



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCIÊNCIAS

Gabriel Cipriani

Análise genômica de bactérias clínicas resistentes aos antimicrobianos como ferramenta complementar ao diagnóstico convencional

Florianópolis
2024

Gabriel Cipriani

Análise genômica de bactérias clínicas resistentes aos antimicrobianos como ferramenta complementar ao diagnóstico convencional

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Profa. Dra. Fabienne Antunes Ferreira

Coorientadora: Dra. Hege Vangstein Aamot

Florianópolis

2024

Cipriani, Gabriel

Análise genômica de bactérias clínicas resistentes aos antimicrobianos como ferramenta complementar ao diagnóstico convencional / Gabriel Cipriani ; orientadora, Fabienne Antunes Ferreira, coorientadora, Hege Vangstein Aamot, 2024.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Genômica. 3. Bactérias resistentes aos antimicrobianos. 4. Diagnóstico complementar. 5. Sequenciamento por nanoporos. I. Ferreira, Fabienne Antunes. II. Aamot, Hege Vangstein. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Gabriel Cipriani

Análise genômica de bactérias clínicas resistentes aos antimicrobianos como ferramenta complementar ao diagnóstico convencional

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 26 de abril de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Fabienne Antunes Ferreira, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Glauber Wagner, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Marina Farrel Côrtes
Universidade de São Paulo

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

.

Prof. Aguinaldo Roberto Pinto, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Profa. Fabienne Antunes Ferreira, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valentim e Fátima, por todo amor, por serem meus alicerces e por me apoiarem de todas as maneiras possíveis. Sem vocês, eu nada seria. Aos meus avós, Irene, Marcolina e Moisés, por todo o carinho e alegria.

À minha orientadora Dra. Fabienne, por simplesmente ser ela mesma, uma pessoa de muita luz e amor. Sempre esbanjando bondade, palavras de motivação e reconforto. Uma pessoa apaixonada pelo que faz, e que encanta a quem fala. Certamente, se não fosse por ti, eu não teria chegado ao final dessa etapa tão importante da minha vida. Te agradeço imensamente.

À minha coorientadora Dra. Hege, por todos os encontros produtivos, pelo conhecimento, pelo intercâmbio linguístico, e por viabilizar o uso dos dados utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Glauber e ao Laboratório de Bioinformática da UFSC e seus colaboradores, por compartilhar conhecimento e pela disponibilização de ferramentas computacionais.

Aos professores Dra. Helen e Dr. Marcelo por dispuserem de tempo para auxiliar nas análises estatísticas.

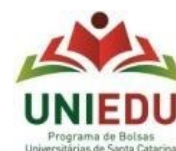
Aos meus amigos, os quais foram minhas bases nos momentos felizes e nos momentos difíceis nesses últimos anos. Agradeço imensamente aos de longa data, Andre, Mariana, Isis, Matheus, Luísa, Davi e Bárbara. Agradeço aos novos amigos que a vida me proveu, Iara, Andressa, Rafaela, Matheus, Natália, Leonardo e Tainara.

Ao SUS e às equipes de saúde das Unidades Básicas, por todo o serviço, suporte e auxílio nas questões relacionadas à saúde física e mental.

A toda sociedade brasileira, que viabiliza a existência das universidades públicas e de qualidade.

À UFSC e seus servidores, por possibilitar a existência de tantas áreas de estudo, geridas com qualidade e excelência sob a articulação entre ensino, pesquisa e extensão. Ao PPGBTC e seu corpo docente por me proporcionar a experiência da pós-graduação e uma formação de excelência.

À Secretaria de Educação do Estado de Santa Catarina, pelo Programa UNIEDU/FUMDES Pós-Graduação, o qual me auxiliou nesse período.



RESUMO

A resistência aos antimicrobianos (AMR) é uma ameaça global à saúde única. Infecções decorrentes de bactérias resistentes estão associadas ao aumento do tempo de hospitalização e a taxas mais altas de morbidade e mortalidade. Tratamentos bem-sucedidos dessas infecções dependem da identificação rápida dos isolados e de seus respectivos perfis de resistência. A identificação de aspectos relacionados à virulência dessas bactérias também pode auxiliar no entendimento da dinâmica de interação patógeno-hospedeiro, com vistas a criar intervenções em benefício da saúde de pacientes. Genes AMR e de fatores de virulência (VF) estão comumente associados a elementos genéticos móveis (MGE), tornando importante a identificação destes para a investigação do potencial de disseminação, via mecanismos de transferência horizontal de genes. O sequenciamento completo do genoma (WGS) tem sido recomendado como uma ferramenta de diagnóstico “one-stop” devido à sua capacidade de fornecer dados diagnósticos e epidemiológicos múltiplos e simultâneos sobre o microrganismo. Em 2021, nosso grupo de pesquisa desenvolveu e validou um protocolo WGS rápido (<33h) baseado em nanoporos (protocolo ONT20h) para vigilância e investigação de surtos. Para avaliar o potencial desse protocolo para diagnósticos complementares, o presente estudo visou identificar genes relacionados à AMR e aos VF, além de MGE, comparando os resultados com os de outros quatro protocolos de sequenciamento mais lentos. Os protocolos estudados incluíram três com sequenciamentos de nanoporos (variando o tempo de sequenciamento e a metodologia de montagem), um com sequenciamento Illumina, e um protocolo de montagem híbrida usando *reads* de nanoporo e Illumina. O estudo envolveu genomas de 42 isolados de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e de seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL-Kp). Genes e MGEs foram detectados usando ferramentas bioinformáticas online e gratuitas. A detecção de genes AMR foi similar entre os protocolos nas análises realizadas no serviço *ResFinder* para MRSA, mas variou significativamente para ESBL-Kp ($p = 0,0031$). As análises realizadas no programa *CARD-RGI* apresentaram diferença significativa entre os protocolos para MRSA ($p < 0,0001$). Não foi observada diferença entre os protocolos para detecção de genes VF em ambas as espécies. A detecção de MGE diferiu entre os protocolos para MRSA e ESBL-Kp (valores $p = 0,0496$ e $0,0019$, respectivamente). A concordância entre os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (AST) baseado em análises de dados WGS (WGS-AST) (ONT20h) e o AST fenotípico foi alta para MRSA (1) e ESBL-Kp (0,81). A acurácia do WGS-AST foi de 100% e 93,06% e a especificidade de 100% e 75% para MRSA e ESBL-Kp, respectivamente, com sensibilidade de 100% para ambos. O protocolo ONT20h apresentou resultados tão bons e até melhores que os demais protocolos testados, fortalecendo seu potencial de aplicação na rotina clínica. De maneira geral, a análise de dados WGS sugere uma alternativa promissora no esforço para fornecer diagnóstico complementar e dados epidemiológicos rápidos e precisos. Porém, mais estudos são necessários para sua implementação, considerando que as análises dependem do custo dos insumos, da disponibilidade de ferramentas de bioinformática e da qualidade e curadoria de bancos dados de referência.

Palavras-chave: análises genômicas; diagnóstico; genótipo-fenótipo; sequenciamento por nanoporos; WGS-AST.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) represents a major threat to one health worldwide. Infections caused by resistant bacteria are associated with increased hospitalization time and higher rates of morbidity and mortality. Successful treatments for AMR-associated bacterial infections depend on the rapid identification of isolates and their respective resistance profiles. Identifying aspects related to the virulence of these bacteria can also assist in understanding the dynamics of pathogen-host interaction, aiming to create interventions for patient health benefits. Genes related to AMR and virulence factors (VF) are commonly associated with mobile genetic elements (MGE), making its identification important for investigating the potential for dissemination via horizontal gene transfer mechanisms. Whole genome sequencing (WGS) has been recommended as a "one-stop" diagnostic tool due to its ability to provide multiple and simultaneous diagnostic and epidemiological data about the microorganism. In 2021, our research group developed and validated a rapid (<33h) WGS protocol based on nanopores (ONT20h protocol) for surveillance and outbreak investigation. To assess the potential of this protocol for complementary diagnostics, the present study aimed to identify genes related to AMR and VF, as well as MGE, comparing the results with those of four other slower sequencing protocols. The sequencing protocols studied included for each bacterial strain: three nanopore sequencing (varying sequencing time and assembly methodology), one sequencing on Illumina platform, and one hybrid assembly protocol using nanopore and Illumina reads. The study involved the genomes of 42 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates and six extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kp) isolates. Genes and MGEs were detected using free online bioinformatics tools. The ability to detect AMR genes was similar among the protocols for MRSA in the *ResFinder* service, unlike what was observed for ESBL-Kp, which showed significant difference ($p=0.0031$). Analyses performed in the CARD-RGI program showed significant difference among the protocols for MRSA ($p < 0.0001$). No difference was observed among the protocols to detect VF genes for both species. MGE detection showed significant differences among the protocols for both MRSA and ESBL-Kp (p values = 0.0496 and 0.0019, respectively). Cohen's Kappa coefficient demonstrated good agreement between the results of antimicrobial susceptibility testing (AST) based on WGS data analyses (WGS-AST) (ONT20h) and phenotypic AST for MRSA (1) and ESBL-Kp (0.81). The accuracy of WGS-AST (ONT20h) was 100% and 93.06% for MRSA and ESBL-Kp, respectively. Specificity was 100% and 75% for MRSA and ESBL-Kp, respectively, and sensitivity was 100% for both species. The ONT20h protocol showed results as good as or even better than the other slower protocols tested, strengthening its potential for application in clinical practice. Overall, WGS data analysis suggests a promising alternative in the effort to provide rapid and accurate complementary diagnostic and epidemiological data. However, further studies are needed for its implementation, considering that analyses depend on the cost of inputs, the availability of bioinformatics tools, and the quality and curation of reference databases.

Keywords: genomic analyses; diagnosis; genotype-phenotype; nanopore sequencing; WGS-AST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráficos indicativos do número total de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos detectados nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. Genomas obtidos a partir de cinco diferentes protocolos e análises realizadas no serviço *ResFinder* (A) e no programa *CARD-RGI* (B). Genes detectados classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada ≠ tamanho da sequência de referência, identidade ≤ 100%43

Figura 2. Gráfico indicativo do número total de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos detectados nos genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. Genomas obtidos a partir de três diferentes protocolos e análises realizadas no serviço *ResFinder*. Genes detectados classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada ≠ tamanho da sequência de referência, identidade ≤ 100%44

Figura 3. Gráficos indicativos do número total de mutações relacionadas à resistência aos antimicrobianos detectadas nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (A) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (B). Resultados de acordo com os protocolos utilizados para obtenção dos genomas e análises realizadas no serviço *PointFinder*45

Figura 4. Gráfico indicativo do número total de genes relacionados aos fatores de virulência detectados nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (A) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (B). Resultados de acordo com os protocolos utilizados para obtenção dos genomas e análises realizadas no serviço *VirulenceFinder* (A) e no programa *VFDB* (B). Genes detectados no serviço *VirulenceFinder* classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada ≠ tamanho da sequência de referência, identidade ≤ 100%46

Figura 5. Gráficos indicativos do número total de plasmídeos detectados nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (A) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (B). Resultados de acordo com os protocolos utilizados para obtenção dos genomas e análises realizadas no serviço *PlasmidFinder*. Plasmídeos detectados classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada ≠ tamanho da sequência de referência, identidade ≤ 100%48

Figura 6. Gráfico indicativo do número total de elementos genéticos móveis (MGE) (exceto plasmídeos) detectados nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (A) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (B). Resultados de acordo com os protocolos utilizados para obtenção dos genomas e análises realizadas no serviço *MobileElementFinder*. MGE detectados classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada ≠ tamanho da sequência de referência, identidade ≤ 100%49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Comandos utilizados nos programas de montagem e polimento de genomas e de análise de qualidade de sequenciamento	32
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Protocolos de sequenciamento/montagem. A tecnologia/plataforma de sequenciamento indica qual tecnologia (ONT = *Oxford Nanopore Technology*; IT = *Illumina Technology*) e plataforma de sequenciamento (GridION; MiSeq) foram utilizadas em cada protocolo; o tempo de sequenciamento indica, em horas, o tempo de corrida utilizado para sequenciar o DNA dos isolados; ademais, são indicados os programas utilizados para montagem *de novo* e polimento, caso haja, dos genomas31
- Tabela 2.** Versões dos programas e dos respectivos bancos de dados utilizados para as análises genômicas dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, de acordo com os protocolos de sequenciamento34
- Tabela 3.** Versões dos programas e dos respectivos bancos de dados utilizados para as análises genômicas dos isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), de acordo com os protocolos de sequenciamento.....35
- Tabela 4.** Estatísticas dos dados de sequenciamentos dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina de realizados via *Oxford Nanopore Technology* (ONT) com 20 e 48h de sequenciamento e via *Illumina Technology* (IT). São indicados os valores médios, mínimos e máximos do tamanho médio dos *reads*, número (nº) de *reads* analisados, nº de bases sequenciadas (Gb) e o *quality score* (*Q-score*) médio39
- Tabela 5.** Estatísticas dos dados de sequenciamentos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido realizados via *Oxford Nanopore Technology* (ONT) com 20 e 48h de sequenciamento e via *Illumina Technology* (IT). São indicados os valores médios, mínimos e máximos do tamanho médio dos *reads*, número (nº) de *reads* analisados, nº de bases sequenciadas (Gb) e o *Quality score* (*Q-score*) médio39
- Tabela 6.** Valores médios, mínimos e máximos das métricas de qualidade da montagem dos genomas dos 42 isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio de diferentes protocolos. São indicadas as estatísticas do tamanho montado dos genomas (Mb), número (nº) de contigs, tamanho do maior contig, porcentagem (%) GC, N50, L50 e cobertura40

Tabela 7. Valores médios, mínimos e máximos das métricas de qualidade da montagem dos genomas dos 42 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de betalactamases de espectro estendido obtidos por meio de diferentes protocolos. São indicadas as estatísticas do tamanho montado dos genomas (Mb), número (nº) de contigs, maior contig, porcentagem GC, N50, L50 e cobertura	41
Tabela 8. Média do número de genes detectados em cada linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina, de acordo com o serviço/programa utilizado	43
Tabela 9. Média do número de mutações detectadas em cada linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina, utilizando o serviço <i>PointFinder</i>	45
Tabela 10. Média do número de genes detectados em cada linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina utilizando o serviço <i>VirulenceFinder</i>	47
Tabela 11. Média do número de elementos genéticos móveis detectados em cada linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina de acordo com o serviço/programa utilizado	48
Tabela 12. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT20h ou IT ou Híbrido	51
Tabela 13. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina obtidos por meio do protocolo ONT48hA	51
Tabela 14. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina obtidos por meio do protocolo ONT48hB	51
Tabela 15. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBL, obtidos por meio do protocolo ONT20h ou ONT48hB	51
Tabela 16. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBL, obtidos por meio do protocolo IT	52

Tabela 17. Parâmetros de acurácia do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseado em análises genômicas. Análises realizadas com isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, das quais os genomas foram obtidos a partir de cinco diferentes protocolos de sequenciamento. São indicados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e o coeficiente Kappa de Cohen, seguidos de seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%.....53

Tabela 18. Parâmetros de acurácia do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos a partir de métodos genômicos. Análises realizadas com isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, das quais os genomas foram obtidos a partir de três diferentes protocolos de sequenciamento. São indicados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e o coeficiente Kappa de Cohen, seguidos de seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Antimicrobiano
AMR	do inglês <i>Antimicrobial resistance</i> , Resistência aos antimicrobianos
AST	do inglês <i>Antimicrobial susceptibility testing</i> , Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
b	bases
CC	Complexo clonal
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
ESBL	do inglês <i>Extended-spectrum betalactamases</i> , Betalactamases de espectro estendido
ESBL-Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de betalactamases de espectro estendido
h	Hora
Hv	Hipervirulento
IC	Intervalo de confiança
IS	do inglês <i>Insertion sequence</i> , Sequências de inserção
IT	<i>Illumina Technology</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
L1	Linhagem 1
L2	Linhagem 2
L3	Linhagem 3
L4	Linhagem 4
Mb	Mega bases
Mpb	Mega pares de bases
MGE	do inglês <i>Mobile genetic elements</i> , Elementos genéticos móveis
min	Minuto
MLE-B	Macrolídeos, lincosamidas, estreptogramina-B
MLST	do inglês <i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
MRSA	do inglês <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> , <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina
MSSA	do inglês <i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i> , <i>S. aureus</i> sensíveis à meticilina
Nº	Número

ONT	<i>Oxford Nanopore Technology</i>
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
PVL	do inglês <i>Panton–Valentine leukocidin</i> , leucocidina de Panton-Valentine
<i>Q-score</i>	do inglês <i>Quality score</i>
SCC	do inglês <i>Staphylococcal chromosome cassettes</i> , Cassete cromossômico estafilocócico
ST	do inglês <i>Sequence type</i>
t	tipagem do gene codificante da proteína A (gene <i>spa</i>)
µg	microgramas
VF	do inglês <i>Virulence factors</i> , Fatores de virulência
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WGS	do inglês <i>Whole genome sequencing</i> , Sequenciamento completo do genoma
WGS-AST	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos baseado em análise de dados WGS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	16
1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
1.4	SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO DNA E BACTERIOLOGIA CLÍNICA	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	GENOMAS BACTERIANOS	30
3.2	ANÁLISES GENÔMICAS	32
3.3	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS FENOTÍPICO E BASEADO EM ANÁLISE DE DADOS WGS	35
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
4	RESULTADOS	39
4.1	GENOMAS BACTERIANOS	39
4.2	ANÁLISES GENÔMICAS	41
4.2.1	Análises de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos.....	42
4.2.2	Análises de mutações relacionadas à resistência aos antimicrobianos	45
4.2.3	Análises de genes relacionados aos fatores de virulência.....	46
4.2.4	Análises de elementos genéticos móveis.....	47
4.3	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS FENOTÍPICO E BASEADO EM ANÁLISE DE DADOS WGS	50
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICES	68
	ANEXOS.....	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A introdução de compostos antimicrobianos (AM) à rotina clínica no início do século XX foi um grande marco para saúde pública e se consolidou como um dos principais alicerces da medicina moderna (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; MOHR, 2016). Doenças bacterianas infecciosas antes consideradas fatais deixaram de ser uma ameaça. A implementação de AM, junto ao desenvolvimento de vacinas e de hábitos de higiene, aumentou consideravelmente a expectativa de vida da nossa espécie (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; ROSINI et al., 2020). Contudo, a eficácia dos AM desenvolvidos até então enfraquece a cada dia em alguns cenários. Sem dúvidas, a resistência aos antimicrobianos (AMR, do inglês *antimicrobial resistance*) se constitui como a principal ameaça a uma série de práticas e tratamentos médicos, podendo comprometer o sucesso de diversas terapias e procedimentos contra infecções (COLSON et al., 2021; ROSINI et al., 2020).

A AMR ocorre quando microrganismos possuem ou adquirem estratégias que lhes conferem a capacidade de contornar os mecanismos de ação dos AM, de maneira a sobreviverem e permanecerem viáveis (ABUSHAHEEN et al., 2020; CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020; MURRAY et al., 2022). Essa capacidade é antiga, sendo constatada muito antes do descobrimento e aplicação em massa dos AM (D’COSTA et al., 2011). Uma série de fatores influenciam, e levam a um rápido aumento da incidência da AMR, sendo que o próprio uso dos AM, em si, exerce uma pressão seletiva sobre as bactérias, tornando disponível um nicho ecológico no qual isolados bacterianos mais adaptados/resistentes podem prosperar (COLSON et al., 2021; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; PULINGAM et al., 2022).

As bactérias podem apresentar AMR por meio de três vias: intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca se dá pelas propriedades inerentes às espécies bacterianas, tal como a permeabilidade reduzida da membrana externa apresentada por bactérias gram-negativas e a atividade natural de bombas de efluxo. A resistência adaptativa acontece de maneira transitória e é desencadeada por sinais específicos ou condições ambientais (por exemplo: estresse, pH, estado de crescimento, condições nutricionais). Já a resistência adquirida é aquela que pode se dar por mutações no DNA do próprio microrganismo ou pela aquisição de elementos genéticos móveis (MGE, do inglês *Mobile genetic elements*), seja por transformação,

transdução ou conjugação (ABUSHAHEEN et al., 2020; CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020; DJORDJEVIC et al., 2024; FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

Os mecanismos envolvidos na AMR atuam de forma a degradar ou modificar a estrutura do AM, alterar o sítio alvo do AM, fazer com que a concentração intracelular do AM diminua ou promover alterações gerais na célula bacteriana (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020; REYGAERT, 2018; SIONOV; STEINBERG, 2022). Diferenças na apresentação desses mecanismos são observadas entre bactérias gram-positivas e -negativas, principalmente devido a questões estruturais. Como exemplo, bactérias gram-negativas podem manifestar qualquer tipo de mecanismos envolvidos na AMR, enquanto que as gram-positivas apresentam menos comumente mecanismos envolvidos na absorção dos antimicrobianos, isto devido ao fato de não possuírem uma membrana externa com lipopolissacarídeos (REYGAERT, 2018).

Infecções causadas por bactérias resistentes aos AM estão associadas a aumentos significativos nos níveis de morbidade e mortalidade, assim como a maiores tempos de hospitalização e custos de tratamento (ABUSHAHEEN et al., 2020; MURRAY et al., 2022; PULINGAM et al., 2022; ROSINI et al., 2020; TILLOTSON; ZINNER, 2017). Atualmente, a resistência a praticamente todos os antimicrobianos já desenvolvidos, o ritmo lento no desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana e a emergência de isolados bacterianos multirresistentes se compõem como alguns dos maiores desafios a serem enfrentados no âmbito de saúde única (ALGAMMAL et al., 2020; BECKER et al., 2018; BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019; CASSINI et al., 2019; TILLOTSON; ZINNER, 2017; WHO, 2020).

Estimativas futuras sobre os impactos econômicos e sociais da AMR são preocupantes, principalmente nos países em desenvolvimento. É estimado que possa haver até 10 milhões de mortes por ano em 2050 relacionadas à AMR. Uma pesquisa do Banco Mundial apontou que, até 2050, o Produto Interno Bruto global pode cair de 1,1% a 3,8% anualmente em decorrência da AMR, o que levaria milhões de pessoas à extrema pobreza (DE KRAKER; STEWARDSON; HARBARTH, 2016; JONAS et al., 2017; O'NEILL, 2014). Em 2019, foi estimado que cerca de 5 milhões de mortes no mundo estiveram associadas à AMR, das quais cerca de 1,27 milhões tiveram como causa direta a AMR. Mais de 70% dessas mortes estiveram relacionadas a seis espécies bacterianas: *Escherichia coli*, a qual apresentou o maior número de mortes relacionadas, seguida de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (MURRAY et al., 2022). No presente trabalho, os objetivos estão alinhados ao estudo de duas dessas espécies: *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma espécie bacteriana gram-positiva, esférica (forma cocos), podendo se apresentar isolada ou em arranjo estafilococo, catalase- e coagulase-positivas. Para humanos, é considerada tanto comensal quanto patogênica, sendo que cerca de 20% da população mundial é portadora persistente e 30% portadora intermitente. Comumente é encontrado colonizando as cavidades nasais de forma assintomática, assim como outras regiões do corpo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Quando patogênico, pode causar uma infinidade de infecções, desde as mais brandas e localizadas até as mais severas e sistêmicas. É uma das espécies bacterianas mais frequentes em quadros de infecção de corrente sanguínea e endocardite infecciosa, além de infecções na pele e em tecidos moles, osteoarticulares e associadas a dispositivos protéticos/implantáveis (TONG et al., 2015).

O genoma de *S. aureus* possui um tamanho de ~2,8 Mpb, do qual cerca de 75% correspondem ao genoma central da espécie (*core*), que é altamente conservado, e 25% ao genoma acessório, onde é observado uma alta diversidade entre os isolados (ABDELBARAY et al., 2017). No genoma central encontramos, em suma, genes espécie-específicos associados ao metabolismo e à replicação. O genoma acessório, por sua vez, é constituído majoritariamente por MGEs, tais como fragmentos de DNA associados a bacteriófagos, transposons (Tn), sequências de inserção (IS, do inglês *insertion sequence*), ilhas de patogenicidade, ilhas genômicas, cassete cromossômico estafilocócito (SCC, do inglês *staphylococcal chromosome cassette*), plasmídeos, entre outros. É no genoma acessório que geralmente se encontram determinantes de resistência aos antimicrobianos/metais/antissépticos, determinantes de evasão do sistema imune e fatores de virulência (VF, do inglês *virulence factors*). Há cerca de 2.700-3.200 genes descritos, dependendo do isolado (ABDELBARAY et al., 2017; TURNER et al., 2019).

Devido à grande variabilidade genética e fenotípica, múltiplas técnicas são empregadas para discriminar isolados de *S. aureus*, o que auxilia principalmente nas investigações epidemiológicas. Algumas técnicas fenotípicas como, por exemplo, a fagotipagem, já foram utilizadas como referência para discriminação de isolados. Contudo, devido às exigências técnicas e a baixa reprodutibilidade, caíram em desuso. A mais utilizada das técnicas fenotípicas nos dias de hoje é o teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos (AST; do inglês *antimicrobial susceptibility testing*), provendo bons resultados acerca dos perfis de resistência. No entanto, essa técnica possui uma baixa capacidade discriminatória entre isolados

estritamente relacionados geneticamente (JI, 2020; LAKHUNDI; ZHANG, 2018; TURNER et al., 2019).

Técnicas moleculares vêm sendo as mais utilizadas para estudos epidemiológicos de *S. aureus*, uma vez que fornecem uma boa reprodutibilidade e alta discriminação entre isolados bacterianos. Baseada na amplificação e sequenciamento de 7 genes *housekeeping*, a técnica *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) proporciona dados que permitem classificar, com base em combinações específicas de alelos, isolados em grupos relacionados denominados de complexos clonais (CCs) e linhagens em *sequence types* (STs). *Spa typing* é outra técnica, com base em sequenciamento de DNA, utilizada para caracterização de *S. aureus*; nela, é amplificada e sequenciada a região polimórfica X (um microsatélite) do gene *spa* (o qual codifica para a proteína A, uma proteína de superfície da bactéria envolvida na interação com o hospedeiro), permitindo uma rápida e boa discriminação entre isolados. Outros exemplos de técnicas moleculares para caracterização de *S. aureus* são a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE; do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), sequenciamento completo do genoma (WGS, do inglês *whole genome sequencing*), entre outras (ABDELBARY et al., 2017; JI, 2020; LAKHUNDI; ZHANG, 2018; TURNER et al., 2019).

