microbiol Spectr* 2019; **7**: 7.4.12.
- 22 McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 2018; **6**: 6.2.10.
- 23 Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E *et al.* Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 957–968.
- 24 Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehrlich R, Schwarz S, Kadlec K. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Int J Med Microbiol* 2013; **303**: 338–349.
- 25 Schwarz S, Feßler AT, Lončarić I, Wu C, Kadlec K, Wang Y *et al.* Antimicrobial Resistance among Staphylococci of Animal Origin. *Microbiol Spectr* 2018; **6**. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0010-2017.
- 26 Couto N, Monchique C, Belas A, Marques C, Gama LT, Pomba C. Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1479–1487.
- 27 Uhlemann A-C, Otto M, Lowy FD, DeLeo FR. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2014; **21**: 563–574.
- 28 European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017*. 2018 doi:10.2900/296939.
- 29 David MZ, Cadilla A, Boyle-Vavra S, Daum RS. Replacement of HA-MRSA by CA-MRSA infections at an academic medical center in the midwestern United States, 2004-5 to 2008. *PLoS One* 2014; **9**: e92760.
- 30 Kouyos R, Klein E, Grenfell B. Hospital-community interactions foster coexistence between methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 2013; **9**: e1003134.
- 31 Popovich KJ, Snitkin ES, Hota B, Green SJ, Pirani A, Aroutcheva A *et al.* Genomic and Epidemiological Evidence for Community Origins of Hospital-Onset Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *J Infect Dis* 2017; **215**: 1640–1647.
- 32 Diekema DJ, Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Tendolkar S *et al.* Continued emergence of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States:

- results from a nationwide surveillance study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014; **35**: 285–292.
- 33 Tavares A, Miragaia M, Rolo J, Coelho C, de Lencastre H. High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community-hospital boundaries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; **32**: 1269–1283.
- 34 Mollaghan AM, Lucey B, Coffey A, Cotter L. Emergence of MRSA clone ST22 in healthy young adults in the community in the absence of risk factors. *Epidemiol Infect* 2010; **138**: 673–676.
- 35 Tinelli M, Monaco M, Vimercati M, Ceraminiello A, Pantosti A. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in skin and soft tissue infections, Northern Italy. *Emerg Infect Dis* 2009; **15**: 250–257.
- 36 Aires-de-Sousa M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clin Microbiol* 2017; **23**: 373–380.
- 37 Grundmann H, Schouls LM, Aanensen DM, Pluister GN, Tami A, Chlebowicz M *et al*. The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: results of a second structured survey. *Euro Surveill Bull* 2014; **19**. doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.49.20987.
- 38 Aanensen DM, Feil EJ, Holden MTG, Dordel J, Yeats CA, Fedosejev A *et al*. Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive *Staphylococcus aureus* in Europe. *MBio* 2016; **7**. doi:10.1128/mBio.00444-16.
- 39 Conceição T, Diamantino F, Coelho C, de Lencastre H, Aires-de-Sousa M. Contamination of Public Buses with MRSA in Lisbon, Portugal: A Possible Transmission Route of Major MRSA Clones within the Community. *PLoS One* 2013; **8**: e77812.
- 40 Marc S, Thierry W, S. AP, L. SR, Anna DG, Martins SP *et al*. Origin and Evolution of European Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* 2021; **5**: e01044-14.
- 41 Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H, A. FN *et al*. Analysis of Typing Methods for Epidemiological Surveillance of both Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 136–144.
- 42 Rolo J, Miragaia M, Turlej-Rogacka A, Empel J, Bouchami O, Faria NA *et al*. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PLoS One* 2012; **7**: e34768.
- 43 Vincze S, Stamm I, Kopp PA, Hermes J, Adlhoch C, Semmler T *et al*. Alarming proportions of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wound samples from companion animals, Germany 2010-2012. *PLoS One* 2014; **9**: e85656.
- 44 Petinaki E, Spiliopoulou I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection risks from companion animals: current perspectives. *Vet Med* 2015; **6**: 373–382.
- 45 Viana D, Comos M, McAdam PR, Ward MJ, Selva L, Guinane CM *et al*. A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host tropism. *Nat Genet* 2015; **47**: 361–366.
- 46 Schijffelen MJ, Boel CHE, van Strijp JAG, Fluit AC. Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* 2010; **11**: 376.
- 47 Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1988; **170**: 4365–4372.
- 48 Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* 1986; **202**: 58–61.
- 49 Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S *et al*. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol* 2001; **183**: 7341–7353.

**Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a
infecções de pele e tecidos moles**

- 50 Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol* 2015; **6**: 1174.
- 51 Papakyriacou H, Vaz D, Simor A, Louie M, McGavin MJ. Molecular Analysis of the Accessory Gene Regulator (*agr*) Locus and Balance of Virulence Factor Expression in Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2000; **181**: 990–1000.
- 52 Liu GY. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr Res* 2009; **65**: 71R-77R.
- 53 Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal *agr* alleles. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69**: 18–23.
- 54 Waters C, Bassler B. Waters CM, Bassler BL. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; **21**: 319–346.
- 55 Ji G, Beavis RC, Novick RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 12055–12059.
- 56 Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 1993; **12**: 3967–3975.
- 57 Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B *et al*. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 446–458.
- 58 Saenz HL, Augsburg V, Vuong C, Jack RW, Götz F, Otto M. Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch Microbiol* 2000; **174**: 452–455.
- 59 Linsheng Z, Guangyong J. Identification of a Staphylococcal AgrB Segment(s) Responsible for Group-Specific Processing of AgrD by Gene Swapping. *J Bacteriol* 2004; **186**: 6706–6713.
- 60 Kavanaugh JS, Thoendel M, Horswill AR. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol Microbiol* 2007; **65**: 780–798.
- 61 Lina G, Jarraud S, Ji G, Greenland T, Pedraza A, Etienne J *et al*. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 655–662.
- 62 Jayaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* 2008; **10**: 145–167.
- 63 Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach T-HL, Khan BA, Sturdevant DE *et al*. RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell* 2008; **32**: 150–158.
- 64 Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, Smeltzer MS, Hurlburt BK. *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-*agr* regulatory region. *J Bacteriol* 2004; **186**: 7549–7555.
- 65 Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. Impact of the *agr* Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2000; **182**: 1688–1693.
- 66 Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004; **186**: 1838–1850.
- 67 Boles BR, Horswill AR. *agr*-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLOS Pathog* 2008; **4**: e1000052.
- 68 Ji G, Beavis R, Novick RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 1997; **276**: 2027–2030.
- 69 Otto M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones

- produced by the accessory gene regulator *agr* system. *Peptides* 2001; **22**: 1603–1608.
- 70 Heinrichs JH, Bayer MG, Cheung AL. Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 418–423.
- 71 Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2001; **183**: 1113–1123.
- 72 Regassa LB, Novick RP, Betley MJ. Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1992; **60**: 3381–3388.
- 73 Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* 2021; **12**: 547–569.
- 74 Lindsay JA, Holden MTG. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol* 2004; **12**: 378–385.
- 75 Kläui AJ, Boss R, Graber HU, Federle MJ. Characterization and Comparative Analysis of the *Staphylococcus aureus* Genomic Island *vSaß*: an *In Silico* Approach. *J Bacteriol* 2019; **201**: e00777-18.
- 76 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**: 2426–2438.
- 77 Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GYC, Otto M. Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? *Commun Integr Biol* 2012; **5**: 275–277.
- 78 Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M *et al*. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 2007; **13**: 1510–1514.
- 79 Tavares A, Nielsen JB, Boye K, Rohde S, Paulo AC, Westh H *et al*. Insights into alpha-hemolysin (Hla) evolution and expression among *Staphylococcus aureus* clones with hospital and community origin. *PLoS One* 2014; **9**: e98634–e98634.
- 80 Tan L, Li SR, Jiang B, Hu XM, Li S. Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) System. *Front Microbiol* 2018; **9**: 55.
- 81 Bronner S, Monteil H, Prévost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 2004; **28**: 183–200.
- 82 David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010; **23**: 616–687.
- 83 Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 43–54.
- 84 Löffler B, Niemann S, Ehrhardt C, Horn D, Lanckohr C, Lina G *et al*. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia: the role of PVL and an influenza coinfection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; **11**: 1041–1051.
- 85 Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr* 2019; **7**. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
- 86 Meunier O, Falkenrodt A, Monteil H, Colin DA. Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* 1995; **21**: 241–247.
- 87 Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC *et al*. The staphylococcal

- toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 2013; **13**: 584–594.
- 88 Ma X, Chang W, Zhang C, Zhou X, Yu F. Staphylococcal Panton-Valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa B activation in neutrophils. *PLoS One* 2012; **7**: e34970.
- 89 Nawrotek P, Karakulska J, Fijałkowski K. The Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin (PVL). In: *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*. Academic Press 2018, pp 117–125.
- 90 Zhao H, Hu F, Jin S, Xu X, Zou Y, Ding B *et al.* Typing of Panton-Valentine Leukocidin-Encoding Phages and *lukSF-PV* Gene Sequence Variation in *Staphylococcus aureus* from China. *Front Microbiol* 2016; **7**: 1200.
- 91 Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G *et al.* *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* 2010; **6**: e1000715.
- 92 Tromp AT, van Strijp JAG. Studying Staphylococcal Leukocidins: A Challenging Endeavor. *Front Microbiol* 2020; **11**: 611.
- 93 Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC *et al.* Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Panton–Valentine leukocidin. *Nat Microbiol* 2018; **3**: 708–717.
- 94 Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D *et al.* Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis* 2006; **194**: 1761–1770.
- 95 Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat. Med.* 2007; **13**: 1405–1406.
- 96 Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, Dumitrescu O, Badiou C, Duchateau L *et al.* Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. *PLoS One* 2011; **6**: e22864–e22864.
- 97 Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D *et al.* Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* 2011; **204**: 937–941.
- 98 Diep BA, Palazzolo-Ballance AM, Tattevin P, Basuino L, Braughton KR, Whitney AR *et al.* Contribution of Panton-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One* 2008; **3**: e3198.
- 99 Diep B, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin T, Basuino L *et al.* Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 5587–5592.
- 100 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**: 1318–1322.
- 101 Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 2016; **14**: 563–575.
- 102 Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Microbial Ecosystems. In: *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson, 2015.
- 103 Attinger C, Wolcott R. Clinically Addressing Biofilm in Chronic Wounds. *Adv wound care* 2012; **1**: 127–132.
- 104 Becker P, Hufnagle W, Peters G, Herrmann M. Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 2958–2965.

- 105 Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ *et al.* Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004; **186**: 4665–4684.
- 106 Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**: 277–281.
- 107 Tortora G, Funke B, Case C. Microbial Growth. In: *Microbiology, an Introduction*. Pearson, 2010.
- 108 Berne C, Ellison CK, Ducret A, Brun Y V. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat Rev Microbiol* 2018; **16**: 616–627.
- 109 Foster TJ. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. *Trends Microbiol* 2019; **27**: 927–941.
- 110 Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* 2001; **69**: 3423–3426.
- 111 Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput Struct Biotechnol J* 2020; **18**: 3324–3334.
- 112 Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr* 2018; **6**. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.
- 113 Gerke C, Kraft A, Süssmuth 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**: 18586–18593.
- 114 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**: 1083–1091.
- 115 Cue D, Lei M, Lee C. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; **2**: 38.
- 116 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**: 5427–5433.
- 117 Fowler VGJ, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol* 2001; **189**: 127–131.
- 118 Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2151–2156.
- 119 Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprosthetic infections. *Diagn Mol Pathol* 2001; **10**: 130–137.
- 120 Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 722–729.
- 121 Conlon KM, Humphreys H, O’Gara JP. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 2002; **184**: 4400–4408.
- 122 Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathog (Basel, Switzerland)* 2013; **2**: 288–356.
- 123 Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014; **78**: 510–543.

- 124 Bjarsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K *et al.* Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound repair* 2008; **16**: 2–10.
- 125 James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E deLancey, Secor P, Sestrich J *et al.* Biofilms in chronic wounds. *Wound repair* 2008; **16**: 37–44.
- 126 Seth AK, Geringer MR, Hong SJ, Leung KP, Mustoe TA, Galiano RD. *In vivo* modeling of biofilm-infected wounds: a review. *J Surg Res* 2012; **178**: 330–338.
- 127 Thomson CH. Biofilms: do they affect wound healing? *Int Wound J* 2011; **8**: 63–67.
- 128 Akiyama H, Huh W-K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in mouse skin: does *S. aureus* generally produce a biofilm on damaged skin? *Br J Dermatol* 2002; **147**: 879–885.
- 129 Akiyama H, Huh W-K, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* 2003; **148**: 526–532.
- 130 Ferreira C, Costa SS, Serrano M, Oliveira K, Trigueiro G, Pomba C *et al.* Clonal Lineages, Antimicrobial Resistance, and PVL Carriage of *Staphylococcus aureus* Associated to Skin and Soft-Tissue Infections from Ambulatory Patients in Portugal. *Antibiotics* 2021; **10**. doi:10.3390/antibiotics10040345.
- 131 Ribeiro R. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de animais de companhia. Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa; 2020.
- 132 Serrano M. Molecular characterization of staphylococci associated with skin and soft tissue infections. Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa; 2020.
- 133 Ferreira MCS. A resistência a biocidas e antibióticos tópicos em *Staphylococcus aureus* de origem humana. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa; 2020.
- 134 Bae T, Glass EM, Schneewind O, Missiakas D. Generating a collection of insertion mutations in the *Staphylococcus aureus* genome using *bursa aurealis*. *Methods Mol Biol* 2008; **416**: 103–116.
- 135 Fey PD, Endres JL, Yajjala VK, Widhelm TJ, Boissy RJ, Bose JL *et al.* A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *MBio* 2013; **4**: e00537-12.
- 136 Soni I, Chakrapani H, Chopra S. Draft Genome Sequence of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announc* 2015; **3**. doi:10.1128/genomeA.01095-15.
- 137 Treangen TJ, Maybank RA, Enke S, Friss MB, Diviak LF, Karaolis DKR *et al.* Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome Announc* 2014; **2**. doi:10.1128/genomeA.01110-14.
- 138 Dhanalakshmi N, Guido M, David H, Jonathan B, Marie B, Steven G *et al.* Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain rn4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *J Bacteriol* 2011; **193**: 2332–2335.
- 139 MacLea KS, Trachtenberg AM. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 Chromosome and Plasmids, Generated by Long-Read Sequencing. *Genome Announc* 2017; **5**. doi:10.1128/genomeA.00954-17.
- 140 Alexopoulou K, Foka A, Petinaki E, Jelastopulu E, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of

