

**Fabienne Antunes Ferreira**

**Dissertação de Mestrado**

**Efeito do Sensor de Densidade Populacional Agr na  
Invasão de Amostras de *Staphylococcus aureus* em  
Células Epiteliais Brônquicas Humanas**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO  
AGOSTO DE 2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fabienne Antunes Ferreira

Efeito do Sensor de Densidade Populacional Agr na Invasão de Amostras de  
*Staphylococcus aureus* em Células Epiteliais Brônquicas Humanas



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadora: Agnes Marie Sá Figueiredo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO  
AGOSTO DE 2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Fabienne Antunes.

Efeito do Sensor de Densidade Populacional Agr na Invasão de Amostras de *Staphylococcus aureus* em Células Epiteliais Brônquicas Humanas. / Fabienne Antunes Ferreira - Rio de Janeiro, 2008.

xx, 72 fls.

Dissertação [Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia)]  
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia  
Prof. Paulo de Góes, 2008.

Orientadora: Agnes Marie Sá Figueiredo

Referências bibliográficas: 55-72.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. mutantes *agr*-nulos 3. Invasão bacteriana. 4. mutantes *rnalIII*-complementados. 5. Lócus *agr*. 6. células epiteliais brônquicas humanas.

I.Figueiredo, Agnes Marie Sá (Orientadora). II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia). III. Efeito do Sensor de Densidade Populacional Agr na Invasão de Amostras de *Staphylococcus aureus* em Células Epiteliais Brônquicas Humanas.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabienne Antunes Ferreira

Efeito do Sensor de Densidade Populacional Agr na Invasão de Amostras de  
*Staphylococcus aureus* em Células Epiteliais Brônquicas Humanas

Rio de Janeiro, 13 de agosto de 2008.

---

(Agnes Marie Sá Figueiredo, Professora Associada, IMPPG, UFRJ)

---

(Lenise Arneiro Teixeira, Professora Associada, Faculdade de Farmácia, UFF)

---

(Geraldo Renato de Paula, Professor Associado, Faculdade de Farmácia, UFF)

---

(Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, Professor Associado, IMPPG, UFRJ)

---

(Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho, Professora Associada, IMPPG, UFRJ)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Agnes Marie de Sá Figueiredo.

A todos que contribuíram e me apoiaram na conquista deste mérito.

"A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana".

**Louis Pasteur**

## AGRADECIMENTOS

- Sobretudo a Deus, pela esplêndida oportunidade da vida e por todas as oportunidades que me são concedidas todo o tempo;
- Aos meus queridos pais, Sérgio e Tais, que são as pessoas mais maravilhosas e que eu mais amo no mundo: agradeço pela presença e ajuda constantes, pelo exemplo, por todo carinho, amor, dedicação e incentivo;
- Aos meus avós Hebe e Emílio (*in memoriam*), por todo incentivo e carinho;
- Aos meus queridos irmãos, Felipe e Inessa, minha cunhada Magna e cunhado Patrick que, mesmo de longe, estavam sempre na torcida;
- Ao querido Frederico, meu super companheiro, por todo carinho, apoio, compreensão e principalmente paciência durante minhas “crises”. Pelos momentos inesquecíveis e por todo o aprendizado na nossa convivência;
- A todos os outros familiares, tios e primos, pelo constante incentivo;
- A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Agnes Marie Sá Figueiredo, a quem tenho enorme admiração, carinho e respeito, agradeço pelas oportunidades, ensinamentos infindáveis, incentivo e amizade;
- À querida tutora, revisora e coordenadora de Graduação, Prof<sup>a</sup>. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho, pela ajuda de sempre, suporte e amizade;
- Aos meus lindos amigos da galera “Fífi’s”: Lara, Lorena, Maurício, Daniela, Hugo, Daniel, Fernanda e Matheus, esta família que escolhi de coração, pelo carinho, incentivo e momentos inesquecíveis de muita alegria;
- Aos queridos amigos de laboratório que mais me auxiliaram na realização deste trabalho: Raquel Rosinha, Raquel Bonelli (junto com Eduardo) e Otávio: muito obrigada por tudo mesmo! Sem vocês, tudo seria mais difícil!
- Aos demais amigos do laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, que são minha segunda família: Maria Cícera (sempre disposta a ajudar e comprar mil coisas para meus experimentos), Raquel Neves (sempre preparando os materiais chatos de cultura de células e RNA; divertindo o lab todos os dias), Léo (sempre amigo de todas as horas), Márcia (que estava sempre disputando o fluxo comigo; a maior “chocólotra” que já conheci), Mariana (Mari Mari lindona!) e as fofíssimas Aninha, Amada, Adriana, Lenise, Solange, Déborah, Cacau, Simone, Juliana, Patrícia e Carolina pela convivência, diversão, apoio e aprendizado diários;
- À Ivi Cristina, pela incalculável ajuda nos experimentos com cultura de células, e a todo pessoal do laboratório de Cocos Patogênicos, por toda ajuda e paciência na “invasão” constante do laboratório e nos empréstimos infindáveis, e pela convivência sempre agradável e divertida;

- À Prof<sup>a</sup> Regina Domingues e toda equipe do laboratório de bactérias anaeróbias pela paciência, ajuda, carinho e amizade nas minhas constantes invasões à salinha de cultura de células;
- À Ana do departamento de Virologia (laboratório do Prof<sup>o</sup>. José Nelson), pelo auxílio com as células 16HBE14o<sup>-</sup>, sempre rebeldes, e paciência com minhas dúvidas;
- À Prof<sup>a</sup>. Thaís Souto Padrón, Coordenadora da Pós-Graduação, e as funcionárias Safira e Luciana, que ofereceram suporte em todo o curso;
- À banca examinadora composta pelos professores Lenise Arneiro Teixeira, Geraldo Renato de Paula, Sérgio Fracalanza e Bernadete Ferreira Teixeira Carvalho, bem como as suplentes Prof<sup>a</sup> Regina Domingues e Ângela Castro.
- A todos os membros, funcionários e prestadores de serviços (especialmente a Shirlei) e corpo docente, do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, que muito me auxiliaram;
- Aos órgãos financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/Pronex) e Ministério da Saúde do Brasil, pelo suporte financeiro.

## RESUMO

FABIENNE ANTUNES FERREIRA

Efeito do sensor de densidade populacional Agr na invasão de amostras de *Staphylococcus aureus* em células epiteliais brônquicas humanas

Orientadora: Agnes Marie Sá Figueiredo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Os *Staphylococcus aureus* apresentam um conjunto de genes de virulência cuja expressão é modulada por sistemas reguladores globais. Dentre esses, um dos mais importantes é o sistema de *quorum sensing* Agr (do inglês: *accessory gene regulator*). O locus *agr* é capaz de regular positivamente a expressão de proteínas extracelulares envolvidas na agressão ao hospedeiro e negativamente a expressão de várias proteínas de superfície envolvidas nos processos de colonização e interação com o hospedeiro. Porém, poucos trabalhos analisaram o papel do *agr* na invasão dos *S. aureus*, sendo que os modelos utilizados envolviam células mamárias de bovinos, osteoblastos ou células endovenosas humanas. Além disso, a maior parte dos estudos publicados utilizou a construção *agr*-nula RN6911 ( $\Delta agr::tetM$ ), que é derivada da cepa laboratorial NTCC8325-4, que por sua vez possui uma deleção espontânea de cerca de 11pb no gene *rsbU* e uma mutação no gene *agrA*. Considerando que os *S. aureus* são importantes agentes causadores de pneumonias hospitalares e comunitárias, buscamos avaliar o efeito do *agr* na invasão de uma amostra clínica de *S. aureus* em células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o-). Para tanto, obtivemos uma construção nocaute para o gene *agr* ( $\Delta agr::tetM$ ) a partir da amostra clínica designada HC474 (*S. aureus* sensível à meticilina; apresentando padrão de PFGE semelhante ao de amostras pertencentes ao clone pediátrico e do clone Nova Iorque/Japão). A seguir, inserimos na construção nocaute um vetor de fusão (pRN6848), contendo o gene de resistência ao cloranfenicol e o promotor da  $\beta$ -lactamase (*Pbla*) ligado ao gene *rnalll* (*Pbla-rnalll-cat*), obtendo uma construção *agr* complementada. As construções foram obtidas a partir de experimentos de transdução utilizando o bacteriófago 80 $\alpha$ , o qual foi inicialmente propagado na cepa *agr*-nula RN6911 ( $\Delta agr::tetM$ ), para obtenção do nocaute e, posteriormente, na cepa RN8041 (que contém o plasmídeo pRN6848 com a construção *Pbla-rnalll-cat*), para a obtenção da complementação. As colônias

tetraciclinas-resistentes (construções *agr* deletadas) e colônias tetraciclinas- e cloranfenicol-resistentes (construções trans-complementadas) foram testadas quanto a ausência ou presença do locus *agr*, através de PCR (do inglês: *Polimerase Chain Reaction*), *dot-* e *Northern-blotting*, utilizando *primers* específicos para o gene *rnalIII*. Nossos dados demonstram que a deleção do *agr* na amostra mutante resultou em um aumento na porcentagem de internalização bacteriana durante a fase estacionária de crescimento, quando comparada às amostra selvagem e mutante complementada isogênicas. O fato de o *agr* regular negativamente as FnBPs (do inglês: *fibronectin binding proteins*; moléculas envolvidas na invasão bacteriana) pode estar correlacionado com estes resultados. Resumidamente, os dados apresentados neste trabalho demonstram o papel do *agr*-RNAIII na modulação do mecanismo de invasão dos *S. aureus* em células epiteliais brônquicas humanas, confirmando resultados experimentais anteriores que indicam um papel importante do *agr* na patogênese (colonização e invasão) das infecções estafilocócicas.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, mutantes *agr*-nulos, invasão bacteriana, mutantes *rnalIII*-complementados, locus *agr*, células epiteliais brônquicas humanas

Rio de Janeiro  
Agosto de 2008

## ABSTRACT

FABIENNE ANTUNES FERREIRA

Efeito do sensor de densidade populacional Agr na invasão de amostras de *Staphylococcus aureus* em células epiteliais brônquicas humanas

Orientadora: Agnes Marie Sá Figueiredo

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requeridos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

*Staphylococcus aureus* can express many virulence factors, which are tightly modulated by global systems of gene regulation, including *agr* locus (the main staphylococcal *quorum sensing*). *agr* system acts by up-regulating extracellular proteins involved in host tissue damages and down-regulating cell surface proteins that are required for bacteria adherence and internalization. However, few studies have analysed the *agr* effect in *S. aureus* internalization, and the models used involved bovine mammary epithelial cell line and osteoblasts or endovenous human cells. Moreover, these studies were carried out with the *agr*-null RN6911 ( $\Delta agr::tetM$ ), derived from the laboratory strain NTCC8325-4, which has a spontaneous deletion of 11pb in the *rsbU* gene and a mutation in the *agrA* gene. Because *S. aureus* are important agents associated with nosocomial and community pneumonia the aim of this study was to evaluate the role of Agr system on internalization of *S. aureus* clinical isolates in the human bronchial cell line (16HBE14o<sup>+</sup>). Using a *agr*-null construction ( $\Delta agr::tetM$ ) derived from a current clinical isolate of *S. aureus* (HC474; MSSA that has a PFGE pattern to that of isolates belonging to pediatric and New York/Japan clones). The complementation of the *agr* function in the *agr*-null construction was achieved by the acquisition of a plasmid pRN6848 carrying chloramphenicol resistance gene and the fusion beta-lactamase promoter-*rnalIII* gene (*Pbla-rnalIII-cat*). The constructions were generated using homologous recombination via 80 $\alpha$  bacteriophage after propagation in RN6911 ( $\Delta agr::tetM$ ) and subsequently propagation in RN8041 strain (which contain the fusion *Pbla-rnalIII-cat*). *agr* constructions were selected in the appropriate antibiotic and the *agr*-elimination and *rnalIII* complementation were confirmed by PCR, dot-blot hybridization and Northern-blotting, using specific primers or probe for an internal fragment of the *rnalIII*. Our data showed that *agr* elimination could increase the

internalization in the *agr*-null construction at stationary phase. The fact that *agr* down-regulates FnBPs (Fibronectin binding proteins; major molecules involved in bacterial internalization) could be associated with these data. Finally, the results of this work showed *agr*-RNAIII has a role on *S. aureus* internalization in human epithelial bronchial cells, corroborating previous experimental results that have indicated an important role of *agr* on the pathogenesis (colonization and invasion) of the staphylococcal infections.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, *agr*-nulls mutants, bacteria internalization, *rnalIII*-complemented mutants, *agr* locus, the human bronchial cell line.

Rio de Janeiro  
Agosto de 2008

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xviii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA)	3
1.3 Mecanismos de adesão e invasão em <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.4 Sistemas de regulação global em <i>Staphylococcus aureus</i>	17
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
3.1 Amostras bacterianas, plasmídios e construções	26
3.2 Soluções e meios de cultura utilizados na transdução	27
3.2.1 <i>GL Agar</i> (1 L)	27
3.2.2 <i>Phage Buffer</i> (1 L)	28
3.2.3 <i>CY Broth</i> (1 L)	28
3.2.4 <i>Top Agar</i> (1 L)	28
3.3 Propagação do bacteriófago 80 $\alpha$	28
3.4 Transdução em cepa clínica	29
3.5 Confirmação das construções <i>agr</i> -nulas e <i>rnalll</i> -complementadas	30
3.5.1 Detecção do locus <i>agr</i> através de PCR	30
3.5.2 Detecção do <i>rnalll</i> através da técnica de <i>dot-blotting</i>	32
3.5.3 Análise da transcrição do <i>rnalll</i> através da técnica de <i>Northern-blotting</i>	33
3.6 Gel de eletroforese submetido a campos elétricos alternados (PFGE)	34
3.7 Ensaio de invasão bacteriana	35
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1 Obtenção das construções <i>agr</i>	37
4.1.1 Deleção do locus <i>agr</i>	37
4.1.2 Trans-complementação do <i>rnalll</i>	37
4.2 Verificação da ausência e da presença do <i>rnalll</i> na construção <i>agr</i> -nula e trans-complementada, respectivamente, através de PCR	37

4.3	Confirmação da ausência e da presença do <i>rnalII</i> nas construções <i>agr</i> -nula e trans-complementada, respectivamente, através de <i>dot-blotting</i>	38
4.4	Análise da transcrição do <i>rnalII</i> através da técnica de <i>Northern-blotting</i> nas construções <i>agr</i> nula e trans-complementada, e na amostra selvagem isogênica	38
4.5	Experimentos de <i>Northern-blotting</i> para as amostras pertencentes ao CEB GV69 e BMB9393	39
4.6	Gel de Eletroforese submetido a campos elétricos alternados (PFGE) para confirmação do perfil genético das construções <i>agr</i>	39
4.7	Invasão Bacteriana	39
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1:** Tipos de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) encontrados em amostras de MRSA, resistência a antimicrobianos, respectivos clones e *sequence type* (ST) associados \_\_\_\_\_ 5
- Figura 1:** Modelo esquemático do sistema de *quorum sensing agr* (Adaptado de IWATSUKI *et al.*, 2006). RNAIII é a molécula efetora do locus *agr*, transcrita a partir do promotor *agrP3* e que regula positivamente a expressão de exoproteínas e negativamente de proteínas de superfície. O RNAII, transcrito a partir do promotor *agrP2*, é composto dos genes *agrBDCA*. O gene *agrD* codifica para a proteína AgrD, que origina o peptídeo autoindutor do sistema Agr (AIP). A proteína AgrD se dirige ao mesmo compartimento onde se encontra a proteína AgrB. A proteína AgrD é processada pela AgrB e secretada já como AIP. As proteínas AgrC e AgrA participam de um sistema de transdução de sinais via dois componentes. O peptídeo AIP ativa o locus *agr* ao se ligar hidrofobicamente à proteína transmembrana sensora AgrC. Por sua vez, essa proteína se auto-fosforila e ativa (fosforilando) a proteína AgrA, a qual, em conjunto com a proteína SarA, são capazes de se ligarem aos promotores *agrP2P3*, ativando assim a transcrição de todo operon Agr. \_\_\_\_\_ 20
- Figura 2:** Organização do locus *agr* (Adaptada de NOVICK *et al.*, 1993). Mapa de restrição do locus *agr* mostrando as ORFs (do inglês: *open reading frame*), promotores e transcritos. Logo abaixo está apresentada a região correspondente ao cromossomo da amostra *agr* nula RN6911, em que o fragmento de 3,4kb *Clal* (1187) – *Hpal* (4546) foi substituído pelo marcador *tetM* \_\_\_\_\_ 27
- Figura 3:** Fotografia do gel de agarose correspondente à amplificação por PCR de uma região interna do *rnalIII* de 292pb e do gene *icaAD* de 701pb (controle interno da reação). Linhas 1: padrão de peso molecular 100pb; 2: controle dos iniciadores (do inglês: *primers*) específicos para o *rnalIII*, amostra BMB9393; 3: amostra selvagem, HC474; 4: mutante *agr*-nulo, MHC474; 5: mutante trans-complementado, CMHC474. \_\_\_\_\_ 41
- Figura 4:** Fotografia do experimento de *dot-blotting* utilizando uma sonda específica correspondente a um fragmento interno do *rnalIII*. Linha 1: controle positivo, DNA da amostra GV69; 2: DNA da amostra selvagem isogênica, HC474; 3: DNA do mutante *agr*-nulo, MHC474; 4: DNA do mutante *rnalIII*-trans-complementado, CMHC474. \_\_\_\_\_ 42
- Figura 5: A.** Invasão bacteriana das amostras HC474, MHC474 e CMHC474 em células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o<sup>-</sup>). A fase logarítmica de crescimento bacteriano corresponde a DO<sub>600nm</sub> de 0,3 e a fase estacionária a DO<sub>600nm</sub> de 2,0. **B.** Fotografia do experimento de *Northern-blotting* utilizando uma sonda específica correspondente a um fragmento interno do *rnalIII*. Linhas 1: RNA total obtido da amostra selvagem, HC474; 2: RNA total obtido da construção *agr*-nula, MHC474; e 3: RNA total obtido do mutante *rnalIII*-complementado, CMHC474. \_\_\_\_\_ 43

**Figura 6: A.** Gráfico resultante dos experimentos de invasão das amostras de *Staphylococcus aureus* BMB9393 (*agr* funcional) e GV69 (*agr* atenuado) em células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o-). A fase logarítmica de crescimento bacteriano corresponde a  $DO_{600nm}$  de 0,3 e a fase estacionária a  $DO_{600nm}$  de 2,0. **B.** Fotografia dos experimentos de *Northern-blotting* utilizando RNA total das amostras clínicas GV69 (linha 1) e BMB9393 (linha 2), hibridizados com sondas específicas para o *rnalIII* e para o *rrna* 16S (controle). \_\_ 44

**Figura 7:** Fotografia do padrão de bandas resultantes da eletroforese em campos elétricos alternados (PFGE), após fragmentação do genoma total da amostra selvagem de *S. aureus* HC474 e mutantes isogênicas. Linhas 1: padrão de peso molecular ( $\Lambda$ ); 2: amostra selvagem isogênica, HC474; 3: construção *agr*-nula, MHC474 e 4: *rnalIII*-complementada, MCHC474. \_\_\_\_\_ 45

**Figura 8:** Micrografia eletrônica de transmissão da invasão, *in vitro*, de uma amostra de *S. aureus* representante do CEB, após 1 h de contato com a monocamada de células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o-). Observar intensa invasão bacteriana, com células bacterianas no interior de vacúolos, apresentando septos transversos, sugerindo a ocorrência de divisão celular (com permissão, AMARAL *et al.*, 2005). \_\_\_\_\_ 49

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIP	Peptídio autoindutor do sistema <i>agr</i> (do inglês: <i>autoinducing peptide</i> )
Agr	Sistema sensor de densidade populacional ( <i>quorum sensing</i> ) dos <i>Staphylococcus aureus</i> (do inglês: <i>Accessory Gene Regulator</i> )
ArIRS	Sistema de transdução de sinais via dois componentes, envolvido na autólise e na atividade proteolítica extracelular (do inglês: <i>ADP ribosylation factor</i> )
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina associados a infecções comunitárias (do inglês: <i>community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
CEB / CH	Clone epidêmico brasileiro / Húngaro
CI	Clone ibérico
CifA e B	Fatores <i>Clumping</i> A e B (do inglês: <i>clumping factor A and B</i> )
CNI/J	Clone Nova Iorque/Japão
Coa	Coagulase
CoBP	Proteína de ligação ao colágeno (do inglês: <i>collagen binding protein</i> )
CP	Clone pediátrico
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DO	Densidade ótica
EMRSA 15 e 16	Clone epidêmico MRSA 15 e 16 (do inglês: <i>epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
FbBP	Proteína de ligação ao fibrinogênio (do inglês: <i>fibrinogen binding proteins</i> )
FnBPA e B	Proteínas de ligação à fibronectina A e B (do inglês: <i>fibronectin binding proteins A and B</i> )
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina associados a infecções hospitalares (do inglês: <i>hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
MLST	Tipagem por seqüenciamento de multilocus enzimáticos (do inglês: <i>multilocus sequence typing</i> )
MOI	Multiplicidade de infecção

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (do inglês: methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )
MSCRAMMs	Componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas da matriz extracelular (do inglês: <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i> )
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à meticilina (do inglês: methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> )
ORF	Sequência de leitura aberta (do inglês: <i>open reading frame</i> )
pb	Pares de base
PBP2a ou PBP2'	Proteína 2a de ligação à penicilina (do inglês: <i>penicillin binding protein 2a</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i> )
PFGE	Gel de eletroforese submetido a campos elétricos alternados (do inglês: <i>pulsed-field gel-electrophoresis</i> ).
PVL	Leucocidina de Panton Valentine (do inglês: <i>Panton Valentine leucocidin</i> )
RFLP	Padrão de polimorfismo de fragmentação do DNA (do inglês: <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i> )
RNAII	Transcrito pelo promotor P2 <sub>agr</sub>
RNAIII	Molécula efetora do locus <i>agr</i> dos estafilococos e transcrita pelo operon P3 <sub>agr</sub>
<i>rsbU</i>	Gene regulador do operon <i>sigB</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SaeRS	Sistema de transdução de sinais via dois componentes (do inglês: <i>Staphylococcus aureus exoprotein expression</i> )
SarA	Proteína reguladora transcricional (do inglês: <i>staphylococcal accessory regulator</i> )
SCC <sub>mec</sub>	Elemento <i>mec</i> ou cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (do inglês: <i>staphylococcal cassette chromosome mec</i> )
SigB	Fator sigma alternativo de fase estacionária (do inglês: <i>sigma factor</i> )
Spa	Proteína A (do inglês: <i>staphylococcal protein A</i> )
ST	Seqüência tipo (do inglês: <i>sequence-typing</i> )

TSA	Meio de cultura com ágar (do inglês: <i>trypcase soy agar</i> )
TSB	Meio de cultura em caldo (do inglês: <i>trypcase soy broth</i> )
UFC	Unidade formadora de colônias
UFP	Unidade formadora de placa de lise
USA	Estados Unidos da América (do inglês: <i>united states of america</i> )
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à vancomicina (do inglês: <i>vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
vWF	Glicoproteína multifuncional liberada pelas células endoteliais e plaquetas humanas chamada de <i>von willebrand factor</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

Microrganismos classificados como *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, freqüentemente referidos como *S. aureus* (terminologia que será aqui adotada), são atualmente alocados como componentes da família *Staphylococcaceae*. Esses microrganismos são cocos Gram-positivos e podem ser encontrados como parte da microbiota anfibiótica da pele e membranas mucosas de humanos e outros mamíferos. Em humanos, elevadas concentrações deste microrganismo são encontradas colonizando mucosas nasais, períneo, axilas, e em menores quantidades a boca, orofaringe, vagina, glândulas mamárias e trato intestinal (CHILLER, SELKIN & MURAKAWA, 2001; MURRAY *et al.*, 2003; LOUGHMAN *et al.*, 2008).

Mais de dois terços da população saudável está permanente ou transitoriamente colonizada por *S. aureus*, com algumas variações dependendo dos fatores geográficos, étnicos, sociais e médicos (LOWY, 1998). A colonização do indivíduo pode servir como uma fonte endógena de infecção (LUZAR *et al.*, 1990; PEACOCK, SILVA & LOWY, 2001; VON EIFF *et al.*, 2001; BAMBERGER, 2007). *S. aureus* são reconhecidos como importantes patógenos e estão envolvidos em uma série de doenças. Essas infecções podem ser relativamente benignas e localizadas, como as infecções na pele, ou mais graves e disseminadas, incluindo as pneumonias e bacteremias (MURRAY *et al.*, 2003; BAMBERGER, 2007). Dentre as principais infecções de pele, incluem-se o impetigo e a celulite; e nos folículos pilosos, podemos citar a foliculite, a furunculose e a carbunculose, esta última caracterizada por pequenos furúnculos coalescentes na altura da cabeça e pescoço, podendo envolver tecidos subcutâneos e levar a sintomas sistêmicos, como febre. Estes microrganismos também são freqüentemente isolados de feridas pós-cirúrgicas, o que pode servir como um foco de desenvolvimento de infecções sistêmicas (KONEMAN, 1997; GARZONI *et al.*, 2007). Com relação às infecções mais graves, pode-se citar quadros de carbúnculo renal, artrite séptica, meningite, pneumonia, endocardite, osteomielite, dentre outras (YAMAGUCHI *et al.*, 2002;

MURRAY *et al.*, 2003; PRÉVOST, COUPPIÉ & MONTEIL, 2003; BAMBERGER, 2007).