A capacidade de *S. aureus* apresentar resistência a diversas classes de antimicrobianos é histórica e notável, se dando principalmente através da aquisição de MGEs (ALIBAYOV et al., 2014; TURNER et al., 2019). Pouco tempo após a introdução da penicilina à clínica médica, foi relatado isolados resistentes a ela. Tal resistência é decorrente da expressão da enzima penicilinase, uma betalactamase codificada pelo gene *blaZ*, que se localiza comumente em um transposon inserido dentro de um plasmídeo. Essa enzima atua de forma a hidrolisar o anel beta-lactâmico de penicilinas, inativando-as (PEACOCK; PATERSON, 2015). Com vistas ao desenvolvimento de novos fármacos não suscetíveis à ação da penicilinase, penicilinas semissintéticas foram desenvolvidas e disponibilizadas no início da década de 1960, como a meticilina e a oxacilina. Contudo, pouco tempo após sua introdução à clínica, isolados resistentes também foram relatados. Houve então uma diferenciação entre isolados sensíveis à meticilina e a outras penicilinas semissintéticas (MSSA, do inglês *Methicillin-susceptible S. aureus*) e isolados resistentes (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant S. aureus*). Tal diferenciação pode ser realizada a partir de observações fenotípicas e genéticas (ALGAMMAL et al., 2020; LAKHUNDI; ZHANG, 2018; TURNER et al., 2019).

A resistência de MRSA à grande maioria dos beta-lactâmicos foi adquirida por meio da aquisição exógena do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), obtido por diferentes variantes genéticas de maneira independente. Dentre os componentes estruturais de

SCC*mec* encontram-se o complexo genético *mec*, o qual comporta o determinante de resistência aos beta-lactâmicos (*mecA* ou *mecC*) e seus reguladores, e o complexo *ccr* das recombinases, o qual apresenta genes relacionados à inserção do cassete no genoma bacteriano (ABDELBARY et al., 2017; PEACOCK; PATERSON, 2015). Diferenças estruturais e no conteúdo genético desses dois complexos servem de base para classificação de SCC*mec* em 14 diferentes tipos (SCC*mec* I - XIV), reconhecidos pelo *International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome Elements* (IWG-SCC, 2023); além desses, um novo tipo foi identificado e proposto recentemente, o SCC*mec* XV (WANG et al., 2022).

Todos os tipos de SCC*mec* carregam o gene *mecA* (exceto o tipo XI, comportando um gene homólogo: *mecC*), que codifica uma proteína ligadora de penicilina alternativa, a PBP2a (do inglês, *penicillin-binding protein 2a*). Essa proteína é uma transpeptidase que possui baixa afinidade com drogas beta-lactâmicas, ou seja, é capaz de catalisar a síntese da parede celular mesmo na presença destes antimicrobianos, exceto as cefalosporinas de quinta geração (LAKHUNDI; ZHANG, 2018; LEE et al., 2018). SCC*mec* também pode conter outros determinantes capazes de conferir resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos e/ou aos metais (LAKHUNDI; ZHANG, 2018; MONECKE et al., 2016). Outro homólogo de *mecA*, o *mecB*, foi identificado em um plasmídeo de um isolado clínico de *S. aureus* na Alemanha, o qual especula-se ter sido adquirido de *Macrococcus* sp. por transferência horizontal (BECKER et al., 2018).

Uma característica marcante no estudo de isolados MRSA é sua estrutura de disseminação clonal, em que algumas linhagens genéticas específicas estão causando infecção em hospedeiros humanos e não humanos em todo o mundo (TURNER et al., 2019). Uma linhagem genética é definida comumente pela combinação do ST e do tipo SCC*mec* identificado, a exemplo da linhagem ST5-SCC*mec*II, amplamente disseminada no Brasil (TURNER et al., 2019; VIANA et al., 2021). Adicionalmente, outras características genotípicas podem ser descritas na linhagem, como o CC e o tipo *spa* (t), a exemplo da linhagem CC5-ST105-SCC*mec*II-t002 (VIANA et al., 2021). É comum que linhagens recebam também o nome de clones de MRSA, quando associados a contextos epidemiológicos específicos, como no caso do clone USA300 (linhagem CC8-ST8-SCC*mec*IV), detectado inicialmente nos Estados Unidos da América (TURNER et al., 2019).

Adicionalmente, é comum que isolados de MRSA apresentem um repertório multirresistente, assim como determinadas linhagens genéticas de MSSA (LAKHUNDI; ZHANG, 2018; LEE et al., 2018; TURNER et al., 2019). Por mecanismos diversos, é reportada resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos existentes no mercado. Como

exemplo, podemos citar genes associados à resistência a desinfetantes (*qacA*; resistência a quaternário de amônio), aos aminoglicosídeos (*aacA-aphD*, *aadD*, *ant(4')*, *ant(9)*), glicopeptídeos e lipoglicopeptídeos (*vanA*), macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLE-B) (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermGM*, *lnu(A)*, *mph(C)*, *mph(BM)*), metais pesados (*arsRBC*, *cadA*, *cadB*, *merA*, *merB*), oxazolidinosas (mutações em múltiplos genes; exemplos: *cfr*, *rrn5*, *rplC*, *rplD*, *rplV*), tetraciclina (*tet(M)*, *tet(K)*), trimetoprima (*dfrA*, *dfrG*, *dfrK*), entre outros (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022; TURNER et al., 2019).

Nas últimas duas décadas foram observados o surgimento e o aumento da prevalência de isolados de *S. aureus* com resistência intermediária e completa à vancomicina (VISA e VRSA, do inglês *Vancomycin-intermediate* e *-resistant S. aureus*, respectivamente), despertando preocupações por conta da potencial ameaça à saúde, por ser a vancomicina uma alternativa comum de terapêutica contra infecções associadas ao MRSA (CONG; YANG; RAO, 2020; WU et al., 2021). A resistência à vancomicina é atribuída ao *S. aureus* por duas vias distintas. A primeira, que está mais relacionada aos isolados VISA, é decorrente do acúmulo gradual de mutações, geralmente em componentes genômicos centrais. A segunda, relacionada aos isolados VRSA, é decorrente da aquisição de um plasmídeo que carrega o transposon Tn1546, onde se encontra o determinante de resistência: operon *vanA*, adquirido de *Enterococcus* sp. por meio de transferência horizontal (CONG; YANG; RAO, 2020; LEE et al., 2018; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022; TURNER et al., 2019). Em isolados portadores do gene *vanA*, é comum observar a presença de outros genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos (provavelmente também oriundos de *Enterococcus* sp.): *ant(6)-Ia* (resistência à estreptomicina), *aph(3')-III* e *aac(6')-aph(2'')* (resistência aos aminoglicosídeos), *msrA* (macrolídeos e estreptograminas), *tet(S)* e *tet(U)* (resistência às tetraciclina), entre outros (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

Além da problemática de AMR, *S. aureus* também possui um repertório variado de genes de virulência, que ocorre em frequências variadas e únicas, de acordo com as diferentes variantes/linhagens genéticas. Podem pertencer ao genoma central ou estar inseridas em MGEs (ABDELBARY et al., 2017; ALIBAYOV et al., 2014; JI, 2020; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022; TURNER et al., 2019). No genoma central é possível encontrar genes relacionados à capacidade de evasão imune (*capA*, *capP*, *spa*), destruição de tecidos (*aur*, *sspA*, *sspB*), adesão (*clfA*, *clfB*, *ebhA*, *ebhB*), coagulação (*coa*), hemólise (*hld*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*), degradação de lipídeos (*geh*), entre outros. Em fragmentos de DNA de bacteriófagos presentes em *S. aureus*, também se encontram genes que codificam diversos VF, como a proteína inibidora de quimiotaxia (*chp*), toxina esfoliativa B (*etb*), estafiloquinase (*sak*),

enterotoxina A (*sea*), enterotoxina P (*sep*), leucocidina de Pantón-Valentine (PVL, do inglês *Panton–Valentine leukocidin*) (*lukF-PV* e *lukS-PV*), entre outros. Em ilhas genômicas, encontramos variados determinantes de virulência, como os que codificam para leucotoxinas (*lukD*, *lukE*), enterotoxinas (*seb*, *sec*, *seq2*, *sek2*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*), superantígenos (*tst*), e outros (ALIBAYOV et al., 2014; TURNER et al., 2019).

1.3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma espécie bacteriana gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae* e ordem *Enterobacterales*. Possui forma de bacilo, em geral é imóvel e produtora de cápsula, é oxidase-negativa e anaeróbia facultativa (GARRITY, 2005; PROCOP et al., 2018). É um organismo ubíquo, que apresenta extensa diversidade fenotípica e genotípica. Em humanos, a espécie é encontrada colonizando superfícies mucosas de maneira comensal, comumente na região nasofaríngea e no trato gastrointestinal. Oportunamente, pode dar origem a quadros infecciosos, tais como pneumonia, infecções no trato urinário, infecção de corrente sanguínea e sepse (GARRITY, 2005; PROCOP et al., 2018; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

Genomas de *K. pneumoniae* possuem tamanho em torno de 5 a 6 Mpb, codificando em torno de 5.000 a 6.000 genes, dos quais aproximadamente 1.700 são conservados em todas as linhagens genéticas da espécie. O pangenoma (repertório de elementos genômicos de uma determinada espécie ou clado) da espécie compreende mais de 100 mil sequências codificadoras, sendo que a maioria é considerada rara, estando presente em menos de 10% dos genomas. Complexos clonais (CC) podem ser identificados com base na tipagem MLST, e geralmente apresentam padrões distintos no repertório de genes acessórios (EIZENGA et al., 2020; WYRES; LAM; HOLT, 2020). A ocorrência de mutações e transferência horizontal de genes é significativa na espécie, sendo responsáveis pela origem, evolução, aquisição e propagação de determinantes genéticos relacionados aos VF e à resistência aos AM (DONG et al., 2022; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

Um amplo repertório de genes de virulência pode ser observado em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, estando presentes tanto no genoma central quanto no acessório (BENGOCHEA; PESSOA, 2019; DONG et al., 2022; PACZOSA; MECSAS, 2016; WYRES; LAM; HOLT, 2020). Um dos mais importantes fatores é a cápsula polissacarídica, a qual confere proteção contra mediadores do sistema imune do hospedeiro. A cápsula atua por meio de múltiplos mecanismos de evasão, tais como inibindo a fagocitose, retardando a resposta imune inata e evitando a lise decorrente da atuação do sistema complemento e de peptídeos

antimicrobianos. Os genes envolvidos na produção da cápsula normalmente se encontram no operon *cps* do genoma cromossômico. Os polissacarídeos capsulares que compõem a matriz são denominados antígenos K, havendo, no mínimo, 78 sorotipos descritos para a espécie (K1 – K78) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Outros importantes VF na espécie são os lipopolissacarídeos (LPS), pili e sideróforos. Os LPS podem contribuir para a patogenicidade por prevenir a atuação do sistema complemento e o processo de opsonização, auxiliar na prevenção da fagocitose por macrófagos, bloquear o efeito bactericida de determinados lipídeos antimicrobianos, evitar o reconhecimento por células hospedeiras por meio de alterações na molécula, entre outras. Nove sorotipos são definidos com base no antígeno O (O1 – O9), sendo O1 e O2 os mais comuns (BENGOCHEA; PESSOA, 2019; PACZOSA; MECSAS, 2016; RIWU et al., 2022). Isolados bacterianos também podem expressar estruturas adesivas localizadas ancoradas às membranas, denominadas pili ou fimbrias, das quais os principais tipos são o 1 e o 3 (lócus *fim* e *mkr*, respectivamente). As fimbrias tipo 1 desempenham papel fundamental na invasão e formação de biofilme nas células da bexiga e em superfícies abióticas, enquanto a tipo 3 está mais relacionada à produção de biofilme em dispositivos médicos implantáveis, tais como cateteres e próteses (PACZOSA; MECSAS, 2016). Por fim, os sideróforos desempenham um papel importante na evasão da imunidade nutricional do ferro. Por meio da expressão de moléculas quelantes de ferro (por exemplo: enterobactina, yersiniabactina, salmochelina e aerobactina), a bactéria possui a capacidade sequestrar ferro do hospedeiro, para suprir suas necessidades nutricionais e promover seu crescimento (BENGOCHEA; PESSOA, 2019; PACZOSA; MECSAS, 2016; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

Linhagens genéticas hipervirulentas (Hv) de *K. pneumoniae* vem sendo relatadas em vários continentes, estando associadas a infecções graves, adquiridas tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade. Nessas linhagens, é observado a produção aumentada de polissacarídeos capsulares e de sideróforos (DONG et al., 2022). É comum a produção de uma hipercápsula, também conhecida como hiper mucoviscosa. Essa hipercápsula consiste em um revestimento exopolissacarídeo mucoviscoso, o qual confere mais robustez em comparação às cápsulas usuais, aumentando assim a resistência às defesas humorais, e contribuindo significativamente para a patogenicidade da bactéria (PACZOSA; MECSAS, 2016). Uma combinação específica de VF centrais geralmente é apresentada por linhagens Hv como, por exemplo, fatores capsulares (K1 ou K2) e LPSs (O1 ou O2). As linhagens também costumam ser definidas pelo ST (WYRES; LAM; HOLT, 2020). A presença de plasmídeos semelhantes ao pLVPK e da ilha de patogenicidade KPHP1208 também estão relacionados à expressão do

fenótipo Hv (DONG et al., 2022). Além desses, diversos outros componentes genéticos, padrões fenotípicos e patológicos foram associados à linhagens Hv, sendo propostos como possíveis marcadores para distinção entre linhagens Hv e comuns (DONG et al., 2022; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

É observado resistência à múltiplas classes de antimicrobianos na espécie, sendo que esta capacidade está estritamente relacionada ao acúmulo de mutações e à aquisição de genes via MGEs. A exemplo, já foram relatadas mutações na região de atuação das quinolonas (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), as quais conferem resistência a estas drogas. No gene codificante de porina (*ompK36*), mutações estão relacionadas à resistência às cefalosporinas e carbapenêmicos. Também já foi observado resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, associada à superexpressão ou alteração da atividade de bombas de efluxo, que decorre de mutações em genes estruturais e/ou regulatórios (*acrAB*, *oqxAB*, *ramA*, *rarA*) (BENGOCHEA; PESSOA, 2019; DONG et al., 2022; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; WYRES; LAM; HOLT, 2020). Um dos principais mecanismos de resistência às polimixinas é decorrente de mutações em genes centrais, envolvidos na maturação (*lpxM*, *ramA*) e neutralização (*pbpP*, *pmrC*, *pmrE*, *pagP*) do lipídeo A do LPS, além de reguladores dos genes modificadores de LPS (*mrgB*, *phoPQ*, *pmrA* e *pmrB*, *pmrD*). Também já foi reportado mutação no gene *rpsJ*, o qual codifica uma proteína ribossomal, causando aumento da resistência à tigeciclina (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

O grupo das bactérias gram-negativas apresenta uma ampla gama de genes que conferem resistência aos beta-lactâmicos. Resistência intrínseca à ampicilina é apresentada por *K. pneumoniae* devido à expressão da enzima betalactamase SHV, codificada pelo gene *blaSHV-1* presente no genoma central da espécie. Tal gene foi incorporado múltiplas vezes junto a sequência de inserção IS26, a qual se inseriu em um plasmídeo e permitiu a disseminação entre espécies. Eventualmente, as variantes móveis do gene foram adquirindo mutações, que culminaram numa resistência amplificada às drogas beta-lactâmicas, incluindo as cefalosporinas de terceira geração e, por vezes, carbapenêmicos (WYRES; LAM; HOLT, 2020). Outros genes com capacidade de mobilidade são os genes codificantes de betalactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês *extended-spectrum beta-lactamase*), sendo os mais comuns *blaTEM*, *blaCTX-M* e *blaOXA*. Adicionalmente, também é observada a ocorrência de genes mais raros, tais como *blaGES*, *blaSFO*, *blaPER*, *blaTLA* e *blaVEB* (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Enzimas ESBL são capazes de hidrolisar monobactâmicos e cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e, geralmente, são suscetíveis a inibidores de betalactamases como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Contra cefamicinas e

carbapenêmicos, as ESBL não apresentam atividade hidrolítica, com poucas exceções (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; RAHMAN et al., 2018).

Devido à emergência de isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs (ESBL-Kp), AM carbapenêmicos se tornaram um recurso importante para tratar essas infecções, levando ao aumento significativa de seu uso. Conforme esperado, enzimas com a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos foram relatadas, sendo chamadas de carbapenemases. *K. pneumoniae* apresenta diversos genes codificantes de carbapenemases, como *blaOXA-48*, *blaNDM-1* e os genes tipo *blaKPC*, que são os mais difundidos na espécie. Os produtos dos genes tipo *blaKPC*, além terem atividade carbapenemase, geralmente apresentam resistência aos inibidores de betalactamases, tornando-se um desafio ainda maior (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

O principal mecanismo pelo qual a espécie adquire resistência é através da transferência horizontal de genes. Mais de 400 genes adquiridos já foram identificados em genomas de *K. pneumoniae*, conferindo resistência à múltiplas classes de antimicrobianos, tais como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, tigeciclina e polimixinas (DONG et al., 2022; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; WYRES; HOLT, 2018). A espécie também se destaca por ser uma potencial doadora de MGE contendo determinantes de AMR e de VF (DONG et al., 2022; WYRES; HOLT, 2018; WYRES; LAM; HOLT, 2020). O surgimento de isolados multirresistentes e hipervirulentos está associado, em grande parte, a essa capacidade de receber e transferir MGEs. Estes isolados levantam grandes preocupações, uma vez que suas infecções tendem a ser mais graves, e há escassez nas opções de tratamento, implicando no aumento das taxas de mortalidade e morbidade. Um melhor entendimento acerca da dinâmica de propagação de genes AMR, junto ao monitoramento desses eventos tem potencial para auxiliar no desenvolvimento de estratégias contingenciais, implicando no aumento da vida útil das terapias disponíveis (DONG et al., 2022; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

1.4 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO DNA E BACTERIOLOGIA CLÍNICA

Para tratar infecções bacterianas, a administração de AM deve se dar de maneira adequada ao tipo e gravidade de infecção, considerando o tempo ideal de tratamento e as características do paciente. Tratamentos bem-sucedidos dependem de um diagnóstico rápido e preciso, de maneira a orientar o melhor tratamento a ser aplicado. Enquanto não há um diagnóstico laboratorial disponível, os tratamentos geralmente são conduzidos de maneira

empírica, utilizando antimicrobianos de amplo espectro, o que pode culminar em maiores taxas de morbidade e mortalidade (LIVERMORE; WAIN, 2013; MAN et al., 2021). Métodos fenotípicos (convencionais) de diagnóstico bacteriano vem sendo criticados pelo tempo longo de resposta (48 a 72 horas), pela restrição de informações e pela subjetividade. Esse cenário torna necessário e impulsiona o desenvolvimento e aplicação de novos métodos, mais rápidos, acurados e padronizados (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019; DIDELOT et al., 2012; LIVERMORE; WAIN, 2013; NOONE; FERREIRA; AAMOT, 2021; VAN BELKUM et al., 2020).

O WGS bacteriano tem sido sugerido como uma ferramenta importante para complementar (e até mesmo substituir, em alguns contextos) o diagnóstico convencional das infecções, uma vez que se trata de um método que pode gerar diversas informações biológicas simultâneas sobre o microrganismo (BALLOUX et al., 2018; BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019; QUAINOO et al., 2017; VAN BELKUM et al., 2020). A evolução das tecnologias de sequenciamento possibilitou a produção massiva de dados com alta eficiência, o que vem impulsionando o desenvolvimento de novas técnicas aplicadas. Na área de bacteriologia clínica, podemos destacar técnicas voltadas à detecção, identificação e tipagem de patógenos, caracterização dos perfis genéticos de AMR, de VF e de MGEs, o estabelecimento de rotas de transmissão e a investigações de surtos (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019; FERREIRA et al., 2021; NOONE; FERREIRA; AAMOT, 2021; SALIPANTE et al., 2015; VAN BELKUM et al., 2020; WANG et al., 2021).

As plataformas desenvolvidas pela *Illumina Technology* (IT) pertencem a segunda geração de tecnologias de sequenciamento e são amplamente utilizadas em todo o mundo. O sequenciamento é realizado por meio de síntese, em que cada nucleotídeo incorporado na cadeia de DNA é identificado individualmente. O processo se inicia com a preparação da amostra, que envolve a obtenção de fragmentos do DNA de interesse (150-300 pb) e a adição de adaptadores em suas extremidades. Por meio do pareamento dos adaptadores com oligonucleotídeos complementares, esses fragmentos são fixados em uma superfície sólida e passam por uma amplificação clonal antes do sequenciamento, para que haja a formação de *clusters* (aglomerados de moléculas de DNA de fita simples contendo a mesma sequência). Esses *clusters* são utilizados como *template* para síntese no processo de sequenciamento, que se dá em ciclos e em cada ciclo é adicionado uma base por molécula. Os dNTPs utilizados na síntese possuem um terminador reversível marcado com fluorescência, os quais permitem pausar o processo de polimerização após adicionados. O terminador é então clivado do nucleotídeo adicionado, emitindo um sinal fluorescente característico para cada tipo de base. Os sinais de

florescência de cada *cluster* são detectados pelo sequenciador que, por sua vez, os traduzem em sequências de texto. O processo é repetido até que os fragmentos sejam totalmente sequenciados (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; HU et al., 2021; REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015). A tecnologia oferece alta precisão no sequenciamento, com a maioria das bases pontuando *quality score* (*Q-score*) 30, ou seja, uma acurácia de 99,9%. O *Q-score* é calculado com base em um algoritmo que determina a probabilidade de uma base ser lida incorretamente. Sua fórmula é $Q = 10\log_{10}(P)$, onde P é a probabilidade de que a base lida esteja incorreta. Um *Q-score* alto indica que a leitura de bases é mais confiável e possui menos probabilidade de estar incorreta (ILLUMINA, 2014, 2024).

A terceira geração de tecnologias de sequenciamento corresponde, entre outras, às plataformas desenvolvidas pela *Oxford Nanopore Technologies* (ONT). Todas as plataformas da tecnologia utilizam *flow cells* onde se encontram poros biológicos em escala nanométrica (nanoporos) inseridos em uma membrana eletroresistente. Cada nanoporo possui um eletrodo conectado a um chip sensor que mede a perturbação na corrente elétrica que flui através do canal. Quando uma molécula passa pelo canal, ocorre uma perturbação na corrente elétrica, a qual possui um traço característico para cada nucleotídeo. Simultaneamente, algoritmos de *basecalling* traduzem essas perturbações em sequências nucleotídicas do DNA ou RNA que está sendo sequenciado (HU et al., 2021; NANOPORETECH, 2024a). Avanços contínuos, como o aprimoramento dos componentes estruturais das *flowcells* e dos algoritmos de *basecalling* baseados em *machine learning*, têm otimizado a precisão das leituras e diminuído significativamente a taxa de erros anteriormente associada a essa tecnologia. Hoje, o método conta com dispositivos e metodologias que permitem alcançar leituras com mais de 99,9% de acurácia (Q30), se equiparando aos valores obtidos por IT (ILLUMINA, 2024; NANOPORETECH, 2024b). Inerente à tecnologia está a capacidade de realizar leituras de fragmentos longos de DNA, podendo superar 1 Mb, o que facilita, por exemplo, a montagem *de novo* de genomas, e a detecção de determinados elementos genéticos, como os MGE. Além disso, os dados são gerados e disponibilizados em tempo real, permitindo a execução de análises simultâneas ao sequenciamento. Essa tecnologia expandiu as possibilidades de aplicações tanto para pesquisa quanto para áreas aplicadas, tendo em vista a aprimoração contínua da acurácia de leitura, sua relativa rapidez, e a possibilidade do uso em campo oferecida pela plataforma MinION (ESPINOSA et al., 2024; FERREIRA et al., 2021; HU et al., 2021; LIN; HUI; MAO, 2021; SHEKA; ALABI; GORDON, 2021).

Mais pesquisas são necessárias para implementação do WGS na rotina clínica. A identificação de componentes genéticos, tais como genes e MGEs, é dependente da

disponibilidade de ferramentas computacionais de detecção, assim como da qualidade de seus bancos de dados. Além disso, os mecanismos complexos de resistência e virulência impõem desafios no estabelecimento de uma correlação direta entre genótipos e fenótipos. Também se mostra necessária a capacitação de profissionais para realizar as análises e interpretá-las com precisão (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019; DOYLE et al., 2020; LÜFTINGER et al., 2021).

Protocolos baseados em ONT podem utilizar dispositivos portáteis que apresentam menor custo de capital do equipamento (quando comparado aos dispositivos de outras tecnologias), podendo fornecer tempo de resposta mais curto, e uma melhor discriminação entre isolados (por ser uma tecnologia que gera *long reads*), com potencial para aplicação na rotina clínica (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019; ESPINOSA et al., 2024; FERREIRA et al., 2021; SHEKA; ALABI; GORDON, 2021; WANG et al., 2021). Em 2021, nosso grupo de pesquisa, em colaboração com um grupo de pesquisa norueguês da Universidade de Oslo, desenvolveu e validou um protocolo WGS rápido, baseado em ONT, para investigação de surtos relacionados a bactérias AMR. Neste protocolo, foi possível confirmar diversos surtos em menos de 33h, permitindo, assim, a identificação destes em estágios iniciais. O protocolo utiliza um dispositivo de sequenciamento portátil e de baixo custo de aquisição, utilizando uma análise genômica simplificada e com o potencial de ser incorporado em fluxos de trabalho clínicos (FERREIRA et al., 2021).

Além da investigação de surtos, os genomas gerados pelo protocolo desenvolvido podem ser analisados para identificação de genes associados à AMR, com potencial de aprimorar algumas limitações do teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos. Adicionalmente, também é possível identificar o repertório de genes de VF bacteriano, de forma a distinguir isolados clínicos quanto ao seu potencial de patogenicidade, podendo auxiliar no tratamento das infecções e no desenvolvimento de estratégias antivirulência.