- the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. *Lett Appl Microbiol* 2006; **43**: 450–454.
- 141 Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; **40**: 175–179.
- 142 Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; **115**: 891–899.
- 143 Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. *Galleria Mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 2016; **7**: 214–229.
- 144 Harding CR, Schroeder GN, Collins JW, Frankel G. Use of *Galleria Mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection. *J Vis Exp* 2013; : e50964.
- 145 Fredericks LR, Lee MD, Roslund CR, Crabtree AM, Allen PB, Rowley PA. The design and implementation of restraint devices for the injection of pathogenic microorganisms into *Galleria Mellonella*. *PLoS One* 2020; **15**: e0230767.
- 146 Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria Mellonella* larvae to infection. *Virulence* 2012; **3**: 497–503.
- 147 Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 2006; **24**: 25–29.
- 148 Tan H, Peng Z, Li Q, Xu X, Guo S, Tang T. The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant *Staphylococcus*. *Biomaterials* 2012; **33**: 365–377.
- 149 Sugimoto S, Sato F, Miyakawa R, Chiba A, Onodera S, Hori S *et al.* Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 2018; **8**: 2254.
- 150 Li H, Xu L, Wang J, Wen Y, Vuong C, Otto M *et al.* Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun* 2005; **73**: 3188–3191.
- 151 Zhang Y-Q, Ren S-X, Li H-L, Wang Y-X, 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**: 1577–1593.
- 152 Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS *et al.* The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 8113–8118.
- 153 Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun* 2003; **71**: 4206–4211.
- 154 Wright JS, Traber KE, Corrigan R, Benson SA, Musser JM, Novick RP. The *agr* Radiation: an Early Event in the Evolution of Staphylococci. *J Bacteriol* 2005; **187**: 5585–5594.
- 155 Desbois AP, Coote PJ. Wax moth larva (*Galleria Mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1785–1790.
- 156 Peleg AY, Monga D, Pillai S, Mylonakis E, Moellering RCJ, Eliopoulos GM. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* 2009; **199**: 532–536.
- 157 Quiblier C, Seidl K, Roschitzki B, Zinkernagel AS, Berger-Bächi B, Senn MM. Secretome analysis defines the major role of SecDF in *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS One* 2013; **8**: e63513–e63513.
- 158 Howden BP, McEvoy CRE, Allen DL, Chua K, Gao W, Harrison PF *et al.* Evolution of Multidrug

- Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalkR. *PLOS Pathog* 2011; **7**: e1002359.
- 159 Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F *et al.* Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; **70**: 631–641.
- 160 Gillaspay AF, Hickmon SG, Skinner RA, Thomas JR, Nelson CL, Smeltzer MS. Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect Immun* 1995; **63**: 3373–3380.
- 161 Abdelnour A, Arvidson S, Bremell T, Rydén C, Tarkowski A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* 1993; **61**: 3879–3885.
- 162 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**: 978–984.
- 163 Verdier I, Reverdy M-E, Etienne J, Lina G, Bes M, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to glycopeptides belong to accessory gene regulator group I or II. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1024–1027.
- 164 Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RCJ, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP *et al.* Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1492–1502.
- 165 Simões RR, Aires-de-Sousa M, Conceição T, Antunes F, da Costa PM, de Lencastre H. High Prevalence of EMRSA-15 in Portuguese Public Buses: A Worrying Finding. *PLoS One* 2011; **6**: e17630.
- 166 Espadinha D, Faria N, Miragaia M, Lito L, Melo-Cristino J, Lencastre H *et al.* Extensive Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the Hospital and the Community in a Country with a High Prevalence of Nosocomial MRSA. *PLoS One* 2013; **8**: e59960.
- 167 Faria NA, Miragaia M, de Lencastre H. Massive dissemination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in bloodstream infections in a high MRSA prevalence country: establishment and diversification of EMRSA-15. *Microb Drug Resist* 2013; **19**: 483–490.
- 168 Day MJ, Breitschwerdt E, Cleaveland S, Karkare U, Khanna C, Kirpensteijn J *et al.* Surveillance of Zoonotic Infectious Disease Transmitted by Small Companion Animals. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: e1–e1.
- 169 Halliday JEB, Meredith AL, Knobel DL, Shaw DJ, Bronsvort BM de C, Cleaveland S. A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. *J R Soc Interface* 2007; **4**: 973–984.
- 170 Chomel BB, Sun B. Zoonoses in the bedroom. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 167–172.
- 171 Wright JS 3rd, Jin R, Novick RP. Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 1691–1696.
- 172 Monecke S, Slickers P, Ehrlich R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; **53**: 237–251.
- 173 Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA, Stabler RA *et al.* Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol* 2006; **188**: 669–676.
- 174 Mullarky IK, Su C, Frieze N, Park YH, Sordillo LM. *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun*