As amostras de *S. aureus* apresentam genoma substancialmente menor (~2.5-2.9 Mb), quando comparadas às bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* (~4.1-5.6 Mb) e *Pseudomonas aeruginosa* (~6.2-6.4 Mb). Porém, a complexidade dos mecanismos genéticos desta bactéria é marcante. Virtualmente, esses microrganismos podem colonizar e infectar qualquer tecido ou órgão e apresentam elevada plasticidade para adaptação (SINHA & HERRMANN, 2005). Além disso, essas bactérias podem estar associadas tanto a infecções de natureza hospitalar (DEURENBERG *et al.*, 2007) quanto a infecções comunitárias (KENNEDY *et al.*, 2008), demonstrando assim uma ampla versatilidade. Esta extraordinária plasticidade dos *S. aureus* tem sido atribuída aos numerosos fatores de virulência que são capazes de produzir, podendo estes estar ancorados à superfície celular ou ser secretados para o meio extracelular. Os fatores de virulência produzidos pelos *S. aureus* que estão ancorados à parede celular são importantes, principalmente, na interação do microrganismo com o hospedeiro, durante o processo inicial de colonização (adesão e invasão), nos mecanismos de evasão (fuga) das defesas do hospedeiro e na modulação da resposta imune. Além disso, a ampla variedade de proteínas secretadas por esse microrganismo, conhecidas como exoproteínas, podem funcionar, por exemplo, como agressinas (causando danos aos tecidos e órgãos do hospedeiro), evasinas (evadindo à ação de componentes de defesa do hospedeiro) ou modulinas, modulando a resposta imune (SALYERS & WHITT, 2002). Assim, a patogênese das infecções causadas pelos *S. aureus* pode ser considerada multifatorial (KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000; GARZONI *et al.*, 2007).

Outra característica importante desse patógeno é a facilidade de aquisição e transferência de genes, tanto relacionados à virulência quanto aqueles que conferem multirresistência aos antimicrobianos normalmente prescritos no tratamento de infecções associadas a esses microrganismos (NOTO *et al.*, 2008).

## 1.2 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)

Observando o histórico do desenvolvimento de agentes terapêuticos, verifica-se que pouco tempo depois da introdução da penicilina no tratamento das infecções estafilocócicas surgiram cepas de *Staphylococcus* resistentes a este antibiótico, devido à produção de  $\beta$ -lactamase (enzima capaz de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico dessa classe de antimicrobiano). Desta forma, diante da necessidade de se disponibilizar novas drogas resistentes à ação desta enzima, foram desenvolvidas as penicilinas semi-sintéticas, como a meticilina e a oxacilina (JEVONS, 1961). Entretanto, no início da década de 1960, foram detectadas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à penicilinas semi-sintéticas (MRSA, do inglês: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; JEVONS, 1961; OLIVEIRA, TOMASZ & LENCASTRE, 2002). Neste contexto, uma evolução acelerada desses microrganismos foi revelada através da emergência de amostras que adquiriram, de forma rápida, mecanismos de resistência a virtualmente quase todos os agentes antimicrobianos, logo após a introdução dos mesmos na prática médica (OLIVEIRA, TOMASZ & LENCASTRE, 2002).

O marco inicial de evolução da resistência à meticilina em *S. aureus* ocorreu quando da aquisição do gene *mecA*, o qual codifica uma nova proteína de ligação à penicilina (PBP2'ou PBP2a; do inglês: *Penicillin binding protein*), que confere resistência à meticilina e a outros  $\beta$ -lactâmicos. Esta proteína possui baixa afinidade pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e, portanto, é capaz de catalisar a reação de transpeptidação (formação das pontes transversas na peptidoglicana) e garantir a formação da parede celular bacteriana, mesmo que as PBPs normais estejam bloqueadas pela ligação covalente ao anel  $\beta$ -lactâmico do antimicrobiano (JONGE *et al.*, 1992; BERGER-BÄCHI, 1995).

O gene *mecA* é um segmento de DNA de 2,1 Kb que não é nativo da espécie *S. aureus*. Tal elemento genético encontra-se inserido em um grande bloco de DNA exógeno, conhecido como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*; do inglês: *staphylococcal cassette chromosome mec*; KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000; LIVERMORE, 2000; HIRAMATSU *et al.*, 2002; NOTO *et al.*, 2008).

O SCC*mec* é um elemento genético móvel, integrado ao cromossomo dos MRSA em um sítio específico (*attBsc*), localizado próximo à origem de replicação, e

flanqueado por seqüências diretas e repetidas. Este segmento de DNA, que pode variar de 21-67 Kb, carrega o chamado complexo gene *mec*, correspondendo às regiões do gene *mecA* e de seus reguladores, *mecRI* e *mecI*; assim como o complexo *ccr*, correspondendo à região onde se encontram os genes que codificam para recombinases, as quais são responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. O produto do gene *mecI* reprime a expressão do *mecA* ao se ligar ao operador. Já o produto do gene *mecRI* constitui uma proteína de membrana envolvida em um sistema de transdução de sinais (do inglês: *signal-transduction*), a qual reconhece a presença de  $\beta$ -lactâmico através de seu domínio extracelular de ligação à penicilina. Seu domínio citoplasmático apresenta atividade de protease e degrada o produto do gene *mecI*, permitindo assim a transcrição do gene *mecA* (MCKINNEY *et al.*, 2001; NOTO *et al.*, 2008).

Além desses genes, outros elementos genéticos também podem estar presentes, dentre eles os elementos de inserção IS431 e IS257, os plasmídios pUB110 e pT181 e o transposon Tn554. Alguns destes elementos carregam genes de resistência à eritromicina, tetraciclina, kanamicina, espectinomicina e tobramicina (HIRAMATSU *et al.*, 2002). Adicionalmente, a presença de mais de uma cópia do IS256 parece servir como *hot spot* (regiões de elevada freqüência de recombinações) para a inserção de outros genes de resistência a drogas. Assim, torna-se claro o porquê dos MRSA apresentarem, freqüentemente, múltipla resistência aos antimicrobianos associada à presença do gene *mecA* (KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000). Devido a todas essas características citadas, o SCC*mec* pode ser definido como uma ilha de resistência a antimicrobianos (HIRAMATSU *et al.*, 2002).

Até o momento, já foram descritos seis tipos de elementos SCC*mec* distintos, cada qual carregando uma combinação característica dos complexos *ccr*, *mec* e do repertório de determinantes de resistência (Tabela 1). O SCC*mec* tipo I foi encontrado em cepas de MRSA que predominavam na década de 1960 no Reino Unido. Este tipo não contém outros genes de resistência a antibióticos além do *mecA*. Já os tipos II e III de SCC*mec* foram associados a cepas predominantes na década de 1980 e carregam múltiplos genes de resistência. Esses três tipos de SCC*mec* têm sido isolados, comumente, em cepas de MRSA associadas a infecções nosocomiais (ITO *et al.*, 2001). Já o SCC*mec* tipo IV tem sido encontrado,

predominantemente, em cepas de MRSA que vêm emergindo em infecções na comunidade (CA-MRSA; do inglês: *community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), e que já foram isoladas em diversos países, incluindo os EUA, França, Suíça, Holanda, Austrália, Nova Zelândia, Brasil, Itália, dentre outros (ITO *et al.*, 2001; DAUM *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005; VALENTINI *et al.*, 2008). Além disso, este tipo de elemento também pode ser encontrado em clones de MRSA associados a infecções hospitalares conhecidos como clone pediátrico e EMRSA-15 (AIRES DE SOUZA *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2007). Já o SCCmec tipo V, além de carrear somente o gene *mecA* como gene de resistência, carrega também um complexo *ccrC* diferente dos descritos anteriormente. Este último SCCmec foi detectado em somente algumas amostras de MRSA causando infecções na comunidade (COOMBS *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2004; O'BRIEN *et al.*, 2005).

**Tabela 1:** Tipos de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCCmec) encontrados em amostras de MRSA, resistência a antimicrobianos, respectivos clones e *sequence type* (ST) associados

ILHA SCCmec	GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	EXEMPLOS DE CLONES ASSOCIADOS
I	Possui somente o <i>mecA</i> como gene de resistência	Clone ibérico (ST247)
II	Carreiam múltiplos genes de resistência, além do <i>mecA</i>	Clone Nova Iorque/Japão (ST5) e EMRSA-16 (ST36)
III	Carreiam múltiplos genes de resistência, além do <i>mecA</i>	Clone epidêmico brasileiro e húngaro (ST239)
IV	Possui somente o <i>mecA</i> como gene de resistência	Clones CA-MRSA (ST1; ST8; ST30, etc); clone pediátrico (ST5) e EMRSA-15 (ST22)
V	Possui somente o <i>mecA</i> como gene de resistência	Algumas amostras de CA-MRSA (ST5, ST8, ST45, etc)
VI	Possui somente o <i>mecA</i> como gene de resistência	Amostras do clone pediátrico encontradas em Portugal (ST5)

Recentemente foi descrito um novo tipo de SCCmec (tipo VI), que apresenta um *ccrAB* alotipo 4, diferente de todos os descritos. Até o momento, o SCCmec VI só foi encontrado em amostras pertencentes ao clone pediátrico isoladas em Portugal (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & LENCASTRE, 2006). Variantes dos tipos principais de SCCmec têm sido descritas. As variações são baseadas na presença

ou ausência de elementos genéticos móveis no cassete (OLIVEIRA & LENCASTRE, 2002; SHORE *et al.*, 2005; MILHEIRIÇO, OLIVEIRA & LENCASTRE, 2007).

A multirresistência adquirida pelos *S. aureus* emergiu de forma acelerada. Estima-se que na década de 1970, somente 2% das bactérias encontradas em hospitais eram MRSA. Já em 2004, nos EUA, 60% dos *S. aureus* isolados em unidades de terapia intensiva eram MRSA, em relação aos *S. aureus* sensíveis à meticilina (NNIS, 2004). A literatura aponta que a partir do início da década de 1990 ocorreu uma rápida e crescente disseminação de amostras de *S. aureus* apresentando elevada multirresistência a antimicrobianos (AL-MASSAUD, DAY & RUSSEL, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1995; CHAMBERS, 1997). Atualmente sabe-se que essa acelerada evolução bacteriana é resultante, principalmente, da pressão seletiva decorrente da imensa quantidade de agentes antimicrobianos aplicados em todo o mundo (OLIVEIRA, TOMASZ & LENCASTRE, 2002). Assim, devido a esse e outros fatores, como o avanço das técnicas terapêuticas e diagnósticas, as características intrínsecas dos pacientes (incluindo aumento da população apresentando extremos de idade e de pacientes portadores de imunossupressão ou outras doenças de base) e os fatores de virulência desses microrganismos, os MRSA tornaram-se o principal patógeno hospitalar em termos de incidência e gravidade das infecções, sendo importantes agentes etiológicos de pneumonias e bacteremias nosocomiais (SCHABERG, CULVER & GAYNES, 1991; RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2008).

É importante citar que a disseminação dos MRSA associados a infecções hospitalares (HA-MRSA; do inglês: *hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) é de proporção mundial. Clones específicos de MRSA são capazes de se disseminar através dos continentes, podendo, desta forma, causar infecções nosocomiais de natureza pandêmica (TEIXEIRA *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 1998; COIMBRA *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2001; COIMBRA *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2008).

Amostras de MRSA geneticamente muito semelhantes ou mesmo iguais (mesmo tipo clonal) quanto ao padrão de PFGE (do inglês: *pulsed-field gel electrophoresis*; SANCHES *et al.*, 1995), MLST (do inglês: *multilocus sequencing typing*; ENRIGHT *et al.*, 2000), tipo SCCmec e de polimorfismos dos genes que codificam para coagulase (gene *coa*) e proteína A (gene *spa*), têm sido detectadas

como agentes etiológicos de infecções nosocomiais em vários países do mundo. Assim, vê-se que um grande número de infecções adquiridas em hospitais é causado por alguns poucos clones específicos de HA-MRSA, sendo estes, deste modo, reconhecidos como um sério problema de saúde pública (VAN BELKUM *et al.*, 1997a; VAN BELKUM *et al.*, 1997b; SÁ-LEÃO *et al.*, 1999; COIMBRA *et al.*, 2003; DEURENBERG *et al.*, 2007; KENNEDY *et al.*, 2008).

Conforme citado na Tabela 1, os principais clones de MRSA relacionados a infecções nosocomiais pandêmicas são: o clone ibérico (CI ou USA500), o clone pediátrico (CP ou USA800), o clone Nova Iorque/Japão (CNI/J ou USA100), os clones EMRSA 15 e EMRSA 16 (este último também chamado USA200) e o clone epidêmico brasileiro/húngaro (CEB/CH). O clone húngaro, na realidade, é um variante do CEB detectado inicialmente na Hungria e que se diferencia deste por possuir uma variação no *SCCmec* (o plasmídeo pT181 substituindo o plasmídeo pl258). Devido a isso, o CH foi classificado como *SCCmec* III, enquanto o CEB foi considerado *SCCmec* IIIA (OLIVEIRA & LENCASTRE, 2002).

O clone ibérico, classificado como ST247 (ST do inglês: *sequencing typing*), *SCCmec* IA e *agr* tipo I foi detectado, inicialmente, em um surto em hospital de Barcelona, Espanha, em 1989 (DOMINGUEZ *et al.*, 1994; FERRY *et al.*, 2006). Posteriormente, o CI foi encontrado também em hospitais de Portugal, Itália, Bélgica, Escócia, Alemanha e Estados Unidos (SANCHES *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 1998).

No ano de 1999, Sá-Leão e colaboradores descreveram a emergência de um outro clone de MRSA, que foi chamado de clone pediátrico (*SCCmec* IV ou VI, *agr* tipo II e ST5), causando infecções em crianças em hospitais localizados em Portugal, Polônia, Argentina, Colômbia e Estados Unidos (SÁ-LEÃO *et al.*, 1999; AIRES DE SOUZA *et al.*, 2005). Recentemente, amostras relacionadas ao CP foram também isoladas de profissionais de saúde e pacientes infectados no Brasil (MELO *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2007).

O clone Nova Iorque/Japão (*SCCmec* II, *agr* tipo II e ST5), geneticamente relacionado ao clone pediátrico, foi detectado inicialmente nas cidades de Nova Iorque e Tóquio e, posteriormente, em vários hospitais localizados em diferentes estados norte-americanos (COIMBRA *et al.*, 2003; FERRY *et al.*, 2006).

Amostras pertencentes aos clones designados como EMRSA 15 (SCC*mec* IV, *agr* tipo I e ST22) e EMRSA 16 (SCC*mec* II, *agr* tipo III e ST36) foram observadas causando infecções no Reino Unido e em países como Finlândia, Alemanha, Bélgica, Suécia e Dinamarca (MURCHAN *et al.*, 2003). Em estudo recente foi demonstrado que amostras relacionadas ao clone EMRSA 15 foram capazes de suplantar àquelas do clone epidêmico brasileiro, previamente predominantes em hospitais localizados em zonas portuárias de Portugal (AIRES DE SOUZA *et al.*, 2005). Já o clone EMRSA 16 tem sido relacionado a elevados índices de infecções nosocomiais na Espanha (CUEVAS *et al.*, 2007).

Finalmente, o CEB (SCC*mec* IIIA, *agr* tipo I e ST239), que foi inicialmente detectado em hospitais de todo o Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 1995), foi posteriormente encontrado em hospitais da Argentina, Uruguai, Paraguai, Chile, Portugal, Itália, República Tcheca, Austrália, Irlanda, Singapura, Coreia, Alemanha, Polônia, Espanha, Argélia, Áustria, Eslovênia, Estados Unidos, Finlândia, República da Geórgia, Grécia, Holanda, Indonésia, Índia, Mongólia, Reino Unido, Sri Lanka, Suécia, Tailândia e Vietnã (OLIVEIRA *et al.*, 1998; MELTER *et al.*, 1999; AIRES DE SOUZA *et al.*, 2001; CAMPANILE *et al.*, 2001; COIMBRA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003; SHORE *et al.*, 2004; COOMBS *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2005; SOO KO *et al.*, 2005; WISPLINGHOFF *et al.*, 2005; LUCZAK- KADLUBOWSKA, KRZYSZTON-RUSSJAN & HRYNIEWICZ, 2006; DEURENBERG *et al.*, 2007; POTEL *et al.*, 2007; BARTELS *et al.*, 2008).

Relatos de infecções comunitárias por MRSA têm sido motivo de grande interesse médico-científico. Estas infecções envolvem pacientes que não apresentam riscos clássicos para infecções nosocomiais (CA-MRSA sem risco). Doenças associadas aos CA-MRSA foram inicialmente observadas na Austrália e Nova Zelândia e, posteriormente, nos Estados Unidos e em alguns países da Europa (VANDENESCH *et al.*, 2003). Mais recentemente, casos bem documentados de CA-MRSA foram também descritos em outros países, como por exemplo, Brasil, Suíça, Taiwan, Espanha, Japão e Itália (CHEN & HUANG, 2005; HARBARTH *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2005; TAKIZAWA *et al.*, 2005; MANZUR *et al.*, 2008; VALENTINI *et al.*, 2008). As linhagens de CA-MRSA são tipicamente diferentes das de HA-MRSA (VANDENESCH *et al.*, 2003). Cepas de CA-MRSA sem risco geralmente causam infecções envolvendo pele e tecidos moles. Porém, infecções mais graves, como

bacteremias e pneumonias, apesar de mais raras, têm sido relatadas. Cepas de CA-MRSA sem risco apresentam características bastantes particulares, como a presença de SCCmec tipo IV ou V, freqüentemente produzem leucocidina de Panton-Valentine (PVL) e apresentam maior susceptibilidade a antimicrobianos, sendo geralmente resistentes somente aos  $\beta$ -lactâmicos e, em algumas casos, à eritromicina (VALENTINI *et al.*, 2008). Entretanto, tais cepas podem, eventualmente, adquirir genes de resistência aos demais antimicrobianos. Como exemplo, pode-se citar uma cepa de CA-MRSA descrita no Japão apresentando resistência a vários antimicrobianos, por carrear um plasmídio de multirresistência (TAKIZAWA *et al.*, 2005).

Uma vez que a grande maioria dos clones de MRSA disseminados internacionalmente apresenta, freqüentemente, multirresistência a drogas, o antibiótico de escolha para o tratamento das infecções hospitalares causadas por esses microrganismos ainda é a vancomicina. O uso dessa droga requer a internação do paciente, pois só é administrada na forma intravenosa, o que aumenta os custos do tratamento (MAINARDI *et al.*, 1995; LYER & HITTINAHALLI, 2008).

No final da década de 1980 foram encontradas as primeiras cepas de enterococos apresentando perfil de elevada resistência aos antimicrobianos glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina. Esta resistência é adquirida normalmente através de plasmídios carreando um transposon conjugativo da família do Tn1546 e os genes *vanA* ou *vanB* (NICAS *et al.*, 1989; SIERADZKI & TOMASZ, 1997). A partir daí, surgiu, então, a preocupação entre os cientistas de que os enterococos pudessem transferir tais genes de resistência para o MRSA (BRAKSTAD & MAELAND, 1997). Nos anos de 2002 e 2004 foi relatado o aparecimento, nos EUA, de algumas amostras de *S. aureus* resistente à vancomicina, denominadas VRSA (do inglês: *vancomycin-resistant staphylococcus aureus*; CDC, 2004; TENOVER *et al.*, 2004; WHITENER *et al.*, 2004). Felizmente, a publicação de relatos sobre a emergência de VRSA em outros países tem sido rara (TIWARI & SEN, 2006; WEIGEL *et al.*, 2007 e SAHA *et al.*, 2008), e até o momento, não houve registro de isolamento de amostras de VRSA no Brasil.

O aumento de amostras de enterococos e o surgimento de MRSA apresentando resistência aos glicopeptídeos têm estimulado o desenvolvimento de novas classes de agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas

por patógenos bacterianos resistentes (AL-TATARI *et al.*, 2006). Entre essas novas classes pode-se citar a oxazolidinona e combinações de estreptogaminas A e B, que têm sido utilizadas em vários países no tratamento de infecções graves por MRSA e são conhecidas comercialmente como Linezolida e Sinercide, respectivamente (HEDSTROM, 2002; WOLFF, 2003). Ambos os antimicrobianos são capazes de se ligar à subunidade ribossomal 50S bacteriana e inibir a síntese protéica (CEPEDA *et al.*, 2004; AL-TATARI *et al.*, 2006). Apesar de ser uma droga moderna, foi relatado recentemente a emergência de cepas de *S. aureus* resistentes à linezolida. Essa resistência foi relacionada a mutações pontuais no gene que codifica o rRNA 23S bacteriano e acarreta resistência cruzada a outros antimicrobianos como cloranfenicol e sinercide (BESIER *et al.*, 2008).

Outros agentes antimicrobianos disponíveis para uso clínico têm sido descritos como eficazes para o tratamento de infecções por MRSA. Entre eles, pode-se citar a Daptomicina, um lipopeptídeo cíclico e a Tigeciclina, uma glicil-ciclina semi-sintética (POSTIER *et al.*, 2004; ENOCH *et al.*, 2007; KANAFANI & COREY, 2007). A Daptomicina foi lançada nos EUA em 2003 para o tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por *S. aureus*, porém resultados satisfatórios já foram obtidos no tratamento de endocardites causadas por estes microrganismos. Esta droga atua na membrana plasmática bacteriana, formando canais que despolarizam tal estrutura, causando morte celular. A Tigeciclina já foi liberada para uso nos EUA, Europa e também no Brasil, porém apenas para uso hospitalar. Essa droga apresenta atividade contra MRSA e outros microrganismos resistentes, como o *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (TOWNSEND, POUND & DREW, 2006) e tem efeito comprovado em infecções de pele severas e infecções intra-abdominais, sem causar intolerância significativa nos pacientes. A Tigeciclina apresenta um mecanismo de ação semelhante as tetraciclina, sendo capaz de ligar-se à subunidade ribossomal 30S e inibir a síntese de proteínas (DOAN *et al.*, 2006; ROSE & RYBAK, 2006; GROLMAN, 2007).

A Telavancina e a Dalbavancina são os agentes mais recentemente aprovados para uso como antimicrobianos. Estas drogas são glicopeptídeos que podem ser utilizados no tratamento de pacientes com infecções graves causadas por *S. aureus* e outros patógenos Gram-positivos. A Telavancina é derivada da vancomicina, enquanto que a Dalbavancina é um glicopeptídeo análogo à

teicoplanina. Ambos são capazes de inibir a biossíntese da parede celular bacteriana (ZHANEL *et al.*, 2008). Outro antimicrobiano recentemente desenvolvido foi chamado Ceftobiprole, uma cefalosporina com atividade contra MRSA. Esta droga possui alta afinidade de ligação à PBP2a (bem como as PBPs normais), impedindo a formação da parede celular bacteriana (PILLAR *et al.*, 2008).

Apesar da queda de interesse da indústria farmacêutica no lançamento de antibióticos durante os últimos anos, novos agentes antimicrobianos ainda têm sido desenvolvidos e testados (SPELLBERG *et al.*, 2004). Entre estes, pode-se citar as fluoroquinolonas denominadas WCK 771 e clinafloxacina, que inibem a ação da enzima DNA-girase; a ramoplanina (lipoglicodepsipeptídeo), que inibe a biossíntese do peptidoglicano; a muraimicina, inibidora semi-sintética de biossíntese da parede celular; e a mannopeptimicina, que também age inibindo a biossíntese do peptidoglicano (WOODFORD, 2003; YAMASHITA *et al.*, 2003; JACOBS *et al.*, 2004; LEVINE *et al.*, 2004; RUZIN *et al.*, 2004).

### **1.3 Mecanismos de adesão e invasão em *Staphylococcus aureus***

Microrganismos pertencentes à espécie *S. aureus* não são considerados patógenos intracelulares clássicos (FINLAY & COSSART, 1997; GARZONI *et al.*, 2007). Porém, através de diversos estudos *in vitro* já foi demonstrado que essas bactérias são capazes de aderir e invadir diferentes células do hospedeiro. Alguns pesquisadores têm estudado tais mecanismos utilizando como modelos células mamárias bovinas; entretanto, a invasão dos *S. aureus* em células humanas tem sido também investigada utilizando-se células endoteliais, epiteliais, osteoblastos e fibroblastos (DRAKE & PANG, 1988; JEVON *et al.*, 1999; SINHA *et al.*, 1999; AMARAL *et al.*, 2005).

Sugere-se que os mecanismos de adesão e invasão bacterianos sejam cruciais para a colonização da bactéria e o estabelecimento de doenças, uma vez que parecem estar associados a infecções endovasculares causadas pelos *S. aureus*, como endocardite. Além disso, estes fenômenos também podem estar envolvidos na patogênese de outras infecções que ocorrem via disseminação hematogênica, como osteomielite e formação de abscesso (PÖHLMANN-DIETZE *et*

*al.*, 2000; SINHA & HERRMANN, 2005). Garzoni e colaboradores (2007) sugerem, ainda, que a internalização dos *S. aureus* é o fator chave nas infecções crônicas.

É importante citar que infecções endovasculares são difíceis de serem tratadas, uma vez que, provavelmente, envolvem uma complexa rede de fatores bacterianos e do hospedeiro, que podem inclusive levar à rápida destruição de válvulas estruturais (endocardite), formação de trombos, disseminação hematogênica e sepse. A taxa de mortalidade derivada destas complicações é relativamente alta, mesmo quando o paciente é medicado apropriadamente. Além disso, pacientes com este tipo de infecção necessitam de tratamento por semanas ou meses (SINHA & HERRMANN, 2005).