Diante do exposto, este estudo visa investigar o potencial de diferentes protocolos de sequenciamento/montagem de genomas para o diagnóstico complementar de infecções bacterianas, no qual se inclui o protocolo citado anteriormente (FERREIRA et al., 2021). É esperado que os dados gerados a partir da análise genômica possam fortalecer o potencial da aplicação futura de protocolos de sequenciamento completo do DNA na rotina clínica. A hipótese do estudo foi de que o protocolo de sequenciamento/montagem de genomas desenvolvido anteriormente apresenta capacidade de detecção de componentes genéticos tão boa ou melhores quanto a de protocolos de sequenciamento mais lentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o potencial de cinco protocolos de sequenciamento/montagem de genomas para detecção de componentes genéticos em isolados bacterianos clínicos, com vistas a contribuir para o diagnóstico complementar de infecções.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a montagem e o polimento de genomas de MRSA e ESBL-Kp sequenciados por ONT, com tempo de sequenciamento de 48 horas;
- Realizar a montagem híbrida de genomas de MRSA baseado em *reads* gerados por ONT, com 20 horas de sequenciamento, e por IT;
- Identificar genes e mutações relacionados à resistência aos antimicrobianos nos genomas dos isolados obtidos por diferentes protocolos;
- Identificar genes relacionados aos fatores de virulência presentes nos genomas dos isolados obtidos por diferentes protocolos;
- Identificar a presença de elementos genéticos móveis;
- Comparar os resultados das análises genômicas anteriores entre os diferentes protocolos de sequenciamento/montagem;
- Comparar os resultados da análise genotípico e do teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GENOMAS BACTERIANOS

Foram analisados *drafts* genomas de 48 isolados clínicos de bactérias resistentes aos antimicrobianos, sendo 42 de MRSA, pertencentes a quatro diferentes linhagens genéticas disseminados na Noruega e internacionalmente: ST8-t304-SCC*mecIV*-PVL negativa (Linhagem 1, L1), t223-PVL negativa (Linhagem 2, L2), t002-PVL negativa (Linhagem 3, L3) e ST772-t657-SSC*mecV*-PVL positiva (Linhagem 4, L4) (Anexo 1); e seis genomas de ESBL-Kp. Esses isolados clínicos são provenientes da coleção pertencente ao Hospital Universitário Akershus, da Universidade de Oslo (Noruega), e foram estudados em colaboração com a Dra. Hege Aamot, pesquisadora da instituição.

Os sequenciamentos das amostras foram realizados por nosso grupo de pesquisa utilizando as tecnologias ONT e IT e os dados brutos já se encontravam disponíveis para processamento. Os *drafts* genomas foram obtidos a partir de cinco protocolos distintos, dos quais três utilizam *reads* gerados por ONT, um IT e outro por ambos. Protocolos que utilizaram sequências geradas por ONT tiveram os dados de sequenciamento coletados em dois tempos: 20h (protocolos ONT20h e Híbrido) e 48h (protocolos ONT48hA e ONT48hB) (Tabela 1). Os dados de sequenciamento dos genomas de MRSA realizados via ONT (20h) e IT encontram-se disponíveis no banco de dados *Sequence Read Archive* do NCBI, sob os *BioProjects* PRJNA658251 e PRJNA658260, respectivamente (FERREIRA et al., 2021).

Os protocolos ONT20h e IT foram desenvolvidos e executados por Ferreira *et al.* (2021), estando os *draft* genomas de MRSA e ESBL-Kp já prontos e disponíveis para análises. Resumidamente, para o protocolo ONT20h, após a coleta dos dados brutos de sequenciamento, foi utilizado o programa *Flye v.2.7.1* (KOLMOGOROV et al., 2019) para montagem *de novo* dos genomas, os quais foram posteriormente polidos em duas interações com o programa *Medaka v.1.0.1* (<https://github.com/nanoporetech/medaka>). Para o protocolo IT, o sequenciamento foi realizado em 56h na Plataforma MiSeq e, após controle de qualidade, os genomas foram montados *de novo* utilizando *SPAdes v.3.13.0*. Os genomas de MRSA obtidos pelos protocolos ONT20h e IT apresentaram cobertura mínima de 115X e 50X, respectivamente (FERREIRA et al., 2021). Para o protocolo ONT48hA, a montagem *de novo* dos genomas de MRSA foi realizada no programa *Canu v.1.9* (KOREN et al., 2017) e os genomas já se encontravam prontos para análise (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolos de sequenciamento/montagem. A tecnologia/plataforma de sequenciamento indica qual tecnologia (ONT = *Oxford Nanopore Technology*; IT = *Illumina Technology*) e plataforma de sequenciamento (GridION; MiSeq) foram utilizadas em cada protocolo; o tempo de sequenciamento indica, em horas, o tempo de corrida utilizado para sequenciar o DNA dos isolados; ademais, são indicados os programas utilizados para montagem *de novo* e polimento, caso haja, dos genomas

Protocolo	Tecnologia/plataforma de sequenciamento	Tempo de sequenciamento	Programa para montagem	Programa para polimento
ONT20h	ONT – GridION	20h	<i>Flye</i>	<i>Medaka</i>
ONT48hA	ONT – GridION	48h	<i>Canu</i>	-
ONT48hB	ONT – GridION	48h	<i>Flye</i>	<i>Medaka</i>
IT	IT – MiSeq	56h	<i>SPAdes</i>	-
Híbrido	ONT – GridION / IT – MiSeq	20h / 56h*	<i>Unicycler</i>	-

* Tempos de sequenciamento para ONT e IT, respectivamente.

Fonte: Ferreira et al. (2021) e elaborado pelo autor.

Os *drafts* genomas dos isolados de MRSA e ESBL-Kp foram obtidos, neste estudo, utilizando o protocolo ONT48hB. O processo seguiu as etapas de montagem e polimento descritas no protocolo ONT20h, com algumas distinções: o tempo de sequenciamento foi estendido para 48 horas, as versões dos programas *Flye v.2.9-b1768* e *Medaka v.1.5.0* foram diferentes (representando as mais atualizadas na época), e houve modificações nos componentes de hardware, por serem computadores diferentes. O protocolo Híbrido foi executado para as amostras de MRSA utilizando *reads* gerados por ONT (20h) e IT para montagem *de novo* dos genomas no programa *Unicycler v. 0.5.0* (WICK et al., 2017) (Tabela 1). As métricas de qualidade dos genomas analisados neste estudo foram obtidas por meio do programa *Quast v.5.2.0* (MIKHEENKO et al., 2018), sendo todas as estatísticas baseadas em contigs com tamanho maior ou igual a 500 pb, exceto as do protocolo IT para MRSA, que foi baseada em contigs com tamanho maior ou igual a 100 pb. Os dados de qualidade do sequenciamento realizado via ONT (48h) foram obtidos por meio do programa *NanoPlot v.1.42.0* (DE COSTER; RADEMAKERS, 2023). Os comandos utilizados nos programas *Flye*, *Medaka*, *NanoPlot*, *Quast* e *Unicycler* se encontram descritos no Quadro 1.

A montagem e polimento dos genomas a partir dos protocolos ONT48hB e Híbrido foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pelo Prof. Dr. Glauber Wagner. Os procedimentos realizados foram executados em Servidores Dell que dispõem de 40 núcleos de processadores (3.2 GHz)

(utilizamos apenas 12), 320 GB de RAM (DDR4, 2400 MHz) e armazenamento de 5TB (HD SATA 2.5" 7200 RPM).

Quadro 1. Comandos utilizados nos programas de montagem e polimento de genomas e de análise de qualidade de sequenciamento

Programa	Comando	Descrição
<i>Flye</i>	flye --nano-raw MRSA_01.fastq -g 2.8m -o flye_MRSA_01 -t 12 --asm-coverage 30	--nano-raw → tipo dos <i>reads</i> de entrada MRSA_01.fastq → nome do arquivo de entrada -g → tamanho estimado do genoma -o → nome do diretório de saída -t → <i>threads</i> a usar asm-coverage → especifica a cobertura alvo dos <i>reads</i> mais longos
<i>Medaka</i>	medaka_consensus -i MRSA_01.fastq -d MRSA_01.fasta -o MRSA_01_polished -t 12 -m r941_min_high_g303	-i → nome do arquivo de entrada de <i>raw reads</i> (.fastq) -d → nome do arquivo do genoma gerado no Flye (.fasta) -o → nome do diretório de saída -t → <i>threads</i> a usar -m → indica o modelo medaka (indicando o (I) tipo do poro, (II) plataforma de sequenciamento, (III) variante e (IV) versão do <i>basecaller</i>)
<i>UniCycler</i>	unicycler -1 MRSA_01_1.fastq.gz -2 MRSA_01_2.fastq.gz -l ONT_MRSA_01.fastq -o output -t 12	-1 → arquivo .fastq 1 de <i>short reads</i> Illumina -2 → arquivo .fastq 2 de <i>short reads</i> Illumina -l → arquivo .fastq ou .fasta de <i>long reads</i> -o → nome do diretório de saída -t → <i>threads</i> a usar
<i>Quast</i>	quast.py MRSA_01.fasta -o quastresults -t 12	MRSA_01.fasta → nome do arquivo do genoma a ser analisado -o → nome do diretório de saída -t → <i>threads</i> a usar
<i>NanoPlot</i>	NanoPlot --fastq MRSA_01.fastq -t 2 -o MRSA_01_report	--fastq → arquivo .fastq -o → nome do diretório de saída -t → <i>threads</i> a usar

Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2021) e elaborado pelo autor.

3.2 ANÁLISES GENÔMICAS

Foram analisados genes e mutações relacionados à AMR, genes relacionados aos VF e MGEs presentes nos genomas. A seleção das ferramentas utilizadas se deu de maneira a priorizar a facilidade de uso, compreensão e interpretação dos resultados. Outros pontos levados

em consideração foram a disponibilidade *online* das ferramentas, interface gráfica e ausência de custos para utilização. A escolha com base nessas características visa a otimização da experiência do usuário através da facilidade de uso, não sendo necessário conhecimentos aprofundados em programação, e a eficácia na realização dos diagnósticos.

A identificação de genes relacionados à resistência foi realizada utilizando os programas/serviços *ResFinder* (BORTOLAIA et al., 2020; CAMACHO et al., 2009; ZANKARI et al., 2017), *1928 Diagnostics* (<https://www.1928diagnostics.com/>) (em parceria com o grupo de pesquisa norueguês. Trata-se de uma ferramenta paga, mas que foi incluída por oferecer análises dos dados em formato *fastq*), e *CARD-RGI* (ALCOCK et al., 2020). Mutações relacionadas à AMR foram identificadas utilizando o serviço *PointFinder* (BORTOLAIA et al., 2020; CAMACHO et al., 2009; ZANKARI et al., 2017). Somente foram consideradas as mutações cujo fenótipo fosse conhecido ou provável.

Para identificação de genes relacionados aos VF, de plasmídeos e demais MGEs foi utilizado a plataforma do *Center of Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org>), na qual os genomas foram submetidos aos serviços/programas *VirulenceFinder* (CAMACHO et al., 2009; JOENSEN et al., 2014; MALBERG TETZSCHNER et al., 2020), *PlasmidFinder* (CAMACHO et al., 2009; CARATTOLI et al., 2014) e *MobileElementFinder* (JOHANSSON et al., 2021), respectivamente. Além do *VirulenceFinder*, também foi utilizado o programa *VFDB* (CHEN et al., 2005) para identificação de genes relacionados aos VF nos genomas de ESBL-Kp.

Os programas/serviços foram executados de acordo com suas configurações padrão (*default mode*) e em suas versões mais recentes à época para as análises de MRSA (Tabela 2) e ESBL-Kp (Tabela 3). Os serviços *ResFinder* e *VirulenceFinder* utilizaram uma porcentagem mínima de identidade de 90% (nucleotídeos idênticos entre o gene presente no banco de dados e a sequência correspondente no genoma) e limite mínimo de cobertura de 60% (número de nucleotídeos que uma sequência deve se sobrepor a um gene para contar como um *match*). Para os serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder*, a porcentagem mínima de identidade adotada foi de 95% e comprimento mínimo de 60%. Além disso, para o serviço *MobileElementFinder*, foi estabelecido um limite máximo de truncamento de 30 nucleotídeos. O serviço *CARD-RGI* utilizou como critérios alinhamentos perfeitos (*matches* perfeitos) ou estritos (variantes previamente desconhecidas de genes AMR conhecidos, incluindo mutações, utilizando modelos para garantir que a variante seja provavelmente funcional), porcentagem de identidade $\geq 95\%$ e sequências de alta cobertura, de modo a excluir predições de genes incompletos.

Tabela 2. Versões dos programas e dos respectivos bancos de dados utilizados para as análises genômicas dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, de acordo com os protocolos de sequenciamento

Protocolo	Programa/serviço	Versão do programa/serviço	Versão do banco de dados
<i>Raw</i> ONT20h	<i>1928 Diagnostics</i>	2021-08.1	-
ONT20h	<i>ResFinder</i>	2021-05-27	2021-04-20
	<i>PointFinder</i>	2022-08-08	2022-04-22
	<i>VirulenceFinder</i>	2.0.3 (2020-05-21)	2020-05-29
	<i>PlasmidFinder</i>	2.0.1 (2020-07-01)	2021-07-12
	<i>MobileElementFinder</i>	1.0.3 (2020-10-09)	1.0.2 (2020-06-09)
	<i>CARD-RGI</i>	5.2.0	3.1.4
ONT48hA	<i>ResFinder</i>	2021-05-27	2021-09-22
	<i>PointFinder</i>	2022-08-08	2022-04-22
	<i>VirulenceFinder</i>	2.0.3 (2020-05-21)	2020-05-29
	<i>PlasmidFinder</i>	2.0.1 (2020-07-01)	2021-07-12
	<i>MobileElementFinder</i>	1.0.3 (2020-10-09)	1.0.2 (2020-06-09)
	<i>CARD-RGI</i>	5.2.0	3.1.4
ONT48hB	<i>ResFinder</i>	2022-03-10	2022-02-04
	<i>PointFinder</i>	2022-08-08	2022-04-22
	<i>VirulenceFinder</i>	2.0.2 (2020-05-21)	2020-05-29
	<i>PlasmidFinder</i>	2.0.1 (2020-07-01)	2021-11-29
	<i>MobileElementFinder</i>	1.0.3 (2020-10-09)	1.0.2 (2020-06-09)
	<i>CARD-RGI</i>	6.0.0	3.2.5
IT	<i>ResFinder</i>	2021-05-27	2021-04-20
	<i>PointFinder</i>	2022-08-08	2022-04-22
	<i>VirulenceFinder</i>	2.0.3 (2020-05-21)	2020-05-29
	<i>PlasmidFinder</i>	2.0.1 (2020-07-01)	2021-07-12
	<i>MobileElementFinder</i>	1.0.3 (2020-10-09)	1.0.2 (2020-06-09)
	<i>CARD-RGI</i>	5.2.0	3.1.4
Híbrido	<i>ResFinder</i>	2022-08-08	2022-05-24
	<i>PointFinder</i>	2022-08-08	2022-04-22
	<i>VirulenceFinder</i>	2.0.3 (2020-05-21)	2022-12-02
	<i>PlasmidFinder</i>	2.0.1 (2020-07-01)	2023-01-18
	<i>MobileElementFinder</i>	1.0.3 (2020-10-09)	1.0.2 (2020-06-09)
	<i>CARD-RGI</i>	6.0.0	3.2.5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3. Versões dos programas e dos respectivos bancos de dados utilizados para as análises genômicas dos isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), de acordo com os protocolos de sequenciamento

Protocolo de sequenciamento	Programa/serviço	Versão do programa/serviço	Versão do banco de dados
ONT20h	<i>ResFinder</i>	2022-08-08	2022-05-24
	<i>PointFinder</i>	2022-08-08	2022-04-22
	<i>VFDB</i>	05/04/2023*	05/04/2023*
	<i>PlasmidFinder</i>	2.0.1 (2020-07-01)	2023-01-18
	<i>MobileElementFinder</i>	1.0.3 (2020-10-09)	1.0.2 (2020-06-09)
ONT48hB	<i>ResFinder</i>	2022-08-08	2022-05-24
	<i>PointFinder</i>	2022-08-08	2022-04-22
	<i>VFDB</i>	28/06/2023*	28/06/2023*
	<i>PlasmidFinder</i>	2.0.1 (2020-07-01)	2023-01-18
	<i>MobileElementFinder</i>	1.0.3 (2020-10-09)	1.0.2 (2020-06-09)
IT	<i>ResFinder</i>	2022-08-08	2022-05-24
	<i>PointFinder</i>	2022-08-08	2022-04-22
	<i>VFDB</i>	05/04/2023*	05/04/2023*
	<i>PlasmidFinder</i>	2.0.1 (2020-07-01)	2023-01-18
	<i>MobileElementFinder</i>	1.0.3 (2020-10-09)	1.0.2 (2020-06-09)

*Versão do programa e do banco de dados não encontrados; dados correspondentes a data das análises.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS FENOTÍPICO E BASEADO EM ANÁLISE DE DADOS WGS

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos fenotípico (AST, do inglês *Antimicrobial susceptibility testing*) foi realizado pelo grupo de pesquisa norueguês citado anteriormente, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2021). Os resultados foram classificados em três categorias:

- Sensível a dosagem padrão: quando há alta probabilidade de sucesso terapêutico usando um regime de dosagem padrão do antimicrobiano;
- Sensível, aumentando a exposição: quando há alta probabilidade de sucesso terapêutico no aumento da exposição bacteriana ao antimicrobiano, que ocorre através do aumento da dosagem e concentração do antimicrobiano no local de infecção;

- Resistente: quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo havendo aumento da dose padrão.

As análises de sensibilidade fenotípica foram conduzidas expondo os isolados de MRSA (exceto isolados MRSA_12, MRSA_20, MRSA_33, MRSA_34, MRSA_41 e MRSA_42 [dados não disponíveis]) a 18 agentes antimicrobianos pelos métodos de disco difusão (ácido fusídico [10 µg], ampicilina [2 µg], penicilina G [1 µg], cefoxitina [30 µg], ciprofloxacina [5 µg], clindamicina [2 µg], cloranfenicol [30 µg], eritromicina [15 µg], gentamicina [10 µg], linezolida [10 µg], mupirocina [200 µg], oxacilina-1 [1 µg], rifampicina [5 µg], trimetoprima-sulfametoxazol [1,25-23,75 µg], tetraciclina [30 µg] e tigeciclina [15 µg]) e Etest® (Biomérieux, França) para teicoplanina e vancomicina.

Os isolados de ESBL-Kp foram expostos a 12 compostos antimicrobianos pelo método disco difusão, sendo amoxilina-clavulanato (20-10µg), ampicilina (10µg), aztreonam (30µg), cefepima (30µg), cefotaxima (5µg), ceftazidima (10µg), cefuroxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), meropenem (10µg), piperacilina-tazobactam (30-6µg) e sulfametoxazol-trimetropima (1.25-23.75µg).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos baseado em análise de dados WGS (WGS-AST) foi realizado com base nos resultados das análises realizadas nos serviços *ResFinder* e *PointFinder*. Esses serviços correlacionam diretamente o gene/mutação detectado com o respectivo fenótipo, facilitando a interpretação dos resultados e tornando-os convenientes para um potencial uso em áreas aplicadas. O teste foi realizado contemplando os mesmos isolados para os quais foi realizado o AST (36 isolados de MRSA e seis de ESBL-Kp). Os resultados do WGS-AST foram comparados com os resultados do AST fenotípico a fim de obter dados comparativos e de acurácia para o método.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das análises genômicas foram comparados entre os protocolos para verificar se houve diferença na capacidade de detecção dos componentes genéticos. Para análise de normalidade foi realizado o Teste Shapiro-Wilk e os dados não paramétricos foram comparados por meio do Teste Kruskal-Wallis. Nos casos de rejeição da hipótese nula, o Teste de Múltiplas Comparações de Dunn foi aplicado, comparando cada grupo com o conjunto de resultados esperado (quantitativo de genes não repetidos detectados em todos os protocolos para

cada genoma). As referidas análises foram realizadas no programa *GraphPad Prism v. 9.5.1* (<https://www.graphpad.com/>).

O coeficiente Kappa de Cohen foi calculado para verificar a concordância entre os resultados do WGS-AST (genes relacionados à resistência detectados ou não, inferindo resistência ou sensibilidade, respectivamente) e os resultados do AST fenotípico (resistente ou sensível, em que isolados sensíveis – aumentando a exposição, foram consideradas sensíveis). O coeficiente foi calculado utilizando o programa online *VassarStat - Website for Statistical Computation* © Richard Lowry (<http://vassarstats.net/>).

Os resultados do WGS-AST foram comparados com os resultados do AST fenotípico para verificar os parâmetros de acurácia do método. Para tal, foram calculadas a sensibilidade e a especificidade, representando as taxas de acerto de verdadeiros positivos e negativos, respectivamente. Além dessas, foram calculados o valor preditivo positivo (VPP), representando a proporção de acertos de isolados resistentes dentre todos os resultados considerados resistentes, ou seja, inclui falsos positivos; e o valor preditivo negativo (VPN), o qual retorna a proporção de acertos de isolados sensíveis dentre todos os considerados sensíveis, ou seja, inclui falsos negativos. Acurácia também foi calculada, representando a probabilidade geral de que o diagnóstico de resistência seja dado corretamente. Foi considerado verdadeiro positivo os resultados que acusaram resistência para determinado antimicrobiano a partir dos métodos genotípico e fenotípico; falso positivo os resultados que acusaram resistência a partir do método genotípico, mas não pelo fenotípico; falso negativo os que não retornaram resistência a partir do método genotípico e que retornaram pelo fenotípico; e verdadeiro negativo aqueles que não acusaram resistência tanto pelo método genotípico quanto pelo fenotípico. Tais análises foram realizadas utilizando o *MedCalc Software Ltd. Diagnostic test evaluation calculator v.22.009* (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php).

A seguir, são dadas as fórmulas de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia, onde: a = verdadeiros positivos; b = falsos positivos; c = falsos negativos; d = verdadeiros negativos.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{d + b} \times 100$$

$$VPP = \frac{a}{a + b} \times 100$$

$$VPN = \frac{d}{d + c} \times 100$$

$$\text{Acurácia} = \text{sensibilidade} \times \text{prevalência} + \text{especificidade} \times (1 - \text{prevalência})$$

4 RESULTADOS

4.1 GENOMAS BACTERIANOS

Os dados estatísticos de sequenciamento dos isolados de MRSA e ESBL-Kp podem ser observados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. São expostos os dados dos sequenciamentos realizados via ONT com 20 e 48h de tempo de sequenciamento e via IT. Os valores para cada isolado se encontram no Apêndice 1.

Tabela 4. Estatísticas dos dados de sequenciamentos dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina de realizados via *Oxford Nanopore Technology* (ONT) com 20 e 48h de sequenciamento e via *Illumina Technology* (IT). São indicados os valores médios, mínimos e máximos do tamanho médio dos *reads*, número (nº) de *reads* analisados, nº de bases sequenciadas (Gb) e o *quality score* (*Q-score*) médio

Sequenciamento	Tamanho médio dos <i>reads</i>	Nº de <i>reads</i> analisados	Nº de bases sequenciadas (Gb)	<i>Q-score</i> médio	Valor
ONT - 20h	3930	267833	1,01	12,96	Médio
ONT - 48h	3906	428487	1,63	11,44	
IT	206	1469811	-	-	
ONT - 20h	1328	90521	0,352	11,7	Mínimo
ONT - 48h	1263	105003	0,414	10,3	
IT	128	939052	-	-	
ONT - 20h	8468	558430	2,7	13,6	Máximo
ONT - 48h	8421	1095744	5,34	12	
IT	255	2196378	-	-	

Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2021) e elaborado pelo autor.

Tabela 5. Estatísticas dos dados de sequenciamentos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido realizados via *Oxford Nanopore Technology* (ONT) com 20 e 48h de sequenciamento e via *Illumina Technology* (IT). São indicados os valores médios, mínimos e máximos do tamanho médio dos *reads*, número (nº) de *reads* analisados, nº de bases sequenciadas (Gb) e o *Quality score* (*Q-score*) médio

Sequenciamento	Tamanho médio dos <i>reads</i>	Nº de <i>reads</i> analisados	Nº de bases sequenciadas (Gb)	<i>Q-score</i> médio	Valor
ONT - 20h	6994	114563	0,82	12,03	Médio
ONT - 48h	6867	159181	1,12	10,77	
IT	203	2056772	-	-	
ONT - 20h	4967	60000	0,405	11,8	Mínimo
ONT - 48h	4925	86546	0,562	10,5	
IT	186	1718698	-	-	

ONT - 20h	8146	232000	1,76	12,65	Máximo
ONT - 48h	7948	308658	2,28	11,4	
IT	231	2435748	-	-	

Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2021) e elaborado pelo autor.

A montagem dos genomas de MRSA utilizando o protocolo ONT48hB levou uma média de 01h05min por genoma, enquanto para os genomas de ESBL-Kp a média foi de 01h16min. Utilizando o protocolo Híbrido para montagem dos genomas de MRSA, a média de tempo foi de 04h22min por genoma.

Os genomas de MRSA obtidos pelos diferentes protocolos apresentaram a média do tamanho montado condizente com o esperado para a espécie. O protocolo IT apresentou um número médio significativamente maior de contigs (230) em comparação aos demais, que variaram entre 1,7 e 10,8. A média do tamanho do maior contig foi uniformemente próximo a 2.8 Mb para os protocolos, exceto para IT, que possui um valor consideravelmente menor (457299 b). A média da porcentagem de GC foi similar entre todos os protocolos. Valores médios de N50 são elevados, indicando contigs longos em todos os protocolos, exceto no IT, que apresentou um valor expressivamente menor (227701 b) em relação aos demais. A média da cobertura variou substancialmente, sendo menor para IT (106x) e maior para ONT48hA (551x) (Tabela 6).

Para ESBL-Kp, a média do tamanho dos genomas foi similar entre os protocolos ONT20h e ONT48hB, mas ligeiramente menor para IT. Interessantemente, o protocolo IT apresentou a menor média no número de contigs, com apenas 1, enquanto para ONT20h foi de 2,7 e para ONT48hB foi de 2. Todos os protocolos apresentam a média do tamanho do maior contig acima de 5Mb. A média da porcentagem GC foi similar entre os protocolos. O L50 foi 1 para todos. A média do N50 foi elevada para os três protocolos, correspondendo ao mesmo valor da média do tamanho do maior contig. A média da cobertura foi de 77x para IT, 148x para ONT20h e 401x para ONT48hB (Tabela 7).

As métricas de qualidade da montagem dos genomas de MRSA e ESBL-Kp estão descritas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Os valores médios, mínimos e máximos de cada parâmetro comentado anteriormente são apresentados de acordo com o protocolo utilizado para obtenção dos genomas. As métricas de cada *draft* genoma podem ser observadas no Apêndice 2.