- 2001; **69**: 45–51.
- 175 Conceição T, Aires-de-Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, Coelho R *et al.* High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; **30**: 293–297.
- 176 Shallcross LJ, Williams K, Hopkins S, Aldridge RW, Johnson AM, Hayward AC. Pantone-Valentine leukocidin associated staphylococcal disease: a cross-sectional study at a London hospital, England. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 1644–1648.
- 177 Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, Bruden D, Reasonover A, Parkinson A *et al.* Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Pantone-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis* 2004; **189**: 1565–1573.
- 178 Rankin S, Roberts S, O’Shea K, Maloney D, Lorenzo M, Benson CE. Pantone valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *Vet Microbiol* 2005; **108**: 145–148.
- 179 Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 275–286.
- 180 Morgan MS. Diagnosis and treatment of Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **30**: 289–296.
- 181 Risson DC, O’Connor ED, Guard RW, Schooneveldt JM, Nimmo GR. A fatal case of necrotising pneumonia due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Med J Aust* 2007; **186**: 479–480.
- 182 Salliot C, Zeller V, Puechal X, Manceron V, Sire S, Varache N *et al.* Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* infections: Report of 4 French cases. *Scand J Infect Dis* 2006; **38**: 192–195.
- 183 Torell E, Molin D, Tano E, Ehrenborg C, Ryden C. Community-acquired pneumonia and bacteraemia in a healthy young woman caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the genes encoding Pantone-Valentine leukocidin (PVL). *Scand J Infect Dis* 2005; **37**: 902–904.
- 184 Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T *et al.* Severe Community-Onset Pneumonia in Healthy Adults Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying the Pantone-Valentine Leukocidin Genes. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 100–107.
- 185 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Four Pediatric Deaths From Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997–1999. *JAMA* 1999; **282**: 1123–1125.
- 186 Rasigade J-P, Laurent F, Lina G, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F *et al.* Global distribution and evolution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981–2007. *J Infect Dis* 2010; **201**: 1589–1597.
- 187 Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2912–2917.
- 188 Viana D, Selva L, Callanan JJ, Guerrero I, Ferrian S, Corpa JM. Strains of *Staphylococcus aureus* and pathology associated with chronic suppurative mastitis in rabbits. *Vet J* 2011; **190**: 403–407.
- 189 Vancaeynest D, Haesebrouck F, Deplano A, Denis O, Godard C, Wildemauwe C *et al.* International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; **53**: 418–422.
- 190 Moreno-Grúa E, Pérez-Fuentes S, Muñoz-Silvestre A, Viana D, Fernández-Ros AB, Sanz-

- Tejero C *et al.* Characterization of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained From Commercial Rabbitries Located in the Iberian Peninsula. *Front Microbiol* 2018; **9**: 1812.
- 191 Coelho C, Torres C, Radhouani H, Pinto L, Lozano C, Gómez-Sanz E *et al.* Molecular detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from dogs in Portugal. *Microb Drug Resist* 2011; **17**: 333–337.
- 192 Couto N, Belas A, Kadlec K, Schwarz S, Pomba C. Clonal diversity, virulence patterns and antimicrobial and biocide susceptibility among human, animal and environmental MRSA in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2483–2487.
- 193 Couto N, Pomba C, Moodley A, Guardabassi L. Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Vet Rec* 2011; **169**: 72.
- 194 O’Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* 2011. doi:10.3791/2437.
- 195 Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**: 2950–2958.
- 196 Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-Flynn H, Caballero J, Sandoval J *et al.* Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Res Rev J Eng Technol* 2017; **6**: <http://www.rroj.com/open-access/quantitative-and->.
- 197 Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR *et al.* Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 2017; **43**: 313–351.
- 198 Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008; **72**: 157–165.
- 199 Haney EF, Trimble MJ, Cheng JT, Vallé Q, Hancock REW. Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides. *Biomolecules* 2018; **8**. doi:10.3390/biom8020029.
- 200 Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK-M, Horstkotte MA *et al.* Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* 2003; **185**: 2879–2886.
- 201 Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 1367–1378.
- 202 Lade H, Park JH, Chung SH, Kim IH, Kim J-M, Joo H-S *et al.* Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *J Clin Med* 2019; **8**:1853. doi:10.3390/jcm8111853.
- 203 Weinrick B, Dunman PM, McAleese F, Murphy E, Projan SJ, Fang Y *et al.* Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 8407–8423.
- 204 Shwan R, Knut O, Ursula W, Jörg H, Michael H, Wilma Z. Alternative Transcription Factor ζ^B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate. *J Bacteriol* 2000; **182**: 6824–6826.
- 205 Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2008; **57**: 1018–1023.
- 206 Land AD, Hogan P, Fritz S, Levin PA. Phenotypic Variation Is Almost Entirely Independent of the Host-Pathogen Relationship in Clinical Isolates of *S. aureus*. *PLoS One* 2015; **10**: e0129670.
- 207 Kwiecinski J, Kahlmeter G, Jin T. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections. *Curr Microbiol* 2015; **70**: 698–703.
- 208 Akers KS, Cardile AP, Wenke JC, Murray CK. Biofilm formation by clinical isolates and its relevance to clinical infections. *Adv Exp Med Biol* 2015; **830**: 1–28.