Através de estudos publicados já na década de 1990, pesquisadores relataram que o mecanismo de invasão bacteriana requer rearranjos do citoesqueleto das células do hospedeiro e induz a formação de estruturas de membrana similares às observadas durante a internalização de espécies de *Listeria* e *Yersinia* em fagócitos não profissionais (BAYLES *et al.*, 1998). Além disso, com o processo de invasão, as bactérias podem: (i) escapar da fagocitose por fagócitos profissionais (neutrófilos e macrófagos, por exemplo); (ii) obter um ambiente rico em nutrientes; e (iii) ficar protegidas da ação de certos antibióticos (SINHA *et al.*, 1999).

Evidências substanciais sustentam que o *S. aureus* pode ser internalizado e sobreviver em uma variedade de fagócitos não-profissionais *in vitro* (BAYLES *et al.*, 1998; LOWY, 1998) e *in vivo* (BROUILLETTE *et al.*, 2004; CLÉMENT *et al.*, 2005). Após internalização, o comportamento da bactéria varia de acordo com a linhagem celular e a cepa bacteriana. Por exemplo, alguns autores relatam uma ativa replicação bacteriana dentro dos vacúolos (KAHL *et al.*, 2000) ou o escape da bactéria do vacúolo e indução de apoptose celular (WESSON *et al.*, 1998; HASLINGER-LOFFLER *et al.*, 2005), enquanto outros descrevem a persistência dos *S. aureus* na célula por diversos dias, antes da indução dos processos de escape; o que poderia contribuir para os quadros de infecção crônica (MENZIES & KOURTEVA, 1998; GARZONI *et al.*, 2007). Foi recentemente relatado que a produção de  $\alpha$ -toxina, uma citolisina formadora de poros, parece ser importante no escape da bactéria dos vacúolos (JARRY, MEMMI & CHEUNG, 2008). Adicionalmente, esta toxina foi associada à indução de apoptose celular (BANTEL *et*

*al.*, 2001; MEMPEL *et al.*, 2002; HASLINGER-LOFFLER *et al.*, 2005; GARZONI *et al.*, 2007).

O processo inicial de adesão dos *S. aureus*, bem como o curso da infecção, são modulados por uma complexa rede de diferentes sistemas regulatórios globais de virulência destes microrganismos e ativação ou repressão de diversos processos nas células hospedeiras (SINHA & HERRMANN, 2005). Um grande número de proteínas de superfície produzidas pelos *S. aureus*, chamadas adesinas, parecem estar envolvidas na adesão. Estas moléculas podem ligar-se a certos componentes das células hospedeiras ou a proteínas plasmáticas, incluindo fibronectina, fibrinogênio, colágeno, dentre outras. Os achados de que os genes para tais proteínas de superfície foram detectados em aproximadamente 100% das amostras clínicas de *S. aureus* parecem indicar a importância dessas proteínas para a bactéria (SINHA & HERRMANN, 2005; LOUGHMAN *et al.*, 2008).

As adesinas estão geralmente ancoradas à parede celular bacteriana e algumas podem ser agrupadas sob a sigla de MSCRAMMs (do inglês: *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Estas moléculas são covalentemente ligadas a peptidoglicana através de uma ligação de transpeptidação. Tais proteínas apresentam um sinal C-terminal peptídico (LPXTG), o qual é reconhecido pela enzima sortase, que está localizada na membrana do *S. aureus*. A enzima cliva os peptídeos entre a treonina e a glicina do domínio LPXTG e catalisa a formação de uma ponte amida entre o radical carboxil da treonina e o grupamento amina da ponte cruzada da peptidoglicana (TON-THAT *et al.*, 1999; BOEKHORST *et al.*, 2005). Através de um estudo realizado em 2003 foi constatado que construções nocautes de *S. aureus* deficientes em sortase não apresentavam uma série de proteínas em sua superfície e não induziam doença em modelo animal (ROCHE *et al.*, 2003).

Como membros clássicos das proteínas de superfície que participam dos eventos de colonização bacteriana podemos citar as proteínas que se ligam a fibronectina (FnBPA e B; do inglês: *fibronectin binding proteins A and B*), as proteínas que se ligam ao fibrinogênio (FbBP; do inglês: *fibrinogen binding protein*), a coagulase ligada (Coa), a proteína que se liga ao colágeno (CoBP; do inglês: *collagen binding protein*), os fatores *clumping* (ClfA e B; do inglês: *clumping factor A*

and B) e a proteína A (Spa; do inglês: *staphylococcal protein A*) (PROJAN & NOVICK, 1997; SALYERS & WHITT, 2002; GARZONI *et al.*, 2007).

A primeira observação de que o *S. aureus* é capaz de se ligar especificamente à fibronectina de humanos foi relatada em 1981 (ESPERSEN & CLEMMENSEN, 1981). Em 1987, foi isolada uma FnBP (*fibronectin binding protein*) da cepa Newman, com peso molecular de 210 kDa (FRÖMAN *et al.*, 1987). Além disso, foi relatado que a região de ligação dos *S. aureus* à fibronectina está localizada na região N-terminal de um fragmento proteolítico de 27 kDa, que corresponde a uma região de ligação de heparina (MOSHER & PROCTOR, 1980).

As FnBPs são codificadas por dois genes denominados de *fnbA* e *fnbB*, que conferem o fenótipo de ligação à fibronectina. Estas proteínas ligam moléculas de fibronectina aos *S. aureus* com elevada afinidade ( $K_d = 1.8$  nM), sendo a interação praticamente irreversível sob condições fisiológicas (KUUSELA *et al.*, 1984; MAXE *et al.*, 1986).

A região de interação entre o principal domínio de ligação das FnBPs com as células hospedeiras foi mapeada recentemente. Relatou-se que a fibronectina da matriz atua como uma ponte de ligação entre a FnBP e o receptor de fibronectina, que corresponde a uma integrina  $\alpha_5\beta_1$ , molécula de adesão na célula hospedeira. Sugeriu-se, ainda, que a interação destas moléculas de superfície bacterianas com os receptores da célula, ativaria a maquinaria fagocítica da célula hospedeira (SINHA *et al.*, 2000; MEENAN *et al.*, 2007). Este mecanismo foi também observado em um trabalho publicado pela equipe de nosso laboratório, em 2005, em um modelo utilizando células respiratórias brônquicas humanas 16HBE14o<sup>-</sup> (AMARAL *et al.*, 2005). Vários outros patógenos utilizam integrinas como receptores celulares, como, por exemplo, os *Streptococcus pyogenes*, que também apresentam a capacidade de invadir células epiteliais através de interações entre fibronectina e integrinas de superfície celular (BERENDT & MCCORMICK, 1997; OZERI *et al.*, 1998).

Diversos estudos publicados apontam que as FnBPs são essenciais para a adesão e para a invasão de células endoteliais humanas, células epiteliais mamárias de bovinos e fibroblastos de ratos. Esta conclusão foi obtida através da observação de que mutantes defectivos para expressão de FnBPs apresentaram grande

redução na adesão e internalização bacterianas. Assim, foi sugerido que as FnBPs representam a via dominante para a aderência dos *S. aureus* a células do hospedeiro e que estas são também essenciais para a subsequente internalização bacteriana. Porém, estes dados não excluem a participação de outros mediadores (DZIEWANOWSKA *et al.*, 1999; LAMMERS *et al.*, 1999; PEACOCK *et al.*, 1999; FOWLER *et al.*, 2000; SINHA *et al.*, 2000; SINHA & HERRMANN, 2005; SCHRÖDER *et al.*, 2006; LOUGHMAN *et al.*, 2008).

O grupo de Bohach (1999) sugere, ainda, que a interação dos *S. aureus* com a fibronectina induz, além de transdução de sinais, atividade de tirosina quinase e rearranjos do citoesqueleto, que parecem ser importantes nos eventos de internalização bacteriana (DZIEWANOWSKA *et al.*, 1999). Verificou-se que tanto a FnBPA quanto a FnBPB são expressas predominantemente durante a fase exponencial de crescimento (SARAVIA-OTTEN, MÜLLER & ARVIDSON, 1997) e que estas proteínas podem ligar-se, além da fibronectina, às moléculas de fibrinogênio e elastina, demonstrando seu caráter multifuncional. Assim, a FnBPA, por exemplo, seria capaz de agregar plaquetas humanas, sugerindo que esta interação poderia indiretamente promover a aderência dos *S. aureus* a células endoteliais (LOUGHMAN *et al.*, 2008). Devido a tais propriedades, foi sugerido que a FnBPA também seja um importante fator de virulência em endocardites (QUE *et al.*, 2005; RINDI *et al.*, 2006). Quanto à FnBPB, ao contrário, foi observado que, apesar de se ligar ao fibrinogênio, parece não estar envolvida no processo de agregação de plaquetas (HEILMANN *et al.*, 2004; HEYING *et al.*, 2007).

Outros dados experimentais também apontam que interações entre adesinas, plaquetas e proteínas plasmáticas, e células endoteliais estão envolvidas nos processos de infecção nos vasos sanguíneos (VAUDAUX *et al.*, 1990; ING, BADDOUR & BAYER, 1997; YEAMAN, 1997; FOSTER & HÖÖK, 1998). O fibrinogênio e a fibrina são as principais proteínas plasmáticas associadas à formação de coágulos sanguíneos e na deposição de componentes em biomateriais implantados. Assim, a habilidade dos *S. aureus* em aderir a estas moléculas pode ser de grande importância para o início de uma infecção (NI EIDHIN *et al.*, 1998).

Os fatores *clumping* A e B (ClfA e ClfB, respectivamente) são proteínas capazes de se ligar a moléculas de fibrinogênio. A interação entre a bactéria e o fibrinogênio em solução resulta em uma instantânea agregação de células

bacterianas. A afinidade de ligação é alta e parece ocorrer mesmo em baixas concentrações de fibrinogênio (NI EIDHIN *et al.*, 1998; MIAJLOVIC *et al.*, 2007). Já que o fibrinogênio possui um papel significativo na formação de trombos, parece que os Clfs podem também estar envolvidos nas interações bactérias-plaquetas (SIBOO *et al.*, 2001; GEORGE *et al.*, 2006).

O fator *clumping* A (ClfA), codificado pelo gene *clfA*, é uma das primeiras adesinas estudadas em *S. aureus* e tem sido relacionado com a patogênese de várias infecções, como endocardite e danos a válvulas cardíacas (VAUDAUX *et al.*, 1995; QUE *et al.*, 2001; MIAJLOVIC *et al.*, 2007). Além disso, já foi visto que o ClfA é um dos principais fatores de virulência para indução de artrite séptica em camundongos (JOSEFSSON *et al.*, 2001; JOSEFSSON *et al.*, 2008). A estrutura desta proteína revela a existência da seqüência sinal (LPXTG), localizada na região C-terminal, seguida de uma longa região chamada A, que contém o domínio de ligação ao fibrinogênio (NI EIDHIN *et al.*, 1998; JOSEFSSON *et al.*, 2008).

O fator *clumping* B (ClfB), codificado pelo gene *clfB*, é estruturalmente similar ao ClfA. A região C-terminal é 41% idêntica, enquanto que a região A possui somente 26% de similaridade. Foi verificado que esta proteína é capaz de promover interações com fibrinogênio solúvel ou imobilizado, induzindo a formação de coágulos. Além disso, o ClfB foi associado com a aderência dos *S. aureus* à mucosa nasal (NI EIDHIN *et al.*, 1998; MIAJLOVIC *et al.*, 2007; WERTHEIM *et al.*, 2008).

Assim como o fator *clumping*, a coagulase ligada (Coa) tem sido relacionada à interação com o fibrinogênio, porém, um estudo de 1995 sugeriu que esta associação é mais fraca que a interação fator *clumping*-fibrinogênio e, portanto, menos eficiente na adesão à superfície celular do hospedeiro (DICKINSON *et al.*, 1995).

Alguns estudos sugerem que a presença de fibrinogênio é necessária para a aderência dos *S. aureus* ao epitélio, mas que esta não é a única molécula requerida neste processo (CHEUNG *et al.*, 1991). Além disso, um trabalho publicado em 1999 apontou que mutantes para proteínas ligadoras de fibrinogênio não tiveram redução significativa na internalização em células epiteliais, quando comparados à amostra selvagem isogênica, a qual apresentava FnBPs intactas (DZIEWANOWSKA *et al.*, 1999).

Como já mencionado, outras proteínas de superfície dos *S. aureus* também foram associadas à adesão e invasão, como a proteína A (Spa) e as proteínas ligadoras de colágeno (CoBP). Entretanto, não foi observada participação crucial destas moléculas na internalização bacteriana (DZIEWANOWSKA *et al.*, 1999; SINHA *et al.*, 2000). Acredita-se que a proteína A deva interagir com vários componentes do hospedeiro durante o processo de colonização, o que poderia estar relacionado com os mecanismos de adesão bacteriana. Um estudo realizado por Hartleib e colaboradores (2000) mostra que a Spa pode interagir com uma glicoproteína multifuncional liberada pelas células endoteliais e plaquetas humanas chamada de *von willebrand factor* (vWF), o que já lhe daria a função de adesina.

Já as proteínas ligadoras de colágeno (CoBPs), codificadas pelo gene *cna*, parecem interagir com plaquetas, uma vez que a agregação destas ocorre predominantemente sobre o colágeno na matriz extracelular e esta superfície poderia servir como potencial sítio de ligação para *S. aureus* em endocardites (MASCARI & ROSS, 2003). Porém, sugere-se que a adesão dos *Staphylococcus aureus* ao colágeno não é o principal determinante de virulência nas osteomielites, artrites sépticas e endocardites (THOMAS *et al.*, 1999).

#### **1.4 Sistemas de regulação global em *Staphylococcus aureus***

A patogênese das infecções causadas pelo *S. aureus* é de natureza multifatorial e modulada por uma complexa e intrincada rede de regulação gênica. Atualmente, são descritos diversos sistemas globais de regulação deste microrganismo. Tais sistemas são capazes de modular finamente a expressão de múltiplos genes, incluindo genes de virulência. Dentre estes sistemas podemos citar o Agr (do inglês: *accessory gene regulator*), o principal sensor de densidade populacional dos *S. aureus*; o SaeRS (do inglês: *S. aureus exoprotein expression*) e o ArlRS (do inglês: *ADP ribosylation factor*); estes dois últimos funcionando como sistemas de tradução de sinais via dois componentes (JI, BEAVIS & NOVICK, 1995; PROJAN & NOVICK, 1997). Além disso, *S. aureus* possuem diversas proteínas reguladoras como SigB (um fator sigma alternativo de fase estacionária; do inglês: *Sigma factor B*) e SarA (do inglês: *staphylococcal accessory regulator*); esta última, uma proteína reguladora transcricional que atua sobre diversos genes de virulência

dos *S. aureus*. Além desses reguladores, várias proteínas com homologia com a proteína SarA (Homólogos Sar) já foram descritas e também podem atuar na regulação de genes virulência direta ou indiretamente, via *agr* ou *sarA*. Dentre essas proteínas podemos citar o regulador Rot, que, além de apresentar função de um repressor de toxinas, também parece atuar como um regulador global, com efeitos negativos e positivos na expressão de vários genes dos *S. aureus* (SAID-SALIM *et al.*, 2003).

O sistema de dois componentes *arlR-arlS* codifica um sistema regulador aparentemente envolvido na autólise, na atividade proteolítica extracelular e na regulação negativa do biofilme (FOURNIER & HOOPER, 2000). Esse sistema está diretamente envolvido na modulação de alguns genes de virulência tais como *hld* (que codifica a delta hemolisina), *lukDE* (codificadores de leucocidinas) e genes relacionados ao crescimento bacteriano (LIANG *et al.*, 2005). Já o sistema SaeRS parece estar envolvido no controle da expressão de genes relacionados à virulência, incluindo genes importantes para aderência bacteriana e invasão em células epiteliais (LIANG *et al.*, 2006; LIANG & JI, 2007).

O locus *agr* (FIGURA 1) codifica um sistema de *quorum sensing* que promove uma regulação negativa de proteínas de superfície envolvidas na colonização do hospedeiro e positiva na expressão de proteínas extracelulares envolvidas na agressão ao hospedeiro (NOVICK *et al.*, 1993; JI, BEAVIS & NOVICK, 1997; LYON *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002; BOLES & HORSWILL, 2008). Foi verificado que o locus *agr* é constituído por duas regiões divergentes de transcrição, denominadas RNAII e RNAIII, as quais são transcritas sob a direção dos promotores *agrP2* e *agrP3*, respectivamente (KOREM *et al.*, 2005).

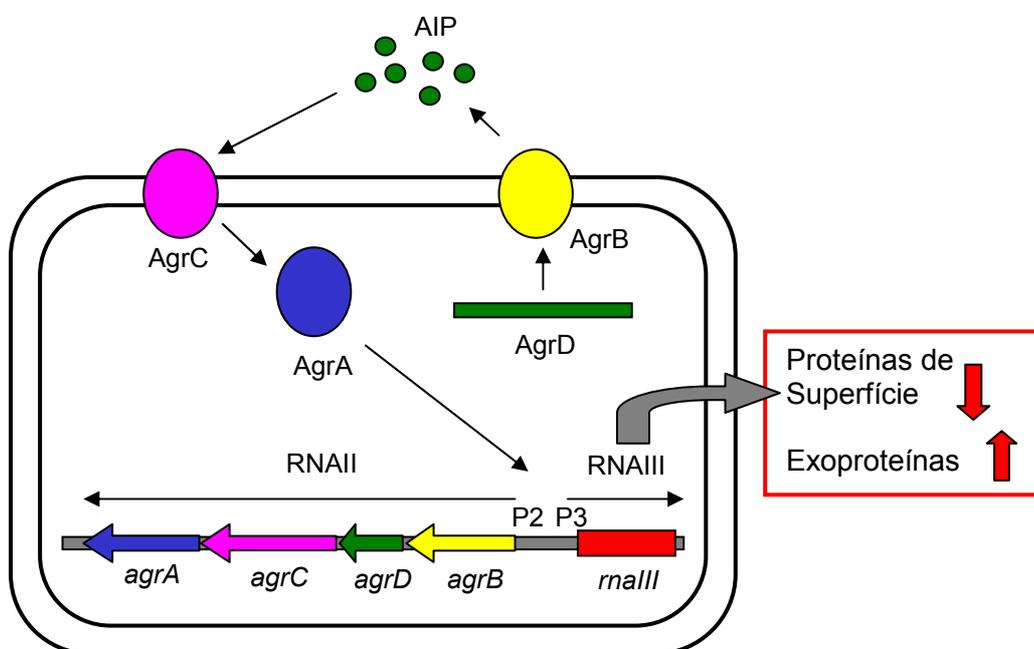
O RNAII é composto de quatro genes: *agrBDCA*. O gene *agrD* codifica para uma proteína que origina o peptídeo autoindutor do sistema Agr, conhecido com AIP (do inglês: *autoinducing peptide*). A proteína AgrD é sintetizada ao nível ribossomal e ancorada à parte interna da bicamada de fosfolipídios da membrana, através de uma hélice com domínios hidrofóbicos na sua região N-terminal, que a dirige ao mesmo compartimento onde se encontra a proteína AgrB, codificada pelo gene *agrB* (ZHANG & JI, 2004). Chegando até AgrB, a proteína AgrD é processada (através de digestão proteolítica e formação de ligação tioéster) e secretada já como AIP. As proteínas AgrC e AgrA (codificadas pelos genes *agrC* e *agrA*, respectivamente)

participam de um sistema de transdução de sinais via dois componentes. O peptídeo AIP ativa o locus *agr* ao se ligar hidrofobicamente à proteína sensora AgrC (WRIGHT III *et al.*, 2004), uma proteína exposta na membrana da célula bacteriana que apresenta, portanto, um domínio transmembranoso e um outro domínio histidina quinase. Por sua vez, essa proteína se auto-fosforila em seu domínio histidina e ativa (fosforilando) a proteína AgrA; uma proteína reguladora de resposta do sistema de dois componentes, com capacidade de se ligar a DNA e funcionar como fator de transcrição. Assim, a proteína AgrA fosforilada, em conjunto com a proteína SarA, são capazes de se ligar aos promotores *agrP2P3*, ativando assim a transcrição de todo operon Agr (NOVICK *et al.*, 1993; MORFELDT, TEGMARK & ARVIDSON, 1996; JI, BEAVIS & NOVICK, 1997; NOVICK & MUIR, 1999; LYON *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002; NOVICK, 2003).

O RNAIII é a molécula efetora do locus *agr*, atuando na regulação à distância (em *trans*) de diversos fatores de virulência. Desta forma, no meio da fase exponencial do crescimento bacteriano, o RNAIII começa a ser expresso. A porção 3' terminal da molécula de RNAIII é capaz de parear com a região Shine-Dalgarno (SD; local de ligação dos ribossomos) dos genes codificadores de proteínas de superfície, importantes para a adesão e/ou invasão às células do hospedeiro. Assim, a molécula efetora do locus *agr* pode regular, em nível de tradução, negativa e diretamente estas proteínas. Por outro lado, o RNAIII também é capaz de suprimir a proteína Rot (inibidor global de exoproteínas), pareando com a região SD do gene responsável por sua transcrição, permitindo, assim, a regulação positiva e indireta das exoproteínas produzidas pelos *S. aureus* (MORFELDT, TEGMARK & ARVIDSON, 1996; GEISINGER *et al.*, 2006; HSIEH, TSENG & STEWART, 2008). A figura 1 (adaptada de IWATSUKI *et al.*, 2006) apresenta um esquema que ilustra o funcionamento do locus *agr*.

Os peptídeos autoindutores (AIP) produzidos a partir do locus *agr* possuem algumas variações na seqüência de aminoácidos e nos domínios histidina-quinase de seus receptores. A partir dessas variações, foram determinados, até o momento, quatro tipos polimórficos de *agr*: *agrI*, *agrII*, *agrIII* e *agrIV* (JI, BEAVIS & NOVICK, 1997; JARRAUD *et al.*, 2000). O *agrIV* foi detectado em um clone envolvido em surtos de Síndrome de pele escaldada nos EUA e na França. O *agrIII* foi inicialmente verificado, nos EUA, nas primeiras amostras de *S. aureus* relacionadas com a

Síndrome do choque tóxico associada ao uso de absorventes internos e tem aparecido, atualmente, em amostras associadas a infecções comunitárias. As amostras *agrI* e II foram encontradas em infecções comunitárias e hospitalares de um modo geral (JARRAUD *et al.*, 2000). Estudos descritos na literatura apontam que estes grupos alélicos podem induzir a atividade de *agr* em amostras de *S. aureus* apresentando um mesmo grupo e inibir a expressão deste locus entre amostras possuindo grupos diferentes de *agr*. Assim, foi proposto que a inibição cruzada da expressão deste operon representaria um tipo de interferência bacteriana, que poderia ser correlacionada com a habilidade de uma cepa suplantar outra, nos locais da infecção ou de colonização, ou de ambos (JI, BEAVIS & NOVICK, 1997).



**Figura 1:** Modelo esquemático do sistema de *quorum sensing agr* (Adaptado de IWATSUKI *et al.*, 2006). RNAIII é a molécula efetora do locus *agr*, transcrita a partir do promotor *agrP3* e que regula positivamente a expressão de exoproteínas e negativamente de proteínas de superfície. O RNAII, transcrito a partir do promotor *agrP2*, é composto dos genes *agrBDCA*. O gene *agrD* codifica para a proteína AgrD, que origina o peptídeo autoindutor do sistema Agr (AIP). A proteína AgrD se dirige ao mesmo compartimento onde se encontra a proteína AgrB. A proteína AgrD é processada pela AgrB e secretada já como AIP. As proteínas AgrC e AgrA participam de um sistema de transdução de sinais via dois componentes. O peptídeo AIP ativa o locus *agr* ao se ligar hidrofobicamente à proteína transmembrana sensora AgrC. Por sua vez, essa proteína se auto-fosforila e ativa (fosforilando) a proteína AgrA, a qual, em conjunto com a proteína SarA, são capazes de se ligarem aos promotores *agrP2P3*, ativando assim a transcrição de todo operon Agr.

Existem diversas evidências de que os reguladores globais de virulência (como o *agr*-RNAIII e SarA) desempenham papéis fundamentais na modulação da

virulência e patogênese bacteriana. Assim, é cada vez maior a busca pela compreensão dos mecanismos envolvidos nessa complexa teia formada pelos sistemas de regulação. Bunce e colaboradores (1992), assim como Cheug e colaboradores (1994), observaram uma atenuação da virulência em diferentes modelos de infecção animal, quando utilizaram amostras de *S. aureus* mutantes *agr*. Por outro lado, o papel do Agr na formação/acumulação de biofilme por *S. aureus* parecia contraditório, uma vez que a maioria dos trabalhos apontava para um efeito mínimo ou neutro (BEENKEN, BLEVINS & SMELTZER, 2003; TOLEDO-ARANA *et al.*, 2005), enquanto outros indicavam um efeito negativo (VUONG *et al.*, 2000; O'NEILL *et al.*, 2007; BOLES & HORSWILL, 2008). Porém, dados recentes de nosso laboratório, utilizando construções *agr* deletadas, demonstraram que o Agr pôde, significativamente, afetar o biofilme, tanto positivamente como negativamente, na maioria das amostras clínicas de *S. aureus* (COELHO *et al.*, 2008). Essa regulação divergente promovida pelo Agr no biofilme poderia ser consequência de uma provável natureza multifatorial do filme biológico, o qual seria mediado, provavelmente, por múltiplos componentes (natureza multifatorial). Dentre prováveis componentes incluem-se tanto proteínas de superfície negativamente reguladas pelo RNAIII, como as FnBPs (O'NEILL *et al.*, 2008), quanto proteínas secretadas reguladas positivamente pelo RNAIII, como a  $\alpha$ -hemolisina (CAIAZZA & O'TOLLE, 2003).