Tabela 6. Valores médios, mínimos e máximos das métricas de qualidade da montagem dos genomas dos 42 isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio de diferentes protocolos. São indicadas as estatísticas do tamanho montado

dos genomas (Mb), número (nº) de contigs, tamanho do maior contig, porcentagem (%) GC, N50, L50 e cobertura

Protocolo	Tamanho montado	Nº de contigs	Maior contig	GC (%)	N50	L50	Cober-tura	Valor
ONT20h	2,85	2	2829748	32,8	2829748	1	344	Médio
ONT48hA	2,96	10,8	2849101	32,8	2849101	1	551	
ONT48hB	2,85	1,7	2829228	32,8	2829228	1	495	
IT	2,85	230	457299	32,7	227701	21,4	106	
Híbrido	2,85	2,5	2818032	32,8	2818032	1	-	
ONT20h	2,78	1	2760824	32,8	2760824	1	115	Mínimo
ONT48hA	2,81	1	2448103	32,5	2448103	1	139	
ONT48hB	2,78	1	2760822	32,7	2760822	1	138	
IT	2,75	43	69330	32,7	18017	4	50	
Híbrido	2,78	1	2624440	32,8	2624440	1	-	
ONT20h	2,97	4	2894099	32,9	2894099	1	946	Máximo
ONT48hA	3,42	72	2942103	33	2942103	1	1787	
ONT48hB	2,98	4	2894095	32,9	2894095	1	1429	
IT	2,97	934	1062513	32,9	725170	101	145	
Híbrido	2,95	8	2892532	32,9	2892532	1	-	

Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2021) e elaborado pelo autor.

Tabela 7. Valores médios, mínimos e máximos das métricas de qualidade da montagem dos genomas dos 42 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido obtidos por meio de diferentes protocolos. São indicadas as estatísticas do tamanho montado dos genomas (Mb), número (nº) de contigs, maior contig, porcentagem GC, N50, L50 e cobertura

Protocolo	Tamanho montado	Nº de contigs	Maior contig	GC (%)	N50	L50	Cober-tura	Valor
ONT20h	5,41	2,7	5241945	57,4	5241945	1	148	Médio
ONT48hB	5,39	2	5234384	57,4	5234384	1	197	
IT	5,09	1	5093428	57,9	5093428	1	77	
ONT20h	5,35	2	5213370	57,1	5213370	1	71	Mínimo
ONT48hB	5,33	2	5213441	57,2	5213441	1	96	
IT	5,06	1	5062603	57,7	5062603	1	63	
ONT20h	5,58	3	5321936	57,4	5321936	1	320	Máximo
ONT48hB	5,49	2	5275916	57,5	5275916	1	401	
IT	5,11	1	5117306	58,1	5117306	1	86	

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 ANÁLISES GENÔMICAS

Genes e MGEs detectados pelos programas/serviços *ResFinder*, *VirulenceFinder*, *MobileElementFinder*, *PlasmidFinder* e *CARD-RGI* foram classificados de acordo com a

porcentagem de identidade no alinhamento entre o gene de referência e o gene identificado no genoma de entrada, e de acordo com a relação de tamanho entre as sequências. Três categorias foram estabelecidas: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada $\neq$ tamanho da sequência de referência, identidade $\leq$ 100%. Foram classificados apenas quanto a sua presença os genes detectados pelos programas *1928 Diagnostics* e *VFDB* e as mutações detectadas a partir do serviço *PointFinder*.

4.2.1 Análises de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos

As análises conduzidas no serviço *ResFinder* apontaram a presença de genes relacionados à resistência aos beta-lactâmicos, tetraciclinas, MLE-B, aminoglicosídeos e trimetoprim nos isolados de MRSA. A detecção desses genes mostrou variações tanto qualitativas quanto quantitativas entre os isolados, com distribuição parcialmente linhagem-dependente (Apêndices 3 a 7). Nota-se que a maioria das detecções nos genomas obtidos através do protocolo ONT48hA é classificada na Categoria B (Figura 1A), tendência a qual se repete nas demais análises. No total, foram detectados 127 genes AMR nos genomas obtidos por meio do protocolo ONT48hA, seguido dos protocolos IT, Híbrido, ONT20h e ONT48hB, com 122, 121, 119 e 115 detecções, respectivamente (Figura 1A). A média de genes detectados em cada linhagem apresentou poucas variações entre os protocolos. Dentre as linhagens, o maior repertório de genes relacionados à resistência foi observado na L4 e o menor na L3 (Tabela 8). Não houve diferença significativa na capacidade de detecção entre os protocolos ($p = 0,5211$).

Os resultados das análises dos genomas de MRSA realizadas no programa *CARD-RGI* variaram substancialmente de acordo com o protocolo de sequenciamento utilizado (Figura 1B, Apêndices 8 a 12). Os protocolos ONT48hB e Híbrido foram os que apresentaram maiores números de detecções, sendo 609 e 627, respectivamente. Podemos observar uma redução considerável na quantidade de detecção nos demais protocolos quando comparados a esses dois. ONT20h apresentou 443 detecções, seguido do IT com 403 e ONT48hA com 228 (Figura 1B). As médias do número de genes detectados em cada linhagem podem ser observadas na Tabela 6. Houve diferença significativa na capacidade de detecção entre os protocolos ($p < 0,0001$). Quando comparados ao esperado, os protocolos ONT48hB e Híbrido não apresentaram diferença estatística ($p > 0,9999$), enquanto ONT20h, ONT48hA e IT apresentaram (valores $p < 0,0001$).

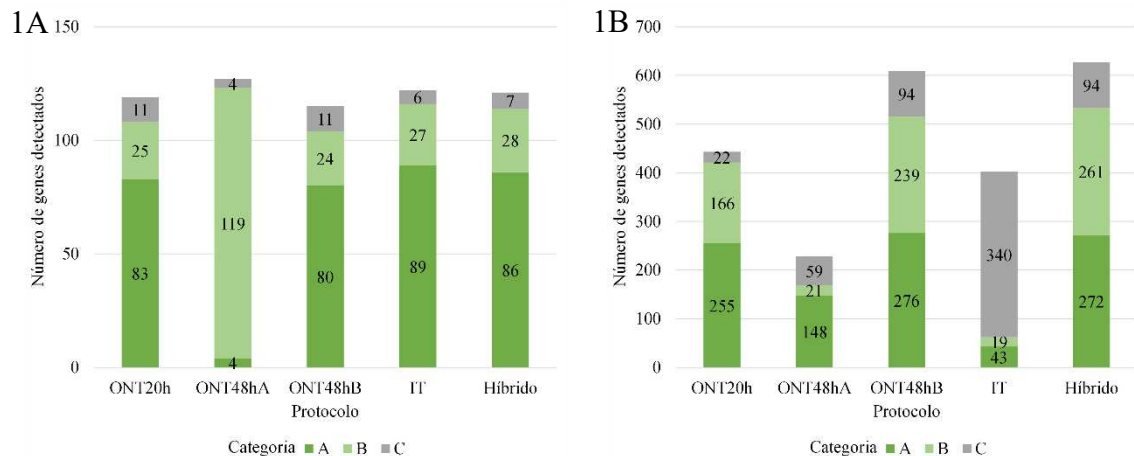


Figura 1. Gráficos indicativos do número total de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos detectados nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. Genomas obtidos a partir de cinco diferentes protocolos e análises realizadas no serviço *ResFinder* (A) e no programa *CARD-RGI* (B). Genes detectados classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada ≠ tamanho da sequência de referência, identidade ≤ 100%

Tabela 8. Média do número de genes detectados em cada linhagem de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, de acordo com o serviço/programa utilizado

Protocolo	Média de genes detectados				Serviço / Programa
	Linhagem 1	Linhagem 2	Linhagem 3	Linhagem 4	
ONT20h	2,83	2,55	1,76	8	<i>ResFinder</i>
ONT48hA	2,83	2,66	2,17	8	
ONT48hB	2,83	2,44	1,58	8	
IT	2,83	2,55	1,94	8	
Híbrido	2,83	2,55	1,94	7,75	
ONT20h	12,17	8,44	9,41	15	<i>CARD-RGI</i>
ONT48hA	6,08	4,11	5,11	7,75	
ONT48hB	16,25	12,55	13,23	19	
IT	11,08	8	8,64	12,75	
Híbrido	16,66	12,88	13,58	20	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Análises realizadas no programa *1928 Diagnostics* com os dados brutos de sequenciamento dos 42 isolados de MRSA (exceto MRSA_17) obtidos via ONT (20h) demonstraram a presença de 16 genes relacionados à AMR (Anexo B). Foram verificados a

presença de genes relacionados à resistência aos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fosfomicina, MLE-B, tetraciclina e trimetoprima, além de bombas de efluxo multidrogas (*mepA*). Ao todo, houve 320 detecções de genes.

Genes envolvidos na resistência contra aminoglicosídeos, anfenicóis, beta-lactâmicos, desinfetantes, fosfomicina, MLE-B, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e trimetopim foram identificados nos genomas de ESBL-Kp a partir das análises realizadas no serviço *ResFinder* (Apêndices 13 a 15). Os protocolos ONT20h e ONT48hB apresentaram um número similar de genes detectados (90 e 92, respectivamente). Quando observamos os resultados do protocolo IT, o número de detecções cai abruptamente em comparação aos demais (25 genes detectados) (Figura 2). Tal diferença levou os protocolos a diferirem em suas capacidades de detecção ($p = 0,0031$). Quando comparados ao esperado, os protocolos ONT20h e ONT48hB não apresentaram diferença significativa (valores $p > 0,9999$). O protocolo IT, por sua vez, diferiu dos resultados esperados ($p = 0,0031$).

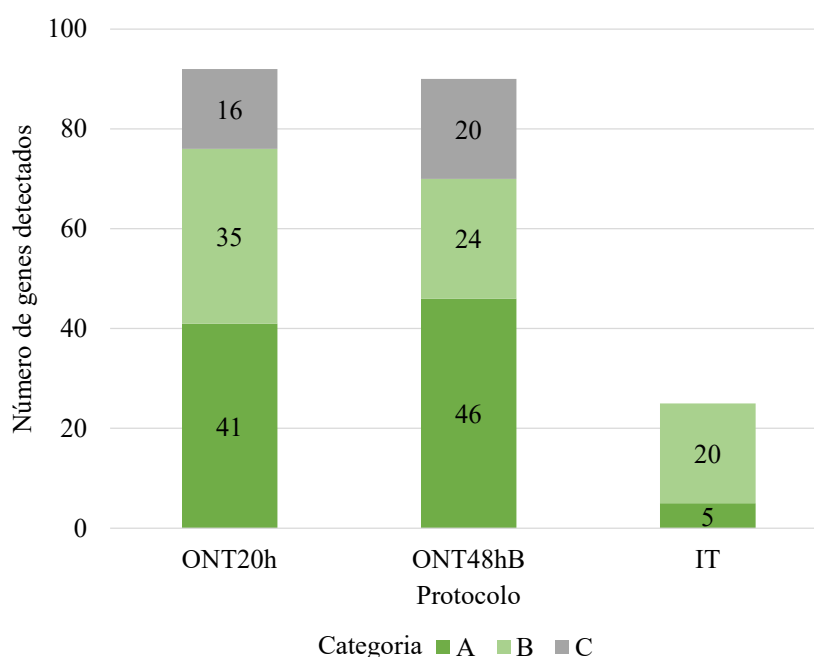


Figura 2. Gráfico indicativo do número total de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos detectados nos genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. Genomas obtidos a partir de três diferentes protocolos e análises realizadas no serviço *ResFinder*. Genes detectados classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada $\neq$ tamanho da sequência de referência, identidade $\leq$ 100%

4.2.2 Análises de mutações relacionadas à resistência aos antimicrobianos

O número de mutações relacionadas à AMR detectadas foi semelhante entre os protocolos de sequenciamento, tanto para MRSA quanto para ESBL-Kp (Figura 3A e 3B, respectivamente). Não houve detecção de mutação nos isolados da L1 e L2 de MRSA. As detecções ocorreram em alguns isolados da L3 e na L4 (Tabela 9). Foram identificadas mutações em três genes, estando relacionadas à resistência ao ácido fusídico (*fusA*) e às quinolonas (*gyrA*, *grrA*) (Apêndices 16 a 20). Já nos genomas de ESBL-Kp foram detectadas mutações em cinco genes, as quais possuem relação com a resistência às tetraciclinas (*ramR*), quinolonas (*parC*, *acrR*), cefalosporinas e carbapenêmicos (*ompK36*, *ompK37*) (Apêndices 21 a 23).

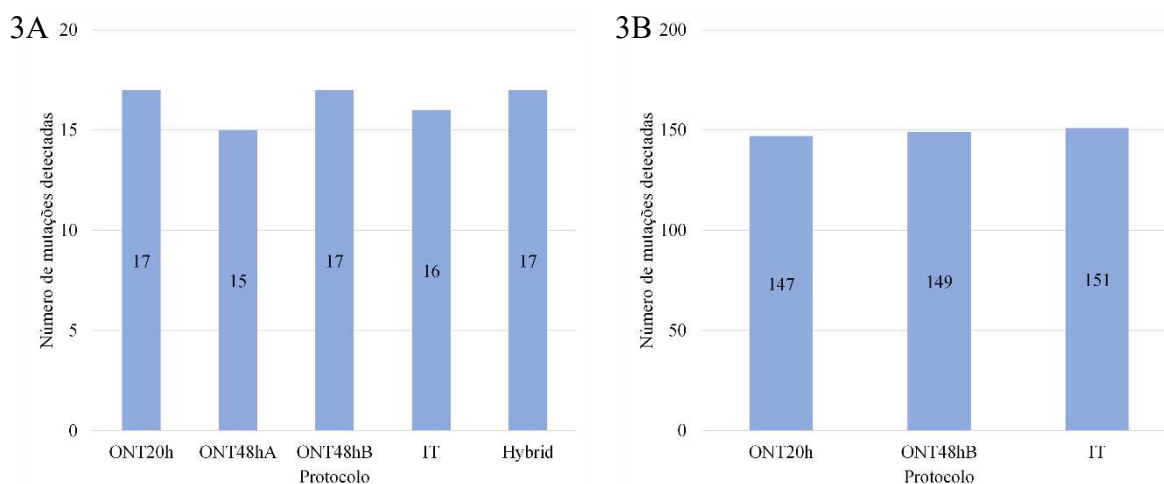


Figura 3. Gráficos indicativos do número total de mutações relacionadas à resistência aos antimicrobianos detectadas nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (A) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (B). Resultados de acordo com os protocolos utilizados para obtenção dos genomas e análises realizadas no serviço *PointFinder*

Tabela 9. Média do número de mutações detectadas em cada linhagem de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, utilizando o serviço *PointFinder*

Protocolo	Média de mutações detectadas			
	Linhagem 1	Linhagem 2	Linhagem 3	Linhagem 4
ONT20h	0	0	0,58	1,75
ONT48hA	0	0	0,47	1,75
ONT48hB	0	0	0,58	1,75
IT	0	0	0,58	1,5
Híbrido	0	0	0,58	1,75

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3 Análises de genes relacionados aos fatores de virulência

Um repertório vasto e característico de genes relacionados aos VF foi identificado para cada linhagem de MRSA, a partir das análises realizadas no serviço *VirulenceFinder* (Apêndices 24 a 28). Foram identificados genes que codificam para toxinas, exoenzimas e produtos relacionados à evasão do sistema imune. Nos protocolos ONT48hA, IT e Híbrido foram detectados 672 genes cada, seguidos pelo protocolo ONT48hB, com 663 e ONT20h, com 636 detecções (Figura 4A). A média de genes detectados em cada linhagem se demonstrou similar entre os protocolos. A L3 apresentou o maior repertório de genes, seguida pela L4, L1 e L2 (Tabela 10). Não houve diferença significativa na capacidade de detecção de genes entre os protocolos ($p = 0,9984$).

Os genomas de ESBL-Kp também apresentaram uma ampla gama de genes relacionados aos VF nas análises realizadas no programa *VFDB* (Apêndices 29 a 31). O maior número de genes foi detectado nos genomas obtidos a partir do protocolo ONT48hB (419), seguido pelo ONT20h (407) e IT (389) (Figura 4B). Os protocolos não apresentaram diferença na capacidade de detectar os componentes genéticos ($p = 0,1411$).

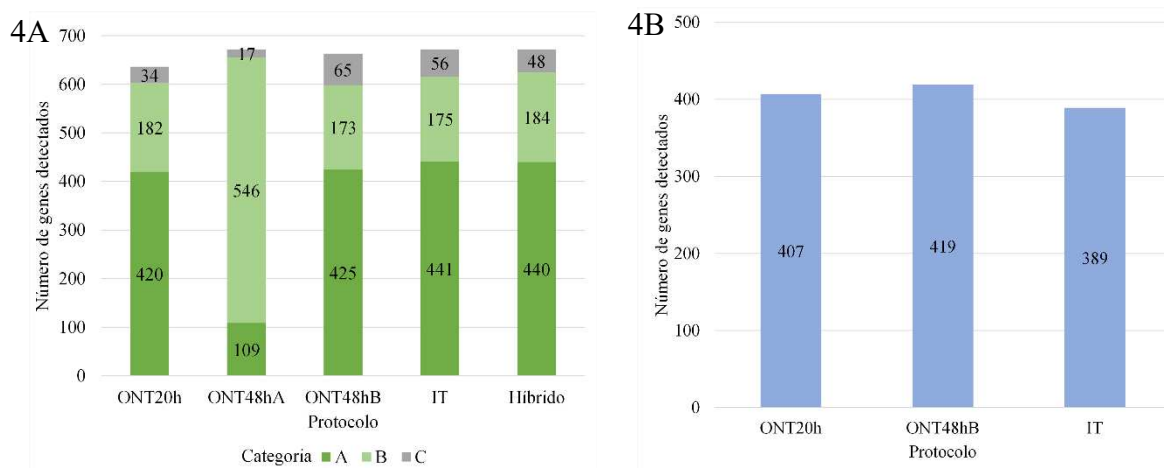


Figura 4. Gráfico indicativo do número total de genes relacionados aos fatores de virulência detectados nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (A) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (B). Resultados de acordo com os protocolos utilizados para obtenção dos genomas e análises realizadas no serviço *VirulenceFinder* (A) e no programa *VFDB* (B). Genes detectados no serviço *VirulenceFinder* classificados em três categorias:

Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada $\neq$ tamanho da sequência de referência, identidade $\leq$ 100%

Tabela 10. Média do número de genes detectados em cada linhagem de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina utilizando o serviço *VirulenceFinder*

Protocolo	Média de genes detectados			
	Linhagem 1	Linhagem 2	Linhagem 3	Linhagem 4
ONT20h	14,5	12,44	18,23	17
ONT48hA	14,5	12,55	18,58	17
ONT48hB	14,5	12,55	18,11	17
IT	14,5	12,56	18,53	17
Híbrido	14,5	12,56	18,65	17

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Análises de elementos genéticos móveis

O número de plasmídeos detectados nos genomas de MRSA pelo serviço *PlasmidFinder* variou entre os protocolos. O protocolo ONT48hA proporcionou um maior número de detecções (93), seguido pelo IT (77), Híbrido (74) ONT20h (59) e ONT48hB (54) (Apêndices 32 a 36, Figura 5A). As maiores diferenças nas médias de detecções entre os protocolos foram observadas na L3 e L4 (Tabela 11). Houve diferença significativa na capacidade de detecção de plasmídeos entre os protocolos ($p = 0,0005$). Quando comparados ao conjunto de resultados esperados, os únicos protocolos a apresentarem diferença significativa foram o ONT20h e o ONT48hB ($p = 0,007$; $p = 0,0015$, respectivamente).

Nas análises realizadas no mesmo serviço com os genomas de ESKK-Kp, foram identificados plasmídeos nos genomas gerados pelos protocolos baseados em tecnologia nanoporo, enquanto no protocolo baseado em Illumina não houve nenhuma detecção (Apêndices 37 a 39, Figura 5B). Por conta disso, os protocolos apresentaram diferença na capacidade de detecção ($p = 0,0002$), e o único a divergir do conjunto de dados esperado foi, justamente, o protocolo IT ($p = 0,0003$).

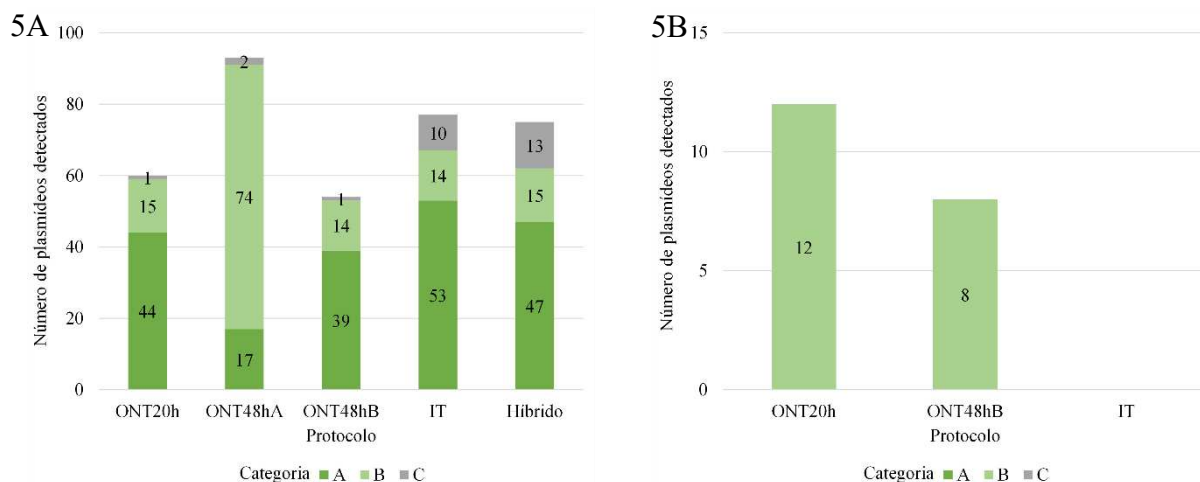


Figura 5. Gráficos indicativos do número total de plasmídeos detectados nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (A) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (B). Resultados de acordo com os protocolos utilizados para obtenção dos genomas e análises realizadas no serviço *PlasmidFinder*. Plasmídeos detectados classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada ≠ tamanho da sequência de referência, identidade ≤ 100%

Tabela 11. Média do número de elementos genéticos móveis detectados em cada linhagem de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina de acordo com o serviço/programa utilizado

Protocolo	Média de MGEs detectados				Serviço
	Linhagem 1	Linhagem 2	Linhagem 3	Linhagem 4	
ONT20h	2,83	1,44	0,64	0,25	<i>Plasmid Finder</i>
ONT48hA	3,58	1,55	1,64	2	
ONT48hB	2,83	1,33	0,47	0	
IT	3,41	1,44	1,11	1	
Híbrido	3,41	1,44	1	0,75	
ONT20h	3	3,88	0,76	3	<i>Mobile Element Finder</i>
ONT48hA	3,08	2,88	0,76	3	
ONT48hB	3	3,88	0,76	3	
IT	2	2,55	0,70	1,5	
Híbrido	3	3,77	0,76	3	

Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises realizadas no serviço *MobileElementFinder* apontaram a presença de sequências de inserção em genomas pertencentes a todas as linhagens de MRSA, além de um transposon (Tn) na Linhagem 1 (Apêndices 32 a 36). O maior número de detecções ocorreu nos

genomas obtidos pelos protocolos ONT20h e ONT48hB (96), seguido pelo Híbrido (95), ONT48hA (88) e IT (65) (Figura 6A). As médias de detecções de MGEs em cada linhagem foram similares entre os protocolos, com exceção do protocolo IT, que apresentou valores menores em comparação aos demais (Tabela 11). Houve diferença em suas capacidades de detecção ($p = 0,0466$), sendo que o único protocolo a divergir significativamente do esperado foi o IT ($p = 0,0326$).

Também foram detectadas sequências de inserção e transposons nas análises realizadas no serviço *MobileElementFinder* com os genomas de ESBL-Kp (Apêndices 37 a 39). Os protocolos ONT20h e ONT48hB detectaram o mesmo número de MGEs (58) e houve uma queda nas detecções no protocolo IT (10) (Figura 6B). Os protocolos divergiram em suas capacidades de detecção ($p = 0,0026$), sendo IT o único a apresentar-se diferente do esperado ($p = 0,0014$).

Quando analisados os resultados dos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* em conjunto, houve diferença significativa entre os protocolos tanto para MRSA quanto para ESBL-Kp (valores $p = 0,0496$ e $0,0019$, respectivamente). Na comparação realizada com o conjunto de dados esperados, apenas o protocolo IT apresentou diferença significativa em ambas as espécies (MRSA, $p = 0,0297$; ESBL-Kp, $p = 0,0008$), sendo que os demais protocolos não diferiram.

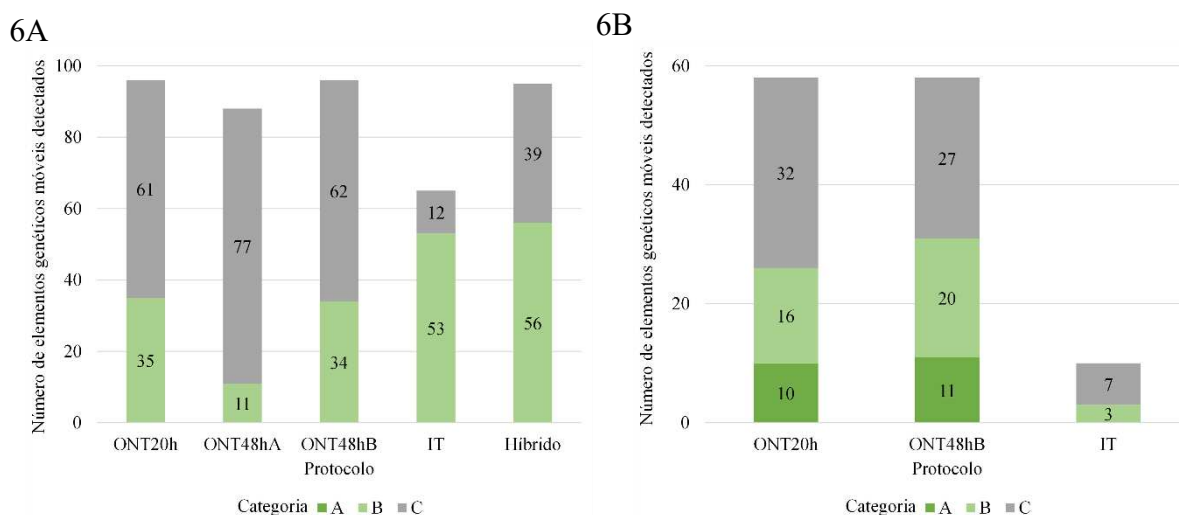


Figura 6. Gráfico indicativo do número total de elementos genéticos móveis (MGE) (exceto plasmídeos) detectados nos genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (A) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (B). Resultados de acordo com os protocolos utilizados para obtenção dos genomas e análises realizadas no serviço *MobileElementFinder*.