- 209 Abbasian S, Farahani NN, Mir Z, Alinejad F, Haeili M, Dahmardehei M *et al.* Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from a burn centre by using *agr*, *spa* and SCCmec typing methods. *New Microbes New Infect* 2018; **26**: 15–19.
- 210 O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA *et al.* Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 1379–1388.
- 211 Knobloch JK-M, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; **191**: 101–106.
- 212 Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 4595–4596.
- 213 Cha J-O, Yoo J II, Yoo JS, Chung H-S, Park S-H, Kim HS *et al.* Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong public Heal Res Perspect* 2013; **4**: 225–232.
- 214 Croes S, Deurenberg RH, Boumans M-LL, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiol* 2009; **9**: 229.
- 215 Khoramrooz SS, Mansouri F, Marashifard M, Malek Hosseini SAA, Akbarian Chenarestane-Olia F, Ganavehei B *et al.* Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and *agr* typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microb Pathog* 2016; **97**: 45–51.
- 216 Kwiecinski JM, Jacobsson G, Horswill AR, Josefsson E, Jin T. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates correlates with the infection type. *Infect Dis (London, England)* 2019; **51**: 446–451.
- 217 Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanojara H, Hashiguchi T *et al.* Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; **63**: 10–15.
- 218 Post V, Wahl P, Uçkay I, Ochsner P, Zimmerli W, Corvec S *et al.* Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. *Int J Med Microbiol* 2014; **304**: 565–576.
- 219 Manago K, Nishi J, Wakimoto N, Miyanojara H, Sarantuya J, Tokuda K *et al.* Biofilm formation by and accessory gene regulator typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from patients with nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; **27**: 188–190.
- 220 Mowlds P, Kavanagh K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria Mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 2008; **165**: 5–12.
- 221 Fallon JP, Troy N, Kavanagh K. Pre-exposure of *Galleria Mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence* 2011; **2**: 413–421.

Tabela 6.1: Quadro resumo das características da coleção de *S. aureus* de origem humana