Os mecanismos de invasão e aderência bacterianos também parecem envolver proteínas e outras moléculas que estão, principalmente, ancoradas à parede celular e, como dito anteriormente, muitos destes componentes podem ser negativamente regulados pelo locus *agr*. Desta forma, este sistema regulador pode apresentar grande influência nestes processos.

Buzzola e colaboradores (2007) analisaram a habilidade de amostras de *S. aureus* pertencentes a diversos grupos *agr* de invadir células epiteliais mamárias bovinas e verificaram um aumento significativo na percentagem de invasão em amostras mutantes *agr* quando comparada às selvagens isogênicas. Além disso, houve também um aumento na percentagem de invasão nas amostras *agr* tipo I, quando comparadas a outros tipos de *agr*. Interessante notar que, naquele estudo, 88% das amostras isoladas de mastite bovina pertenciam ao *agr* tipo I, sugerindo que tais amostras clínicas poderiam possuir maior habilidade para invadir células do

hospedeiro. Cabe aqui também ressaltar que estudos anteriores, realizados pelo nosso grupo, demonstraram que amostras de MRSA hospitalares se concentram nos grupos Agr I e II (JARRAUD *et al.*, 2000). Adicionalmente, demonstramos ainda que o CEB (ST239 e SCC*mec* IIIA) é um clone de MRSA altamente invasor e também possui *agr* tipo I (AMARAL *et al.*, 2005). Entretanto, outros estudos são necessários para se atribuir uma associação entre tipos *agr* e propriedades de virulência dos *S. aureus*, como por exemplo a invasão.

Alguns estudos foram realizados visando-se verificar a influência do *agr* nos processos de adesão e invasão. Utilizando a construção RN6911 (*agr* nula; e que portanto possui um aumento na expressão de FnBPs), foi observado um aumento na porcentagem de internalização desta cepa, tanto em células epiteliais mamárias bovinas como em células endoteliais, quando comparada com a amostra *agr*<sup>+</sup> RN6390B (selvagem isogênica; derivada da cepa laboratorial NTCC8325-4). Os autores sugeriram que a amostra mutante, apresentando o *agr* inativado, expressaria níveis elevados de proteínas de superfície, os quais culminariam com uma maior capacidade desse mutante para invadir células do hospedeiro (WESSON *et al.*, 1998; LAMMERS, NUIJTEN & SMITH, 1999; SHENKMAN *et al.*, 2001; SHENKMAN *et al.*, 2002). O grupo de Rubinstein em 2002 verificou, ainda, uma maior habilidade desse mesmo mutante *agr* de induzir agregação de plaquetas em suspensão, quando comparado à amostra selvagem (*agr*<sup>+</sup>), correlacionando este resultado ao aumento da ligação ao fibrinogênio na amostra *agr*<sup>-</sup> (SHENKMAN *et al.*, 2002).

Outro estudo comparou a porcentagem de adesão e invasão entre o mutante *agr*<sup>-</sup> (RN6911) e a amostra selvagem isogênica *agr*<sup>+</sup> (RN6390B), nas fases exponencial e estacionária de crescimento. Foi observado que na fase exponencial a amostra selvagem apresentou valores de adesão e invasão às células mamárias bovinas semelhantes ao da amostra *agr*<sup>-</sup> RN6911. Porém, na fase estacionária, a amostra selvagem exibiu níveis de adesão e invasão bem menores que a amostra mutante (LAMMERS, NUIJTEN & SMITH, 1999).

Um trabalho publicado por Amaral e colaboradores em 2005 utilizou células epiteliais brônquicas humanas e as mesmas amostras bacterianas (RN6390B e RN6911) com o objetivo de estudar a atividade de ligação à fibronectina de células bacterianas em fase logarítmica de crescimento e em fase estacionária. O

comportamento bacteriano observado neste caso foi semelhante ao encontrado por Lammers, Nuijten e Smith (1999). Na fase estacionária a amostra selvagem exibiu níveis de atividade de ligação a fibronectina significativamente inferiores aos da amostra mutante, que por sua vez permaneceu com alta atividade de ligação à fibronectina (AMARAL *et al.*, 2005).

Estes dados parecem indicar que as diferenças observadas nas fases de crescimento estavam relacionadas às variações na expressão das proteínas envolvidas na adesão e invasão bacterianas, as quais são controladas pelo locus *agr*, incluindo as FnBPs (LAMMERS, NUIJTEN & SMITH., 1999; AMARAL *et al.*, 2005). Como o locus *agr* é um sistema de *quorum sensing*, há, na fase estacionária, maior número de células, mais peptídeo *agr* (AIP) e, portanto, maior ativação deste locus.

A proteína SarA é ativadora do sistema Agr, por ser capaz de se ligar aos promotores *agr*, aumentando suas expressões e, conseqüentemente, a transcrição da molécula de RNAIII (HEINRICHS, BAYER & CHEUNG, 1996; MANNA & CHEUNG, 2006). Esta proteína também regula a expressão de outros genes de modo independente do locus *agr*, podendo inclusive ativar genes associados à ligação da bactéria ao fibrinogênio, fibronectina e outras proteínas plasmáticas do hospedeiro. Durante o início da fase exponencial de crescimento bacteriano, o sistema SarA promove a síntese de adesinas. Porém, ao contrário, da metade para o final da fase exponencial, o RNAIII ativa a transcrição de vários genes que codificam para proteínas secretadas e inibe outros que codificam para proteínas de superfície (WOLZ *et al.*, 2000; DUNMAN *et al.*, 2001; SHENKMAN *et al.*, 2001).

Acredita-se que o grande número de fatores de virulência produzidos pelos *S. aureus*, em sintonia com a regulação global de tais produtos, sejam responsáveis pela sua extraordinária capacidade de adaptação aos diferentes nichos do hospedeiro e, ainda, pela modulação da patogenicidade bacteriana, tornando assim esses microrganismos extremamente versáteis como agentes de diversas doenças hospitalares e comunitárias.

Como exposto anteriormente, alguns estudos publicados na literatura já demonstraram a influência do locus *agr* na invasão e aderência dos *Staphylococcus aureus* a certos tipos de células, regulando negativamente proteínas envolvidas nestes processos (WESSON *et al.*, 1998; LAMMERS, NUIJTEN & SMITH, 1999;

SHENKMAN *et al.*, 2001; SHENKMAN *et al.*, 2002; AMARAL *et al.*, 2005; BUZZOLA *et al.*, 2007). Porém, em nenhum destes trabalhos utilizou-se mutantes *agr* construídos a partir de cepas clínicas. A grande maioria fez uso da construção *agr*-nula RN6911, que é derivada da cepa laboratorial NTCC8325-4 (NOVICK *et al.*, 1991), a qual apresenta uma deleção natural de 11pb no gene *rsbU* (fosfatase regulada pelo fator Sigma B; KULLIK, GIACHINO, & FUCHS, 1998; CASSAT *et al.*, 2006) e no gene *agrA* (ADHIKARI, ARVIDSON & NOVICK, 2007). Por outro lado, foi observado que o comportamento desta amostra mutante *agr* pôde variar, dependendo do laboratório no qual encontrava-se estocada (VALLE *et al.*, 2003). É notório ainda que esses trabalhos tiveram como modelos de estudo, principalmente, células mamárias bovinas ou células endoteliais. Considerando que *Staphylococcus aureus* são um dos principais causadores de infecções pulmonares e estão envolvidos em quadros graves de pneumonias associadas a infecções hospitalares e comunitárias (SILVA *et al.*, 2004; EBERT, SHETH & FISHMAN, 2008; VENTURA *et al.*, 2008), nos parece interessante verificar o efeito do *agr* na invasão de células epiteliais da via respiratória de humanos, utilizando *agr*-nocautes construídos a partir de uma cepa clínica de *S. aureus*. O estudo da virulência bacteriana e seus mecanismos de regulação gênica tem sido apontado como de grande importância, uma vez que poderia implicar na obtenção de alvos promissores para o desenvolvimento de terapias alternativas, tendo em vista a falência dos esquemas na antibioticoterapia atual (SPELLBERG *et al.*, 2004).

## 2 OBJETIVOS

Avaliar a influência do locus *agr* na invasão bacteriana, utilizando como modelo células epiteliais brônquicas humanas transformadas (16HBE14o<sup>-</sup>). Para tanto, foram utilizadas duas construções, uma nocaute *agr* ( $\Delta agr::tetM$ ) e uma trans-complementada (*Pbla-rnalIII-cat*), ambas derivadas de uma cepa clínica de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina. Além disso, foi ainda nosso objetivo, analisar o papel da atenuação natural do *agr* na invasão de amostras de MRSA pertencentes ao clone epidêmico brasileiro (CEB).

Objetivos específicos:

- I. Obter uma construção nocaute *agr* ( $\Delta agr::tetM$ ) a partir de uma cepa clínica de MSSA, através de experimentos genéticos envolvendo troca alélica, via recombinação homóloga por duplo *crossing*.
- II. Complementar a construção nocaute *agr* através da introdução do plasmídio de expressão pRN6848 contendo a fusão *Pbla-rnalIII-cat*, via transdução.
- III. Analisar o efeito do locus *agr* quanto à invasão bacteriana utilizando as construções *agr*-nula e *rnalIII*-complementada, em modelo de monocamadas de células epiteliais brônquicas humanas transformadas (16HBE14o<sup>-</sup>).
- IV. Avaliar o papel da atenuação natural do locus *agr* na invasão de duas amostras de MRSA pertencentes ao clone epidêmico brasileiro: BMB9393 (*agr*-funcional) e GV69 (*agr*-atenuada).

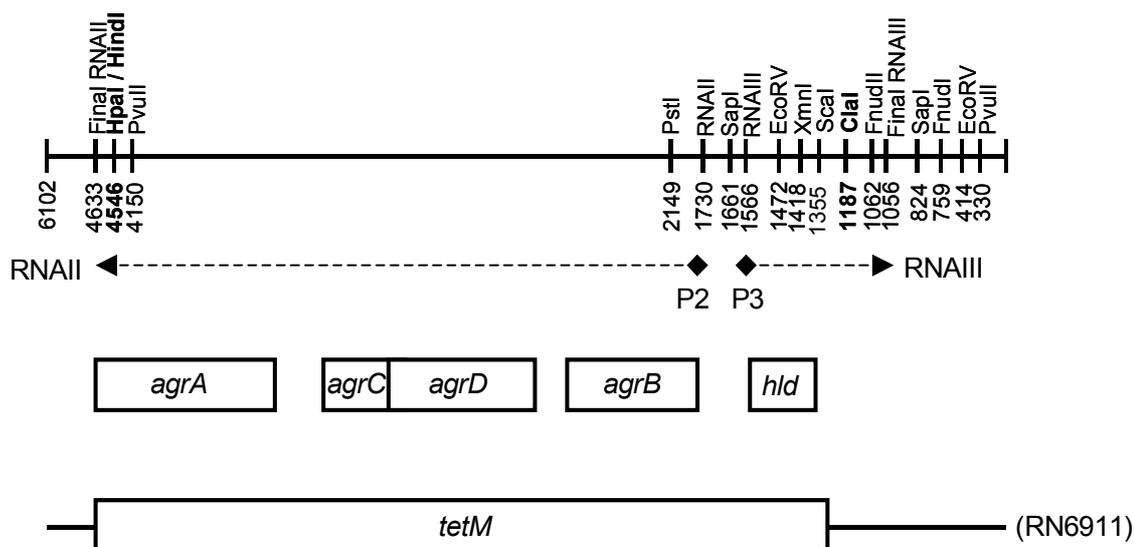
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras bacterianas, plasmídios e construções

As amostras clínicas de *S. aureus* utilizadas neste trabalho (HC474, GV69 e BMB9393) fazem parte da coleção do laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (IMPPG – UFRJ) e foram isoladas em diferentes hospitais e ambulatórios do país a partir de origens clínicas diversas. Os experimentos para a obtenção dos mutantes foram realizados com uma amostra clínica de *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), denominada HC474, a qual apresenta um padrão de PFGE similar ao de amostras de MRSA pertencentes ao clone pediátrico (linhagem ST5-SCC*mec* IV) e clone Nova Iorque (ST5-SCC*mec* II).

A construção do mutante *agr* nulo ( $\Delta agr::tetM$ ) foi obtida através de transdução utilizando o bacteriófago 80 $\alpha$ , propagado inicialmente na cepa de *S. aureus* RN450 e, posteriormente, na cepa *agr*-nula RN6911 (gentilmente cedidas pelo Dr. Richard Novick, do *Skirball Institute of Molecular Medicine*, NY, EUA). Nesta etapa, o locus *agr* foi totalmente removido através de troca alélica, via recombinação homóloga por duplo *crossing*, utilizando a cepa RN6911, na qual foi previamente inserido o gene de resistência à tetraciclina no local onde deveria estar inserido o operon *agrBDCA*, que constitui o locus *agr* (FIGURA 2; adaptada de NOVICK *et al.*, 1993).

A construção *agr*-nula complementada em trans com o gene que codifica para o RNAIII [molécula reguladora (efetora) do locus *agr*] foi obtida através de transdução utilizando o bacteriófago 80 $\alpha$ , propagado inicialmente na cepa de *S. aureus* RN450 e, posteriormente, na cepa RN8041 (também gentilmente cedida pelo Dr. Richard Novick). A cepa RN8041 carrega o plasmídio pRN6848, que contém clonado o gene codificador do RNAIII fundido ao promotor do gene da  $\beta$ -lactamase (*Pbla*) e o gene de resistência ao cloranfenicol (pRN5548::*Pbla-rnaIII-cat* ; NOVICK *et al.*, 1993).



**Figura 2:** Organização do locus *agr* (Adaptada de NOVICK *et al.*, 1993). Mapa de restrição do locus *agr* mostrando as ORFs (do inglês: *open reading frame*), promotores e transcritos. Logo abaixo está apresentada a região correspondente ao cromossomo da amostra *agr* nula RN6911, em que o fragmento de 3,4kb *ClaI* (1187) – *HpaI* (4546) foi substituído pelo marcador *tetM*

Duas amostras representantes do clone epidêmico brasileiro (CEB) foram utilizadas nos experimentos de invasão bacteriana: a amostra BMB9393 (*agr*-funcional e isolada de colonização de profissional de saúde) e a amostra GV69 (*agr* naturalmente atenuada, isolada de um caso de pneumonia em paciente hospitalizado).

### 3.2 Soluções e meios de cultura utilizados na transdução

Todos os meios de cultura e soluções listados a seguir foram preparados de acordo com o descrito por Novick em 1991.

#### 3.2.1 GL Agar (1 L)

- Casoaminoácido: 3 g
- Extrato de levedura: 3 g
- Cloreto de sódio: 5,9 g
- Lactato de sódio: 3,3 g
- Glicerol 25% (p/v): 4 mL

- Ágar: 15 g
- Água destilada q. s. p.: 1000 mL

### **3.2.2 Phage Buffer (1 L)**

- Sulfato de magnésio 0,1 M: 10 mL
- Cloreto de cálcio 0,4 M: 10 mL
- Tris-HCl 2,5 M pH 7,8: 20 mL
- Cloreto de sódio: 5,9 g
- Gelatina: 1,0 g
- Água destilada q. s. p.: 1000 mL

### **3.2.3 CY Broth (1 L)**

- Casoaminoácido: 10 g
- Extrato de levedura: 10 g
- Cloreto de sódio: 5,9 g
- Glicose: 5 g
- Água destilada q. s. p.: 1000 mL

### **3.2.4 Top Agar (1 L)**

- Casoaminoácido: 3 g
- Extrato de levedura: 3 g
- Cloreto de sódio: 5,9 g
- Lactato de sódio: 3,3 g
- Glicerol 25% (p/v): 4 mL
- Ágar: 7,5 g
- Água destilada q. s. p.: 1000 mL

## **3.3 Propagação do bacteriófago 80 $\alpha$**

A partir do estoque, a amostra RN450 foi plaqueada em *GL Agar* e incubada a 37°C por 24 h. Em seguida, uma suspensão bacteriana foi feita em uma mistura (1:1

v/v) de *CY broth* e *phage buffer*. A essa suspensão foi acrescido o lisado contendo o bacteriófago 80 $\alpha$ , esterilizado por filtração (filtros Millipore 0,22  $\mu$ m), de forma a atingir 1 MOI (multiplicidade de infecção). A mistura foi incubada a 30°C por aproximadamente 2 h, sob leve agitação, ou até que a lise bacteriana completa fosse observada (pela diminuição da turvação no meio). Em seguida, esta mistura foi centrifugada (900 g por 10 min a 4°C), filtrada (filtros Millipore 0,22  $\mu$ m), diluída e, posteriormente, 10  $\mu$ l de cada diluição foram aplicados sobre um “tapete” da cepa RN450. Este tapete foi preparado a partir de uma suspensão bacteriana em fase logarítmica de crescimento ( $10^7$ - $10^8$  UFC/mL), obtida a partir de um cultivo em *GL Agar*. As placas foram incubadas a 30°C por 24 h e as unidades de placas de lise por mililitro (upl/mL) foram contadas. Os fagos assim propagados na amostra RN450 foram novamente propagados na cepa *agr* nula RN6911 e, separadamente, na cepa RN8041 (*Pbla-rnIII-cat*), para que fossem realizados os experimentos de transdução.

### 3.4 Transdução em cepa clínica

Para a obtenção da construção *agr*-nula, a amostra HC474 foi cultivada em *GL Agar* e incubada a 37°C por 24 h. Uma suspensão bacteriana, preparada em *CY broth:phage Agar* (1:1 v/v), foi diluída em uma suspensão do fago 80 $\alpha$ , previamente propagado na amostra *agr*-nula RN6911 (contendo aproximadamente  $10^{10-11}$  ufp/mL), de modo a conter 1 multiplicidade de infecção (1 MOI). A mistura foi incubada a 32°C por 30 min sob suave agitação. Em seguida, acrescentou-se *Top agar* e verteu-se todo o conteúdo sobre uma placa contendo *GL Agar* suplementada com 5  $\mu$ g/mL de tetraciclina (GL-Tc). Esta placa foi incubada a 32°C por 24 h a 48 h. Somente as células bacterianas transdutantes (resistentes à tetraciclina: Tc<sup>r</sup>) devem crescer no GL-Tc. As colônias Tc<sup>r</sup> foram isoladas, re-testadas quanto à resistência à tetraciclina através de nova passagem em GL-Tc e finalmente estocadas a -70°C. Foi realizado ainda um controle negativo para os experimentos de transdução, onde foram procedidas todas as etapas descritas acima, excluindo-se a adição de suspensão fágica, a qual foi substituída por igual volume de *CY broth:phage Agar* (1:1).

Para a construção da amostra *rnalll*-complementada, o mutante *agr* nulo obtido foi cultivado em placa com *GL Agar* a 37°C por 24 h. Em seguida, foram realizados os mesmos experimentos de transdução como descrito acima, com exceção da propagação do fago 80 $\alpha$ , que foi realizada com a amostra RN8041 (a qual contém o plasmídio pRN6848 com o gene codificador do RNAIII). Além disso, a seleção das colônias transdutantes foi realizada em placas contendo *GL Agar* com 5  $\mu$ g/mL de tetraciclina e 10  $\mu$ g/mL de cloranfenicol (GL-Tc+Cm), uma vez que a construção *rnalll*-complementada apresenta estas marcas de resistência.

### 3.5 Confirmação das construções *agr*-nula e *rnalll*-complementada

#### 3.5.1 Detecção do locus *agr* através de PCR

O DNA total das colônias transdutantes obtidas foi obtido através do método da lise térmica, conforme descrito por Pacheco e colaboradores (1997). As transdutantes foram cultivadas em TSA (do inglês: *trypcase soy agar*) e incubadas a 37°C por 24 h. Uma leve massa bacteriana foi suspensa em TE (Tris 1 mM pH 7,4; EDTA 1 mM pH 8 e água bidestilada) e a densidade ótica (DO) a 600 nm da mesma, determinada. Com auxílio da fórmula abaixo, foi calculado o volume da suspensão inicial a ser transferido para um novo tubo tipo Eppendorf para que a extração fosse realizada.

$$X = 80 / \text{DO da suspensão}$$

X = Volume da suspensão em  $\mu$ L  
que será utilizado para a  
preparação do DNA

O volume da suspensão em TE calculado (através da fórmula acima) foi centrifugado por 2 min a 1000 *g*. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em TE. Após vigorosa homogeneização, a suspensão celular foi fervida por 10 min e, em seguida, centrifugada (2 min a 1000 *g*). O sobrenadante obtido contendo o DNA foi estocado a -20°C, até o momento do uso (PACHECO *et al.*, 1997).

O DNA obtido foi amplificado pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR; do inglês: *Polimerase Chain Reaction*). Foram utilizados iniciadores (do inglês: *primers*) específicos para um fragmento de DNA correspondente a uma região interna do RNAIII, que apresenta 292pb de tamanho (iniciador 1: 5'catagcactgagtccaagga<sup>3'</sup> e iniciador 3: 5'caatcggtgacttagtaaaatg<sup>3'</sup>). Para um volume de reação final de 50 µl, foram utilizados os seguintes reagentes: 100 µM de cada dNTP, 100 pmoles de cada iniciador, aproximadamente 50 ng de DNA molde extraído previamente, 1,5 µM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 1,25 U de Taq DNA polimerase (Gibco), 1x tampão da enzima (Gibco) e água bidestilada estéril q.s.p. 50µl.

A amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp (PCR system 9700, *Perkin-elmer Cetus*), programado de acordo com as seguintes etapas (INNIS *et al.*, 1990):

- a) Pré-desnaturação a 94°C por 4 min, sem a adição da Taq-polimerase.
- b) Adição da Taq e realização de 30 ciclos:
  - Denaturação a 94°C por 30 s;
  - Anelamento a 55°C por 30 s;
  - Extensão a 72°C por 1 min e 30 s.
- c) Extensão final a 72°C por 4 min.

Como controle positivo dos experimentos de PCR utilizamos o DNA da amostra *agr*<sup>+</sup> BMB9393 e como controle negativo o DNA da amostra *agr*-nula RN6911. Para o controle interno utilizamos iniciadores específicos para amplificar um fragmento interno de 701 pb dos genes *icaAD* (*icaAF*: 5'tcaagggggacacgaagtat<sup>3'</sup> e *icaAR*: 5'gattctcctcctctgcca<sup>3'</sup>).

Após amplificação, uma alíquota do produto da reação e um volume de 2 µl do marcador de tamanho molecular 123 (Invitrogen), foram adicionados, separadamente, a um volume igual do corante de corrida contendo glicerol [azul de bromofenol a 0,25% (p/v); xileno-cianol FF a 0,25% (p/v); glicerol a 30% (v/v) em água]. Os DNA foram aplicados em canaletas de um mini-gel de agarose 1,2% (p/v) e submetidos à eletroforese a 90 V, por 90 min. Posteriormente, o gel foi tratado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL e o DNA visualizado com auxílio de um

transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado com filme Polaroid tipo 667 (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

As colônias bacterianas que cresceram no agar GL-Tc, provavelmente correspondentes às construções *agr*-nulas ( $\Delta agr::tetM$ ), cujos DNA não promoveram a amplificação do fragmento do *rnalll*, apesar da amplificação do controle interno *icaAD*, foram selecionadas e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em presença de glicerol a 12%. Do mesmo modo, as colônias bacterianas que cresceram em agar GL-Tc+Cm, possivelmente correspondentes às construções *rnalll*-complementadas (*Pbla-rnalll-cat*), cujos DNA permitiram a amplificação do fragmento interno do *rnalll* foram selecionadas e estocadas conforme acima.

### **3.5.2 Detecção do *rnalll* através da técnica de *dot-blotting***

Para confirmar se a construção *agr*-nula obtida realmente não possuía o *rnalll* em seu genoma, o DNA foi extraído e hibridizado com sonda específica para *rnalll*. A extração foi realizada através da técnica que utiliza fenol-clorofórmio, descrita por Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989), com algumas modificações: as células bacterianas foram lisadas com lisostafina (100 U/mL; Sigma), homogeneizadas e incubadas por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, o material foi processado como recomendado. O DNA obtido foi purificado, utilizando-se o kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences do Brasil Ltda.), de acordo com as recomendações do fabricante.

Em seguida, 10  $\mu\text{g}$  da preparação do DNA purificado foi fervido por 5 min, para abertura das fitas de DNA, e colocado imediatamente no gelo por mais 5 min. Após rápida centrifugação, toda a solução de DNA foi aplicada sobre uma membrana de nitrocelulose (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences), e o DNA foi fixado em forno (Famo; mod. st. 200) a  $80^{\circ}\text{C}$  por 2 h.

A sonda para o *rnalll* foi obtida através de PCR utilizando os mesmos iniciadores descritos anteriormente (item 3.5.1). O produto da PCR foi purificado com o kit comercial *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences do Brasil Ltda. São Paulo, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. O produto purificado foi marcado utilizando-se o kit *Gene Images Alkphos Direct*

*Labelling and Detection System with CDP Star* (Amersham Biosciences) também de acordo com as instruções do fabricante.