MGE detectados classificados em três categorias: Categoria A: tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade = 100%; Categoria B:

tamanho da sequência no genoma de entrada = tamanho da sequência de referência, identidade < 100%; Categoria C: tamanho da sequência no genoma de entrada $\neq$ tamanho da sequência de referência, identidade $\leq$ 100%

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS FENOTÍPICO E BASEADO EM ANÁLISE DE DADOS WGS

O AST fenotípico foi realizado com os 42 isolados de MRSA, exceto MRSA_12, MRSA_20, MRSA_33, MRSA_34, MRSA_41 e MRSA_42. Todos apresentaram resistência à ampicilina, cefoxitina, oxacilina-1 e penicilina G. Resistência à tetraciclina foi observada em 100% dos isolados pertencentes a L1 e no isolado MRSA_19. Quatro isolados foram classificados como resistentes à gentamicina, sendo MRSA_31, MRSA_32, MRSA_39 e MRSA_40. MRSA_39 e MRSA_40 também apresentaram resistência à eritromicina. Os isolados MRSA_35 a MRSA_40 foram classificados como resistentes à ciprofloxacina, enquanto os demais foram classificados como sensíveis, aumentando exposição. MRSA_27 e MRSA_28 apresentaram resistência ao ácido fusídico. Aos demais antimicrobianos, os isolados se demonstraram sensíveis (Anexo C).

Todos os isolados de ESBL-Kp apresentaram resistência fenotípica contra amoxilina-clavulanato, ampicilina, aztreonam, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima e sulfametoxazol-trimetropima. Os isolados Kp_01, Kp_02, Kp_04 e Kp_06 foram classificados como resistentes à ciprofloxacina, enquanto os isolados Kp_03 e Kp_05 foram classificados como sensíveis, aumentando exposição. Ademais, o isolado Kp_04 foi classificado como sensível, aumentando exposição para piperacilina-tazobactam. Nenhum dos isolados apresentou resistência contra gentamicina e meropenem (Anexo D).

As Tabelas 12 a 16 expressam os valores quantitativos dos resultados do AST fenotípico e do WGS-AST, de acordo com o protocolo utilizado para obtenção dos genomas. Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e coeficiente Kappa de Cohen tiveram como base para os cálculos os valores apresentados nessas tabelas, onde a = verdadeiro positivo, b = falso positivo, c = falso negativo e d = verdadeiro negativo.

Os resultados do WGS-AST realizados com base nas análises dos genomas de MRSA obtidos por meio do protocolo ONT20h ou IT ou Híbrido encontram-se na Tabela 12, enquanto os utilizando os protocolos ONT48hA e ONT48hB podem ser observados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. Resultados do WGS-AST realizado com base na análise dos genomas de ESBL-Kp obtidos por meio do protocolo ONT20h ou ONT48hB são expressos na Tabela 15.

Na Tabela 16 encontram-se os resultados referentes aos dos genomas obtidos por meio do protocolo IT.

Tabela 12. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT20h ou IT ou Híbrido

		Genotípico		
Fenotípico		Resistente	Sensível	Total
	Resistente	170 (a)	0 (c)	170
	Sensível	0 (b)	478 (d)	478
	Total	170	478	648

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 13. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina obtidos por meio do protocolo ONT48hA

		Genotípico		
Fenotípico		Resistente	Sensível	Total
	Resistente	168 (a)	2 (c)	170
	Sensível	5 (b)	473 (d)	478
	Total	173	475	648

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 14. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina obtidos por meio do protocolo ONT48hB

		Genotípico		
Fenotípico		Resistente	Sensível	Total
	Resistente	169 (a)	1 (c)	170
	Sensível	0 (b)	478 (d)	478
	Total	169	479	648

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 15. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, obtidos por meio do protocolo ONT20h ou ONT48hB

		Genotípico		
Fenotípico		Resistente	Sensível	Total
	Resistente	52 (a)	0 (c)	52
	Sensível	5 (b)	15 (d)	20
	Total	57	15	72

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 16. Resultados do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseados nos métodos fenotípicos e genotípicos. Análises realizadas com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, obtidos por meio do protocolo IT

Fenotípico	Genotípico		
		Resistente	Sensível
	Resistente	46 (a)	6 (c)
	Sensível	2 (b)	18 (d)
	Total	48	24
			Total
			52
			20
			72

Fonte: Elaborado pelo autor.

O método WGS-AST realizado com base nas análises dos genomas obtidos por meio do protocolo ONT20h, IT ou Híbrido resultou em sensibilidade, especificidade, VPP, VPN de 100% para os isolados de MRSA (Tabela 17). Nenhum desses grupos apresentaram falsos negativos ou positivos (Tabelas 12), o que levou a esses resultados. Já os testes realizados utilizando genomas obtidos por meio dos protocolos ONT48hA e ONT48hB apresentaram resultados falsos negativos (Tabelas 13 e 14), levando a uma diminuição na taxa de sensibilidade e VPN, as quais ficaram acima de 98% (Tabela 17). A especificidade e o VPP do teste realizado com os genomas obtidos através do protocolo ONT48hB foram de 100%. A ocorrência de falsos positivos no diagnóstico realizado com os genomas obtidos por meio do protocolo ONT48hA (Tabela 13) ocasionou a diminuição da especificidade e do VPP em comparação aos demais grupos (Tabela 17). A acurácia geral do método genotípico ficou acima de 98% para os diferentes protocolos, atingindo a máxima de 100% para ONT20h, IT e Híbrido (Tabela 17). O coeficiente Kappa de Cohen retornou o valor de 1 para as análises realizadas com os genomas obtidos pelos protocolos ONT20h, IT ou Híbrido, e com valor de 0,97 e 0,99 para ONT48hA e ONT48hB, respectivamente, indicando uma forte concordância entre os resultados dos diagnósticos baseados nos métodos fenotípico e genotípico (Tabela 17).

A sensibilidade e o VPN do WGS-AST com base na análise dos genomas obtidos a partir dos protocolos ONT20h e ONT48hB foram de 100% para ESBL-Kp (Tabela 18). Em contrapartida, o diagnóstico genotípico a partir da análise dos genomas obtidos pelo protocolo IT apresentou uma sensibilidade de 88,46% e VPN de 75% (Tabela 18), consequência da ocorrência de seis falsos negativos (Tabela 16). A especificidade e o VPP para o diagnóstico a partir dos protocolos ONT20h e ONT48hB foram de 75% e 91,23%, respectivamente. O protocolo IT apresentou as taxas de 90% e 95,83% para especificidade e VPP. Já os coeficientes de concordância dos métodos foram de 0,81 para os protocolos ONT20h e ONT48hB e de 0,73 para IT (Tabela 18).

Tabela 17. Parâmetros de acurácia do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos baseado em análises genômicas. Análises realizadas com isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, das quais os genomas foram obtidos a partir de cinco diferentes protocolos de sequenciamento. São indicados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e o coeficiente Kappa de Cohen, seguidos de seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%

Dados de acurácia	Protocolo		
	ONT20h ou IT ou Híbrido	ONT48hA	ONT48hB
Sensibilidade (IC 95%)	100% (97,85 – 100)	98,82% (95,81 – 99,86)	99,41% (96,77 – 99,99)
Especificidade (IC 95%)	100% (99,23 – 100)	98,95% (97,58 – 99,66)	100% (99,23 – 100)
VPP (IC 95%)	100% (97,85 – 100)	97,11% (93,35 – 98,77)	100% (97,84 – 100)
VPN (IC 95%)	100% (99,23 – 100)	99,58% (98,35 – 99,89)	99,79% (98,54 – 99,97)
Acurácia	100% (99,43 – 100)	98,92% (97,79 – 99,56)	99,85% (99,14 – 100)
Kappa de Cohen (IC 95%)	1 (1 – 1)	0,97 (0,95 – 0,99)	0,99 (0,98 – 1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 18. Parâmetros de acurácia do diagnóstico de sensibilidade aos antimicrobianos a partir de métodos genômicos. Análises realizadas com isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, das quais os genomas foram obtidos a partir de três diferentes protocolos de sequenciamento. São indicados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e o coeficiente Kappa de Cohen, seguidos de seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%

Dados de acurácia	Protocolo	
	ONT20h ou ONT48hB	IT
Sensibilidade (IC 95%)	100% (93,15 – 100)	88,46% (76,56 – 95,65)
Especificidade (IC 95%)	75% (50,90 – 91,34)	90,00% (68,30 – 98,77)
VPP (IC 95%)	91,23% (82,96 – 95,69)	95,83% (86,02 – 98,85)
VPN (IC 95%)	100% (78,20 – 100)	75,00% (58,22 – 86,59)
Acurácia	93,06% (84,53 – 97,71)	88,89% (79,28 – 95,08)
Kappa de Cohen (IC 95%)	0,81 (0,65 – 0,96)	0,73 (0,57 – 0,90)

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Os protocolos de sequenciamento/montagem empregados na obtenção dos genomas analisados neste estudo revelaram variações e semelhanças na sua eficácia em detectar componentes genéticos, dependendo da ferramenta utilizada e do alvo de identificação. De maneira geral, o protocolo ONT20h apresentou resultados tão bons e, por vezes, até melhores que os protocolos mais lentos para detecção de genes, sejam relacionados à AMR ou aos VF. Para detecção de elementos genéticos móveis (exceto plasmídeos), o mesmo protocolo se apresentou eficaz. Interessantemente, a detecção de plasmídeos foi menor nos genomas obtidos pelo protocolo ONT20h em comparação aos demais, ficando à frente apenas do protocolo ONT48hB.

Safar et al. (2023) avaliaram o impacto de diferentes ferramentas na montagem *de novo* e no polimento de genomas utilizando sequências geradas por ONT. Foi observado que a escolha das ferramentas pode impactar no tamanho total do genoma, e na detecção de genes associados à AMR e aos VF, além de plasmídeos. Montagens feitas no *Flye* tiveram um melhor desempenho para detecção de genes associados à AMR e aos VF. O polimento com *Medaka* e *Racon* melhoraram consideravelmente os parâmetros de qualidade dos genomas. Uma melhor capacidade de detecção de plasmídeos foi observada em montagens realizadas no *Canu*, semelhante ao observado neste trabalho (Figura 5A).

De maneira geral, genomas obtidos por meio do protocolo ONT48hA apresentaram mais resultados classificados na Categoria B, em comparação aos demais protocolos. Essa categoria indica que o determinante genético detectado no genoma possui o mesmo tamanho que o da sequência na base de dados, mas com identidade inferior a 100%. A presença dos mesmos genes com uma correspondência perfeita nos demais protocolos (inclusive no ONT48hB que utilizou os mesmos *reads*) traz o indicativo de que os processos de montagem/polimento estão associados à qualidade final do genoma obtido. O *Canu*, programa utilizado para montagem dos genomas no protocolo ONT48hA, pode apresentar performance de baixa qualidade se não for ajustado de maneira adequada e precisa. Montagens realizadas no *default mode* podem exibir métricas como N50, número de *contigs* e número e tamanho de *gaps* inferiores, em comparação a montagens com parâmetros personalizados (SCHIAVONE et al., 2022). A ausência de etapa adicional de polimento, como a realizada no protocolo ONT20h com *Medaka*, também pode ter exercido influência na qualidade final dos genomas obtidos pelo protocolo ONT48hA. Resultados aprimorados em relação à detecção de elementos genéticos

foram observados em genomas polidos com *Medaka*, ressaltando a importância desta etapa para obtenção de genomas de maior qualidade (LEE et al., 2021; SAFAR et al., 2023).

Diferentes plataformas de sequenciamento e metodologias de montagem podem influenciar na montagem *de novo* de genomas bacterianos. Enquanto cromossomos bacterianos circulares são obtidos mais facilmente a partir de montagens realizadas com dados de *long reads* gerados por ONT ou PacBio, sua obtenção é mais difícil utilizando *short reads* Illumina. Além disso, regiões repetitivas no genoma, comuns em MGE, e altas taxas de conteúdo GC dificultam a montagem de genomas a partir de *short reads*. No entanto, apesar de apresentar a vantagem de gerar sequências com maior contiguidade, a montagem com *long reads* é mais propensa a erros, e pode apresentar perda de pequenas sequências plasmidiais. Abordagens híbridas utilizando *long* e *short reads* para montagem de genomas demonstraram resultados mais robustos, gerando contigs cromossômicos mais contíguos, e um pouco mais longos e com maior precisão, quando comparados às montagens utilizando apenas *short* ou *long reads* (GOLDSTEIN et al., 2019; JURASCHEK et al., 2021). Cada tecnologia apresenta suas vantagens e desvantagens e, ao combinar as duas, podemos superar as limitações individuais de cada uma. O protocolo Híbrido aplicado nesse estudo foi o único a não divergir estatisticamente dos demais protocolos ou do esperado em todas as análises realizadas, fortalecendo o potencial da abordagem híbrida para obtenção de genomas mais precisos. No entanto, no âmbito da necessidade de urgência de um diagnóstico, esta abordagem dificilmente será a mais rápida.

As novas tecnologias de sequenciamento têm tornado o WGS cada vez mais acessível e rápido para uso, impulsionando o desenvolvimento de novos métodos voltados a identificação e caracterização de patógenos. As informações genômicas do WGS podem ser usadas para realizar o WGS-AST, e diversos estudos estão sendo conduzidos para o desenvolvimento de métodos, ferramentas e pipelines aplicados a esta área (DOYLE et al., 2020; SU; SATOLA; READ, 2019; WEINMAIER et al., 2023). Em 2015, um subcomitê foi criado pelo EUCAST para averiguar o papel do WGS no AST. Em seu relatório publicado em 2017, críticas foram tecidas acerca do método, principalmente pela falta de evidências concretas de sua eficácia. Para que o WGS-AST se torne uma ferramenta confiável e viável, foi destacada a necessidade de mais investimentos e estudos aplicados na área, assim como o um acordo internacional sobre controle de qualidade e padrões mínimos de desempenho para ferramentas bioinformáticas. Foi ressaltada também a importância da criação de uma base de dados única para genes/mutações relacionadas à AMR, com curadoria contínua (ELLINGTON et al., 2017). Desde então, esforços continuam sendo aplicados na área, e avanços significativos ocorreram.

O WGS-AST realizado utilizando genomas obtidos por meio do protocolo ONT20h demonstrou acurácia geral de 100% para as análises realizadas com MRSA, e de 93,06% para ESBL-Kp. A sensibilidade observada foi de 100% para MRSA e ESBL-Kp e a especificidade foi de 100% e 75%, respectivamente. A ausência de resultados falsos positivos e negativos refletiu nos valores de sensibilidade e especificidade máximos. A queda na especificidade de ESBL-Kp está associada a presença de resultados falsos positivos, ou seja, o isolado foi considerado resistente pelas análises genotípicas, mas apresentou fenótipo sensível ou sensível, aumentando a exposição ao determinado antimicrobiano.

Dois dos resultados falsos positivos de ESBL-Kp estiveram relacionados à resistência à ciprofloxacina, em que os isolados se apresentaram sensíveis, aumentando a exposição (Kp_03 e Kp_05). Com exceção dos isolados Kp_01 e Kp_02, que apresentaram mais de um gene relacionado à resistência à ciprofloxacina, os demais isolados apresentaram apenas o gene *OqxB*, que codifica uma bomba de efluxo (AREF SHARIATI et al., 2022). Altos níveis de expressão de bombas de efluxo estão relacionados diretamente ao aumento da resistência aos antimicrobianos que estão sujeitos àquela bomba. A regulação da expressão de bombas de efluxo está associada a diversas vias, sejam locais ou globais (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A manifestação dos fenótipos sensíveis, aumentando a exposição ou resistente por parte dos isolados que apresentaram apenas o gene *OqxB* pode estar relacionado a intensidade com que a expressão dessa bomba de efluxo ocorre; não podendo ser descartada a possibilidade de influência de outros fatores, tal como alterações no influxo de antimicrobianos decorrentes de eventos mutacionais ou adaptativos relacionados às porinas (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

Outros três isolados de ESBL-Kp apresentaram falsos positivos relacionados à resistência à combinação dos fármacos piperacilina-tazobactam. Tal resistência foi inferida pela presença dos genes *blaOXA-1*, *blaTEM-33* e *blaTEM-34*. Na literatura, a resistência ao piperacilina-tazobactam é associada à hiperprodução de enzimas betalactamases, tais como as do tipo TEM. A hiperprodução dessas enzimas decorre da amplificação gênica extensiva, ou pela presença de genes com promotores fortes. Altas concentrações de betalactamases exercem atividade inibitória contra o tazobactam, permitindo com que ocorra a hidrólise da piperacilina, o que resulta no quadro de resistência (HUBBARD et al., 2020; SCHECHTER et al., 2018; ZHOU et al., 2019). Contudo, foi observado em modelos murinos que o aumento da concentração de tazobactam restaurava a sensibilidade ao piperacilina-tazobactam em isolados hiperprodutores de betalactamases (ABDELRAOUF et al., 2020). A expressão gênica e a intensidade com que ela ocorre são processos complexos, regulados por diversos fatores. A

previsão da expressão gênica a partir de dados genômicos enfrenta diversos desafios, devido à complexidade dos sistemas biológicos, o que pode implicar em interpretações errôneas de determinados resultados, como na inferência de AMR. Avanços estão sendo realizados nesse sentido, principalmente através de estratégias integrativas das ciências ômicas, junto ao desenvolvimento de recursos em bioinformática (SUBRAMANIAN et al., 2020).

Variados fatores podem exercer influência sobre a predição de AMR a partir de análises de dados WGS. Um estudo interlaboratorial foi conduzido com o objetivo de verificar a reprodutibilidade da predição bioinformática de AMR, e identificar fatores que pudessem levar a resultados discordantes. A qualidade dos dados de sequenciamento, os métodos de bioinformática empregados e a interpretação dos resultados foram os aspectos mais expressivos que contribuíram para as divergências observadas (DOYLE et al., 2020).

Sequenciamento de baixa qualidade e com baixa cobertura podem afetar consideravelmente a precisão da identificação de genes AMR, implicando na diminuição da sensibilidade e especificidade do método WGS-AST. Além disso, a escolha das ferramentas analíticas e seus parâmetros, e dos bancos de dados para as análises, também podem influenciar os resultados, levando a imprecisões relacionadas à identificação de variantes genéticas no mesmo *loci* gênico. Nesse sentido, é importante se atentar aos parâmetros de identidade e a amplitude dos limites de cobertura, os quais recomendam-se ser mantidos elevados em comparações com os bancos de dados, para que não haja identificações errôneas (DOYLE et al., 2020). Tais discrepâncias entre os resultados acendem preocupações acerca da confiabilidade das atuais ferramentas e pipelines de bioinformática para prever AMR em ambientes clínicos. Torna-se necessário o desenvolvimento de ferramentas analíticas e banco de dados padronizados, de fácil utilização e compreensão.

Recentemente, uma plataforma bioinformática com certificação ISO foi desenvolvida para detecção de genes AMR, a partir de dados WGS. Essa plataforma foi chamada de *abritAMR*, e tem como base de dados o NCBI *AMRFinderPlus*. Os resultados são apresentados de forma adaptada para relatórios, facilitando a aplicação e o entendimento na rotina clínica. Na validação da inferência de resistência a partir das análises genômicas, a ferramenta apresentou resultados promissores, com 99,9% de acurácia, alta sensibilidade (98,9% / IC 98,4–99,3) e especificidade (98,9% / IC 98,7–99,1%) (SHERRY et al., 2023).

Semelhante aos resultados observados em nosso trabalho, estudos recentes vêm relatando alta concordância entre o WGS-AST e o AST fenotípico, demonstrando que os dados obtidos a partir de sequências genômicas podem se correlacionar bem com a resistência fenotípica em grande parte dos casos (CONZEMIUS et al., 2022; FAKSRI et al., 2019;

SHERRY et al., 2023; WEINMAIER et al., 2023). Contudo, variações de quase 20% ou mais foram observadas na concordância entre os métodos genotípico e fenotípico, a depender do antimicrobiano testado (FAKSRI et al., 2019; WEINMAIER et al., 2023). A relação complexa entre fenótipo e genótipo se torna um dos maiores desafios na predição de resistência a partir de análises genômicas. Muitos mecanismos já estão bem descritos e estabelecidos, permitindo uma inferência de resistência fenotípica a partir da identificação de determinantes genéticos. Contudo, ainda há diversos mecanismos que necessitam de uma base teórica adicional para que uma inferência possa ser feita, o que torna a pesquisa de base essencial para prover mais robustez para as previsões (LÜFTINGER et al., 2021).

Em nosso estudo, o WGS-AST conduzido com os genomas obtidos por meio do protocolo ONT20h demonstrou resultados promissores em termos de acurácia e de concordância com o AST fenotípico. No entanto, é fundamental considerar que o tamanho amostral reduzido pode ter exercido influência sobre os resultados. A obtenção de resultados tão bons quanto ou até melhores que os protocolos mais lentos reforçam seu potencial de aplicação na clínica, uma vez que a velocidade com que se obtém o diagnóstico é primordial para o tratamento de infecções bacterianas resistentes. Tais resultados corroboram com o potencial do protocolo ONT20h em oferecer informações de diagnóstico precisas e com rapidez. Como recomendações para pesquisas futuras, seria ideal conduzir testes WGS-AST com um tamanho amostral maior, incorporando uma maior diversidade de espécies e com diferentes origens geográficas. Além disso, a inclusão de isolados com resistência a diferentes classes de antimicrobianos é necessária, uma vez que os mecanismos de resistência são muito diversificados.

6 CONCLUSÃO

Em geral, o protocolo ONT20h, o mais rápido de todos, obteve resultados tão satisfatórios quanto os dos protocolos mais demorados. Destaca-se também a precisão dos parâmetros do WGS-AST, realizado com os genomas gerados por esse protocolo, evidenciando seu potencial como uma ferramenta de diagnóstico complementar na prática clínica e reforçando a viabilidade dessa aplicação. Entretanto, são necessários pesquisas adicionais para viabilizar a adoção de protocolos genômicos na prática clínica devido a várias limitações. Essas incluem aspectos como custo, padronização, implementação de fluxos de trabalho simplificados e a precisão das plataformas, ferramentas e bases de dados em bioinformática.

REFERÊNCIAS

- ABDELBARY, M. M. H. et al. The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: **Genetics and Evolution of Infectious Diseases: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 553–572.
- ABDELRAOUF, K. et al. Piperacillin-Tazobactam-Resistant/Third-Generation Cephalosporin-Susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates: Resistance Mechanisms and In vitro-In vivo Discordance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 3, p. 105885, 2020.
- ABUSHAHEEN, M. A. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, 2020.
- ALCOCK, B. P. et al. CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D517–D525, 2020.
- ALGAMMAL, A. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 3255–3265, 2020.
- ALIBAYOV, B. et al. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 8, p. 5005–5018, 2014.
- AREF SHARIATI et al. The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. **Frontiers in Public Health**, p. 1–28, 2022.
- BALLOUX, F. et al. From Theory to Practice: Translating Whole-Genome Sequencing (WGS) into the Clinic. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 12, p. 1035–1048, 2018.
- BECKER, K. et al. Plasmid-encoded transferable mecB-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 242–248, 2018.
- BENGOCHEA, J. A.; PESSOA, J. S. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, p. 123–144, 2019.
- BOOLCHANDANI, M.; D’SOUZA, A. W.; DANTAS, G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 6, p. 356–370, 2019.
- BORTOLAIA, V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 2020.
- CAMACHO, C. et al. BLAST+: Architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1–9, 2009.
- CARATTOLI, A. et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, 2014.

- CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 56–66, 2019.
- CHEN, L. et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. DATABASE ISS., p. 325–328, 2005.
- CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020.
- COLSON, A. R. et al. Antimicrobial Resistance: Is Health Technology Assessment Part of the Solution or Part of the Problem? **Value in Health**, v. 24, n. 12, p. 1828–1834, 2021.
- CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169–176, 2020.
- CONZEMIUS, R. et al. Automated antimicrobial susceptibility testing and antimicrobial resistance genotyping using Illumina and Oxford Nanopore Technologies sequencing data among Enterobacteriaceae. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. August, p. 1–10, 2022.
- D’COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457–461, 2011.
- DE COSTER, W.; RADEMAKERS, R. NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. **Bioinformatics**, v. 39, n. 5, p. 0–2, 2023.
- DE KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? **PLoS Medicine**, v. 13, n. 11, p. 1–6, 2016.
- DIDELLOT, X. et al. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, p. 601–612, 2012.
- DJORDJEVIC, S. P. et al. Genomic surveillance for antimicrobial resistance — a One Health perspective. **Nature Reviews Genetics**, v. 25, n. 2, p. 142–157, 2024.
- DONG, N. et al. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. **eBioMedicine**, v. 79, p. 103998, 2022.
- DOYLE, R. M. et al. Discordant bioinformatic predictions of antimicrobial resistance from whole-genome sequencing data of bacterial isolates: An inter-laboratory study. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 2, 2020.
- EIZENGA, J. M. et al. Pangenome Graphs. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 21, p. 139–162, 2020.
- ELLINGTON, M. J. et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 1, p. 2–22, 2017.

ESPINOSA, E. et al. Advancements in long-read genome sequencing technologies and algorithms. **Genomics**, v. 116, n. 3, p. 110842, 2024.

EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 11.0**. Disponível em:

<https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents>. Acesso em: 20 set. 2022.

FAKSRI, K. et al. Comparisons of whole-genome sequencing and phenotypic drug susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis causing MDR-TB and XDR-TB in Thailand. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 2, p. 109–116, 2019.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.

FERREIRA, F. A. et al. Rapid nanopore-based DNA sequencing protocol of antibiotic-resistant bacteria for use in surveillance and outbreak investigation. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 4, 2021.

GARRITY, G. M. **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. [s.l.] Springer US, 2005. v. 2

GOLDSTEIN, S. et al. Evaluation of strategies for the assembly of diverse bacterial genomes using MinION long-read sequencing. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1–17, 2019.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333–351, 2016.

HU, T. et al. Next-generation sequencing technologies: An overview. **Human Immunology**, v. 82, n. 11, p. 801–811, 2021.

HUBBARD, A. T. M. et al. Piperacillin/tazobactam resistance in a clinical isolate of Escherichia coli due to IS26-mediated amplification of bla TEM-1B. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2020.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. Figure 1, p. 72–80, 2019.

ILLUMINA. Understanding Illumina Quality Scores. **Technical Note: Informatics**, p. 1–2, 2014.

ILLUMINA. **Measuring sequencing accuracy**. Disponível em:

<<https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html>>. Acesso em: 12 maio. 2024.

IWG-SCC. **International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements: SCCmec types list**. Disponível em:

<<https://www.sccmec.org/index.php/en/sccmmcc-list-smn-en>>. Acesso em: 24 set. 2023.

Jl, Y. **Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols: Cutting-Edge**

Technologies and Advancements. 3. ed. New York: Humana Press, 2020. v. 2069

JOENSEN, K. G. et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1501–1510, 2014.

JOHANSSON, M. H. K. et al. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 1, p. 101–109, 2021.

JONAS, O. B. et al. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future (Final Report). **World Bank Report**, v. 2, n. March, p. 1–132, 2017.