ID	Perfil de resistência	ST (CC)	agr	PVL	Média OD ± SD (1% glucose)	Média OD ± SD (1% glucose + 3% NaCl)
BIOS-H1	MSSA/não-MDR	72 (8)	I	-	-0,041 ± 0,014	0,127 ± 0,028
BIOS-H2	MSSA/não-MDR	152 (152)	I	+	-0,035 ± 0,002	0,07 ± 0,013
BIOS-H3	MSSA/não-MDR	152 (152)	I	+	-0,044 ± 0,004	0,158 ± 0,02
BIOS-H4	MSSA/MDR	25 (25)	I	-	-0,034 ± 0,025	0,036 ± 0,058
BIOS-H5	MRSA/não-MDR	8 (8)	I	+	0,048 ± 0,025	0,267 ± 0,039
BIOS-H6	MRSA/não-MDR	8 (8)	I	+	0,18 ± 0,037	0,493 ± 0,115
BIOS-H7	MSSA/MDR	105 (5)	II	-	0,101 ± 0,014	0,023 ± 0,043
BIOS-H8	MRSA/MDR	105 (5)	II	-	0,131 ± 0,001	0,006 ± 0,03
BIOS-H9	MSSA/MDR	6531(5)	II	-	0,287 ± 0,06	0,094 ± 0,009
BIOS-H10	MRSA/MDR	105 (5)	II	-	-0,046 ± 0,001	0,045 ± 0,015
BIOS-H11	MSSA/MDR	105 (5)	II	-	-0,023 ± 0,012	0,058 ± 0,025
BIOS-H12	MSSA/não-MDR	278 (45)	I	-	0,03 ± 0,005	0,02 ± 0,031
BIOS-H13	MRSA/não-MDR	8 (8)	I	+	0,035 ± 0,032	0,293 ± 0,032
BIOS-H14	MRSA/MDR	8 (8)	I	+	0,187 ± 0,069	0,098 ± 0,035
BIOS-H16	MRSA/MDR	22 (22)	I	-	0,071 ± 0,025	0,023 ± 0,016
BIOS-H17	MSSA/não-MDR	7 (7)	I	-	0,005 ± 0,051	1,381 ± 0,029
BIOS-H18	MSSA/não-MDR	7 (7)	I	-	0,053 ± 0,002	1,493 ± 0,15
BIOS-H19	MRSA/MDR	105 (5)	II	-	0,155 ± 0,039	0,189 ± 0,028
BIOS-H20	MSSA/não-MDR	15 (15)	II	-	0,084 ± 0,03	0,053 ± 0,019
BIOS-H21	MSSA/não-MDR	8 (8)	I	-	0,232 ± 0,012	0,119 ± 0,044
BIOS-H22	MSSA/não-MDR	105 (5)	II	-	0,099 ± 0,014	0,116 ± 0,041
BIOS-H23	MRSA/MDR	105 (5)	II	-	0,168 ± 0,01	0,151 ± 0,001
BIOS-H24	MSSA/não-MDR	25 (25)	I	-	0,084 ± 0,019	0,045 ± 0,009
BIOS-H25	MSSA/não-MDR	6564	I	-	0,029 ± 0,025	0,12 ± 0,028
BIOS-H26	MRSA/não-MDR	22 (22)	I	-	0,079 ± 0,003	0,06 ± 0,02
BIOS-H27	MRSA/MDR	22 (22)	I	-	0,079 ± 0,001	0,064 ± 0,007
BIOS-H28	MSSA/não-MDR	5 (5)	II	-	-0,008 ± 0,015	0,278 ± 0,075
BIOS-H29	MSSA/não-MDR	15 (15)	II	-	0,05 ± 0,032	0,05 ± 0,012
BIOS-H30	MSSA/não-MDR	97 (97)	I	-	0,091 ± 0,002	0,365 ± 0,052
BIOS-H31	MRSA/MDR	22 (22)	I	-	0,664 ± 0,06	0,042 ± 0,006
BIOS-H32	MSSA/não-MDR	30 (30)	III	+	0,058 ± 0,008	0,107 ± 0,007
BIOS-H33	MRSA/MDR	5(5)	II	-	0,114 ± 0,01	0,199 ± 0,006
BIOS-H34	MRSA/MDR	22 (22)	I	-	0,404 ± 0,095	0,189 ± 0,111
BIOS-H35	MRSA/MDR	5 (5)	II	-	0,17 ± 0,018	0,247 ± 0,012

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à metilina; MDR: Multirresistência; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal; OD: Densidade Ótica; SD: Desvio Padrão.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

Tabela 6.2: Quadro resumo das características da coleção de *S. aureus* de origem animal