Para a hibridização do DNA fixado à membrana com as sondas marcadas e detecção do sinal quimioluminescente, foi utilizado o mesmo kit. A membrana foi, então, exposta a um filme de raio X (X-OMAT-XK1; Kodak) por 1 h, conforme recomendado pelo fabricante, e o filme foi revelado automaticamente em máquina apropriada: X-OMAT/M20-BR; Kodak. Como controle positivo do *dot-blotting* foi utilizado o DNA da amostra GV69 (representante do CEB).

### **3.5.3 Análise da transcrição do *rnall* através da técnica de *Northern-blotting***

Os RNA totais do *set* da amostra MHC474 ( $\Delta agr::tetM$ ), construção *rnall*-complementada (*Pbla-rnall-cat*) e a respectiva amostra selvagem isogênica foram obtidos utilizando o kit de extração *Rneasy Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, os RNA obtidos foram quantificados em espectrofotômetro (*GeneQuant RNA/DNA calculator*; Pharmacia Biotech) e volumes contendo 10  $\mu$ g da preparação de RNA foram aplicados em gel de agarose 1,2% (p/v), em presença de tampão de corrida contendo MOPS 10X {200 mM MOPS (3-[*N-morpholino*] *propanesulfonic acid*), 10 mM EDTA, 50 mM acetato de sódio e água bidestilada, pH 7,0}, 12,3 M de formaldeído e água bidestilada q.s.p. 500mL} como preconizado pelo fabricante.

A transferência do RNA do gel de agarose para membrana de nitrocelulose (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia) foi realizada através de vácuo (Vacum geneXL; Pharmacia) por 2 h a 55 mmHg, conforme recomendação do manual do fabricante. Após transferência, a membrana foi colocada em um forno (Famo; mod. st. 200) a 80°C por 2 h para que o RNA fosse fixado.

A sonda para o *rnall* foi obtida por PCR utilizando os mesmo iniciadores descritos anteriormente. O produto da PCR foi purificado com o kit comercial *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences do Brasil Ltda.), de acordo com as instruções do fabricante. O produto purificado foi marcado utilizando-se o kit *Gene Images Alkphos Direct Labelling and Detection System with CDP Star* (Amersham Biosciences) conforme protocolo do fabricante. Para a hibridização do

RNA fixado à membrana com as sondas marcadas e detecção do sinal quimioluminescente, foi utilizado o mesmo kit. A membrana foi então exposta a um filme de raio X (X-OMAT-XK1; Kodak) por 1 h e o filme revelado automaticamente em máquina apropriada (X-OMAT/M20-BR; Kodak).

O *Northern-blotting* das amostras pertencentes ao CEB, GV69 e BMB9393 foi realizado com o objetivo de confirmarmos a atenuação natural do locus *agr* na amostra GV69. Os experimentos foram feitos da mesma forma como descrito para o *set* da amostra HC474. Como controle da técnica, foi utilizada uma sonda específica para o *rrna* 16S utilizando os iniciadores: F16S: 5' aacgcattaagcactccgc<sup>3'</sup> e R16S: 5'gtgtgtagcccaaatcataa<sup>3'</sup>. A reação de PCR para obtenção desta sonda foi realizada conforme descrito no item 3.5.1.

### **3.6 Gel de eletroforese submetido a campos elétricos alternados (PFGE)**

A técnica de PFGE foi utilizada para confirmar o perfil genético do *set* composto da amostra selvagem e das construções obtidas [HC474 (selvagem isogênica), MHC474 (*agr*-nula) e CMHC474 (*rnalIII*-complementada)]. O DNA total foi preparado utilizando a metodologia descrita por Sanches e colaboradores em 1995. Resumidamente, as células bacterianas foram inicialmente embebidas em agarose de baixo ponto de geleificação e a parede celular lisada com 100 U/mL de lisostafina (Sigma). Posteriormente, o material foi tratado com 4,27 U/mL de proteinase K (Amersham) e submetido a uma série de lavagens em tampão TE (10 mM Tris pH 7,5 e 1 mM EDTA pH 8,0). Em seguida, o DNA inserido nos blocos de agarose foi clivado pela enzima de restrição *SmaI* (40 U/mL - Amersham Bioscience do Brasil Ltda; São Paulo, SP, Brasil) e separado no aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad Brasil) por 23 h. Os parâmetros de corrida utilizados foram: pulso inicial, 1 s; pulso final, 30 s; 5,5 V/cm de voltagem e 11°C de temperatura. Métodos anteriormente descritos foram utilizados para tratar e fotografar os géis (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

### 3.7 Ensaio de invasão bacteriana

A invasão bacteriana foi investigada utilizando a linhagem de células 16HBE14o<sup>-</sup> (células epiteliais brônquicas humanas transformadas; COZENS *et al.*, 1992). Monocamadas destas células foram preparadas em garrafas de vidro (Corning) com meio de cultura M199 (Sigma) contendo 2,5 mg/L de fungizona (Bristol-Myers Squibb Brasil), 50 mg/L de gentamicina (Sigma) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco). Quando a monocamada de células formou um tapete homogêneo, após incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por cerca de 2 dias, as células foram transferidas [utilizando solução estéril de tripsina contendo 10 µM de NaCl, 5 µM de KCl, 5 µM de dextrose, 6 µM de NaHCO<sub>3</sub>, tripsina 0,025% (Invitrogen), 0,5 µM de EDTA, vermelho de fenol 1% (p/v) e água destilada q.s.p. 1000mL] para placas de 24 poços (Nunc) e incubadas por 2-3 dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Previamente ao experimento de invasão, a monocamada foi lavada 2x com meio M199 sem antibióticos para retirada da gentamicina do cultivo.

A amostra clínica de *S. aureus* selvagem, assim como a amostra *agr*-nula ( $\Delta agr::tetM$ ) e *rnalIII*-complementada (*Pbla-rnalIII-cat*) isogênicas, foram utilizadas nestes experimentos de forma a analisarmos o efeito da presença ou ausência do *rnalIII* na invasão bacteriana. Para tanto, culturas bacterianas (37°C a 250 rpm), obtidas em caldo TSB (do inglês: *tryptic soy broth*), tanto na fase logarítmica (DO<sub>600nm</sub> de 0,3) quanto na fase estacionária de crescimento (DO<sub>600nm</sub> de 2,0) foram utilizadas. Em seguida, a cultura foi centrifugada (2000 g por 15 min), o sedimento ressuspenso em solução salina estéril 0,85% (p/v) e o inóculo padronizado para turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland. Diluições seriadas desta suspensão foram plaqueadas em TSA para se obter as unidades formadoras de colônias (UFC) iniciais (antes da invasão), para posterior comparação.

Um volume de 500 µL do inóculo bacteriano de cada amostra na fase logarítmica e na fase estacionária de crescimento foi adicionado à monocamada de células em quadruplicata. Após 3,5 h de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, a monocamada foi lavada 2x com meio M199 e incubada com 100 U/mL de lisostafina (Sigma) por 20 min a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para lisar as bactérias que não invadiram. Em seguida, a monocamada foi lavada novamente (2x) com meio M199, incubada por 5 min e 5% de CO<sub>2</sub> com 0,25% (p/v) de tripsina (Invitrogen) e lisada durante

mais 5 min de incubação (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) com 0,025% (v/v) de Triton X-100 (Sigma). Por último, o conteúdo dos poços foi totalmente retirado, diluído e plaqueado em TSA. O número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foi determinado e a percentagem de invasão bacteriana calculada de acordo com a equação abaixo, comparando-se os valores obtidos com o número inicial de células bacterianas (YAO *et al.*, 1995):

$$\% \text{ invasão} = \frac{\text{UFC/mL internalizada}}{\text{UFC/mL inóculo inicial}} \times 100$$

As amostras estudadas foram classificadas com base na percentagem de invasão bacteriana como altamente invasiva ( $\geq 10\%$  de bactérias internalizadas), invasiva (1% a  $< 10\%$  de bactérias internalizadas), pobremente invasivas ( $> 0,001\%$  a  $< 1\%$  de bactérias internalizadas) ou não invasivas ( $\leq 0,001\%$  de bactérias internalizadas; AMARAL *et al.*, 2005).

As amostras clínicas BMB9393 e GV69 (representantes do CEB) também foram adicionadas a este estudo, uma vez que a GV69 possui o *agr* naturalmente atenuado.

Foram realizados dois experimentos independentes para cada *set* de amostras (*set* da HC474 e das amostras GV69 e BMB9393) e, para análise estatística da invasão, foi utilizado o teste *t* de *Student*, considerando populações não pareadas, para  $\alpha=0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Obtenção das construções *agr*

#### 4.1.1 Deleção do locus *agr*

A deleção do locus *agr* na amostra clínica de *S. aureus* HC474 foi realizada através de recombinação por duplo *crossing*, resultando na troca alélica de todo operon *agr* pelo gene de resistência à tetraciclina, *tetM*. A mutação  $\Delta agr::tetM$  foi introduzida no *S. aureus* via fago 80 $\alpha$ , anteriormente propagado na construção *agr* nula RN6911 ( $\Delta agr::tetM$ ). Após o experimento de transdução, as colônias resistentes à tetraciclina foram selecionadas e estocadas a -70°C, para posterior confirmação da mutação, conforme descrito abaixo.

#### 4.1.2 Trans-complementação do *rnalIII*

A partir da construção *agr*-nula (MHC474) foi construído o mutante *rnalIII*-complementado (CMHC474), através da introdução do plasmídio (pRN6848) contendo o gene de resistência ao cloranfenicol (*cat*), como marcador, e a fusão *Pbla-rnalIII* (*rnalIII* ligado ao promotor do gene que codifica para a  $\beta$ -lactamase; *Pbla*). Após propagação do fago 80 $\alpha$  na cepa RN8041, a qual contém o vetor de fusão *Pbla-rnalIII-cat*, foi realizado o experimento de transdução na construção *agr* nula. As colônias tetraciclina-cloranfenicol resistentes foram então selecionadas e estocadas à temperatura de -70°C, para posterior confirmação da mutação conforme descrito abaixo.

### 4.2 Verificação da ausência e da presença do *rnalIII* na construção *agr*-nula e trans-complementada, respectivamente, através de PCR

A ausência do *rnalIII* na construção *agr*-nula foi verificada, inicialmente, através da técnica de PCR. A ausência de amplificação do fragmento interno do *rnalIII* foi indicativa da ocorrência de troca alélica, ou seja, da substituição do locus *agr* pelo *tetM*. Na figura 3 podemos observar o resultado da PCR com a amplificação

do fragmento do *rnaIII* na amostra selvagem HC474 (linha 3) e ausência deste fragmento na construção *agr*-nula (MHC474; linha 4). Um fragmento de tamanho correspondente ao esperado (292pb) para a amplificação do *rnaIII* foi observado na preparação de DNA obtida a partir da construção *rnaIII* trans-complementada, indicando o sucesso na obtenção de tal construção (Figura 3).

#### **4.3 Confirmação da ausência e da presença do *rnaIII* nas construções *agr*-nula e trans-complementada, respectivamente, através de *dot-blotting***

Uma vez que a técnica de PCR pode ser passível de erros (contaminações e falhas na amplificação), a presença ou ausência do *rnaIII* foi mais uma vez confirmada, nas construções *agr*, através da hibridização DNA-DNA pela técnica de *dot-blotting*. Nenhum sinal quimioluminescente pôde ser observado a partir da preparação de DNA obtida da construção *agr*-nula (MHC474), cujo fragmento do *rnaIII* não foi amplificado por PCR, demonstrando que o locus *agr* havia sido deletado nessa construção (Figura 4). Por outro lado, os experimentos com a construção *rnaIII*-complementada, cujo *rnaIII* foi amplificado através da técnica de PCR, produziu sinais quimioluminescentes, o que pode ser visualizado na figura 4. Tais dados confirmam a ausência e presença do *rnaIII* nas construções MHC474 ( $\Delta agr::tetM$ ) e CMHC474 (*Pbla-rnaIII-cat*), respectivamente, refletindo o sucesso dos experimentos de troca alélica e trans-complementação.

#### **4.4 Análise da transcrição do *rnaIII* através da técnica de *Northern-blotting* nas construções *agr* nula e trans-complementada, e na amostra selvagem isogênica**

Os experimentos de *Northern-blotting* demonstraram que a amostra selvagem isogênica (HC474) apresenta o *agr* funcional. Da mesma forma, a expressão do *rnaIII* foi observada na construção trans-complementada. Como esperado, nenhum sinal foi obtido na hibridização DNA-RNA quando o RNA total da amostra MHC474 ( $\Delta agr::tetM$ ) foi utilizado. A figura 5B mostra os resultados do *Northern-blotting* obtido para o *set* formado pela amostra selvagem isogênica (HC474), a construção *agr*-nula (MHC474) e o mutante *rnaIII*-complementado (CMHC474).

#### **4.5 Experimentos de *Northern-blotting* para as amostras pertencentes ao CEB GV69 e BMB9393**

O RNA total das amostras CEB (GV69 e BMB9393) foram também obtidos com o objetivo de confirmar a atenuação natural do locus *agr* na amostra GV69. Conforme demonstrado na figura 6B, a expressão do RNAlII encontra-se diminuída nesta amostra, quando comparada com a BMB9393. Como controle da expressão gênica, a mesma membrana foi re-hibridizada com uma sonda específica para o *rrna* 16S, o qual é expresso constitutivamente nas diferentes fases do crescimento bacteriano (Figura 6B).

#### **4.6 Gel de Eletroforese submetido a campos elétricos alternados (PFGE) para confirmação do perfil genético das construções *agr***

Através da técnica de PFGE, o padrão de polimorfismo de fragmentação do DNA (RFLP; do inglês: *restriction fragment length polymorphism*) do set de construções *agr*-nula (MHC474), *rnalII*-trans-complementada (CMHC474) e amostra selvagem isogênica (HC474) foi analisado. Tanto a amostra selvagem como as respectivas construções apresentaram, exatamente como esperado, o mesmo padrão de fragmentação pela enzima *Sma*I (Figura 7).

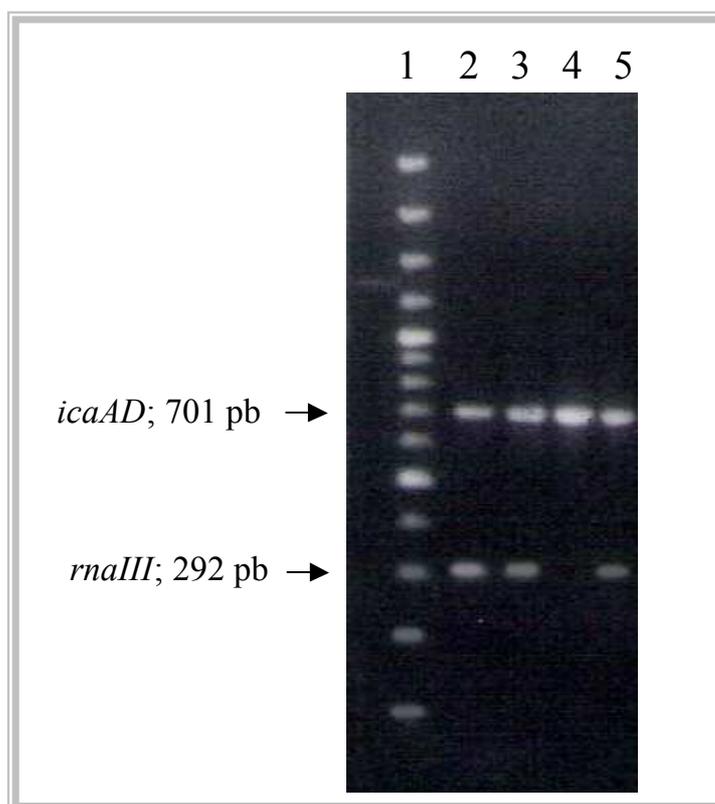
#### **4.7 Invasão Bacteriana**

Os resultados obtidos confirmam a capacidade invasiva aumentada em células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o<sup>+</sup>) da construção *agr* nula derivada de amostra clínica de *S. aureus* (HC474). Adicionalmente, as amostras clínicas de MRSA pertencentes ao CEB, GV69 (*agr*-atenuada) e BMB9393 (*agr*-funcional) foram também estudadas, confirmando, do mesmo modo, o efeito negativo do *agr* sobre o processo de invasão.

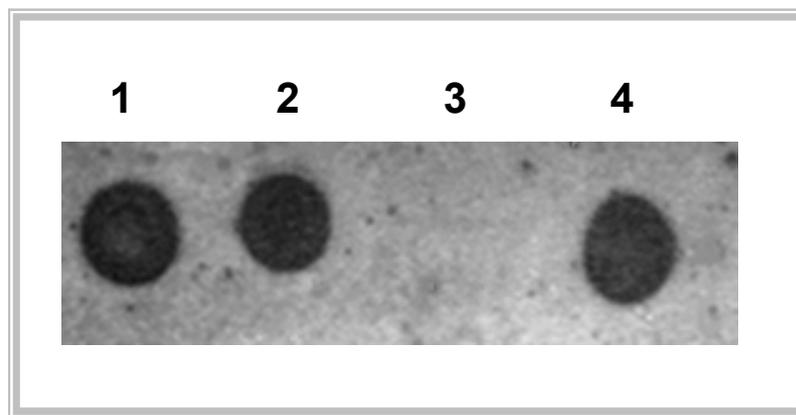
Nossos dados demonstraram que na fase logarítmica de crescimento (fase log; DO<sub>600nm</sub>=0,3) as percentagens de invasão foram estatisticamente semelhantes (14,5% ± 5,5%, 16,35% ± 7,57% e 9,1% ± 4,95%) para a amostra selvagem,

construção *agr*-nula e mutante *rnalIII*-trans-complementada, respectivamente (Figura 5A). Nesta fase de crescimento (devido à baixa densidade populacional), a expressão do *quorum-sensing agr* é fraca ou inexistente, e as percentagens de invasão observadas foram elevadas. Já na fase estacionária de crescimento (fase est.;  $DO_{600nm}=2,0$ ), quando ocorre acúmulo de AIP no meio extracelular, e conseqüente aumento da expressão do RNAlII, observamos uma queda na percentagem de invasão da amostra selvagem HC474 ( $2,8\% \pm 1,2\%$ ;  $p=0,0033$ ), enquanto que no mutante *agr*-nulo (MHC474) a percentagem de invasão ficou em torno de  $10,6\% \pm 0,14\%$ , estatisticamente semelhante à percentagem observada na fase logarítmica de crescimento. A introdução da fusão *Pbla-rnalIII-cat* na construção *agr*-nula levou à expressão do RNAlII nesta mutante (CMHC474; Figura 5A) e ao decréscimo da taxa de invasão ( $2,3\% \pm 0,74\%$ ;  $p=0,0033$ ), na fase estacionária de crescimento (quando a expressão do *agr* encontra-se aumentada), para o nível da amostra selvagem isogênica. Os resultados dos experimentos de invasão com este *set* de mutantes e dos experimentos de *Northern blotting* utilizando uma sonda específica para o *rnalIII* podem ser observados na figura 5.

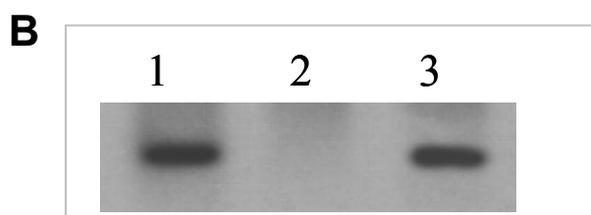
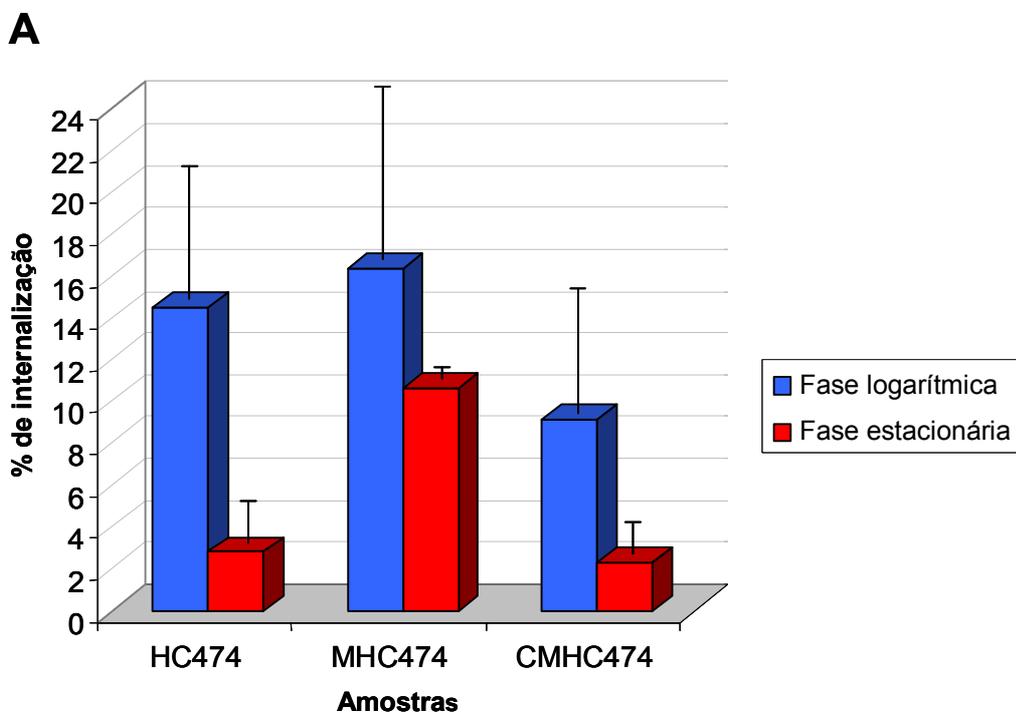
Como dissemos, os resultados obtidos com amostras clínicas representativas do CEB, apresentando o mesmo MLST (ST239), o mesmo padrão de PFGE e SCC*mec* IIIA, denominadas BMB9393 (*agr* funcional) e GV69 (que possui uma expressão do *agr* naturalmente atenuada), também comprovaram o efeito da inibição do *agr* sobre o processo de invasão bacteriana. Percentagem de invasão mais elevada, na fase log de crescimento, foi obtida para a amostra *agr* atenuada GV69 ( $6,95\% \pm 1,77\%$ ), quando comparada à da amostra BMB9393 ( $2,25\% \pm 0,21\%$ ;  $p=0,032$ ). Na fase estacionária de crescimento, por outro lado, observou-se uma queda significativa na invasão de ambas as amostras ( $p=0,0388$ , GV69 e  $p=0,0069$ , BMB9393), sendo que a percentagem de internalização da amostra GV69 permaneceu um pouco mais elevada ( $0,76\% \pm 0,21\%$ ) do que a da amostra BMB9393 ( $0,35\% \pm 0,07\%$ ; figura 6A). Estes resultados sugerem que a atenuação natural do *agr* em amostras clínicas interfere com o mecanismo de invasão em células epiteliais humanas, processo este reconhecido como sendo importante para a patogenicidade e persistência do microrganismo no hospedeiro.



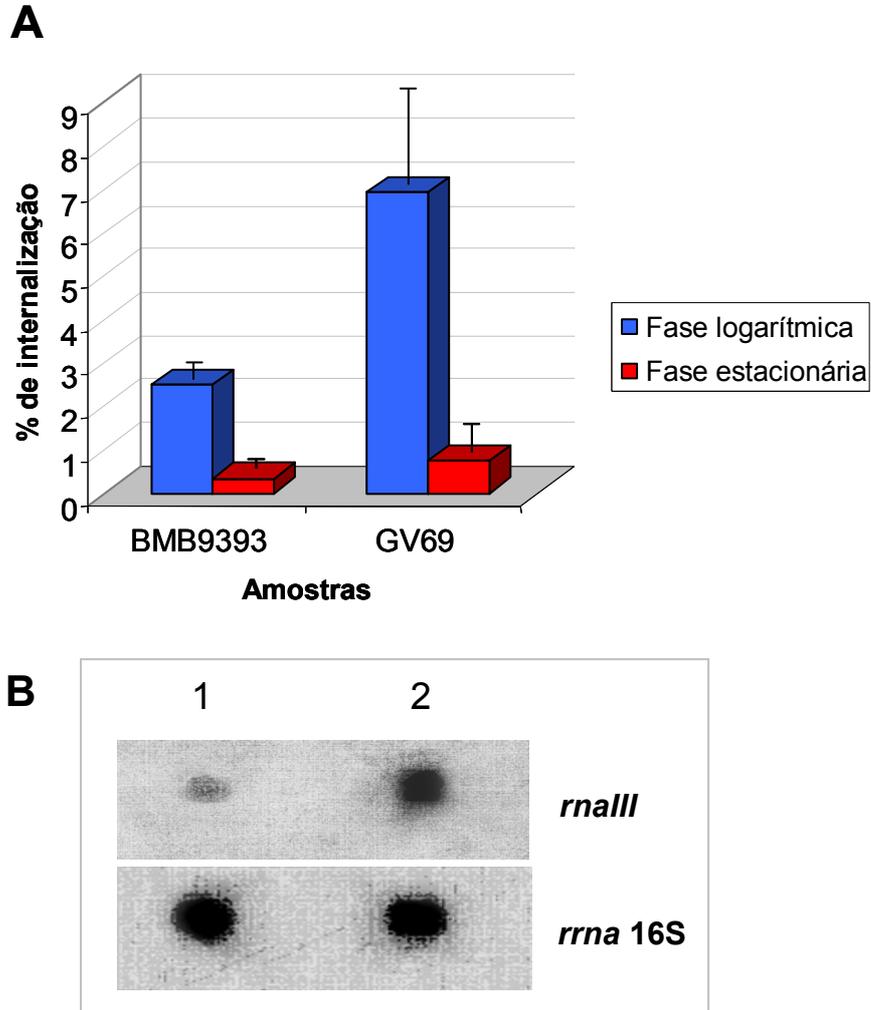
**Figura 3:** Fotografia do gel de agarose correspondente à amplificação por PCR de uma região interna do *rnaIII* de 292pb e do gene *icaAD* de 701pb (controle interno da reação). Linhas 1: padrão de peso molecular 100pb; 2: controle dos iniciadores (do inglês: *primers*) específicos para o *rnaIII*, amostra BMB9393; 3: amostra selvagem, HC474; 4: mutante *agr*-nulo, MHC474; 5: mutante trans-complementado, CMHC474.