JURASCHEK, K. et al. Article outcome of different sequencing and assembly approaches on the detection of plasmids and localization of antimicrobial resistance genes in commensal *Escherichia coli*. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2021.

KOLMOGOROV, M. et al. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 540–546, 2019.

KOREN, S. et al. Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive κ -mer weighting and repeat separation. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 722–736, 2017.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. v. 31, n. 4, 2018.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–23, 2018.

LEE, J. Y. et al. Comparative evaluation of Nanopore polishing tools for microbial genome assembly and polishing strategies for downstream analysis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

LIN, B.; HUI, J.; MAO, H. Nanopore technology and its applications in gene sequencing. **Biosensors**, v. 11, n. 7, 2021.

LIVERMORE, D. M.; WAIN, J. Revolutionising bacteriology to improve treatment outcomes and antibiotic stewardship. **Infection and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2013.

LÜFTINGER, L. et al. Predictive antibiotic susceptibility testing by next-generation sequencing for periprosthetic joint infections: Potential and limitations. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, 2021.

MALBERG TETZSCHNER, A. M. et al. In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Sequencing Data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 10, p. e01269-20, 2020.

MAN, M. Y. et al. Impact of appropriate empirical antibiotics on clinical outcomes in *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. **Hong Kong Medical Journal**, v. 27, n. 4, p. 247–257, 2021.

MIKHEENKO, A. et al. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. **Bioinformatics**, v. 34, n. 13, p. i142–i150, 2018.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, 2022.

MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 398, p. 237–272, 2016.

MONECKE, S. et al. Diversity of SCCmec elements in *staphylococcus aureus* as observed in south-eastern Germany. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–24, 2016.

MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2014.

NANOPORETECH. **How nanopore sequencing works**. Disponível em: <<https://nanoporetech.com/platform/technology>>. Acesso em: 13 jun. 2024a.

NANOPORETECH. **Nanopore sequencing accuracy**. Disponível em: <<https://nanoporetech.com/platform/accuracy>>. Acesso em: 13 jun. 2024b.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252–275, 2017.

NOONE, J. C.; FERREIRA, F. A.; AAMOT, H. V. Culture-independent genotyping, virulence and antimicrobial resistance gene identification of *staphylococcus aureus* from orthopaedic implant-associated infections. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, 2021.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. n. December, 2014.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae* : ir a la ofensiva con una defensa fuerte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016.

PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 577–601, 2015.

PROCOP, G. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA, 2018.

PULINGAM, T. et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106103, 2022.

QUAINOO, S. et al. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens : the Future of Nosocomial. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 1015–1064, 2017.

RAHMAN, S. U. et al. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

REUTER, J. A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, M. P. High-Throughput Sequencing

Technologies. **Molecular Cell**, v. 58, n. 4, p. 586–597, 2015.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.

RIWU, K. H. P. et al. A review: Virulence factors of *Klebsiella pneumonia* as emerging infection on the food chain. **Veterinary World**, v. 15, n. 9, p. 2172–2179, 2022.

ROSINI, R. et al. Vaccines Against Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. June, p. 1–14, 2020.

SAFAR, H. A. et al. The impact of applying various de novo assembly and correction tools on the identification of genome characterization, drug resistance, and virulence factors of clinical isolates using ONT sequencing. **BMC Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 1–15, 2023.

SALIPANTE, S. J. et al. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1072–1079, 2015.

SCHECHTER, L. M. et al. Extensive gene amplification as a mechanism for piperacillin-Tazobactam resistance in *Escherichia coli*. **mBio**, v. 9, n. 2, 2018.

SCHIAVONE, A. et al. Factors Affecting the Quality of Bacterial Genomes Assemblies by Canu after Nanopore Sequencing. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 6, 2022.

SHEKA, D.; ALABI, N.; GORDON, P. M. K. Oxford nanopore sequencing in clinical microbiology and infection diagnostics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 5, p. 1–17, 2021.

SHERRY, N. L. et al. An ISO-certified genomics workflow for identification and surveillance of antimicrobial resistance. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, 2023.

SIONOV, R. V.; STEINBERG, D. Targeting the Holy Triangle of Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, 2022.

SU, M.; SATOLA, S. W.; READ, T. D. Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 3, 2019.

SUBRAMANIAN, I. et al. Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 7–9, 2020.

TILLOTSON, G. S.; ZINNER, S. H. Burden of antimicrobial resistance in an era of decreasing susceptibility. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 15, n. 7, p. 663–676, 2017.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019.

VAN BELKUM, A. et al. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 299–311, 2020.

VIANA, A. S. et al. Multidrug-resistant methicillin-resistant staphylococcus aureus associated with bacteremia and monocyte evasion, rio de janeiro, brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 11, p. 2825–2835, 2021.

WANG, W. et al. Novel SCCmec type XV (7A) and two pseudo-SCCmec variants in foodborne MRSA in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 4, p. 903–909, 2022.

WANG, Y. et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. **Nature Biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 1348–1365, 2021.

WEINMAIER, T. et al. Validation and Application of Long-Read Whole-Genome Sequencing for Antimicrobial Resistance Gene Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 1–11, 2023.

WHO. **Antibiotic resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>. Acesso em: 8 abr. 2022.

WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. 1–22, 2017.

WU, Q. et al. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-resistance Staphylococcus aureus isolates. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2021.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. Klebsiella pneumoniae as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 131–139, 2018.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of Klebsiella pneumoniae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344–359, 2020.

ZANKARI, E. et al. PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 10, p. 2764–2768, 2017.

ZHOU, K. et al. Piperacillin-Tazobactam (TZP) resistance in Escherichia coli due to hyperproduction of TEM-1 β -lactamase mediated by the promoter Pa/Pb. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 1–6, 2019.

APÊNDICES

Apêndice 1. Quadro apresentando os valores do tamanho médio dos *reads*, número (nº) de *reads* analisados, nº de bases sequenciadas (Gb) e *Quality score* (*Q-score*) médio dos sequenciamentos realizados para cada isolado bacteriano via *Oxford Nanopore Technology* (ONT) com 20 e 48h de sequenciamento e via *Illumina Technology* (IT)

Isolado	Sequenciamento	Tamanho médio dos <i>reads</i>	Nº de <i>reads</i> analisados	Nº de bases sequenciadas (Gb)	<i>Q-score</i> médio
MRSA_01	ONT 20h	3869	375063	1,4	13,1
	ONT 48h	3858	573267	2,21	11,6
	IT	152	1754542		
MRSA_02	ONT 20h	1328	343980	0,456	11,9
	ONT 48h	1263	646435	0,817	10,5
	IT	157	939052		
MRSA_03	ONT 20h	2374	281897	0,669	12,3
	ONT 48h	2286	394129	0,901	11,2
	IT	161	1140438		
MRSA_04	ONT 20h	1962	202473	0,397	13,6
	ONT 48h	1956	308839	0,604	12
	IT	155	1042266		
MRSA_05	ONT 20h	1524	271438	0,414	11,9
	ONT 48h	1451	495348	0,718	10,7
	IT	240	1397759		
MRSA_06	ONT 20h	2222	355173	0,789	11,7
	ONT 48h	2101	689164	1,44	10,3
	IT	219	1653672		
MRSA_07	ONT 20h	2393	387687	0,928	12,32
	ONT 48h	2314	536596	1,24	11,2
	IT	200	1711446		
MRSA_08	ONT 20h	3715	259388	0,963	11,7
	ONT 48h	3545	497725	1,76	10,5
	IT	158	1568694		
MRSA_09	ONT 20h	4061	558430	2,2	11,8
	ONT 48h	3886	1095744	4,25	10,5
	IT	200	1454580		
MRSA_10	ONT 20h	3383	310661	1	12,7
	ONT 48h	3383	470819	1,59	10,9
	IT	128	1326662		
MRSA_11	ONT 20h	3181	110745	0,352	11,7
	ONT 48h	3098	216997	0,672	10,5

	IT	209	1779820		
MRSA_12	ONT 20h	2520	187923	0,473	12,9
	ONT 48h	2523	274607	0,692	11,2
	IT	129	2196378		
MRSA_13	ONT 20h	5959	185714	1,1	13,4
	ONT 48h	6008	217441	1,3	12
	IT	209	1628272		
MRSA_14	ONT 20h	2764	149504	0,413	13,3
	ONT 48h	2763	174381	0,487	11,8
	IT	218	1382044		
MRSA_15	ONT 20h	1880	189497	0,356	12,35
	ONT 48h	1779	265153	0,471	11,2
	IT	206	1505182		
MRSA_16	ONT 20h	6097	459081	2,7	13,5
	ONT 48h	6048	883811	5,34	11,7
	IT	202	1822354		
MRSA_17	ONT 20h	4777	319204	1,5	12,8
	ONT 48h	4066	472850	1,92	11,2
	IT	190	1206720		
MRSA_18	ONT 20h	4172	337536	1,4	12,4
	ONT 48h	4755	489413	2,32	11,1
	IT	213	1364524		
MRSA_19	ONT 20h	3467	289439	1	13,6
	ONT 48h	3521	546204	1,92	11,9
	IT	212	1736968		
MRSA_20	ONT 20h	3833	203478	0,78	12,7
	ONT 48h	3826	307739	1,17	10,9
	IT	205	1116512		
MRSA_21	ONT 20h	3458	362110	1,2	12,8
	ONT 48h	3454	540867	1,86	11
	IT	201	1715146		
MRSA_22	ONT 20h	5040	150883	0,76	13,4
	ONT 48h	5051	176225	0,89	11,9
	IT	231	1681230		
MRSA_23	ONT 20h	3674	169465	0,622	13,3
	ONT 48h	3690	199735	0,737	11,7
	IT	221	1463374		
MRSA_24	ONT 20h	4665	152432	0,711	13,4
	ONT 48h	4697	214092	1	11,9
	IT	229	1671346		
MRSA_25	ONT 20h	5234	149649	0,783	13,4
	ONT 48h	5250	205691	1,07	11,9
	IT	232	1309892		
MRSA_26	ONT 20h	5944	250146	1,4	13,2
	ONT 48h	5996	353984	2,12	11,7

	IT	222	1585422		
MRSA_27	ONT 20h	5403	228273	1,2	13,3
	ONT 48h	5424	314485	1,7	11,8
	IT	244	1119728		
MRSA_28	ONT 20h	6008	222342	1,3	13,4
	ONT 48h	6013	309808	1,86	11,9
	IT	255	1269168		
MRSA_29	ONT 20h	3772	448882	1,7	13,3
	ONT 48h	3771	718085	2,7	11,7
	IT	233	1238678		
MRSA_30	ONT 20h	4618	294540	1,3	13,5
	ONT 48h	4620	463757	2,14	12
	IT	219	1415030		
MRSA_31	ONT 20h	6370	278437	1,7	13,5
	ONT 48h	6367	445495	2,83	11,8
	IT	210	1238686		
MRSA_32	ONT 20h	2170	232323	0,504	13,6
	ONT 48h	2162	356195	0,77	11,9
	IT	204	1933856		
MRSA_33	ONT 20h	3940	90521	0,356	13,3
	ONT 48h	3950	105003	0,414	11,8
	IT	230	1709504		
MRSA_34	ONT 20h	8468	158779	1,3	13,4
	ONT 48h	8421	250910	2,11	11,7
	IT	194	2120956		
MRSA_35	ONT 20h	4445	264142	1,1	13,5
	ONT 48h	4448	499991	2,22	11,7
	IT	218	1669562		
MRSA_36	ONT 20h	4318	285407	1,2	13,5
	ONT 48h	4304	544303	2,34	11,6
	IT	227	1393224		
MRSA_37	ONT 20h	5303	194251	1	13,6
	ONT 48h	5351	360746	1,93	11,9
	IT	220	1031474		
MRSA_38	ONT 20h	4041	262256	1	13,4
	ONT 48h	4017	493300	1,98	11,5
	IT	220	1058394		
MRSA_39	ONT 20h	2544	318509	0,81	12,35
	ONT 48h	2452	450253	1,1	11,1
	IT	238	1365038		
MRSA_40	ONT 20h	3551	434669	1,5	13,1
	ONT 48h	3546	665541	2,36	11,6
	IT	230	1136686		
MRSA_41	ONT 20h	3575	384704	1,3	13,2
	ONT 48h	3582	587427	2,1	11,7

	IT	213	1164138		
MRSA_42	ONT 20h	3044	137974	0,42	13,4
	ONT 48h	3065	183909	0,563	11,8
	IT	236	1713648		
Kp_01	ONT 20h	6328	64000	0,405	11,8
	ONT 48h	6140	91607	0,562	10,5
	IT	231,9	2031126		
Kp_02	ONT 20h	7630	127381	0,972	12,65
	ONT 48h	7729	184206	1,42	11,4
	IT	229,6	1879116		
Kp_03	ONT 20h	8146	108000	0,879	12
	ONT 48h	7948	146906	1,16	10,8
	IT	192,3	2356684		
Kp_04	ONT 20h	7312	60000	0,438	11,9
	ONT 48h	7059	86546	0,61	10,6
	IT	186,6	1919262		
Kp_05	ONT 20h	7584	232000	1,76	12
	ONT 48h	7402	308658	2,28	10,8
	IT	186,6	2435748		
Kp_06	ONT 20h	4967	96000	0,476	11,8
	ONT 48h	4925	137165	0,675	10,5
	IT	196,5	1718698		

Apêndice 2. Quadro apresentando os valores do tamanho do genoma montado, número (nº) de contigs, tamanho do maior contig, porcentagem (%) GC, N50, L50 e cobertura dos genomas de cada isolado bacteriano obtidos por meio de diferentes protocolos de sequenciamento/montagem

Isolado	Protocolo	Tamanho montado	Nº de contigs	Maior contig	GC (%)	N50	L50	Cobertura
MRSA_01	ONT20h	2973236	3	2894099	32.75	2894099	1	451
	ONT48hA	3105125	19	2919818	32.72	2919818	1	712
	ONT48hB	2973234	3	2894095	32.75	2894095	1	672
	IT	2940227	184	384588	32.66	132375	14	90
	Híbrido	2916956	6	2790827	32.78	2790827	1	
MRSA_02	ONT20h	2956724	3	2890938	32.79	2890938	1	140
	ONT48hA	3019190	10	2891349	32.79	2891349	1	270
	ONT48hB	2956626	3	2890982	32.79	2890982	1	241
	IT	2931855	72	649475	32.67	291262	7	50
	Híbrido	2956471	8	2858412	32.79	2858412	1	
MRSA_03	ONT20h	2956981	3	2891212	32.78	2891212	1	203
	ONT48hA	2960014	2	2905725	32.79	2905725	1	304
	ONT48hB	2984308	3	2891229	32.73	2891229	1	266
	IT	2934750	75	682262	32.67	291262	7	62
	Híbrido	2958384	4	2891204	32.78	2891204	1	
MRSA_04	ONT20h	2880147	1	2880147	32.87	2880147	1	137
	ONT48hA	3055526	52	2880904	32.88	2880904	1	198
	ONT48hB	2880252	1	2880252	32.87	2880252	1	200
	IT	2859106	60	118004	32.80	47762	41	56
	Híbrido	2879684	2	2878320	32.87	2878320	1	
MRSA_05	ONT20h	2888247	2	2860868	32.82	2860868	1	135
	ONT48hA	2909778	3	2853521	32.83	2853521	1	247
	ONT48hB	2888288	2	2860909	32.82	2860909	1	232
	IT	2903284	234	215338	32.75	94681	22	115
	Híbrido	2888473	2	2861082	32.82	2861082	1	
MRSA_06	ONT20h	2890049	2	2862670	32.82	2862670	1	247
	ONT48hA	2941192	6	2869625	32.84	2869625	1	492
	ONT48hB	2917467	2	2862708	32.77	2862708	1	436
	IT	2873270	75	998437	32.71	618288	4	126
	Híbrido	2891663	3	2862908	32.82	2862908	1	
MRSA_07	ONT20h	2890310	2	2862919	32.82	2862919	1	296
	ONT48hA	2952337	7	2880192	32.80	2880192	1	421
	ONT48hB	2890289	2	2862897	32.82	2862897	1	399
	IT	2929472	337	178675	32.73	59043	30	116
	Híbrido	2891667	3	2862912	32.82	2862912	1	

MRSA_08	ONT20h	2917394	2	2862658	32.77	2862658	1	325
	ONT48hA	2943708	3	2887456	32.82	2887456	1	599
	ONT48hB	2917466	2	2862704	32.77	2862704	1	579
	IT	2900373	214	246773	32.70	77935	24	85
	Híbrido	2890314	2	2862923	32.82	2862923	1	
MRSA_09	ONT20h	2880026	1	2880026	32.87	2880026	1	772
	ONT48hA	2951137	9	2917972	32.89	2917972	1	1443
	ONT48hB	2880072	1	2880072	32.87	2880072	1	1429
	IT	2902220	271	164139	32.77	73991	25	100
	Híbrido	2881604	2	2880240	32.87	2880240	1	
MRSA_10	ONT20h	2864901	2	2837506	32.79	2837506	1	346
	ONT48hA	2909215	2	2854668	32.75	2854668	1	547
	ONT48hB	2864791	2	2837396	32.78	2837396	1	523
	IT	2845359	82	749973	32.66	211267	7	59
	Híbrido	2864744	2	2837353	32.78	2837353	1	
MRSA_11	ONT20h	2864451	2	2837072	32.79	2837072	1	120
	ONT48hA	2901754	3	2845636	32.79	2845636	1	232
	ONT48hB	2864508	2	2837128	32.78	2837128	1	214
	IT	2849048	81	749843	32.68	304963	5	130
	Híbrido	2864740	2	2837349	32.78	2837349	1	
MRSA_12	ONT20h	2868102	3	2838960	32.78	2838960	1	157
	ONT48hA	3000655	5	2834333	32.56	2834333	1	231
	ONT48hB	2893757	2	2838957	32.73	2838957	1	226
	IT	2846383	78	831076	32.65	283474	6	99
	Híbrido	2865928	2	2838528	32.78	2838528	1	
MRSA_13	ONT20h	2832763	2	2795580	32.81	2795580	1	345
	ONT48hA	2940613	2	2836262	32.78	2836262	1	444
	ONT48hB	2869956	2	2795581	32.78	2795581	1	420
	IT	2845650	360	329005	32.80	127544	13	119
	Híbrido	2835913	3	2795359	32.80	2795359	1	
MRSA_14	ONT20h	2837691	3	2801525	32.79	2801525	1	142
	ONT48hA	2886478	2	2819281	32.80	2819281	1	167
	ONT48hB	2837402	3	2801499	32.79	2801499	1	163
	IT	2861581	421	127572	32.75	43162	43	105
	Híbrido	2838459	2	2801535	32.79	2801535	1	
MRSA_15	ONT20h	2837976	3	2801816	32.81	2801816	1	115
	ONT48hA	2848059	4	2448103	32.87	2448103	1	166
	ONT48hB	2837991	3	2801833	32.81	2801833	1	157
	IT	2870257	615	174067	32.86	76731	27	108
	Híbrido	2839396	2	2800987	32.81	2800987	1	
MR	ONT20h	2881599	1	2881599	32.87	2881599	1	946
	ONT48hA	2991005	4	2942103	32.82	2942103	1	1787

	ONT48hB	2881594	1	2881594	32.87	2881594	1	804
	IT	2893922	230	176739	32.79	65424	29	127
	Híbrido	2860309	1	2860309	32.86	2860309	1	
MRSA_17	ONT20h	2899498	4	2868485	32.83	2868485	1	500
	ONT48hA	3103000	4	2923992	32.68	2923992	1	620
	ONT48hB	2899427	4	2868469	32.83	2868469	1	283
	IT	2884549	385	196420	32.91	73501	30	79
	Híbrido	2888572	2	2854867	32.82	2854867	1	
MRSA_18	ONT20h	2938146	2	2870740	32.77	2870740	1	466
	ONT48hA	3068200	4	2934942	32.76	2934942	1	758
	ONT48hB	2938174	2	2870756	32.77	2870756	1	568
	IT	2949312	234	280564	32.73	74320	23	98
	Híbrido	2903083	3	2868335	32.82	2868335	1	
MRSA_19	ONT20h	2937772	3	2892636	32.84	2892636	1	295
	ONT48hA	3420647	55	2921708	32.51	2921708	1	562
	ONT48hB	2938174	2	2870756	32.77	2870756	1	559
	IT	2979324	540	243608	32.82	48200	33	123
	Híbrido	2934129	3	2892532	32.85	2892532	1	
MRSA_20	ONT20h	2786273	1	2786273	32.88	2786273	1	273
	ONT48hA	2814962	1	2814962	32.92	2814962	1	418
	ONT48hB	2786293	1	2786293	32.88	2786293	1	404
	IT	2785496	237	244755	32.79	67817	28	82
	Híbrido	2789113	2	2786061	32.87	2786061	1	
MRSA_21	ONT20h	2836026	1	2836026	32.85	2836026	1	431
	ONT48hA	2859214	1	2859214	32.89	2859214	1	653
	ONT48hB	2836058	1	2836058	32.85	2836058	1	637
	IT	2866481	391	124043	32.78	39436	43	120
	Híbrido	2835971	1	2835971	32.85	2835971	1	
MRSA_22	ONT20h	2812733	2	2762615	32.79	2762615	1	255
	ONT48hA	2843582	2	2793744	32.81	2793744	1	313
	ONT48hB	2812750	2	2762630	32.79	2762630	1	299
	IT	2757637	50	1062250	32.71	290108	6	140
	Híbrido	2787669	2	2762609	32.82	2762609	1	
MRSA_23	ONT20h	2785883	2	2760824	32.82	2760824	1	219
	ONT48hA	2829556	2	2780525	32.80	2780525	1	260
	ONT48hB	2810939	2	2760822	32.79	2760822	1	248
	IT	2756531	47	1062513	32.71	598499	4	117
	Híbrido	2785870	2	2760810	32.82	2760810	1	
MRSA_24	ONT20h	2806911	1	2806911	32.90	2806911	1	237
	ONT48hA	2988939	23	2863972	32.76	2863972	1	336
	ONT48hB	2806903	1	2806903	32.90	2806903	1	212
	IT	2780671	48	804685	32.78	725170	4	137

	Híbrido	2809316	2	2806918	32.89	2806918	1	
MRSA_25	ONT20h	2832022	2	2806961	32.86	2806961	1	253
	ONT48hA	2928320	6	2844203	32.81	2844203	1	369
	ONT48hB	2832020	2	2806958	32.86	2806958	1	343
	IT	2807739	52	804684	32.76	725170	4	108
	Híbrido	2834429	3	2806970	32.85	2806970	1	
MRSA_26	ONT20h	2806985	1	2806985	32.90	2806985	1	523
	ONT48hA	2959652	6	2869343	32.82	2869343	1	717
	ONT48hB	2806977	1	2806977	32.90	2806977	1	739
	IT	2805574	50	780700	32.74	725170	4	125
	Híbrido	2834431	3	2806972	32.85	2806972	1	
MRSA_27	ONT20h	2802092	1	2802092	32.89	2802092	1	451
	ONT48hA	2839227	2	2835541	32.92	2835541	1	601
	ONT48hB	2802085	1	2802085	32.89	2802085	1	608
	IT	2776401	43	1044241	32.78	718613	4	98
	Híbrido	2802097	1	2802097	32.88	2802097	1	
MRSA_28	ONT20h	2817167	1	2817167	32.88	2817167	1	464
	ONT48hA	2910001	3	2858715	32.96	2858715	1	640
	ONT48hB	2817160	1	2817160	32.88	2817160	1	640
	IT	2854218	372	161401	32.83	52640	36	113
	Híbrido	2817165	1	2817165	32.88	2817165	1	
MRSA_29	ONT20h	2854691	3	2799352	32.84	2799352	1	513
	ONT48hA	2920725	7	2831418	32.81	2831418	1	927
	ONT48hB	2799362	1	2799362	32.89	2799362	1	800
	IT	2884866	474	122452	32.79	38590	47	100
	Híbrido	2826800	3	2799343	32.85	2799343	1	
MRSA_30	ONT20h	2824431	2	2799370	32.85	2799370	1	405
	ONT48hA	2937322	8	2833088	32.78	2833088	1	729
	ONT48hB	2799365	1	2799365	32.89	2799365	1	615
	IT	2799832	50	1059946	32.74	601153	4	110
	Híbrido	2826801	3	2799344	32.85	2799344	1	
MRSA_31	ONT20h	2782358	1	2782358	32.87	2782358	1	591
	ONT48hA	2886151	4	2824249	32.83	2824249	1	983
	ONT48hB	2782335	1	2782335	32.87	2782335	1	930
	IT	2865776	475	140605	32.73	38717	42	90
	Híbrido	2809436	2	2782170	32.81	2782170	1	
MRSA_32	ONT20h	2788511	2	2761245	32.81	2761245	1	169
	ONT48hA	2825140	3	2766682	32.78	2766682	1	273
	ONT48hB	2815761	2	2761227	32.75	2761227	1	252
	IT	2765189	47	766322	32.71	630294	4	142
	Híbrido	2788497	2	2761231	32.81	2761231	1	
MRSA_33	ONT20h	2863301	2	2836028	32.81	2836028	1	117

	ONT48hA	2988592	5	2851195	32.63	2851195	1	139
	ONT48hB	2890566	2	2836022	32.76	2836022	1	138
	IT	2835842	52	811118	32.70	421833	5	138
	Híbrido	2863231	2	2835960	32.81	2835960	1	
MRSA_34	ONT20h	2822120	1	2822120	32.87	2822120	1	448
	ONT48hA	2941402	3	2881148	32.79	2881148	1	718
	ONT48hB	2821967	1	2821967	32.87	2821967	1	651
	IT	2824850	61	811583	32.71	250038	6	145
	Híbrido	2848877	4	2624440	32.82	2624440	1	
MRSA_35	ONT20h	2845621	2	2818359	32.80	2818359	1	404
	ONT48hA	2952076	4	2865241	32.74	2865241	1	753
	ONT48hB	2845624	2	2818356	32.80	2818356	1	730
	IT	2889928	400	164302	32.73	53303	39	125
	Híbrido	2845561	2	2818296	32.80	2818296	1	
MRSA_36	ONT20h	2845609	2	2818344	32.80	2818344	1	415
	ONT48hA	3004038	8	2850926	32.64	2850926	1	780
	ONT48hB	2872882	2	2818349	32.75	2818349	1	771
	IT	2880300	369	157452	32.72	52166	34	109
	Híbrido	2845559	2	2818294	32.80	2818294	1	
MRSA_37	ONT20h	2859500	2	2805001	32.76	2805001	1	366
	ONT48hA	2926857	4	2840640	32.72	2840640	1	660
	ONT48hB	2805018	1	2805018	32.87	2805018	1	652
	IT	2818343	246	319847	32.71	117904	15	80
	Híbrido	2832221	2	2804956	32.81	2804956	1	
MRSA_38	ONT20h	2845598	2	2818333	32.80	2818333	1	365
	ONT48hA	2948097	4	2857059	32.70	2857059	1	672
	ONT48hB	2845604	2	2818341	32.80	2818341	1	664
	IT	2849014	220	205805	32.70	59017	30	81
	Híbrido	2845550	2	2818285	32.80	2818285	1	
MRSA_39	ONT20h	2815927	1	2815927	32.83	2815927	1	274
	ONT48hA	2862846	7	2832411	32.83	2832411	1	386
	ONT48hB	2815934	1	2815934	32.83	2815934	1	372
	IT	2965740	934	69330	32.79	18017	101	109
	Híbrido	2819158	2	2815826	32.82	2815826	1	
MRSA_40	ONT20h	2831485	1	2831485	32.84	2831485	1	540
	ONT48hA	3043106	35	2860549	32.69	2860549	1	776
	ONT48hB	2831458	1	2831458	32.84	2831458	1	795
	IT	2803588	172	337224	32.73	96949	16	93
	Híbrido	2829658	2	2826326	32.84	2826326	1	
MRSA	ONT20h	2818510	1	2818510	32.82	2818510	1	464
	ONT48hA	3202206	72	2843634	32.49	2843634	1	657
	ONT48hB	2818481	1	2818481	32.82	2818481	1	710