ID	Perfil de resistência	ST (CC)	agr	PVL	Média OD ± SD (1% glucose)	Média OD ± SD (1% glucose + 3% NaCl)
BIOS-V4	MDR/MRSA	398 (398)	I	-	0,07 ± 0,003	0,059 ± 0,004
BIOS-V5	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,29 ± 0,062	0,189 ± 0,028
BIOS-V6	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,09 ± 0,01	0,571 ± 0,056
BIOS-V19	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,054 ± 0,034	0,011 ± 0,001
BIOS-V20	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,118 ± 0,012	0,072 ± 0,009
BIOS-V21	não-MDR/MSSA	97 (97)	I	-	0,061 ± 0,066	0,151 ± 0,018
BIOS-V22	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,154 ± 0,034	0,046 ± 0,026
BIOS-V30	MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,174 ± 0,017	0,064 ± 0,006
BIOS-V31	não-MDR/MSSA	188 (1)	I	-	0,578 ± 0,009	0,053 ± 0,018
BIOS-V60	não-MDR/MSSA	816	II	-	0,703 ± 0,063	0,309 ± 0,049
BIOS-V61	não-MDR/MSSA	5 (5)	II	-	0,412 ± 0,011	0,101 ± 0,035
BIOS-V62	não-MDR/MSSA	15 (15)	II	-	0,12 ± 0,002	0,167 ± 0,011
BIOS-V63	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,077 ± 0,01	0,02 ± 0,011
BIOS-V70	não-MDR/MRSA	5 (5)	II	-	0,341 ± 0,076	0,116 ± 0,012
BIOS-V74	não-MDR/MSSA	5 (5)	II	-	0,229 ± 0,015	0,122 ± 0,045
BIOS-V75	não-MDR/MSSA	72 (8)	I	-	-0,011 ± 0,018	0,104 ± 0,035
BIOS-V76	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,224 ± 0,043	0,137 ± 0,018
BIOS-V85	não-MDR/MSSA	5 (5)	II	-	0,329 ± 0,003	0,245 ± 0,064
BIOS-V118	não-MDR/MRSA	6535(5)	II	-	0,443 ± 0,039	0,705 ± 0,037
BIOS-V128	não-MDR/MSSA	5 (5)	II	-	0,282 ± 0,046	1,641 ± 0,531
BIOS-V129	não-MDR/MSSA	121	IV	+	0,01 ± 0,011	0,53 ± 0,084
BIOS-V147	não-MDR/MSSA	398 (398)	I	-	-0,024 ± 0,004	0,358 ± 0,031
BIOS-V150	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,595 ± 0,106	0,057 ± 0,012
BIOS-V151	MDR/MSSA	398 (398)	I	-	0,669 ± 0,032	2,147 ± 0,012
BIOS-V153	MDR/MRSA	105 (5)	II	-	0,057 ± 0,041	0,147 ± 0
BIOS-V154	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,516 ± 0,107	0,006 ± 0,023
BIOS-V155	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,102 ± 0,033	0,086 ± 0,006
BIOS-V156	não-MDR/MSSA	6565(1)	I	-	0,03 ± 0,054	2,22 ± 0,048
BIOS-V157	não-MDR/MRSA	6566(8)	I	-	0,375 ± 0,001	0,603 ± 0,036
BIOS-V158	não-MDR/MSSA	7 (7)	I	-	0,271 ± 0,031	0,394 ± 0,058
BIOS-V159	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,071 ± 0,004	0,024 ± 0,02
BIOS-V160	não-MDR/MRSA	5 (5)	II	-	0,088 ± 0,012	0,089 ± 0,015
BIOS-V161	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,187 ± 0,024	0,085 ± 0,005
BIOS-V168	não-MDR/MSSA	72 (8)	I	-	0,093 ± 0,015	0,233 ± 0,007
BIOS-V172	não-MDR/MSSA	5 (5)	II	-	0,479 ± 0,002	0,81 ± 0,196
BIOS-V178	MDR/MSSA	398 (398)	I	-	0,152 ± 0,007	0,555 ± 0,014
BIOS-V183	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,028 ± 0,011	0,127 ± 0,012
BIOS-V184	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,014 ± 0,006	0,077 ± 0,022

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina; MDR: Multirresistência; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal; OD: Densidade Ótica; SD: Desvio Padrão.

Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles

Tabela 6.2: Continuação.

ID	Perfil de resistência	ST (CC)	agr	PVL	Média OD ± SD (1% glucose)	Média OD ± SD (1% glucose + 3% NaCl)
BIOS-V185	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,027 ± 0,003	0,08 ± 0,012
BIOS-V186	MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,398 ± 0,072	0,064 ± 0,009
BIOS-V187	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,071 ± 0,019	0,032 ± 0,006
BIOS-V200	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,142 ± 0,016	0,011 ± 0,023
BIOS-V201	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,299 ± 0,041	0,032 ± 0,026
BIOS-V202	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,205 ± 0,033	0,041 ± 0,016
BIOS-V203	não-MDR/MSSA	398 (398)	I	-	0,297 ± 0,006	0,023 ± 0
BIOS-V204	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	1,54 ± 0,108	0,051 ± 0,003
BIOS-V245	não-MDR/MSSA	1 (1)	III	-	1,329 ± 0,18	0,706 ± 0,033
BIOS-V250	não-MDR/MSSA	1 (1)	III	-	0,585 ± 0,017	0,182 ± 0,037
BIOS-V255	MDR/MRSA	105 (5)	II	-	0,198 ± 0,032	0,071 ± 0,018
BIOS-V257	não-MDR/MSSA	15 (15)	II	-	0,587 ± 0,048	0,016 ± 0,023
BIOS-V258	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,077 ± 0,007	-0,006 ± 0,015
BIOS-V279	não-MDR/MSSA	72 (8)	I	-	0,324 ± 0,032	1,297 ± 0,165
BIOS-V295	não-MDR/MSSA	72 (8)	I	-	0,114 ± 0,008	0,106 ± 0,01
BIOS-V296	não-MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,661 ± 0,188	0,364 ± 0,02
BIOS-V300	MDR/MRSA	22 (22)	I	-	0,076 ± 0,008	0,041 ± 0,016

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina; MDR: Multirresistência; ST: Sequência-tipo; CC: Complexo clonal; OD: Densidade Ótica; SD: Desvio Padrão.



2021

KETLYN OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS ASSOCIADOS A INFEÇÕES DE PELE E TECIDOS MOLES