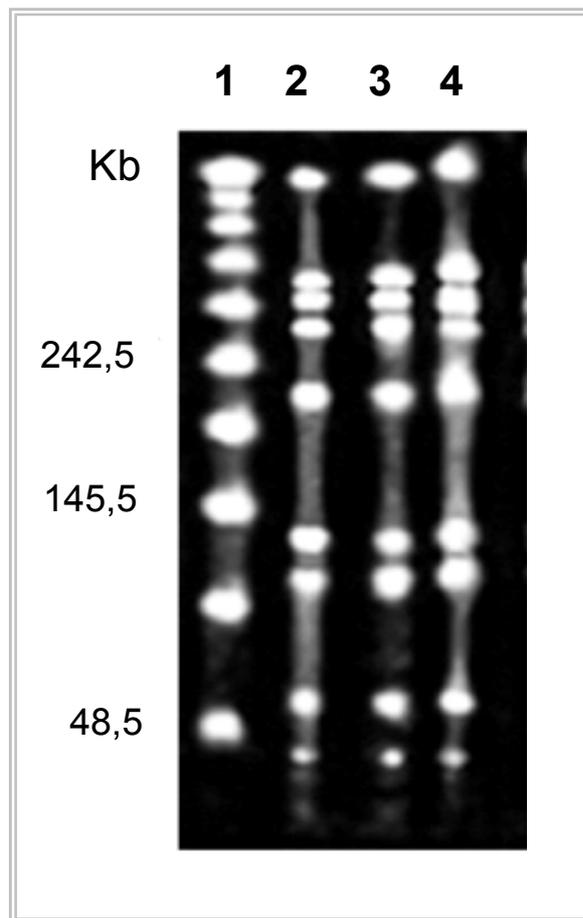
**Figura 4:** Fotografia do experimento de *dot-blotting* utilizando uma sonda específica correspondente a um fragmento interno do *rnalll*. Linha 1: controle positivo, DNA da amostra GV69; 2: DNA da amostra selvagem isogênica, HC474; 3: DNA do mutante *agr-nulo*, MHC474; 4: DNA do mutante *rnalll*-trans-complementado, CMHC474.



**Figura 5: A.** Invasão bacteriana das amostras HC474, MHC474 e CMHC474 em células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o<sup>+</sup>). A fase logarítmica de crescimento bacteriano corresponde a DO<sub>600nm</sub> de 0,3 e a fase estacionária a DO<sub>600nm</sub> de 2,0. **B.** Fotografia do experimento de *Northern-blotting* utilizando uma sonda específica correspondente a um fragmento interno do *rnaIII*. Linhas 1: RNA total obtido da amostra selvagem, HC474; 2: RNA total obtido da construção *agr-nula*, MHC474; e 3: RNA total obtido do mutante *rnaIII*-complementado, CMHC474.



**Figura 6:** **A.** Gráfico resultante dos experimentos de invasão das amostras de *Staphylococcus aureus* BMB9393 (*agr* funcional) e GV69 (*agr* atenuado) em células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o-). A fase logarítmica de crescimento bacteriano corresponde a  $DO_{600nm}$  de 0,3 e a fase estacionária a  $DO_{600nm}$  de 2,0. **B.** Fotografia dos experimentos de *Northern-blotting* utilizando RNA total das amostras clínicas GV69 (linha 1) e BMB9393 (linha 2), hibridizados com sondas específicas para o *rnall* e para o *rrna 16S* (controle).



**Figura 7:** Fotografia do padrão de bandas resultantes da eletroforese em campos elétricos alternados (PFGE), após fragmentação do genoma total da amostra selvagem de *S. aureus* HC474 e mutantes isogênicos. Linhas 1: padrão de peso molecular (Lambda); 2: amostra selvagem isogênica, HC474; 3: construção *agr*-nula, MHC474 e 4: *rnalIII*-complementada, MCHC474.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho, utilizando estratégias de manipulação genética, demonstram claramente que o *agr* exerce um efeito negativo na internalização de *S. aureus* em células epiteliais brônquicas humanas transformadas (16HBE14o<sup>-</sup>). Estes resultados confirmam dados anteriormente descritos na literatura, nos quais foram utilizados outros modelos experimentais (WESSON *et al.*, 1998; LAMMERS, NUIJTEN & SMITH, 1999; SHENKMAN *et al.*, 2001; SHENKMAN *et al.*, 2002). Estudos sobre o papel do *agr* na invasibilidade de *S. aureus* utilizaram, em sua grande maioria, células epiteliais mamárias bovinas ou células endoteliais humanas. Até o momento, não temos conhecimento de nenhum outro estudo sobre o efeito do *agr* na internalização de células respiratórias humanas. Além disso, os trabalhos publicados anteriormente utilizaram, principalmente, mutantes derivadas da cepa NTCC 8325-4, a qual apresenta mutações no operon *sigB* e ainda no gene *agrA*, o que poderia interferir em tais sistemas experimentais (KULLIK *et al.*, 1998; ADHIKARI, ARVIDSON & NOVICK, 2007). Adicionalmente, foi relatado que a NTCC 8325-4 pôde variar quanto a certas características de virulência (como por exemplo em relação a produção de biofilme), dependendo do laboratório onde encontrava-se estocada (VALLE *et al.*, 2003).

Na fase logarítmica de crescimento bacteriano, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre as percentagens de invasão da amostra selvagem (HC474; amostra clínica de MSSA) e dos mutantes isogênicos *agr*-nulo ( $\Delta agr::tetM$ ; MHC474) e *rnalIII*-complementado (CMHC474;  $\Delta agr::tetM$ , *Pbla-rnalIII-cat*) em células epiteliais brônquicas humanas. Porém, na fase estacionária de crescimento, a invasão foi significativamente inibida ( $p=0,0033$ ) na amostra selvagem e no mutante *rnalIII*-complementado, o que não foi observado para a construção *agr* nula, cuja percentagem de invasão foi estatisticamente comparável aos valores obtidos na fase logarítmica de crescimento.

Lammers, Nuijten e Smith (1999) analisaram a internalização bacteriana em células epiteliais mamárias bovinas de amostras derivadas da cepa NTCC 8325-4, designadas RN6911 (*agr* nula) e RN6390B (selvagem isogênica), tanto utilizando um inóculo na fase logarítmica ( $DO_{600nm} = 0,3$ ), quanto na fase estacionária de crescimento (18 h de incubação). Estes autores observaram que, na fase log, os

valores das unidades formadoras de colônias por poço da microplaca (UFC/poço) foram similares para ambas (aproximadamente  $10^5$  UFC/poço). Por outro lado, na fase estacionária de crescimento, a amostra selvagem RN6390B exibiu níveis consideravelmente menores de bactérias internalizadas ( $10^3$  UFC/poço), enquanto que o número de UFC/poço na amostra *agr*-nula RN6911 permaneceu em torno de  $10^5$ .

Diversos autores já demonstraram que as proteínas de ligação à fibronectina (do inglês: *fibronectin-binding proteins*; FnBPs) são as principais moléculas envolvidas na internalização dos *S. aureus* em células hospedeiras (AMARAL *et al.*, 2005; GARZONI *et al.*, 2007; LOUGHMAN *et al.*, 2008). Amaral e colaboradores (2005) compararam a atividade de ligação à fibronectina da cepa RN6390B e do mutante *agr* RN6911, tanto na fase logarítmica ( $DO_{600nm} = 0,3$ ) como na fase estacionária de crescimento ( $DO_{600nm} = 2,0$ ). Os autores observaram que, na fase log, a percentagem de atividade de ligação à fibronectina foi estatisticamente semelhante na amostra RN6390B (15,3%) e na construção *agr*-nula RN6911 (13,5%). Já na fase estacionária, foi observada uma redução significativa na atividade de ligação à fibronectina na RN6390B (2%), enquanto que na RN6911 tal atividade permaneceu semelhante aos índices obtidos na fase log (11,4%). Esses autores também observaram que algumas amostras de *S. aureus*, inclusive de MRSA, foram capazes de invadir eficientemente células epiteliais das vias respiratórias de humanos, e que o tratamento prévio de *S. aureus* com fibronectina solúvel inibiu significativamente o processo de internalização dessas amostras em células 16HBE14o<sup>-</sup>. Assim, foi sugerido que as FnBPs poderiam apresentar um papel fundamental para a invasão do *S. aureus* em células respiratórias humanas. Porém, Amaral e colaboradores (2005) não chegaram a estudar o efeito da deleção do *agr* na internalização bacteriana nessa linhagem de células epiteliais.

O fato de o *agr*-RNAIII regular negativamente FnBPs (NOVICK *et al.*, 2000) sugere que as amostras selvagem e trans-complementada isogênica, na fase estacionária de crescimento, estariam expressando menores níveis de FnBPs e, por isso, apresentando menores percentagens de internalização, quando comparada a amostra mutante *agr*-nula. Como o locus *agr* é um sistema de *quorum sensing*, há, na fase estacionária, maior número de células bacterianas e, portanto, maior quantidade de moléculas de AIP no meio e, conseqüentemente, maior ativação de

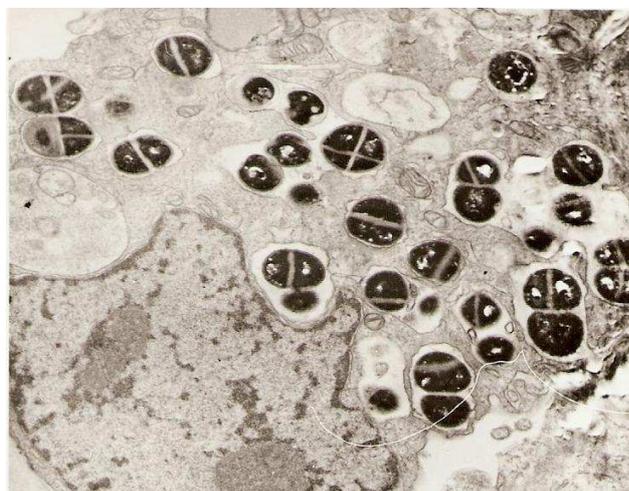
todo o lócus *agr*, culminando com uma transcrição aumentada de sua molécula reguladora, o RNAIII. Assim, espera-se que a amostra selvagem e o mutante complementado, na fase estacionária de crescimento, possuam a expressão de suas proteínas de superfície inibidas, provavelmente, através de um mecanismo *antisense* direto, envolvendo a ligação do RNAIII na região de Shine-Dalgarno do mRNA da proteína alvo (MORFELDT, TEGMARK & ARVIDSON, 1996). Possivelmente por este motivo, a invasão às células do hospedeiro diminui significativamente nesta fase de crescimento, o que não ocorre na amostra *agr*-nula, já que esta continua expressando proteínas de superfície constitutivamente devido a ausência do RNAIII.

Os dados obtidos na fase logarítmica de crescimento para a HC474 indicam que esta amostra clínica de MSSA é altamente invasiva (percentagem de invasão  $\geq 10\%$ ; AMARAL *et al.*, 2005). A construção trans-complementada correspondente (CMHC474) apresentou percentagem de invasão estatisticamente semelhante a cepa selvagem na mesma fase de crescimento. Por outro lado, na fase estacionária, a reintrodução do RNAIII na construção *agr* nula (MHC474) levou a uma queda na percentagem de invasão de 10,6% para 2,3% (valor semelhante ao obtido para a amostra selvagem, 2,8%), o que permite inferir que o experimento de complementação no mutante *agr*-nulo (MHC474) foi bem sucedido ( $p=0.0033$ ). Assim, a restauração do sistema Agr no mutante *agr*-nulo foi capaz de recuperar o fenótipo de internalização em níveis próximos aos observados na respectiva amostra selvagem.

Um dado interessante recentemente publicado por O'Neill e colaboradores (2008), sugere que as proteínas de ligação à fibronectina (FnBPs) parecem estar também envolvidas na acumulação de biofilme de *S. aureus*. Este fenômeno envolveria um domínio diferente dos domínios de ligação à fibronectina e fibrinogênio apresentados por esta proteína multifuncional (O'NEILL *et al.*, 2008). Assim sendo, é importante citar que a amostra HC474 foi anteriormente classificada por nós como forte produtora de biofilme (COELHO *et al.*, 2008). Embora não tenhamos realizado experimentos que comprovem tal hipótese, é possível que a elevada percentagem de invasão observada para a HC474 esteja relacionada a uma elevada expressão de FnBPs da amostra selvagem, o que também explicaria o seu fenótipo de biofilme forte. Adicionalmente, estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que o mutante *agr*-nulo MHC474 apresenta uma queda considerável

na expressão do biofilme, defeito esse que pôde ser regenerado pela introdução da fusão *Pbla-rnalIII-cat* na construção *agr* deletada (COELHO *et al.*, 2008).

Os MRSA pertencentes a linhagem ST239-SCC*mec* IIIA (CEB) estão amplamente disseminados em diferentes hospitais no Brasil e em vários países no mundo. Este clone tem sido associado a milhares de mortes e aumento dos gastos hospitalares, o que constitui um grave problema de saúde pública global (OLIVEIRA *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2001; BARTELS *et al.*, 2008). Dados anteriores de nosso laboratório indicam que a variante predominante do CEB, chamada A<sub>1</sub> (padrão no PFGE) é, freqüentemente, altamente invasora em modelos que utilizam monocamadas de células 16HBE14o<sup>-</sup>, o que poderia estar contribuindo para sua persistência no hospedeiro e, conseqüentemente, para o aumento de sua disseminação. A figura 8 ilustra os resultados de microscopia eletrônica obtidos por Amaral e colaboradores, utilizando uma cepa CEB. Nesta figura, podemos observar a invasão maciça dos *S. aureus* na célula epitelial respiratória (16HBE14o<sup>-</sup>) após 1 h de contato célula-bactéria, representada por um grande número de microrganismos internalizados.



**Figura 8:** Micrografia eletrônica de transmissão da invasão, *in vitro*, de uma amostra de *S. aureus* representante do CEB, após 1 h de contato com a monocamada de células epiteliais brônquicas humanas (16HBE14o<sup>-</sup>). Observar intensa invasão bacteriana, com células bacterianas no interior de vacúolos, apresentando septos transversos, sugerindo a ocorrência de divisão celular (com permissão, AMARAL *et al.*, 2005).

Além disso, resultados deste último trabalho e de Coelho e colaboradores (2008) indicaram que algumas amostras CEB apresentam uma atenuação natural do locus *agr*, levando, conseqüentemente, a uma diminuição significativa na expressão do transcrito de RNAlII. Complementando estes dados, nós demonstramos que a internalização realizada pela amostra CEB designada GV69 (*agr* naturalmente atenuada), na fase logarítmica de crescimento, encontra-se cerca de 3 vezes ( $p=0,032$ ) aumentada em relação a BMB9393, cujo transcrito de RNAlII parece ser expresso normalmente. Por outro lado, na fase estacionária de crescimento, quando o número de transcritos de RNAlII aumentam consideravelmente, a invasão foi significativamente inibida nessas duas amostras ( $p=0,069$ , BMB9393 e  $p=0,0388$ , GV69). Tais resultados, mais uma vez, comprovam a regulação negativa do *agr* neste modelo de invasão bacteriana e indica que a atenuação natural do *agr* em amostras clínicas poderia ter um significado importante na patogênese das infecções estafilocócicas em determinados cenários epidemiológicos.

De maneira geral, os estudos de internalização bacteriana utilizando *S. aureus* sugerem que este microrganismo não pode ser considerado um patógeno intracelular clássico, uma vez que a grande maioria das amostras testadas apresenta baixo índice de invasão (FOWLER *et al.*, 2000; GARZONI *et al.*, 2007). Porém, também foi sugerido que a habilidade dos *S. aureus* de invadir células epiteliais, mesmo que em percentagens relativamente baixas, poderia explicar a capacidade da bactéria de colonizar e persistir no tecido hospedeiro (BAYLES *et al.*, 1998; SINHA *et al.*, 2000). De fato, a grande maioria dos trabalhos aponta que a persistência bacteriana no hospedeiro e o desenvolvimento de infecções disseminadas podem estar relacionados com a habilidade dos *S. aureus* de invadir células e escapar dos mecanismos de defesa (GARZONI *et al.*, 2007). Entretanto, nossos estudos demonstram que algumas linhagens de MRSA (como por exemplo a ST239-SCC*mec* IIIA - CEB) e mesmo algumas cepas de MSSA, como a amostra HC474, podem apresentar um fenótipo altamente invasor em células epiteliais humanas respiratórias.

*Staphylococcus aureus* representam um dos principais causadores de pneumonias hospitalares e vêm emergindo como importantes agentes etiológicos de pneumonias associadas a infecções comunitárias (SILVA *et al.*, 2004; MONTGOMERY *et al.*, 2008; RUBINSTEIN, KOLLEF & NATHWANI, 2008;

VENTURA *et al.*, 2008). Apesar de ser relativamente rara em indivíduos saudáveis, a pneumonia estafilocócica constitui uma infecção grave, podendo produzir abscessos pulmonares e acúmulo de secreção purulenta no espaço pleural (HOSHINO *et al.*, 2007; RUBINSTEIN, KOLLEF & NATHWANI, 2008). Além disso, amostras de *S. aureus* associadas a infecções comunitárias e produtoras da leucocidina de Panton-Valentine (PVL) têm sido relacionadas com quadros de pneumonia necrosante, caracterizada por extensas lesões cavitárias (CHEUNG *et al.*, 2008; VALENTINI *et al.*, 2008).

Já foi demonstrado que *S. aureus* são capazes de aderir e invadir diferentes tipos de células da via respiratória humana (MONGODIN *et al.*, 2000; MONGODIN *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2004; JARRY, MEMMI & GHEUNG, 2008) e que, após um período inicial na fase lag, a bactéria começa a se replicar dentro das células, podendo causar apoptose (KAHL *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2004).

Estudos utilizando modelos animais verificaram que amostras contendo mutações nos genes que codificam para a enzima sortase, alfa-hemolisina, proteína A e reguladores gênicos globais (tais como SarA e Agr) exibiram atenuação da virulência nos quadros de pneumonia, sugerindo que estas moléculas apresentam um papel importante na patogênese das pneumonias estafilocócicas (HEYER *et al.*, 2002; GOMEZ *et al.*, 2004; WARDENBURG, PATEL & SCHNEEWIND, 2007; VENTURA *et al.*, 2008). Interessante notar que a amostra GV69 (utilizada neste estudo), obtida de um quadro de pneumonia de um paciente hospitalizado, exibiu uma percentagem de invasão relativamente elevada (6,9%) na fase log de crescimento, quando a expressão de proteínas de superfície encontra-se aumentada. Desta forma, como *S. aureus* são importantes agentes de pneumonias, seria interessante avaliar o papel do fenótipo altamente invasor na gravidade de certas infecções respiratórias associadas à intensa necrose e hemoptise pulmonar, principalmente daquelas associadas às infecções comunitárias.

Apesar de ser difícil relacionar diretamente os resultados obtidos *in vitro* com o que ocorre exatamente durante o processo infeccioso, é provável que a internalização dos *S. aureus* em células respiratórias humanas, observada neste estudo, possa apresentar implicações nos processos de infecção e na persistência bacteriana no hospedeiro humano. Fowler e colaboradores (2004) verificaram que a maioria das amostras isoladas de bacteremias estafilocócicas persistentes

apresentavam disfunções no locus *agr*, sugerindo que a atenuação deste locus poderia contribuir para a patogênese das infecções endovasculares. Adicionalmente, um trabalho recentemente publicado demonstrou que a atividade da alfa-hemolisina (também regulada por *agr*) era necessária para o escape dos *S. aureus* dos vacúolos para o citoplasma, quando internalizados em células epiteliais respiratórias em um modelo de fibrose cística (JARRY, MEMMI & CHEUNG, 2008). Além disso, Jarry, Memmi & Cheung (2008) e outros autores também observaram indução eventual de apoptose celular após internalização dos *S. aureus* e associaram tal mecanismo com quadros de infecções crônicas, dano vascular e sepse (WESSON *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2004; HASLINGER-LOFFLER *et al.*, 2005; GARZONI *et al.*, 2007).

Alguns estudos têm apontado o locus *agr* como alvo para o desenvolvimento de novas terapias (BALABAN *et al.*, 2007; KAVANAUGH, THOENDEL & HORSWILL, 2007). Uma dessas estratégias seria a utilização de um inibidor sintético da proteína SpsB (do inglês: *S. aureus signal peptidase B*), que, segundo tais estudos, estaria envolvida na biossíntese do AIP. Os autores verificaram que, além de inibir o AIP, tal produto demonstrou uma significativa ação antimicrobiana sobre *S. aureus* testados (KAVANAUGH, THOENDEL & HORSWILL, 2007).

Porém, estudos experimentais *in vitro* de nosso laboratório demonstraram que o *agr* exerce um efeito divergentemente na expressão de biofilme em *S. aureus*, ou seja, podendo tanto aumentar como diminuir o fenótipo do biofilme, dependendo da amostra testada. Deste modo, tais dados parecem sugerir que estratégias terapêuticas visando a inibição do *agr* poderiam não ser tão eficazes na inibição de biofilmes formados sobre a superfície cateteres (COELHO *et al.*, 2008). Adicionalmente, vimos que a deleção do *agr* também acarreta em aumento da internalização bacteriana, sugerindo que a inativação de tal locus poderia, em certos processos infecciosos, aumentar a persistência da bactéria no hospedeiro. Por outro lado, modelos de infecção animal utilizando mutantes *agr* de *S. aureus* resultaram em atenuação da virulência em infecções cutâneas e endocardite (BUNCE *et al.*, 1992; CHEUNG *et al.*, 1994). Considerando os dados controversos, estudos mais detalhados necessitam ser realizados para se avaliar, claramente, o papel de inibidores do *agr* como agentes terapêuticos potenciais.

Resumindo, os resultados apresentados nesta dissertação demonstraram que o *agr* regula negativamente a invasão dos *S. aureus* em células respiratórias humanas e corroboram experimentos prévios sobre o efeito do locus *agr* na internalização dos *S. aureus*, sugerindo sua provável implicação na patogênese das infecções estafilocócicas.

## 6 CONCLUSÕES

1. Através de manipulação genética, demonstramos que o sistema Agr regula negativamente o processo de internalização bacteriana em células epiteliais brônquicas humanas transformadas (16HBE14o<sup>-</sup>).
2. Esse efeito do *agr* foi detectado tanto em amostras clínicas de MRSA (*agr* naturalmente atenuada) como de MSSA (construção *agr*-nula).
3. É provável que a regulação negativa promovida pelo Agr esteja associada à diminuição da expressão de FnBPs, a qual é promovida pelo aumento do número de moléculas de RNAIII na fase estacionária do crescimento bacteriano.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ADHIKARI, R.P., ARVIDSON, S. & NOVICK, R.P. **A nonsense mutation in *agrA* accounts for the defect in *agr* expression and the avirulence of *Staphylococcus* ' 8325-4 *traP::kan*.** Infect. Immun., 75, 4534-4540, 2007.

AIRES DE SOUSA, M., CONCEIÇÃO, T., SIMAS, C. & LENCASTRE de, H. **Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and community.** J. Clin. Microbiol., 43, 5150-5157, 2005.

AIRES DE SOUSA, M., MIRAGAIA, M., SANTOS SANCHES, I., HEITMAN, I. & LENCASTRE de, H. **Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998.** J. Clin. Microbiol., 39, 2197-2205, 2001.

AL-MASSAUD, S.B., DAY, M.J. & RUSSEL, A.D. **Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*.** J. Appl. Bacteriol., 70, 279-290, 1991.

AL-TATARI, H., ABDEL-HAQ, N., CHEARSKUL, P., ASMAR, B. **Antibiotics for treatment of resistant gram-positive coccal infections.** Indian J. Pediatr., 73, 323-334, 2006.

AMARAL, M.M., COELHO, L.R., FLORES, R.P., SOUZA, R.R., SILVA- CARVALHO, M.C., TEIXEIRA, L.A., FERREIRA-CARVALHO, B.T. & FIGUEIREDO, A.M. **The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells.** J. Infect. Dis., 192, 801-810, 2005.

BALABAN, N.; CIRIONI, O.; GIACOMETTI, A.; GHISELLI, R.; BRAUNSTEIN, J.B.; SILVESTRI, C.; MOCCHEGIANI, F.; SABA, V. & SCALISE, G. **Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP.** Antimicrob. Agents Chemother., 51, 2226-2229, 2007.

BAMBERGER, D.M. **Bacteremia and endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the potencial role of Daptomycin.** Therap. Clin. Risk Manag., 3, 675-684, 2007.

BANTEL, H., SINHA, B., DOMSCHKE, W., PETERS, G., SCHULZE-OSTHOFF, K. & RU, J.  **$\alpha$ -Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling.** J. Cell. Biol., 155, 637-648, 2001.

BARTELS, M.D., NANUASHVILI, A., BOYE, K., ROHDE, S. M., JASHIASHZILI, N. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tbilisi, the Republic of Georgia, are variants of the Brazilian clone.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., [Epub ahead of print], 2008.