	IT	2785779	124	269641	32.71	76417	22	89
	Híbrido	2824786	3	2818010	32.81	2818010	1	
MRSA_42	ONT20h	2829428	4	2825710	32.83	2825710	1	147
	ONT48hA	3030220	49	2836203	32.65	2836203	1	186
	ONT48hB	2825663	1	2825663	32.84	2825663	1	193
	IT	2821665	218	385103	32.79	171275	10	143
	Híbrido	2828240	3	2713309	32.83	2713309	1	
Kp_01	ONT20h	5497569	2	5275553	57.24	5275553	1	71
	ONT48hB	5497931	2	5275899	57.24	5275899	1	96
	IT	5117306	1	5117306	57.70	5117306	1	86
Kp_02	ONT20h	5588684	2	5321936	57.14	5321936	1	170
	ONT48hB	5497936	2	5275916	57.24	5275916	1	255
	IT	5115219	1	5115219	57.73	5115219	1	78
Kp_03	ONT20h	5352345	3	5213720	57.43	5213720	1	161
	ONT48hB	5338690	2	5213945	57.45	5213945	1	206
	IT	5072626	1	5072626	58.10	5072626	1	85
Kp_04	ONT20h	5351997	3	5213393	57.43	5213393	1	80
	ONT48hB	5338190	2	5213441	57.45	5213441	1	108
	IT	5096305	1	5096305	57.92	5096305	1	67
Kp_05	ONT20h	5352323	3	5213700	57.43	5213700	1	320
	ONT48hB	5338387	2	5213632	57.45	5213632	1	401
	IT	5096509	1	5096509	57.88	5096509	1	85
Kp_06	ONT20h	5351922	3	5213370	57.43	5213370	1	86
	ONT48hB	5338231	2	5213475	57.45	5213475	1	118
	IT	5062603	1	5062603	57.92	5062603	1	63

Apêndice 3. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *ResFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo ONT20h

ISOLADO	GENE										
	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>tet(M)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>msr(A)</i>	<i>mph(C)</i>	<i>dfpG</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>aph(3')-III</i>
MRSA_01	A	A	B								
MRSA_02	B	B	B								
MRSA_03	A	A	B								
MRSA_04	A		B								
MRSA_05	A	A	B								
MRSA_06	C	A	C								
MRSA_07	A	A	B								
MRSA_08	A	A	C								
MRSA_09	B		B								
MRSA_10	A	A	B								
MRSA_11	A	A	C								
MRSA_12	A	A	B								
MRSA_13	A	B									
MRSA_14	A	B		B							
MRSA_15	A	B									
MRSA_16	A	B									
MRSA_17	A	A		B							
MRSA_18	A	A		B							
MRSA_19	A	B			B						
MRSA_20	A			B							
MRSA_21	A	B		B							
MRSA_22	A	A									
MRSA_23	A	A									
MRSA_24	A										
MRSA_25	A	A									
MRSA_26	A										
MRSA_27	A										
MRSA_28	A										
MRSA_29	A	A									
MRSA_30	A	A									
MRSA_31	A					A					
MRSA_32	A	A				A					
MRSA_33	A	A									
MRSA_34	A										
MRSA_35	A	A									
MRSA_36	A	A									
MRSA_37	A	A									
MRSA_38	A	A									
MRSA_39	A	A				A	C	A	A	C	A
MRSA_40	A	A				A	C	A	A	C	A
MRSA_41	A	A				A	B	A	A	C	A
MRSA_42	A	A				A	C	A	A	C	A

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 4. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *ResFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT48hA

ISOLADO	GENE										
	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>tet(M)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>msr(A)</i>	<i>mph(C)</i>	<i>dfp-G</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>aph(3')-III</i>
MRSA_01	B	B	B								
MRSA_02	B	B	B								
MRSA_03	B	B	B								
MRSA_04	B		B								
MRSA_05	B	B	B								
MRSA_06	B	B	B								
MRSA_07	B	B	B								
MRSA_08	B	B	B								
MRSA_09	B		B								
MRSA_10	B	B	B								
MRSA_11	B	B	B								
MRSA_12	B	B	B								
MRSA_13	B	B									
MRSA_14	B	B		B							
MRSA_15	B	B									
MRSA_16	B	B			B						
MRSA_17	B	B		B							
MRSA_18	B	B		B							
MRSA_19	B	B			B						
MRSA_20	B			B							
MRSA_21	B	B		B							
MRSA_22	B	B									
MRSA_23	B	B									
MRSA_24	B										
MRSA_25	B	B									
MRSA_26	B	B									
MRSA_27	B										
MRSA_28	B										
MRSA_29	B	B									
MRSA_30	B	B									
MRSA_31	B	B				B					
MRSA_32	B	B				B					
MRSA_33	B	B									
MRSA_34	B	B									
MRSA_35	B	B			B						
MRSA_36	B	B			B						
MRSA_37	B	B			B						
MRSA_38	B	B			B						
MRSA_39	B	B				B	B	A	B	C	B
MRSA_40	B	B				B	B	A	B	C	B
MRSA_41	B	B				B	B	A	B	C	B
MRSA_42	B	B				B	B	B	A	C	B

- A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 5. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *ResFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT48hB

ISOLADO	GENE									
	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>tet(M)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>msr(A)</i>	<i>mph(C)</i>	<i>dfpG</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>aph(3')-III</i>
MRSA_01	A	A	B							
MRSA_02	A	B	B							
MRSA_03	A	A	B							
MRSA_04	A		B							
MRSA_05	B	A	C							
MRSA_06	A	A	C							
MRSA_07	A	A	B							
MRSA_08	A	B	C							
MRSA_09	B		B							
MRSA_10	A	A	C							
MRSA_11	A	A	C							
MRSA_12	A	A	B							
MRSA_13	A	B								
MRSA_14	A	B		B						
MRSA_15	A	B								
MRSA_16	A	B								
MRSA_17	A	A		B						
MRSA_18	A	A		B						
MRSA_19	A	B								
MRSA_20	A			B						
MRSA_21	A	B		B						
MRSA_22	A	A								
MRSA_23	A	A								
MRSA_24	A									
MRSA_25	A	A								
MRSA_26	A									
MRSA_27	A									
MRSA_28	A									
MRSA_29	A									
MRSA_30	A									
MRSA_31	A				A					
MRSA_32	A	A			A					
MRSA_33	A	A								
MRSA_34	A									
MRSA_35	A	A								
MRSA_36	A	A								
MRSA_37	A									
MRSA_38	A	A								
MRSA_39	A	A			A	C	A	A	C	A
MRSA_40	A	A			A	C	A	A	C	A
MRSA_41	A	A			A	B	A	A	C	A
MRSA_42	A	A			A	B	A	A	C	A

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 6. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *ResFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo IT

ISOLADO	GENE										
	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>tet(M)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>aac(6)-aph(2'')</i>	<i>mst(A)</i>	<i>mph(C)</i>	<i>dfg</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>aph(3')-III</i>
MRSA_01	A	A	B								
MRSA_02	A	A	B								
MRSA_03	A	A	B								
MRSA_04	A		B								
MRSA_05	A	A	C								
MRSA_06	A	A	B								
MRSA_07	A	A	B								
MRSA_08	A	A	B								
MRSA_09	A		B								
MRSA_10	A	A	B								
MRSA_11	A	A	B								
MRSA_12	A	A	B								
MRSA_13	A	B									
MRSA_14	A	B		B							
MRSA_15	A	B									
MRSA_16	A	B									
MRSA_17	A	A		B							
MRSA_18	A	A		B							
MRSA_19	A	B			A						
MRSA_20	A			B							
MRSA_21	A	B		B							
MRSA_22	A	A									
MRSA_23	A	A									
MRSA_24	A										
MRSA_25	A	A									
MRSA_26	A	A									
MRSA_27	A										
MRSA_28	A										
MRSA_29	A	A									
MRSA_30	A	A									
MRSA_31	A	A				A					
MRSA_32	A	A				A					
MRSA_33	A	A									
MRSA_34	A	A									
MRSA_35	A	A									
MRSA_36	A	A									
MRSA_37	A	A									
MRSA_38	A	A									
MRSA_39	A	A				A	B	A	A	C	A
MRSA_40	A	C				A	B	A	A	C	A
MRSA_41	A	B				A	B	A	A	C	A
MRSA_42	A	A				A	B	A	A	C	A

- A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 7. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *ResFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo Híbrido

ISOLADO	GENE											
	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>tet(M)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>msr(A)</i>	<i>mph(C)</i>	<i>dfpG</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>aph(3')-III</i>	<i>aph(2'')-Ia</i>
MRSA_01	A	A	B									
MRSA_02	A	A	B									
MRSA_03	A	A	B									
MRSA_04	A		B									
MRSA_05	A	A	B									
MRSA_06	A	A	B									
MRSA_07	A	A	B									
MRSA_08	A	A	B									
MRSA_09	A		B									
MRSA_10	A	A	B									
MRSA_11	A	A	B									
MRSA_12	A	A	B									
MRSA_13	A	B										
MRSA_14	A	B		B								
MRSA_15	A	B										
MRSA_16	A	B										
MRSA_17	A	A		B								
MRSA_18	A	A		B								
MRSA_19	A	B			A							
MRSA_20	A			B								
MRSA_21	A	B		B								
MRSA_22	A	A										
MRSA_23	A	A										
MRSA_24	A											
MRSA_25	A	A										
MRSA_26	A	A										
MRSA_27	A											
MRSA_28	A											
MRSA_29	A	A										
MRSA_30	A	A										
MRSA_31	A	A				A						
MRSA_32	A	A				A						
MRSA_33	A	A										
MRSA_34	A	A										
MRSA_35	A	A										
MRSA_36	A	A										
MRSA_37	A	A										
MRSA_38	A	A										
MRSA_39	A	A				C	B	A	A	C	A	C
MRSA_40	A	A					B	A	A	C	A	
MRSA_41	A	B				C	B	A		C	A	
MRSA_42	A	A				A	B	A	A	C	A	

- A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 8. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *CARD-RGI* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo ONT20h

ISOLADO	GENE																						
	<i>arIR</i>	<i>arIS</i>	<i>dfcC</i>	<i>mecA</i>	<i>mepA</i>	<i>mepR</i>	<i>mgrA</i>	<i>blaZ</i>	<i>fosB</i>	<i>LmrS</i>	<i>murA</i>	<i>norA</i>	<i>tet(W/N/W)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>InuA</i>	<i>fusA</i>	<i>AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>APH(3')-IIIa</i>	<i>mphC</i>	<i>dfcG</i>	<i>msrA</i>
MRSA_01	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										
MRSA_02	A	A			A	A	A		A	A	B	B	C										
MRSA_03	A	A		B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										
MRSA_04	A	A	B	B	A	A	A		A	A	B	B		B									
MRSA_05	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										
MRSA_06	A	A	B		A	A	A	B	A	A	B	B											
MRSA_07	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										
MRSA_08	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B											
MRSA_09	A	A	B		A	A	A		A	A	B	B	C										
MRSA_10	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										
MRSA_11	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										
MRSA_12	A	A	B	B	A	A	A	B	A	C	B	B	C										
MRSA_13	A	A		B		A		B		B		B											
MRSA_14	A	A		B		A	A	B		C		B			B								
MRSA_15	A		B	B		A	A	B		C		B											
MRSA_16	A	A	B	B		A	A	B		B		B											
MRSA_17	A			B		A	A	B		C		B			B								
MRSA_18	A	A		B		A	A	B		B		B			B								
MRSA_19	A	A	B	B		A	A	B		C		B											
MRSA_20	A	A		B		A	A			B		B			B								
MRSA_21	A	A		B		A	A	B		B		B			B								
MRSA_22	A	A		B		A	A	A	A	B		A											
MRSA_23	A	A		B		A	A	A	A	B		A											
MRSA_24	A	A	B	B		A	A		A	B		A											
MRSA_25	A	A	B	B		A	A	A	A	B		A											
MRSA_26	A		B	B		A	A		A	B		A											
MRSA_27	A	A		B		A	A		A	B		A				B							
MRSA_28	A	A		B		A	A		A	B		A				B							
MRSA_29	A	A		B		A	A	A	A	B		A											
MRSA_30	A	A		B		A	A	A	A	B		A											
MRSA_31	A	A		B		A	A		A	B		A					A						
MRSA_32	A	A		B		A	A	B	A	B		A					A						
MRSA_33	A	A		B		A	A	B	A	B		A											
MRSA_34	A			B		A	A		A	B		A											
MRSA_35	A	A		B		A	A	B	A	B		A						C	B				
MRSA_36	A	A		B		A	A	B	A	B		A						C	B				
MRSA_37	A	A		B		A	A	B	A	B		A						C	B				
MRSA_38	A	A		B		A	A	B	A	B		A						C	B				
MRSA_39	A	A		B		A	A	B	A	B		B					A		B	A	B	A	
MRSA_40	A	A		B		A	A	B	A	B		B					A	C	B	A	B	A	
MRSA_41	A	A		B		A	A	B	A	B		B					A	C	B	A	B	A	B
MRSA_42	A	A		B		A	A	B	A	C		B					A	C	B	A	B	A	

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 9. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *CARD-RGI* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo ONT48hA

ISOLADO	GENE												
	<i>arIR</i>	<i>mepA</i>	<i>mepR</i>	<i>mgrA</i>	<i>fosB</i>	<i>LmrS</i>	<i>murA</i>	<i>norA</i>	<i>fusA</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>mphC</i>	<i>dfrG</i>
MRSA_01	A	A	A	A		C	B						
MRSA_02	A	A	A	A		C	B						
MRSA_03	A	A	A	A		A	B						
MRSA_04	A	A	A	A		C	B						
MRSA_05	A	A	A	A		C	B						
MRSA_06	A	A	A	A		C	B						
MRSA_07	A	A	A	A		C	B	C					
MRSA_08	A	A	A	A		C	B						
MRSA_09	A	A	A	A		C	C						
MRSA_10	A	A	A	A		A	B						
MRSA_11	A	A	A	A		C	B						
MRSA_12	A	A	A	A		C	B						
MRSA_13	A		A	A		B							
MRSA_14	A		A	A		B							
MRSA_15	A		A	A		C							
MRSA_16	A		A	A		C							
MRSA_17	A		A	A		C							
MRSA_18	A		A	A		B							
MRSA_19	A		A	A		C		C					
MRSA_20	A		A	A		B							
MRSA_21	A		A	A		B							
MRSA_22	A		A	A		B		A					
MRSA_23	A		A	A		B							
MRSA_24	A		A	A		C							
MRSA_25	A		A	A		C							
MRSA_26	A		A	A		C							
MRSA_27	A		A	A		C			C				
MRSA_28	A		A	A		C			C				
MRSA_29	A		A	A	A	C							
MRSA_30	A		A	A		C		C					
MRSA_31	A		A	A	A	C		C					
MRSA_32	A		A	A	A	C							
MRSA_33	A		A	A	A	C							
MRSA_34	A		A	A		C							
MRSA_35	A		A	A		C				C	C		
MRSA_36	A		A	A	A	C				C	C		
MRSA_37	A		A	A		C		C		C	C		
MRSA_38	A		A	A		C				C	C		
MRSA_39	A		A	A		C					C	B	C
MRSA_40	A		A	A		C				C	C	B	C
MRSA_41	A		A	A	A	C				C	C	B	C
MRSA_42	A		A	A		C				C	C		A

- A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 10. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *CARD-RGI* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo ONT48hB

ISOLADO	GENE																									
	<i>arR</i>	<i>arS</i>	<i>dfcC</i>	<i>mecA</i>	<i>mepA</i>	<i>mepR</i>	<i>mgrA</i>	<i>blaZ</i>	<i>fosB</i>	<i>LmrS</i>	<i>murA</i>	<i>norA</i>	<i>tet(M)</i>	<i>lmuA</i>	<i>fusA</i>	<i>AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>APH(3)-IIIa</i>	<i>mphC</i>	<i>dfgG</i>	<i>msrA</i>	<i>sdrM</i>	<i>vanT</i>	<i>norC</i>	<i>sepA</i>
MRSA_01	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										A	C	B	B
MRSA_02	A	A		B	A	A	A		A	A	B	B	C										A	C	B	C
MRSA_03	A	A		B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										A	C	B	B
MRSA_04	A	A	B	B	A	A	A		A	A	B	B	B										A	C	B	B
MRSA_05	A	A	B		A	A	A	B	A	A	B	B	C										A	C	B	B
MRSA_06	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										A	C	B	C
MRSA_07	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										A	C	B	B
MRSA_08	A	A	B	B	A	A	A		A	A	B	B	C										A		B	C
MRSA_09	A	A	B		A	A	A		A	A	B	B	C										A	C	B	B
MRSA_10	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										A	C	B	B
MRSA_11	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										A	C	B	B
MRSA_12	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	C										A	C	B	C
MRSA_13	A	A		B		A	B	B		B		B											B	C	B	C
MRSA_14	A	A		B		A	A	B		C		B		B									C	C	B	C
MRSA_15	A		B	B		A	A	B		C		B											B	C	B	C
MRSA_16	A	A	B	B		A	A	B		B		B											C	C	B	C
MRSA_17	A			B		A	A	B		C		B		B									C	C	B	C
MRSA_18	A	A		B		A	A	B		B		B		B									C	C	B	C
MRSA_19	A	A	B	B		A	A	B		C		B											B	C	B	C
MRSA_20	A	A		B		A	A			B		B		B									C	C	B	C
MRSA_21	A	A		B		A	A	B		B		B		B									B	C	B	C
MRSA_22	A	A		B		A	A	A	A	B		A											C	C	B	B
MRSA_23	A	A		B		A	A	A	A	B		A											C	C	B	B
MRSA_24	A	A	B	B		A	A		A	B		A											C	C	B	B
MRSA_25	A	A	B	B		A	A	A	A	B		A											C	C	B	B
MRSA_26	A		B	B		A	A		A	B		A											C	C	B	B
MRSA_27	A	A		B		A	A		A	B		A			B								C	C	B	B
MRSA_28	A	A		B		A	A		A	B		A			B								C	C	B	B
MRSA_29	A	A		B		A	A		A	B		A											C	C	B	B
MRSA_30	A	A		B		A	A		A	B		A											C	C	B	B
MRSA_31	A	A		B		A	A		A	B		A				A							A	C	B	B
MRSA_32	A	A		B		A	A	B	A	B		A				A							A	C	B	C
MRSA_33	A	A		B		A	A	B	A	B		A											B	C	B	C
MRSA_34	A			B		A	A		A	B		A											B	C	B	C
MRSA_35	A	A		B		A	A	B	A	B		A					C	B					B	C	B	B
MRSA_36	A	A		B		A	A	B	A	B		A					C	B					B	C	B	B
MRSA_37	A	A		B		A	A		A	B		A					C	B					B	C	B	B
MRSA_38	A	A		B		A	A	B	A	B		A					C	B					B	C	B	B
MRSA_39	A	A		B		A	A	B	A	B		A				A		B	A	B	A		A	C	B	B
MRSA_40	A	A		B		A	A	B	A	B		A				A	C	B	A	B	A		A	C	B	C
MRSA_41	A	A		B		A	A	B	A	B		A				A		B	A	B	A	B	A	C	B	B
MRSA_42	A	A		B		A	A	B	A	B		A				A	C	B	A	B	A	B	A	C	B	C

- A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 11. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *CARD-RGI* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina obtidos, por meio do protocolo IT

ISOLADO	GENE																							
	<i>arlR</i>	<i>arlS</i>	<i>dfcC</i>	<i>mecA</i>	<i>mepA</i>	<i>mepR</i>	<i>mgrA</i>	<i>blaZ</i>	<i>fosB</i>	<i>LmrS</i>	<i>murA</i>	<i>norA</i>	<i>tet(W/N/W)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>lnuA</i>	<i>fusA</i>	<i>AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>APH(3')-IIIa</i>	<i>mphC</i>	<i>dfcG</i>	<i>msrA</i>	<i>tet(K)</i>
MRSA_01	C		C	C		C	C	C	C	C	C	C		C										
MRSA_02	C			C		C	A	C	A	C	C	B		C										
MRSA_03	A	A		C		C	C	C	A	C	C	C		C										
MRSA_04	C		C	C		C	C		C	C	C	C		C										
MRSA_05	C		C	C		C	C	C	C	C	C	C	C											
MRSA_06	C		C	C	A	A	C	B	C	C	C	C		C										
MRSA_07	C		C	C		C	C	C	C	C	C	C		C										
MRSA_08	C		C	C	A	A	C	C	C	C	C	C		C										
MRSA_09	C		C	C		C	C		C	C	C	C		C										
MRSA_10	A	A	B	B		C	C	C	A	C	C	C		C										
MRSA_11	C		B	B		C	A	C	C	C	C	C		C										
MRSA_12	A	A	C	C		C	A	C	C	C	C	B		C										
MRSA_13	C			C		C	C	C		C		C												
MRSA_14	C			C		C	C	C		C		C			C									
MRSA_15	C		C	C		C	C	C		C		C												
MRSA_16	C		C	C		C	C	C		C		C												
MRSA_17	C			C		C	C	C		C		C			C									
MRSA_18	C			C		C	C	C		C		B			C									
MRSA_19	C		C	C		C	A	C		C		C												C
MRSA_20	A	A		C		C	C			C		C			C									
MRSA_21	C			C		C	C	C		C		C			C									
MRSA_22	C			B		C	C	A	A	C		C												
MRSA_23	C			C		C	C	A	A	C		C												
MRSA_24	C		C	B		A	C		C	C		C												
MRSA_25	C		B	B		C	C	C	C	C		C												
MRSA_26	C		B	B		C	C	C	C	C		C												
MRSA_27	C			B		C	C		A	C		C				B								
MRSA_28	C			C		C	C		C	C		C				C								
MRSA_29	C			C		C	C	C	A	C		C												
MRSA_30	C			B		A	C	A	C	C		C												
MRSA_31	C			C		C	C	C		C		C					C							
MRSA_32	C			B		A	C	C	C	C		C					C							
MRSA_33	A	A		C		A	C	C	A	C		C												
MRSA_34	C			C		A	C	C	A	C		C												
MRSA_35	C			C		C	C	C	C	C		C						C	C					
MRSA_36	C			C		C	C	C	C	C		C						C	C					
MRSA_37	C			C		C	A	C		C		C						C	C					
MRSA_38	C			C		C	C	C	A	C		C						C	C					
MRSA_39	C			C		C	C	C	C	C		C					C			C	C	C	C	
MRSA_40	C			C		C	A		C	C		A					C	C		C	C	C	C	
MRSA_41	C			C		C	C	C	A	C							C	C		C	C	C	C	
MRSA_42	A	A		C		C	C	C	C								C			C	C	A	B	

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 12. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *CARD-RGI* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo Híbrido

ISOLADO	GENE																											
	<i>arlR</i>	<i>arlS</i>	<i>dfcC</i>	<i>mecA</i>	<i>mepA</i>	<i>mepR</i>	<i>mgrA</i>	<i>blaZ</i>	<i>fosB</i>	<i>LmrS</i>	<i>murA</i>	<i>norA</i>	<i>tet(M)</i>	<i>lruA</i>	<i>fusA</i>	<i>AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>APH(3')-IIIa</i>	<i>mphC</i>	<i>dfcG</i>	<i>msrA</i>	<i>sdrM</i>	<i>vanT</i>	<i>norC</i>	<i>sepA</i>	<i>tet(K)</i>	<i>kdpD</i>
MRSA_01	A	A	B	B	A	A	A	B	A	C	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_02	A	A		B	A	A	A	B	A	C	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_03	A	A		B	A	A	A	B	A	C	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_04	A	A	B	B	A	A	A		A	C	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_05	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_06	A	A	B	B	A	A	A	B	A	C	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_07	A	A	B	B	A	A	A	B	A	C	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_08	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_09	A	A	B	B	A	A	A		A	C	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_10	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_11	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_12	A	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	B										A	C	B	B		
MRSA_13	A	A		B		A	B	B		C		B											B	C	B	C		
MRSA_14	A	A		B		A	A	B		B		B		B									B	C	B	C		
MRSA_15	A	A	B	B		A	A	B		B		B											B	C	B	C		
MRSA_16	A	A	B	B		A	A	B		B		B											B	C	B	C		
MRSA_17	A	A		B		A	A	B		B		B		B									B	C	B	C		
MRSA_18	A	A		B		A	A	B		C		B		B									B	C	B	C		
MRSA_19	A	A	B	B		A	A	B		C		B											B	C	B	C	A	
MRSA_20	A	A		B		A	A			C		B		B									B	C	B	C		
MRSA_21	A	A		B		A	A	B		B		B		B									B	C	B	C		
MRSA_22	A	A		B		A	A	A	A	B		A											C	C	B	B		
MRSA_23	A	A		B		A	A	A	A	B		A											C	C	B	B		
MRSA_24	A	A	B	B		A	A		A	C		A											C	C	B	B		
MRSA_25	A	A	B	B		A	A	A	A	C		A											C	C	B	B		
MRSA_26	A		B	B		A	A	A	A	C		A											C	C	B	B		
MRSA_27	A	A		B		A	A		A	B		A			B								C	C	B	B		
MRSA_28	A	A		B		A	A		A	B		A			B								C	C	B	B		
MRSA_29	A	A		B		A	A	A	A	C		A											C	C	B	B		
MRSA_30	A	A		B		A	A	A	A	C		A											C	C	B	B		
MRSA_31	A	A		B		A	A	B	A	B		A				A							A	C	B	B		
MRSA_32	A	A		B		A	A	B	A	B		A				A							A	C	B	C		
MRSA_33	A	A		B		A	A	B	A	B		A											B	C	B	B		
MRSA_34	A			B		A	A	B	A	C		A											B	C	B	B		
MRSA_35	A	A		B		A	A	B	A	B		A					C	B					B	C	B	B		
MRSA_36	A	A		B		A	A	B	A	B		A					C	B					B	C	B	B		
MRSA_37	A	A		B		A	A	B	A	B		A					C	B					B	C	B	B		
MRSA_38	A	A		B		A	A	B	A	B		A					C	B					B	C	B	B		
MRSA_39	A	A		B		A	A	B	A	C		A				C		B	A	B	A	B	A	C	B	B		C
MRSA_40	A	A		B		A	A	B	A	C		A					C	B	A	B	A	B	A	C	B	B		C
MRSA_41	A	A		B		A	A		A	C		A					C	B	A	B	A	B	A	C	B	B		C
MRSA_42	A	A		B		A	A	B	A	C		A				A	C	B	A	B	A	B	A	C	B	B		C