BAYLES, K. W., WESSON, C. A., LIOU, L. E., FOX, L. K., BOHACH, G. A. & TRUMBLE, W. R. **Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis.** Infect. Immun., 66, 336-342, 1998.

BEENKEN, K.E., BLEVINS, J.S. & SMELTZER, M.S. **Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation.** Infect. Immun., 71, 4206-4211, 2003.

BERENDT, A.R. & MCCORMICK, C.J. **Use of host adhesion molecules by infectious agents.** *In: Adhesion molecules in health and disease*, 1<sup>st</sup> ed, pp. 347-379. Edited by L. C. Paul & T. B. Issekutz. New York: Marcel Dekker, 1997.

BERGER-BÄCHI, B. **Factors affecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.** *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 6, 13-21, 1995.

BESIER, S.; LUDWIG, A.; ZANDER, J.; BRADE, V. & WICHELHAUS, T.A. **Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*, gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 1570-1572, 2008.

BOEKHORST, J., DE BEEN, M.W. H. J., MICHIEL KLEEREBEZEM, M. & SIEZEN, R.J. **Genome-Wide Detection and Analysis of Cell Wall-Bound Proteins with LPXTG-Like Sorting Motifs.** *J. Bacteriol.*, 187, 4928-4934, 2005.

BOLES, B.R. & HORSWILL, A. R. ***agr*-mediated dispersal *Staphylococcus aureus* biofilms.** *PLOS pathogens*, 4, 37-52, 2008.

BRAKSTAD, O.G. & MAELAND, J.A. **Mechanisms of methicillin-resistance staphylococci.** *APMIS*, 105, 264-276, 1997.

BROUILLETTE, E., GRONDIN, G., LEFEBVRE, C., TALBOT, B.G., MALOUIN, F. **Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*.** *Vet. Microbiol.*, 101, 253-262, 2004.

BUNCE, C., WHEELER, L., REED, G., MUSSER, J. & BARG, N. **Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci.** *Infect. Immun.*, 60, 2636-2640, 1992.

BUZZOLA, F.R., ALVAREZ, L.P., TUCHSCHERR, L.P.N., BARBAGELATA, M.S., LATTAR, S.M., CALVINHO, L. & SORDELLI, D.O. **Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverge *agr* groups to invade mammary epithelial cells.** *Infect. Immun.*, 75, 886-891, 2007.

CAIAZZA, N.C. & O'TOLLE, G.A. **Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*.** *J. Bacteriol.*, 185, 3214-3217, 2003.

CAMPANILE, F., CAFISO, V., CASCONI, C., GIANNINO, V., DI MARCO, O. & STEFANI, S. **Clonal diffusion and evolution of *mecA* and Tn554 polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italy.** *Infect. Med.*, 9, 30-38, 2001.

CASSAT, J., DUNMAN, P.M., MURPHY, E., PROJAN, S.J., BEENKEN, K.E., PALM, K.J., YANG, S.J., RICE, K.C., BAYLES, K.W. & SMELTZER, M.S. **Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic *agr* and *sarA* mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390.** *Microbiology*, 152, 3075-3090, 2006.

CDC (Centers of Disease Control and Prevention). **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004.** *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 53, 322-323, 2004.

CEPEDA, J.A., WHITEHOUSE, T., COOPER, B., HAILS, J., JONES, K., KWAKU, F., TAYLOR, L., HAYMAN, S., SHAW, S., KIBBLER, C., SHULMAN, R., SINGER, M. & WILSON, P.R. **Linezolid versus teicoplanin in the treatment of Gram-positive infections in the critically ill: a randomized, double-blind, multicentre study.** *J. Antim. Chem.*, 53, 345-355, 2004.

CHAMBERS, H. F. **Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications.** Clin. Microbiol. Rev., 10, 781-791, 1997.

CHEN, C.J. & HUANG, Y.C. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan.** J. Microbiol. Immunol. Infect., 38, 376-382, 2005.

CHEUNG, A.S., ABOLTINS, C.A., DAFFY, J.R. & STANLEY, P.A. **Necrotising pneumonia due to Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*.** Med. J. Aust., 188, 373, 2008.

CHEUNG, A.L., EBERHARDT, K.J., CHUNG, E., YEAMAN, M.R., SULLAM, P.M., RAMOS, M., BAYER, A.S. **Diminished virulence of a *sar-lagr*-mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis.** J. Clin. Invest., 94, 1815-1822, 1994.

CHEUNG, A. L., KRISHNAN, M., JAFFE, E. A. & FISCHETTI, V.A. **Fibronectin acts as a bridging molecule in the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells.** J. Clin. Invest., 87, 2236-2245, 1991.

CHILLER, K., SELKIN, B.A. & MURAKAWA, G.J. **Skin microflora and bacterial infections of the skin.** J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 6, 170-174, 2001.

CLÉMENT, S., VAUDAUX, P., FRANCOIS, P., SCHRENZEL, J., HUGGLER, E., KAMPF, S., CHAPONNIER, C., LEW, D. & LACROIX, J.S. **Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis.** J. Infect. Dis., 192, 1023-1028, 2005.

COELHO, L.R., SOUZA, R.R., FERREIRA, F.A., FERREIRA-CARVALHO, B.T. & FIGUEIREDO, A.M.S. **RNAIII molecule alone can either up-regulate or down-regulate glucose-dependent biofilm formation in methicillin-susceptible and –resistant lineages of *Staphylococcus aureus*.** Microbiology, in Print, 2008.

COIMBRA, M.V.S., SILVA-CARVALHO, M.C., WISPLINGHOFF, H., HALL, G. O., TALLENT, S., WALLACE, S., EDMOND, M.B., FIGUEIREDO, A.M.S. & WENZEL, R.P. **Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States.** J. Hosp. Infect., 53, 103-110, 2003.

COIMBRA, M. V. S., TEIXEIRA, L. A., RAMOS, R. L. B., PREDARI, S. C., CASTELO, L. & FIGUEIREDO, A. M. S. **Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina.** J. Med. Microbiol., 49, 187-192, 2000.

COOMBS, G. W., NIMMO, G. R., BELL, J. M., HUYGENS, F. O'BRIEN, F. G., MALKOWSKI, M. J., PEARSON, J. C., STEPHENSM A. J., GIFFARD, P. M. & THE AUSTRALIAN GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE. **Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia.** J. Clin. Microbiol., 42, 4735-4743, 2004.

COOMBS, G.W., NIMMO, G.R., BELL, J.M., HUYGENS, F., O'BRIEN, F.G., MALKOWSKI, M.J., PEARSON, J.C., STEPHENS, A.J. & GIFFARD, P.M. **Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 2070-2083, 2005.

COZENS, A.L., YEZZI, M.J., YAMAYA, M., STEIGER, D., WAGNER, J.A., GARBER, S.S., CHIN, L., SIMON, E.M., CUTTING, G.R., GARDNER, P. *et al.* **A transformed human epithelial cell line that retains tight junctions post crisis.** In Vitro Cell Dev. Biol., 28A, 735-744, 1992.

- CUEVAS, O., CERCENADO, E., BOUZA, E., CASTELLARES, C., TRINCADO, P. CABRERA, R. & VIDEL, A. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002)**. Clin. Microbiol. Infect., 13, 250-256, 2007.
- DAUM, R.S., ITO, T., HIRAMATSU, K., HUSSAIN, F., MONGKOLRATTANOTHAI, K., JAMKLANG, M. & BOYLE-VAVRA, S. **A novel methicillin-resistant cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds**. J. Infect. Dis., 186, 1344-1347, 2002.
- DEURENBERG, R.H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A.; STOBBERINGH, E.E. **The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Clin. Microbiol. Infect., 13, 222-235, 2007.
- DICKINSON, R. B., NAGEL, J.A., MCDEVITT, D., FOSTER, T.J., PROCTOR, R.A & COOPER, S.L. **Quantitative comparison of clumping factor- and coagulase- mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to surface-bound fibrinogen under flow**. Infect. Immun., 63, 3143-3160, 1995.
- DOAN, T.L., FUNG, H.B., MEHTA, D. & RISKI, P.F. **Tigecycline: a glycylcycline antimicrobial agent**. Clin. Ther., 28, 1079-1167, 2006.
- DOMINGUEZ, M. A., LENCASTRE de, H., LINARES, J. & TOMASZ, A. **Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital**. J. Clin. Microbiol., 32, 2081-2087, 1994.
- DRAKE, T.A. & PANG, M. ***Staphylococcus aureus* induces tissue factor expression in cultured human cardiac valve endothelium**. J. Infect. Dis., 157, 749-756, 1988.
- DUNMAN, P.M., MURPHY, E., HANEY, S., PALACIOS, D., TUCKER-KELLOGG, G., WU, S., BROWN, E.L., ZAGURSKY, R.J., SHLAES, D. & PROJAN, S.J. **Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci**. J. Bacteriol., 183, 7341-7353, 2001.
- DZIEWANOWSKA, K., PATTI, J. M., DEOBALD, C.F., BAYLES, K.W., TRUMBLE, W.R. & BOHACH, G.A. **Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells**. Infect. Immun., 67, 4673-4678, 1999.
- EBERT, M.D., SHETH, S. & FISHMAN, E.K. **Necrotizing pneumonia caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an increasing cause of "mayhem in the lung"**. Emerg Radiol., [Epub ahead of print], 2008.
- ENOCH, D.A., BYGOTT, J.M., DALY, M.L. & KARAS, J.A. **Daptomycin**. J. Infect., 55, 205-213, 2007.
- ENRIGHT, M., DAY, N., DAVIES, C., PEACOCK, S. & SPRAT, B. **Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol., 38, 1008-1015, 2000.
- ESPERSEN, F. & CLEMMENSEN, I. **Clumping of *Staphylococcus aureus* by human fibronectin**. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 89, 317-321, 1981.
- FERRY, T., BES, M., DAUWALDER, O., MEUGNIER, H., LINA, G., FOREY, F., VANDENESCH, F. & ETIENNE, J. **Toxin gene content of the lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones**. J. Clin. Microbiol., 44, 2642-2644, 2006.

FINLAY, B. B. & COSSART, P. **Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens.** *Science*, 276, 718-725, 1997 (*Erratum: Science*, 278, 373, 1997).

FOURNIER, B. & HOOPER, D.C. **A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*.** *J. Bacteriol.*, 182, 3955-3964, 2000.

FOSTER, T.J. & HÖÖK, M. **Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*.** *Trends Microbiol.*, 6, 484-488, 1998.

FOWLER, T., WANN, E. R., JOH, D., JOHANSSON, S., FOSTER, T. J. & HÖÖK, M. **Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell  $\beta_1$  integrins.** *Eur. J. Biochem.*, 79, 672-679, 2000.

FOWLER, V.G., SAKOULAS, G., MCINTYRE, L.M., MEKA, V. G., ARBEIT, R. D., CABELL, C. H., STRYJEWSKI, M. E., ELIOPOULOS, G. M., RELLER, B., COREY, G. R., JONES, T., LUCINDO, N., YEAMAN, M. R. & BAYER, A. S. **Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein.** *J. Infect. Dis.*, 190, 1140-1149, 2004.

FRÖMAN, G., SWITALSKI, L. M. SPEZIALE, P. & HÖÖK, M. **Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*.** *J. Biol. Chem.*, 262, 6564-6571, 1987.

GARZONI, C., FRANÇOIS, P., HUYGHE, A., COUZINET, S., TAPPAREL, C., CHARBONNIER, Y., RENZONE, A., LUCCHINE, S., LEW, D. P., VAUDAUX, P., KELLEY, W. & SCHRENZEL, J. **A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells.** *BMC genomics*, 8, 1-14, 2007.

GEISINGER, E., ADHIKARI, R.P., JIN, R., ROSS, H.F. & NOVICK, R.P. **Inhibition of *rot* translation by RNAll, a key feature of *agr* function.** *Mol. Microbiol.*, 61, 1038-1048, 2006.

GEORGE, N. P.E., WEI, Q., SHIN, P.K., KONSTANTOPOULOS, K. & ROSS, J. M. ***Staphylococcus aureus* adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to immobilized platelets demonstrates shear-dependent behavior.** *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 2394-2400, 2006.

GOMEZ, M. I., LEE, A., REDDY, B., MUIR, A., SOONG, G., PITT, A., CHEUNG, A. & PRINCE, A. ***Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1.** *Nat. Med.*, 10, 842-848, 2004.

GROLMAN, D.C. **Therapeutic applications of Tigecycline in the management of complicated skin and skin structure infections.** *Int. J. Infect. Dis.*, 11 Suppl. 1, S7-15, 2007.

HARBARTH, S.; FRANCOIS, P.; SHRENZEL, J.; FANKHAUSER-RODRIGUEZ, C.; HUGONNET, S.; KOESSLER, T.; HUYGHE, A. & PITTET, D. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Switzerland.** *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 962-965, 2005.

HARTLEIB, J., KÖHLER, N., DICKINSON, R.B., CHHATWAL, G.S., SIXMA, J.J., HARTFORD, O.M., FOSTER, T.J., PETERS, G., KEHREL, B. E. & HERRMANN, M. **Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*.** *Blood J.*, 96, 2149-2156, 2000.

HASLINGER-LOFFLER, B., KAHL, B.C., GRUNDMEIER, M., STRANGFEL, K., WAGNER, B., FISCHER, U., CHEUNG, A.L., PETERS, G., SCHULZE-OSTHOFF, K. & SINHA, B. **Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus* induced apoptosis in endothelial cells.** Cell. Microbiol., 7, 1087-1097, 2005.

HEDSTROM, S. A. **Linezolid: an antibiotic with new action mechanism.** Lakartidningen., 99, 1201-1202, 1205-1208, 2002.

HEILMANN, C., NIEMANN, S., SINHA, B., HERRMANN, M., KEHREL, B.E. & PETERS, G. ***Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein (FnBP) mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA, but not by FnBPB.** J. Infect. Dis., 190, 321-329, 2004.

HEINRICH, J.H., BAYER, M.G. & CHEUNG, A.L. **Characterization of the *sar* locus its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 178, 418-423, 1996.

HEYER, G., SABA, S., ADAMO, R., RUSH, W., SOONG, G., CHEUNG, A. & PRINCE, A. ***Staphylococcus aureus agr* and *sarA* functions are required for invasive infections but not inflammatory responses in the lung.** Infect. Immun., 70, 127-133, 2002.

HEYING, R., VAN DE GEVEL, J., QUE, Y.A., MOREILLON, P. & BEEKHUIZEN, H. **Fibronectin-binding proteins and clumping factor A in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: FnBPA is sufficient to activate human endothelial cells.** Thromb. Haemost., 97, 617-626, 2007.

HIRAMATSU, K., KATAYAMA, Y., YAZAWA, H. & ITO, T. **Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Int. J. Med. Microbiol., 292, 67-74, 2002.

HOSHINO, C., SATOH, N., SUGAWARA, S., KURIYAMA, C., KIKUCHI, A. & OHTA, M. **Community-acquired *Staphylococcus aureus* pneumonia accompanied by rapidly progressive glomerulonephritis and hemophagocytic syndrome.** Internal Medicine, 46, 63-78, 2007.

HSIEH, H.Y., TSENG, C.W. & STEWART, G.C. **Regulation of Rot expression in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 190, 546-554, 2008.

HSU, L. Y., KOH, Y. L., CHLEBICKA, N. L., TAN, T. Y., KRISHNAN, P., LIN, R. T., TEE, N., BARKHAM, T. & KOH, T. H. **Establishment of ST30 as the predominant clonal type among community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Singapore.** J. Clin. Microbiol., 44, 1090-1093, 2005.

ING, M.B., BADDOUR, L. & BAYER, A.S. **Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications.** In: The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone., 331-354, 1997.

INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.** Academic. Presse. Inc., San Diego, California, USA, 1990.

ITO, T., KATAYAMA, Y., ASADA, K. & MORI, N. **Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob. Agents Chemother., 45, 1323-1336, 2001.

ITO, T., MA, X. X., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H. & HIRAMATSU, K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*.** Antimicrob. Agents Chemother., 48, 2637-2651, 2004.

IWATSUKI, K., YAMASAKI, O., MORIZANE, S. & OONO, T. **Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression.** J. Dermatol. Sci., 42, 203-214, 2006.

JACOBS, M.R., BAJAKSOUZIAN, S., WINDAU, A., APPELBAUM, P.C., PATEL, M.V., GUPTA, S.V., BHAGWAT, S.S., SOUZA de, N.J. & KHORAKIWALA, H. F. **In vitro activity of the new quinolone WCK 771 against staphylococci.** Antimicrob. Agent. Chemo., 48, 3338-3342, 2004.

JARRAUD, S., LYON, G.J., FIGUEIREDO, A.M.S., GERARD, L., VANDENESCH, F., ETIENNE, J., MUIR, T.W. & NOVICK, R.P. **Exfoliating producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 82, 6517-6522, 2000.

JARRY, T.M., MEMMI, G., CHEUNG, A.L. **The expression of alpha-haemolysin is required for *Staphylococcus aureus* phagosomal escape after internalization in CFT-1 cells.** Cell. Microbiol., In Print. 2008.

JEVON, M., GUO, C., MA, B., MORDAN, N., NAIR, S. P., HARRIS, M., HENDERSON, B., BENTLEY, G., & MEGHJI, S. **Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts.** Infect. Immun., 67, 2677-2681, 1999.

JEVONS, P. **“Celbenin” – resistant staphylococci.** Br. Med., 1, 124-125, 1961.

JI, G., BEAVIS, R. & NOVICK, R.P. **Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants.** Science, 276, 2027-2030, 1997.

JI, G., BEAVIS, R. & NOVICK, R.P. **Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 12055-12059, 1995.

JONGE de, B.L.M., YOO-SEOK, C., GAGE, D. & TOMASZ, A. **Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain.** J. Biol. Chem., 267, 11248-11254, 1992.

JOSEFSSON, E., HARTFORD, O., O'BRIEN, L., PATTI, J.M. & FOSTER, T. **Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant.** J. Infect. Dis., 184, 1572-1580, 2001.

JOSEFSSON, E., HIGGINS, J., FOSTER, T. & TARKOWSKI, A. **Fibrinogen binding sites P<sub>336</sub> and Y<sub>338</sub> of clumping factor A are a crucial for *Staphylococcus aureus* virulence.** PLOS, 3, 2206-2217, 2008.

KAHL, B.C., GOULIAN, M., VAN WAMEL, W., HERRMANN, M., SIMON, S.M., KAPLAN, G., PETERS, G. & CHEUNG, A.L. ***Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line.** Infect. Immun., 68, 5385-5392, 2000.

KANAFANI, Z.A. & COREY, G.R. **Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections.** Expert. Rev. Anti. Infect. Ther., 5, 177-184, 2007.

KATAYAMA, Y., ITO, T. & HIRAMATSU, K. **A new class of genetic element, *Staphylococcus aureus* chromosome *mec*, encodes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Agents Chemother., 44, 1549-1555, 2000.

KAVANAUGH, J.S.; THOENDEL, M. & HORSWILL, A.R. **A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing.** Mol. Microbiol., 65, 780-798, 2007.

KENNEDY, A.D.; OTTO, M.; BRAUGHTON, K.R.; WHITNEY, A.R.; CHEN, L.; MATHEMA, B.; MEDIAVILLA, J.R.; BYRNE, K.A.; PARKINS, L.D.; TENOVER, F.C.; KREISWIRTH, B.N.; MUSSER, J.M. & DELEO, F.R. **Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, recent clonal expansion and diversification.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 105, 1327-1332, 2008.

KONEMAM, E. W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Lippincott., p. 539-566, 1997.

KOREM, M., GOV, Y., KIRAN, M.D. & BALABAN, N. **Transcriptional profiling of target of RNAIII-activation protein, a master regulator of staphylococcal virulence.** Infect. Immun., 73, 6220-6228, 2005.

KULLIK, I., GIACHINO, P. & FUCHS, T. **Deletion of the alternative sigma factor  $\sigma^B$  in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes.** J Bacteriol., 180, 204814-20, 1998.

KUUSELA, P., VARTIO, T., VUENTO, M. & MYHRE, E. B. **Binding sites for streptococci and staphylococci in fibronectin.** Infect. Immun., 45, 433-436, 1984.

LAMMERS, A., NUIJTEN, P.J.M., KRUIJT, E., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., VECHT, U., SMITH, H.E. & VAN ZIJDERVELD, F.G. **Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures.** Vet. Microbiol., 67, 77-89, 1999.

LAMMERS, A., NUIJTEN, P.J.M. & SMITH, H.E. **The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells.** FEMS microbiol. Lett., 180, 103-109, 1999.

LEVINE, D. P., HOLLEY, H. P., EISEMAN, I., WILLCOX, P. & TACK, K. **Clinafloxacin for the treatment of bacterial endocarditis.** Clin. Infect. Dis., 38, 620-631, 2004.

LIANG, X. & JI, Y. **Comparative analysis of staphylococcal adhesion and internalization by epithelial cells.** Methods Mol. Biol., 391, 145-51, 2007.

LIANG, X., YU, C., SUN, J., LIU, H., LANDWEHR, C., HOLMES, D. & JI, Y. **Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*.** Infect. Immun., 74, 4655-4665, 2006.

LIANG, X., ZHENG, L., LANDWEHR, C., LUNSFORD, D., HOLMES, D. & JI, Y. **Global regulation of gene expression by ArIRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 187, 5486-5492, 2005.

LIVERMORE, D.M. **Antibiotic resistance in Staphylococci.** Intern. J. Antimicrob. Agents., 16, 3-10, 2000.

LOUGHMAN, A., SWEENEY, T., KEANEM F.M., PIETROCOLA, G., SPEZIALE, P. & FOSTER, T.J. **Sequence diversity in the A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A.** BMB microbiol., 8, 1471-2180, 2008.

LOWY, F.D. ***Staphylococcus aureus* infections.** N. Engl. J. Med., 339, 520-532, 1998.

LUCZAK-KADLUBOWSKA, A., KRZYSZTON-RUSSJAN, J. & HRYNIEWICZ, W. **Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated in Poland in 1996 to 2004 that were deficient in species-specific proteins.** J. Clin. Microbiol., 44, 4018-4024, 2006.

LUZAR, M.A., COLES, G.A., FALLER B., SLINGENEYER, A., DAH., G. D., BRIAT, C., WONE., C., KNEFATI., Y., KESSLER., M. & PELUSO., F. ***Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis.** N. Engl. J. Med., 322, 505-509, 1990.

LYER, R.N. & HITTINAHALLI, V. **Modified PAP method to detect heteroresistance to vancomycin among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care hospital.** Indian. J. Med. Microbiol., 26, 176-179, 2008.

LYON, G. J., WRIGHT, J.S., MUIR, T.W. & NOVICK, R.P. **Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*.** Biochem., 41, 10095-10104, 2002.

MAINARDI, J.L., SHLAES, D.M., GOERING, R.V., SHLAES, J.H., ACAR, J.F. & GOLDSTEIN, F.W. **Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*.** J. Infect. Dis., 171, 1646-1650, 1995.

MANNA, A.C. & CHEUNG, A.L. **Expression of SarX, a negative regulator of *agr* and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 188, 4288-4299, 2006.

MANZUR, A.; DOMINGUEZ, A.M.; PUJOL, M.; GONZÁLEZ, M.P.; LIMON, E.; HORNERO, A.; MARTÍN, R.; GUDIOL, F. & ARIZA, J. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, an emerging threat in Spain.** Clin. Microbiol. Infect., 14, 377-380, 2008.

MASCARI, L. M. & ROSS, J. M. **Quantification of staphylococcal-collagen binding interactions in whole blood by use of a confocal microscopy shear-adhesion assay.** J. Infect. Dis., 188, 98-107, 2003.

MAXE, L., RYDEN, C., WADSTROM, T. & RUDIN, K. **Specific attachment of *Staphylococcus aureus* to immobilized fibronectin.** Infect. Immun., 54, 695-704, 1986.

MCKINNEY, T. K., SHARMA, V. K., CRAIG, W. A. & ARCHER, G. L. **Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coincuded by cognate *mecA* and  $\beta$ -Lactamase regulators.** J. Bacteriol., 183, 6862-6868, 2001.

MEENAN, N.A., VISAI, L., VALTULINA, V., SCHWARZ-LINEK, U., NORRIS, N.C., GURUSIDDAPPA, S., HÖÖK, M., SPEZIALE, P. & POTTS, J.R. **The tandem  $\beta$ -zipper model defines high affinity fibronectin-binding repeats within *Staphylococcus aureus* FnBPA.** J. Biol. Chemist., 282, 25893-25902, 2007.

MELO, M.C., SILVA-CARVALHO, M.C., FERREIRA, R.L., COELHO, L.R., SOUZA, R.R., GOBBI, C.N., ROZENBAUM, R., SOLARI, C.A., FERREIRA-CARVALHO, B.T. & FIGUEIREDO, A.M. **Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone.** J. Hosp. Infect., 58, 276-285, 2004.

MELTER, O., SANTOS-SANCHES, I., SCHINDLER, J., ZEMLICKOVA, H. & LENCASTRE de, H. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic.** J. Clin. Microbiol., 37, 2798-2803, 1999.

MEMPEL, M., SCHNOPP, C., HOJKA, M., FESQ, H., WEIDINGER, S., SCHALLER, M., KORTING, H.C., RING, J. & ABECK, D. **Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death.** Br. J. Dermatol., 146, 943-951, 2002.

MENZIES, B.E. & KOURTEVA, I. **Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis.** Infect. Immun., 66, 5994-5998, 1998.

MIAJLOVIC, H., LOUGHMAN, A., BRENNAN, M., COX, D. & FOSTER, T.J. **Both complement- and fibrinogen-dependent mechanisms contribute to platelet aggregation mediated by *Staphylococcus aureus* clumping factor B.** Infect. Immun., 75, 3335-3343, 2007.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D.C. & LENCASTRE de, H. **Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, SCC*mec* IV multiplex.** J. Antimicrob. Chemother., 60, 42-48, 2007.

MIRANDA, O.P., CARVALHO, M.C.S., RIBEIRO, A., PORTELA, F., CAETANO, N., CORDEIRO, R., VIDAL, C. & FIGUEIREDO, A. M. **Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC*mec* IV in Brazil genetically related to USA 800.** Clin. Microbiol. Infect., 13, 1165-1172, 2007.

MONGODIN, E., BAJOLET, O., CUTRONA, J., BONNET, N., DUPUIT, F., PUCHELLE, E. & BENTZMANN, de S. **Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium.** Infect. Immun., 70, 620-630, 2002.

MONGODIN, E., BAJOLET, O., HINNRASKY, J., PUCHELLE, E. & BENTZMANN, de S. **Cell wall-associated protein A as a tool for immunolocalization of *Staphylococcus aureus* in infected human airway epithelium.** J. Histochem. Cytochem., 48, 523-533, 2000.

MONTGOMERY, C.P., BOYLE-VAVRA, S., ADEM, P.V., LEE, J.C., HUSAIN, A.N., CLASEN, J. & DAUM, R.S. **Comparison of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pulsotypes USA300 and USA400 in a Rat Model of Pneumonia.** J. Infect. Dis., [Epub ahead of print], 2008.

MORFELDT, E., TEGMARK, K. & ARVIDSON, S. **Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*.** Mol. Microbiol., 21:1227-1237, 1996.

MOSHER, D. F. & PROCTOR, R.A. **Binding and factor XIIIa- mediated cross-linking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*.** Science, 209, 927-929, 1980.

MURCHAN, S., KAUFMANN, M. E., DEPLANO, A., DE RYCK, R., STRUELENS, M., ZINN, C. E., FUSSING, V., SALMENLINNA, S., VUOPIO-VARKILA, J., EL SOLH, N., CUNNY, C., WITTE, W., TASSIOS, P. T., LEGAKIS, N., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VINDEL, A., LACONCHA, I., GARAIZAR, J., HAEGGMAN, S., OLSSON-LILJEQUIST, B., RANSJO, U., COOMBES, G. & COOKSON, B. **Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains.** J. Clin. Microbiol., 41, 1574-1585, 2003.

MURRAY, P. R., BARON, E. J. JORGENSEN, J. H., PFALLER, M. A. & YOLKEN, R. H. ***Staphylococcus*, *Micrococcus* and another catalase-positive cocci that grow aerobically.** In: Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington. ASM Press., 1, 384-404, 2003.

NICAS, T.I., COLE, C.T., PRESTON, D.A., SCHABEL, A.A. & NAGARAJAN, R. **Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant gram-positive bacteria.** *Antimicrobi. Agents. Chemother.*, 33, 1477-1481, 1989.

NÍ EIDHIN, D., PERKINS, S., FRANÇOIS, P. P., VAUDAUX, P., HÖÖK, M. & FOSTER, T. J. **Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesion of *Staphylococcus aureus*.** *Mol. Microbiol.*, 30, 245-257, 1998.

NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance - NNIS). **System report, data summary, from January 1992 through June 2004, issued October 2004.** *Am. J. Infect. Control*, 32, 470-485, 2004.

NOTO, M.J., KREISWIRTH, B.N., MONK, A.B. & ARCHERI, G.L. **Gene acquisition at the insertion site for *SCCmec*, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.** *J. Bacteriol.*, 190, 1276-1283, 2008.

NOVICK, R.P. **Genetic systems in staphylococci.** *Methods Enzimol.*, 204, 587-636, 1991.

NOVICK, R.P. **Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence.** *Mol. Microbiol.*, 48, 1429-1449, 2003.

NOVICK, R.P. & MUIR, T.W. **Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other gram-positive bacteria.** *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 40-45, 1999.

NOVICK, R.P., ROSS, H.F., PROJAN, S.J., KORNBLUM, J., KREISWIRTH, B. & MOGHAZEH, S. **Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule.** *EMBO J.*, 12, 3967-3975, 1993.

O'BRIEN, F.G., COOMBS, G.W., PEARSON, J.C., CHRISTIANSEN, K.J. & GRUBB, W.B. **Type V staphylococcal cassette chromosome *mec* in community staphylococci from Australia.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 5129-5132, 2005.

OLIVEIRA, D.C. & LENCASTRE, de. H. **Multiplex PCR strategy for rapid identification os structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 2155-2161, 2002.

OLIVEIRA, D.C., MILHEIRIÇO, C. & LENCASTRE, de H. **Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, *SCCmec* type VI.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 3457-3459, 2006.

OLIVEIRA, D.C., SANCHES, I. S., TAMAYO, M., RIBEIRO, G., COSTA, D. & LENCASTRE, de H. **Virtually all MRSA infections in the largest Portuguese hospitals are caused by two intenationally spreas multiresistant strains: the "Iberian" and the "Brazilian" clones of MRSA.** *Clin. Microbiol. Infect.*, 4, 373-384, 1998.

OLIVEIRA, D.C., TOMASZ, A & LENCASTRE, de H. **Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Lancet. Infect. Dis.*, 2: 180-189. *Erratum in: Lancet. Infect. Dis.*, 2, 315, 2002.

OLIVEIRA, G.A., FARIA, J.B., LEVY, C.E. & MAMIZUCA, E.M. **Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil.** *Braz. J. Infect. Dis.*, 5, 163-170, 2001.

O'NEILL, E.; POZZI, C.; HOUSTON, P.; SMYTH, D.; HUMPHREYS, H.; ROBINSON, D.A. & O'GARA, J.P. **Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections.** J. Clin. Microbiol., 45, 1379-1388, 2007.

O'NEILL, E.; POZZI, C.; HOUSTON, P.; HUMPHREYS, H.; ROBINSON, D.A.; LOUGHMAN, A.; FOSTER, T.J. & O'GARA, J.P. **A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB.** J. Bacteriol., 190, 3835-3850, 2008.

OZERI, V., ROSENSHINE, I., MOSHER, D.F., FÄSSLER, R. & HANSKI, E. **Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1.** Mol. Microbiol., 30, 625-637, 1998.

PACHECO, A.B., GUTH, B.E., SOARES, K.C., NISHIMURA, L., DE ALMEIDA, D.F. & FERREIRA, L.C. **Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans.** J. Clin. Microbiol., 35, 1521-1525, 1997.

PEACOCK, S. J., SILVA da, I. & LOWY F. D. **What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?** Trends Microbiol., 9, 605-610, 2001.

PEACOCK, S. J., FOSTER, T. J., CAMERON, B.J. & BERENDT, A.R. **Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells.** Microbiol., 145, 3477-3486, 1999.

PILLAR, C.M., ARANZA, M. K., SHAH, D., SAHM, D.F. ***In vitro* activity profile of ceftobiprole, an anti-MRSA cephalosporin, against recent gram-positive isolates of European origin.** J. Antimicrob. Chemother., 61, 595-602, 2008.

PÖHLMANN-DIETZE, P., ULRICH, M., KISER, K.B., DÖRING G., LEE, J.C., FOURNIER, J., BOTZENHART, K. & WOLZ, C. **Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phase.** Infect. Immun., 68, 4865-4871, 2000.

POSTIER, R.G., GREEN, S. L., KLEIN, S.R., ELLIS-GROSSE, E.J. & LOH, E. **Results of a multicenter, randomized, open-label efficacy and safety study of two doses of tigecycline for complicated skin and skin-structure infections in hospitalized patients.** Clin. Ther., 26, 704-714, 2004.

POTEL, C., ALVAREZ, M., ALVAREZ, P. & OTERO, I. **Evolution, antimicrobial susceptibility and assignment to international clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated over a 9-year period in two Spanish hospitals.** Clin. Microbiol. Infect., 13, 728-730, 2007.

PRÉVOST, G., COUPPIÉ, P & MONTEIL, H. **Staphylococcal epidermolysins.** Curr. Opin. Infect. Dis., 16, 71-76, 2003.

PROJAN, S. J. & NOVICK, R. P. **The basis of pathogenicity.** In: Crossler, K. B., Archer, G. L. eds. The staphylococci in human diseases. New York: Churchill Livingstone. P. 55-82, 1997.

QUE, Y.A., FRANÇOIS, P., HAEFLIGER, J.A., ENTENZA, J.M., VAUDAUX, P. & MOREILLON, P. **Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*.** Infect. Immun., 69, 6296-6302, 2001.

QUE, Y.A., HAEFLIGER, J.A., PIROTH, L., FRANCOIS, P., WIDMER, E., ENTENZA, J.M., SINHA, B., HERRMANN, M., FRANCIOLI, P., VAUDAUX, P. & MOREILLON, P. **Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis.** J. Exp. Med., 201, 1627-1635, 2005.

RIBEIRO, A., DIAS, C., SILVA-CARVALHO, M.C., BERQUÓ, L. FERREIRA, F.A., SANTOS, R.N.S., FERREIRA-CARVALHO, B., FIGUEIREDO, A.M.S. **First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America.** J. Clin. Microbiol., 43, 1985-1988, 2005.

RINDI, S., CICALINI, S., PIETROCOLA, G., VENDITTI, M., FESTA, A., FOSTER, T.J., PETROSILLO, N. & SPEZIALE, P. **Antibody response in patients with endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*.** Eur. J. Clin. Invest., 36, 536-543, 2006.

ROCHE, F. M. MASSEY, R., PEACOCK, S.J. DAY, N. P., VISAI, L., SPEZIALE, P., LAM, A., PALLAN, M. & FOSTER, T. J. **Characterization of novel LPTXG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences.** Microbiology, 149, 643-654, 2003.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J., BISCHOFBERGER, C., ÁLVAREZ-LERMA, F., ANSENSIOD, A., DELGADOE, T., GARCÍA-ARCALF, D., GARCÍA-ORTEGAA, L., HERNÁNDEZG, M.J., MOLINA-CABRILLANAH, J.M., PÉREZ-CANOSAD, C. & PUJOLI, M. **Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a metecilina en hospitales españoles.** Enferm. Infec. Microbiol. Clin., 26, 285-298, 2008.

ROSE, W.E. & RYBAK, M.J. **Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents.** Pharmacotherapy., 26, 1099-1110, 2006.

RUBINSTEIN, E., KOLLEF, M.H. & NATHWANI, D. **Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Clin Infect Dis., 5, S378-385, 2008.

RUZIN A.; SINGH G.; SEVERIN A.; YANG Y.; DUSHIN R.G.; SUTHERLAND A.G.; MINNICK A.; GREENSTEIN M.; MAY M.K.; SHLAES D.M. & BRADFORD P.A. **Mechanism of action of the mannopeptimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against vancomycin-resistant gram-positive bacteria.** Antimicrob. Agents Chemother., 48, 728-738, 2004.

SAHA, B., SINGH, A.K., GHOSH, A. & BAL, M. **Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia).** J. Med. Microbiol., 57, 72-79, 2008.

SAID-SALIM, B., DUMMAN, P.M., MCALEESE, F.M., MACAPAGAL, D., MURPHY, E., MCNAMARA, P.J., ARVIDSON, S., FOSTER, T.J. PROJAN, S. J. & KREISWIRTH, B. N. **Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot.** J. Bacteriol., 185: 610-619, 2003.

SÁ-LEÃO, R., SANTOS-SANCHES, I, DIAS, D., PERES, I., BARROS, R.M. & LENCASTRE de, H. **Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strains?** J. Clin. Microbiol., 37, 1913-1920, 1999.

SALYERS, A.A. & WHITT, D. D. **Bacterial strategies for evading or surviving the defense systems of the human body.** In: Bacterial Pathogenesis – a molecular approach. 2 ed.; ASM Press; Washington; D.C., 2002.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989.

SANCHES, I.S., RAMIREZ, M., TRONI, H., ABECASSIS, M., PADUA, M., TOMASZ, A. & DE LENCASTRE de, H. **Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain.** J. Clin. Microbiol., 33, 1243-1246, 1995.

SARAVIA-OTTEN, P., MÜLLER, H.P & ARVIDSON. **Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by *agr* and an *agr*-independent mechanism.** J. Bacteriol., 179, 5259, 1997.

SCHABERG, D.R., CULVER, D.H. & GAYNES, R. P. **Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection.** Am. J. Med., 91, 72S-75S, 1991.

SCHRÖDER, A., SCHRÖDER, B., ROPPENSER, B., LINDER, S., SINHA, B., FÄSSLER, R. & AEPFELBACHER, M. ***Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells.** Mol. Biol. Cell., 17, 5198-210, 2006.

SHENKMAN, B., RUBINSTEIN, E., CHEUNG, A., BRILL, G.E., DARDIK, R., TAMARIN, I., SAVION, N. & VARON, D. **Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions: Roles of *agr* and *sar* loci, platelets, and plasma ligands.** Infect. Immun., 69, 4473-4478, 2001.

SHENKMAN, B., VARON, D., TAMARIN, I., DARDIK, R., PEISACHOV, M., SAVION, N. & RUBINSTEIN, E. **Role of *agr* (RNAIII) in *Staphylococcus aureus* adherence to fibrinogen, fibronectin, platelets and endothelial cells under static and flow conditions.** J. Med. Microbiol., 51, 747-754, 2002.

SHORE, A., ROSSNEY, A.S., KEANE, C.T., ENRIGHT, M.C. & COLEMAN, D.C. **Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatients infections in Australia.** J. Clin. Microbiol., 42, 4735-4743, 2004.

SHORE, A., ROSSNEY, A.S., KEANE, C.T., ENRIGHT, M.C. & COLEMAN, D.C. **Seven novel variants of the staphylococcal chromosome cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 2070-2083, 2005.

SIBOO, I.R., CHEUNG, A.L., BAYER, A.S. & SULLAM, P.M. **Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets.** Infect. Immun., 69, 3120-3127, 2001.

SIERADZKI, K. & TOMASZ, A. **Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 179, 2557-2566, 1997.

SILVA da, M. C. A., ZAHM, J.N., GRAS, D., BAJOLET, O., ABELY, M., HINNRSKY, J., MILLIOT, M., DE ASSIS, M. C., HOLOGNE, C., BONNET, N., MERTEN, M., PLOTKOWSKI, M. C. & PUCHELLE, E. **Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*.** Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 287, L543-L551, 2004.

SINHA, B., FRANÇOIS, P. P., NÜBE, O., FOTI, M., HARTFORD, O. M., VAUDAUX, P., FOSTER, T. J., LEW, D. P., HERRMANN, M. & KRAUSE, K. H. **Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasion via fibronectin bridging to integrin  $\alpha_5\beta_1$ .** Cell. Microbiol., 1, 101-117, 1999.

SINHA, B., FRANÇOIS, P. P., QUE, Y.A., HUSSAIN, M., HEILMANN, C., MOREILLON, P., LEW, D., KRAUSE, K.H., PETERS, G. & HERRMANN, M. **Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein are sufficient for invasion of host cells.** Infect. Immun., 68, 6871-6878, 2000.

SINHA, B. & HERRMANN, M. **Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*.** Thromb Haemost., 94, 266-277, 2005.

SOARES, M.J.S., TEIXEIRA, L.A., NUNES, M.R., CARVALHO, M.C.S., FERREIRA-CARVALHO, B.T. & FIGUEIREDO, A.M.S. **Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian Epidemic clone.** J. Med. Microbiol., 50, 732-742, 2001.

SOO KO, K., KIM, Y.S., SONG, J.H., YEOM, J.S., LEE, H., JUNG, S.I., JEONG, D.R., KIM, S.W., CHANG, H.H., KI, H.K., MOON, C., OH, W.S., PECK, K.R. & LEE, N.Y. **Genotypic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Korean hospitals.** Antimicrobi. Agents. Chemother., 49, 3583-3585, 2005.

SOUZA de, M.A., CRISOSTOMO, M.I., SANCHES, I.S., FUZHONG, J.S., TOMASZ, A. & LENCASTRE de, H. **Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China.** J. Clin. Microbiol., 41, 159-163, 2003.

SOUZA de, M.A., SANCHES, I.S., FERRO, M.L., VAZ, M.J., SARAIVA, Z., TENDEIRO, T., SERRA, J. & LENCASTRE de, H. **Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone.** J. Clin. Microbiol., 36, 2590-2596, 1998.

SPELLBERG, B., POWERS, J. H., BRASS, E. P., MILLER, L. G. & EDWARDS, J. E. **Trends in antimicrobial drug development: implications for the future.** Clin. Infect. Dis., 38, 1279-86, 2004.

TAKIZAWA Y.; TANEIKE I.; NAKAGAWA S.; OISHI T.; NITAHARA Y.; IWAKURA N.; OZAKI K.; TAKANO M.; NAKAYAMA T. & YAMAMOTO T. **A Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan.** J. Clin. Microbiol., 43, 3356-3363, 2005.

TEIXEIRA, L. A., RESENDE, C. A., ORMOND, L. R., ROSEMBAUM, R., FIGUEIREDO, A. M. S., LENCASTRE de, H. & TOMASZ, A. **Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil.** J. Clin. Microbiol., 33, 2400-2404, 1995.

TENOVER, F.C., WEIGEL, L.M., APPELBAUM, P.C. MCDUGAL, L.K., CHAITRAM, J., MCALLISTER, S., CLARK, N., KILLGORE, J., O'HARA, C. M., JEVITT, L., PATEL, J. B. & BOZDOGAN, B. **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania.** Antimicrob. Agents Chemother., 48, 275-280, 2004.

THOMAS, M.G., PEACOCK, S., DAENKE, S. & BERENDT, A.R. **Adhesion of *Staphylococcus aureus* to collagen is not a major virulence determinant for septic arthritis, osteomyelitis, or endocarditis.** J. Infect. Dis., 179, 291-293, 1999.

TIWARI, H.K. & SEN, M.R. **Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India.** BMC Infect. Dis., 6, 156, 2006.

TOLEDO-ARANA, A., MERINO, N., VERGARA-IRIGARA, Y.M., DEBARBOUILLE, M., PENADES, J.R. & LASA, I. ***Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system.** J. Bacteriol., 187, 5318-5329, 2005.

TON-THAT, H., LIU, G., MAZMANIAN, S.K., FAULL, K.F. & SCHINEEWIND, O. **Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 12424-12429, 1999.

TOWNSEND, M.L., POUND, M.W. & DREW, R.H. **Tigecycline: a new glycylcycline antimicrobial.** Int. J. Clin. Pract., 60, 1662-1672, 2006.

VALENTINI, P., PARISE, G., MONACO, M., CREA, F., SPANU, T., RANNO, O., TRONCI, M. & PANTOSTI, A. **A uncommon presentation for a severe invasive infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in Italy: a case report.** Annal. Clin. Microbiol. Antimicrobiol, 7, 1-6, 2008.

VALLE, J., TOLEDO-ARANA, A., BERASAIN, C., GHIGO, J., AMORENA, B., PENADES, J.R. & LASA, I. **SarA and not SigB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*.** Mol. Microbiol., 48, 1075-1087, 2003.

VAN BELKUM, A., VAN LEEUWEN, W., VERKOOYEN, R., SACILIK, S. C., COKMUS, C. & VERBRUGH, H. **Dissemination of a single clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Turkish hospitals.** J. Clin. Microbiol., 35, 978-981, 1997 (a).

VAN BELKUM, A., VANDENBERGH, M., KESSIE, G., QADRI, S. M., LEE, G., VAN DEN BRAAK, N., VERBRUGH, H. & AL-AHDAL, M. N. **Genetic homogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Saudi Arabia.** Microb. Drug Resist. Winter., 3, 365-369, 1997 (b).

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C.; LINA, G.; NIMMO, G.R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M.E. & ETIENNE, J. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes, worldwide emergence.** Emerg. Infect. Dis., 9, 978-84, 2003.

VAUDAUX, P., FRANÇOIS, P., PROCTOR, R.A., MCDEVITT, D., FOSTER, T.J., ALBRECHT, R.M., LEW, D. P., WABERS, H. & COOPER, S.L. **Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts.** Infect. Immun., 63, 585-590, 1995.

VAUDAUX, P., YASUDA, H., VELAZCO, M. I., HUGGLER, E., RATTI, I., WALDVOGEL, F.A., LEW, D. P. & PROCTOR, R.A. **Role of host and bacterial factors in modulating staphylococcal adhesion to implanted polymer surfaces.** J. Biomater. Appl., 5, 134-153, 1990.

VENTURA, C.L., HIGDON, R., KOLKER, E., SKERRET, S.J. & RUBENS, C.E. **Host airway proteins interact with *Staphylococcus aureus* during early pneumonia.** Infect. Immun., 76, 888-98, 2008.

VON EIFF, C., BECKER, K., MACHKA, K., STAMMER, H. & PETERS G. **Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia.** N. Engl. J. Med., 344, 11-6, 2001.

VUONG, C., SAENZ, H.L., GOTZ, F. & OTTO, M. **Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*.** J. Infect. Dis., 182, 1688-1693, 2000.

WARDENBURG, J. B., PATEL, R. J. & SCHNEEWIND, O. **Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia.** Infect. Immun., 75, 1040-1044.

WEIGEL, L.M.; DONLAN, R.M.; SHIN, D.H.; JENSEN, B.; CLARK, N.C.; MCDUGAL, L.K.; ZHU, W.; MUSSER, K.A.; THOMPSON, J.; KOHLERSCHMIDT, D.; DUMAS, N.; LIMBERGER, R.J. & PATEL, J.B. **High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm.** Antimicrob. Agents Chemother., 51, 231-238, 2007.

WESSON, C.A., LIU, L.E., TODD, K.M., BOHACH, G.A., TRUMBLE, W.R. & BAYLES, K.W. ***Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis.** Infect. Immun., 66, 5238-5243, 1998.

WERTHEIM, H.F.L., WALSH, E., CHOUDHURY, R., MELLES, D.C., BOELEN, H.A.M., MIAJLOVIC, H., VERBRUGH, H.A., FOSTER, T. & VAN BELKUM, A. **Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans.** PLoS Med., 5, e17, 2008.

WHITENER, C. J., PARK, S. Y., BROWNE, F. A., PARENT, L. J., JULIAN, K., BOZDOGAN, B., APPELBAUM, P. C., CHAITRAM, J., WEIGEL, L. M., JERNIGAN, J., MCDUGAL, L. K., TENOVER, F. C. & FRIDKIN, S. K. **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure.** Clin. Infect. Dis., 38, 1049-1055, 2004.

WISPLINGHOFF, H., EWERTZ, P., WISPLINGHOFF, S., STEPANIK, D., PLUM, G., PERDREAU-REMINGTON, F. & SEIFERT, H. **Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998.** J. Clin. Microbiol., 43, 5445-5451, 2005. *Erratum:* J. Clin. Microbiol., 44, 676, 2006.

WOLFF, M. **Treatment of severe Gram-positive infections: current situation and new opportunities.** Presse. Med., 32, 9-12, 2003.

WOLZ, C. P., PÖHLMANN-DIETZE, A., STEINHUBER, Y. T., CHEIN, A., MANNA, W., VAN WAMEL & CHEUNG, A. **Agr-independent regulation of fibronectin-binding proteins by the regulatory locus sar in *Staphylococcus aureus*.** Mol. Microbiol., 36, 230-243, 2000.

WOODFORD N. **Novel agents for the treatment of resistant Gram-positive infections.** Expert Opin. Investig. Drugs., 12, 117-137, 2003.

WRIGHT III, J. S., LYON, G.J., GEORGE, E.A., MUIR, T.W. & NOVICK, R.P. **Hydrophobic interactions drive ligand-receptor recognition for activation and inhibition of staphylococcal quorum sensing.** PNAS, 101, 16168-16173, 2004.

YAMAGUCHI, T., NISHIFUJI, K., SASAKI, M. FUDABA, Y., AEPFELBACHER, M., TAKATA, T., OHARA, M., KOMATSUZAWA, H., AMAGAI, M & SUGAI, M. **Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B.** Infect. Immun., 70, 5835-5845, 2002.

YAMASHITA A.; NORTON E.; PETERSEN P.J.; RASMUSSEN B.A.; SINGH G.; YANG Y.; MANSOUR T.S. & HO D.M. **Muraymycins, novel peptidoglycan biosynthesis inhibitors, synthesis and SAR of their analogues.** Bioorg. Med. Chem. Lett., 13, 3345-3350, 2003.

YAO, L., BENGUALID, V., LOWY, F.D., GIBBONS, J.J., HATCHER, V.B. & BERMAN, J.W. **Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression.** Infect. Immun., 63, 1835-1839, 1995.

YEAMAN, M. R. **The role of platelets in antimicrobial host defense.** Clin. Infect. Dis., 25, 951-968, 1997.

ZHANEL, G.G., TRAPP, S., GIN, A.S., DECORBY, M., LAGACÉ-WIENS, P.R.S., RUBINSTEIN, E., HOBAN, D.J., KARLOWSKY, J.A. **Dalbavancin and telavancin: novel lipoglycopeptides for the treatment of gram-positive infections.** Future Drugs., 6, 67-81, 2008.

ZHANG, L., GRAY, L., NOVICK, R.P. & JI, G. **Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*.** J. Biol. Chem., 277, 34736-34742, 2002.

ZHANG, L. & JI, G. **Identification of a staphylococcal AgrB segment(s) responsible for group-specific processing of AgrD by gene swapping.** J Bacteriol., 186, 6706-6713, 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)