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 13. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *ResFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo ONT20h

ISOLADO	GENE																																	
	<i>sul1</i>	<i>dfrA12</i>	<i>Oqx4</i>	<i>OqxB</i>	<i>aadA2</i>	<i>aph(3'')-Ia</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>fosA</i>	<i>mph(4)</i>	<i>aac(6')-Ib-cr2</i>	<i>tet(4)</i>	<i>blaOXA-1</i>	<i>blaCTX-M-15</i>	<i>blaSHV-106</i>	<i>blaSHV-28</i>	<i>blaTEM-1B</i>	<i>qacE</i>	<i>catB3</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>qnrB1</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA14</i>	<i>blaSHV-187</i>	<i>blaTEM-206</i>	<i>blaTEM-57</i>	<i>blaTEM-216</i>	<i>blaTEM-214</i>	<i>blaTEM-210</i>	<i>blaTEM-209</i>	<i>blaTEM-34</i>	<i>blaTEM-33</i>	<i>blaTEM-141</i>	
Kp_01	A	A	B	B	A	A	A	B	B	A	C	A	A	B	B	A	C	C																
Kp_02	A	B	B	B	B	A	A	B	B		B	B	B	B	B	B	C	C																
Kp_03			B	B				B			A		A			A			A	A	A	A	A	A										
Kp_04			B	B				B			A		B			C			A	B	A	A	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Kp_05			B	B				B			C		A			A			A	B	A	A	A	A										
Kp_06			B	B				B			A		A			A			A	B	A	B	A	A										

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%

B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%

C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 14. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *ResFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo ONT48hB

ISOLADO	GENE																																
	<i>sul1</i>	<i>dfrA12</i>	<i>Oqx4</i>	<i>OqxB</i>	<i>aadA2</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>fosA</i>	<i>mph(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>blaOXA-1</i>	<i>blaCTX-M-15</i>	<i>blaSHV-106</i>	<i>blaSHV-28</i>	<i>blaTEM-1B</i>	<i>qacE</i>	<i>catB3</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>qnrB1</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA14</i>	<i>blaSHV-187</i>	<i>blaTEM-206</i>	<i>blaTEM-57</i>	<i>blaTEM-216</i>	<i>blaTEM-214</i>	<i>blaTEM-210</i>	<i>blaTEM-209</i>	<i>blaTEM-34</i>	<i>blaTEM-33</i>	<i>blaTEM-141</i>	
Kp_01	A	A	B	B	A	A	A	B	B	C	A	A	B	B	A	C	C																
Kp_02	A	A	B	C	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	C	C																
Kp_03			B	B				B		C		A			A				A	A	A	A	A										
Kp_04			B	B				B		A		A			C			A	B	A	A	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Kp_05			B	B				B		C		A			A			A	A	A	A	A	C										
Kp_06			B	B				B		A		A			A			A	B	A	A	A	C										

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%

B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%

C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 15. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *ResFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo IT

ISOLADO	GENE					
	<i>OqxA</i>	<i>OqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>blaSHV-106</i>	<i>blaSHV-28</i>	<i>blaSHV-187</i>
Kp_01	B	B	B	B	B	
Kp_02	B	B	B			A
Kp_03	B	B	B			A
Kp_04	B	B	B			A
Kp_05	B	B	B			A
Kp_06	B	B	B			A

A	Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B	Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C	Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 16. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *PointFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo ONT20h

ISOLADO	MUTAÇÃO			
	<i>fusA</i> :p.V90I	<i>gyrA</i> :p.S84L	<i>griA</i> :p.S80F	<i>griA</i> :p.S80Y
MRSA_01				
MRSA_02				
MRSA_03				
MRSA_04				
MRSA_05				
MRSA_06				
MRSA_07				
MRSA_08				
MRSA_09				
MRSA_10				
MRSA_11				
MRSA_12				
MRSA_13				
MRSA_14				
MRSA_15				
MRSA_16				
MRSA_17				
MRSA_18				
MRSA_19				
MRSA_20				
MRSA_21				
MRSA_22				
MRSA_23				
MRSA_24				
MRSA_25				
MRSA_26				
MRSA_27	P			
MRSA_28	P			
MRSA_29				
MRSA_30				
MRSA_31				
MRSA_32				
MRSA_33				
MRSA_34				
MRSA_35		P	P	
MRSA_36		P	P	
MRSA_37		P	P	
MRSA_38		P	P	
MRSA_39				P
MRSA_40		P		P
MRSA_41		P		P
MRSA_42		P		P

P = Mutação detectada

Apêndice 17. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *PointFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, obtidos por meio do protocolo ONT48hA

ISOLADO	MUTAÇÃO			
	gyrA:p.S84L	grlA:p.S80F	grlA:p.S80Y	grlA;;grlA;;kppm:p.S80Y
MRSA_01				
MRSA_02				
MRSA_03				
MRSA_04				
MRSA_05				
MRSA_06				
MRSA_07				
MRSA_08				
MRSA_09				
MRSA_10				
MRSA_11				
MRSA_12				
MRSA_13				
MRSA_14				
MRSA_15				
MRSA_16				
MRSA_17				
MRSA_18				
MRSA_19				
MRSA_20				
MRSA_21				
MRSA_22				
MRSA_23				
MRSA_24				
MRSA_25				
MRSA_26				
MRSA_27				
MRSA_28				
MRSA_29				
MRSA_30				
MRSA_31				
MRSA_32				
MRSA_33				
MRSA_34				
MRSA_35	P	P		
MRSA_36	P	P		
MRSA_37	P	P		
MRSA_38	P	P		
MRSA_39			P	
MRSA_40	P			P
MRSA_41	P		P	
MRSA_42	P		P	

P P = Mutação detectada

Apêndice 18. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *PointFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo ONT48hB

ISOLADO	MUTAÇÃO			
	fusA:p.V90I	grlA:p.S80F	gyrA:p.S84L	grlA:p.S80Y
MRSA_01				
MRSA_02				
MRSA_03				
MRSA_04				
MRSA_05				
MRSA_06				
MRSA_07				
MRSA_08				
MRSA_09				
MRSA_10				
MRSA_11				
MRSA_12				
MRSA_13				
MRSA_14				
MRSA_15				
MRSA_16				
MRSA_17				
MRSA_18				
MRSA_19				
MRSA_20				
MRSA_21				
MRSA_22				
MRSA_23				
MRSA_24				
MRSA_25				
MRSA_26				
MRSA_27	P			
MRSA_28	P			
MRSA_29				
MRSA_30				
MRSA_31				
MRSA_32				
MRSA_33				
MRSA_34				
MRSA_35		P	P	
MRSA_36		P	P	
MRSA_37		P	P	
MRSA_38		P	P	
MRSA_39				P
MRSA_40			P	P
MRSA_41			P	P
MRSA_42			P	P

P = Mutação detectada

Apêndice 19. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *PointFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo IT

ISOLADO	MUTACÃO															
	fusA;;fusA;;skfi:p.V90I	fusA;;fusA;;szhn:p.V90I	griA;;griA;;epmy:p.S80F	gyrA;;gyrA;;zdhv;;gyrA;;hnpw;;gyrA;;iheo;;gyrA;;pdrv;;gyrA;;vtod:p.S84L	griA;;griA;;jfrm:p.S80F	gyrA;;gyrA;;bubq:p.S84L	griA;;griA;;ufvi:p.S80F	gyrA;;gyrA;;hunq:p.S84L	gyrA;;gyrA;;pygg;;gyrA;;imnc;;gyrA;;kthl:p.S84L	griA;;griA;;mbzc:p.S80F	gyrA;;gyrA;;gqld:p.S84L	griA;;griA;;yxfn:p.S80Y	gyrA;;gyrA;;kkyp:p.S84L	griA;;griA;;ojio:p.S80Y	gyrA;;gyrA;;cmeb:p.S84L	griA;;griA;;wvpb:p.S80Y
MRSA_01																
MRSA_02																
MRSA_03																
MRSA_04																
MRSA_05																
MRSA_06																
MRSA_07																
MRSA_08																
MRSA_09																
MRSA_10																
MRSA_11																
MRSA_12																
MRSA_13																
MRSA_14																
MRSA_15																
MRSA_16																
MRSA_17																
MRSA_18																
MRSA_19																
MRSA_20																
MRSA_21																
MRSA_22																
MRSA_23																
MRSA_24																
MRSA_25																
MRSA_26																
MRSA_27	P															
MRSA_28		P														
MRSA_29																
MRSA_30																
MRSA_31																
MRSA_32																
MRSA_33																
MRSA_34																
MRSA_35			P	P												
MRSA_36					P	P										
MRSA_37							P	P								
MRSA_38									P	P						
MRSA_39																
MRSA_40											P	P				
MRSA_41													P	P		
MRSA_42															P	P

P = Mutação detectada

Apêndice 20. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *PointFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, obtidos por meio do protocolo Híbrido

ISOLADO	MUTAÇÃO			
	fusA:p.V90I	gyrA:p.S84L	grlA:p.S80F	grlA:p.S80Y
MRSA_01				
MRSA_02				
MRSA_03				
MRSA_04				
MRSA_05				
MRSA_06				
MRSA_07				
MRSA_08				
MRSA_09				
MRSA_10				
MRSA_11				
MRSA_12				
MRSA_13				
MRSA_14				
MRSA_15				
MRSA_16				
MRSA_17				
MRSA_18				
MRSA_19				
MRSA_20				
MRSA_21				
MRSA_22				
MRSA_23				
MRSA_24				
MRSA_25				
MRSA_26				
MRSA_27	P			
MRSA_28	P			
MRSA_29				
MRSA_30				
MRSA_31				
MRSA_32				
MRSA_33				
MRSA_34				
MRSA_35		P	P	
MRSA_36		P	P	
MRSA_37		P	P	
MRSA_38		P	P	
MRSA_39				P
MRSA_40		P		P
MRSA_41		P		P
MRSA_42		P		P

P P = Mutação detectada

Apêndice 21. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *PointFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo ONT20h

ISOLADO	MUTACÃO																																									
	ompK36:p.A217S	ompK36:p.D223G	ompK37:p.I128M	ompK36:p.G189T	ompK36:p.L59V	ompK36:p.T222L	ompK36:p.N49S	ompK37:p.I70M	ompK36:p.E232R	ompK36:p.N304E	ompK36:l228_Non e229insK	ompK36:p.Q227_N one679del	ompK36:p.F207Y	ompK36:p.F198Y	acrR:p.L195V	acrR:p.G164A	acrR:p.P161R	acrR:p.R173G	gyrA:p.S83F	gyrA:p.D87A	acrR:p.K201M	acrR:p.F197I	parC:p.S80I	acrR:p.F172S	ramR:p.A19V	parC:p.E84K	ompK36:p.T254S	ompK36:p.A93S	ompK36:p.L229V	ompK36:p.L191Q	ompK36:p.F207W	ompK36:n304_Non e305insE	ompK36:p.Q227N	ompK36:p.D91K	ompK36:p.T86V	ompK36:p.N218H	ompK36:p.H235D	ompK36:p.S88_No ne264del	ompK36:p.S89T	ompK36:s90_None 91insD		
Kp_01	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P			P	P	P	P	P																	
Kp_02	P	P		P	P	P	P		P	P	P	P	P	P					P	P					P	P																
Kp_03	P		P		P		P	P	P						P	P	P	P			P	P		P			P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Kp_04	P		P		P		P	P	P	P					P	P	P	P			P	P		P			P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Kp_05	P		P		P		P	P	P	P					P	P	P	P			P	P		P			P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Kp_06	P		P		P		P	P	P						P	P	P	P			P	P		P			P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

P = Mutação detectada

Apêndice 22. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *PointFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo ONT48hB

ISOLADO	MUTACÃO																																								
	ompK36:p.A217S	ompK36:p.D223G	ompK37:p.I128M	ompK36:p.G189T	ompK36:p.L59V	ompK36:p.T222L	ompK36:p.N49S	ompK37:p.I70M	ompK36:p.E232R	ompK36:p.N304E	ompK36:l228_Non e229insK	ompK36:p.Q227_None679del	ompK36:p.F207Y	ompK36:p.F198Y	acrR.p.L195V	acrR.p.G164A	acrR.p.P161R	acrR.p.R173G	gyrA.p.S83F	gyrA.p.D87A	acrR.p.K201M	acrR.p.F197I	parC.p.S80I	acrR.p.F172S	ramR.p.A19V	ompK36:p.T254S	ompK36:p.A93S	ompK36:p.L229V	ompK36:p.L191Q	ompK36:p.F207W	ompK36:n304_None305insE	ompK36:p.Q227N	ompK36:p.D91K	ompK36:p.T86V	ompK36:p.N218H	ompK36:p.H235D	ompK36:p.S88_None264del	ompK36:p.S89T	ompK36:s90_None91insD		
Kp_01	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P									P		P																
Kp_02	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P																
Kp_03	P		P		P		P	P	P						P	P	P	P			P	P		P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Kp_04	P		P		P		P	P	P	P					P	P	P	P			P	P		P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Kp_05	P		P		P			P	P	P					P	P	P	P			P	P		P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Kp_06	P		P		P			P	P	P					P	P	P	P			P	P		P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

P = Mutação detectada

Apêndice 23. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *PointFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo IT

ISOLADO	MUTACÃO																																								
	ompK36;p.A217S	ompK36;p.D223G	ompK37;p.I128M	ompK36;p.G189T	ompK36;p.L59V	ompK36;p.T222L	ompK36;p.N49S	ompK37;p.I170M	ompK36;p.E232R	ompK36;p.N304E	ompK36;i228_Non e229insK	ompK36;p.Q227_ None679del ompK36;p.F207Y		ompK36;p.F198Y	acrR;p.L195V	acrR;p.G164A	acrR;p.P161R	acrR;p.R173G	gyrA;p.S83F	gyrA;p.D87A	acrR;p.K201M	acrR;p.F197I	parC;p.S80I	acrR;p.F172S	ramR;p.A19V	ramR::ramR::rpf:p .A19V	ompK36;p.T254S	ompK36;p.A93S	ompK36;p.L229V	ompK36;p.L191Q	ompK36;p.F207W	ompK36:n304_No ne305insE	ompK36;p.Q227N	ompK36;p.D91K	ompK36;p.T86V	ompK36;p.N218H	ompK36;p.H235D	ompK36;p.S88_No ne264del	ompK36;p.S89T	ompK36:s90_None 91insD	
	Kp_01	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P																
	Kp_02	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P																
	Kp_03	P		P		P		P	P	P																															
	Kp_04	P		P		P		P	P	P						P	P	P	P				P	P		P			P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	Kp_05	P		P		P		P	P	P						P	P	P	P				P	P		P			P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Kp_06	P		P		P		P	P	P						P	P	P	P				P	P		P			P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
P	P = Mutação detectada																																								

P = Mutação detectada

Apêndice 24. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *VirulenceFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT20h

ISOLADO	GENE																											
	<i>hlgA</i>	<i>hlgB</i>	<i>hlgC</i>	<i>lukD</i>	<i>lukE</i>	<i>sea</i>	<i>sed</i>	<i>sej</i>	<i>ser</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	<i>sem</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>	<i>seu</i>	<i>lst</i>	<i>sep</i>	<i>lukF-PV</i>	<i>lukS-PV</i>	<i>sec</i>	<i>sec3</i>	<i>sel</i>	<i>aur</i>	<i>splA</i>	<i>splB</i>	<i>splE</i>	<i>sak</i>	<i>sen</i>
MRSA 01	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 02	A	B	B	C	C	C	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 03	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 04	A	B	B	A	C	A																	A	B	B	A	A	A
MRSA 05	A	B	B	A	C	A	B	B	B														C	B	B	A	A	A
MRSA 06	A	B	B	A	C	C	B	B	B														B	B	B	A	A	A
MRSA 07	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 08	A	B	B	A	C	A	B	B	B														C	B	B	A	A	A
MRSA 09	A	B	B	A	C	A																	C	B	B	A	A	A
MRSA 10	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	C	A
MRSA 11	A	B	B	C	C	C	B	B	B														C	B	B	A	B	A
MRSA 12	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 13	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					
MRSA 14	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 15	B	A	A							B	B	C	A	A	A	A							A				A	B
MRSA 16	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				B	A
MRSA 17	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 18	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 19	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				B	A
MRSA 20	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					
MRSA 21	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 22	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	C	A		A	A
MRSA 23	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	A	A		A	A
MRSA 24	A	A	A	A	A					C	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 25	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 26	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 27	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 28	A	A	A	A	A					B	A	A	B	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 29	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	A	A		A	A
MRSA 30	A	A	A	A	B					B	A	A	A	B	C	A	A						A	A	A		A	A
MRSA 31	A	A	A	B	A					C	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 32	A	A	A	B	A		A	B	B	C	A	A	A	A	C		A						C	A	A		C	A
MRSA 33	A	A	B	A	A		A	B	B	C	A	A	A	B	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 34	A	A	B	A	A					B	A	A	A	B	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 35	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 36	A	A	B	A	A		B		B	B	B	A	A	A	C		A						C	A	A		A	A
MRSA 37	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 38	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 39	A	A	C			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 40	B	A	C			A				B	B	B	B	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 41	A	C	C			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 42	A	A	C			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 25. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *VirulenceFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT48hA

ISOLADO	GENE																											
	<i>hlgA</i>	<i>hlgB</i>	<i>hlgC</i>	<i>lukD</i>	<i>lukE</i>	<i>sea</i>	<i>sed</i>	<i>sej</i>	<i>ser</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	<i>sem</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>	<i>seu</i>	<i>lst</i>	<i>sep</i>	<i>lukF-PV</i>	<i>lukS-PV</i>	<i>sec</i>	<i>sec3</i>	<i>sel</i>	<i>aur</i>	<i>splA</i>	<i>splB</i>	<i>splE</i>	<i>sak</i>	<i>sen</i>
MRSA 01	B	B	B	B	C	B	B	B	B														B	B	B	B	B	B
MRSA 02	B	B	B	B	C	B	B	B	B														B	B	B	B	B	B
MRSA 03	B	B	B	B	C	B	B	B	B														B	B	B	B	B	B
MRSA 04	B	B	B	B	C	B																	B	B	B	B	A	B
MRSA 05	B	B	B	B	C	B	B	B	B														B	B	B	B	B	B
MRSA 06	B	B	B	B	C	B	B	B	B														B	B	B	B	B	A
MRSA 07	B	B	B	B	C	B	B	B	B														A	B	B	B	B	B
MRSA 08	B	B	B	B	C	B	B	B	B														B	B	B	B	B	A
MRSA 09	B	B	B	B	C	B																	B	B	B	B	B	B
MRSA 10	B	B	B	B	C	B	B	B	B														B	B	B	B	B	B
MRSA 11	A	B	B	B	C	B	B	B	B														B	B	B	B	B	B
MRSA 12	B	B	B	B	C	B	B	B	B														A	B	B	B	B	B
MRSA 13	B	B	A							B	B	B	B	A	A	B							B					
MRSA 14	B	B	A							B	B	B	B	A	A	B							B				B	B
MRSA 15	B	B	A							B	B	B	B	A	A	B							B				B	B
MRSA 16	B	B	B							B	B	B	B	A	A	B							B				B	B
MRSA 17	B	B	B							B	B	B	B	A	A	B							B				B	B
MRSA 18	B	B	A							B	B	B	B	A	A	B							B				B	B
MRSA 19	B	B	A							B	B	B	B	A	A	B							A				B	B
MRSA 20	B	B	A							B	B	B	B	A	B	B							B					
MRSA 21	B	B	A							B	B	B	B	A	A	B							B				B	A
MRSA 22	B	B	A	B	B					B	B	A	B	A	B	B	B						A	A	A		B	B
MRSA 23	A	B	A	B	B					B	B	A	B	A	B	B	B						B	A	B		B	B
MRSA 24	B	B	A	B	B					B	B	B	B	A	B		B						B	B	B		B	B
MRSA 25	B	B	A	B	B					B	B	B	B	A	B		B						A	A	A		B	B
MRSA 26	B	B	B	B	B					B	B	B	B	A	C		B						B	A	A		B	A
MRSA 27	B	B	A	B	B					B	B	B	B	A	B		B						B	A	B		B	B
MRSA 28	A	B	A	B	B					B	B	B	B	A	B		B						B	A	B		B	B
MRSA 29	B	B	A	B	B					B	B	B	B	A	B	B	B						B	A	A		B	A
MRSA 30	B	B	B	B	B					B	B	B	B	B	B	B	B						B	A	B		B	B
MRSA 31	A	B	B	B	A		B	B	B	B	B	B	B	A	B		B						B	A	A		B	B
MRSA 32	B	B	A	B	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B						A	A	A		B	B
MRSA 33	A	B	B	B	A		B	B	B	B	B	B	B	B	B		B						B	A	B		B	A
MRSA 34	B	B	B	B	A		B	B	B	B	B	B	B	B	B		B						B	A	A		B	B
MRSA 35	B	B	B	B	A		B	B	B	B	B	B	B	A	B		B						B	A	A		B	A
MRSA 36	B	B	B	B	A		B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B						A	A	A		B	B
MRSA 37	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B	B	A	B		B						B	A	A		B	B
MRSA 38	B	B	B	B	B			B	B	B	B	A	B	A	B		B						B	A	A		B	B
MRSA 39	B	B	A			B				B	B	B	B	A	B			B	B	B	B	C	B					B
MRSA 40	B	B	A			B				B	B	B	B	A	B			B	B	B	B	C	B					B
MRSA 41	B	B	A			B				B	B	B	B	A	B			B	B	B	B	C	B					B
MRSA 42	B	B	A			B				B	B	B	B	A	B			B	B	B	B	C	B					B

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 26. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *VirulenceFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT48hB

ISOLADO	GENE																											
	hlgA	hlgB	hlgC	lukD	lukE	sea	sed	sej	ser	seg	sei	sem	sen	seo	seu	lst	sep	lukF-PV	lukS-PV	sec	sec3	sel	aur	splA	splB	splE	sak	sen
MRSA 01	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 02	A	B	B	C	C	A	C	B	B														C	B	B	A	C	A
MRSA 03	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 04	A	B	B	A	C	A																	C	B	B	A	A	A
MRSA 05	A	B	C	A	C	A	B	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 06	A	B	B	A	C	A	C	B	B														C	B	B	A	C	A
MRSA 07	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 08	A	B	B	A	C	A	B	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 09	A	B	B	A	C	A																	A	B	B	A	C	A
MRSA 10	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	C	A
MRSA 11	A	B	B	C	C	C	C	B	B														C	B	B	A	A	A
MRSA 12	A	B	B	A	C	A	C	B	C														A	B	B	A	A	A
MRSA 13	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					
MRSA 14	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 15	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	B
MRSA 16	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				B	A
MRSA 17	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 18	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 19	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				B	A
MRSA 20	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					
MRSA 21	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 22	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	C	A		A	A
MRSA 23	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	A	A		A	A
MRSA 24	A	A	A	A	A					C	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 25	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 26	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 27	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 28	A	A	A	A	A					C	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 29	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	A	A		A	A
MRSA 30	A	A	A	A	B					B	A	A	A	B	C	A	A						A	A	A		A	A
MRSA 31	A	A	A	B	A					C	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 32	A	A	A	B	A		A	B	B	B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 33	A	A	B	A	A		A	B	B	C	A	A	A	B	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 34	A	A	B	A	A					B	A	A	A	B	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 35	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 36	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						C	A	A		A	A
MRSA 37	A	A	B	A	A					B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		C	A
MRSA 38	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 39	A	A	C			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 40	A	A	C			A				B	B	B	B	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 41	A	A	C			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 42	A	A	C			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 27. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *VirulenceFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo IT

ISOLADO	GENE																											
	hlgA	hlgB	hlgC	lukD	lukE	sea	sed	sej	ser	seg	sei	sem	sen	seo	seu	lst	sep	lukF-PV	lukS-PV	sec	sec3	sel	aur	splA	splB	splE	sak	sen
MRSA 01	A	B	B	A	C	A	C	C	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 02	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 03	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 04	A	B	B	A	C	A																	A	B	B	A	A	A
MRSA 05	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 06	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 07	A	B	B	A	C	A	C	B	C														A	B	B	A	A	A
MRSA 08	A	B	B	C	C	A	C	B	C														A	B	B	A	A	A
MRSA 09	A	B	B	A	C	A																	A	B	B	A	A	A
MRSA 10	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 11	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 12	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 13	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					
MRSA 14	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 15	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	B
MRSA 16	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				B	A
MRSA 17	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 18	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 19	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				B	A
MRSA 20	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					
MRSA 21	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A				A	A
MRSA 22	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 23	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 24	A	A	A	A	A					C	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 25	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 26	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 27	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 28	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 29	A	A	A	A	B					B	A	C	A	A	C	C	A						A	A	A		A	A
MRSA 30	A	A	A	A	B					B	A	A	A	B	C	A	A						A	A	A		A	A
MRSA 31	A	A	A	B	A		A	B	B	B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 32	A	A	A	B	A		A	C	B	B	A	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 33	A	A	B	A	A		A	B	B	B	A	A	A	B	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 34	A	A	B	A	A		A	B	B	B	A	A	A	B	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 35	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 36	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 37	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 38	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	C	C		A						A	A	A		A	A
MRSA 39	A	A	A			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 40	A	A	A			A				C	C	B	B	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 41	A	A	A			A				B	C	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 42	A	A	A			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	C					A

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 28. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no serviço *VirulenceFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo Híbrido

ISOLADO	GENE																											
	<i>hlgA</i>	<i>hlgB</i>	<i>hlgC</i>	<i>lukD</i>	<i>lukE</i>	<i>sea</i>	<i>sed</i>	<i>sej</i>	<i>ser</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	<i>sem</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>	<i>seu</i>	<i>lst</i>	<i>sep</i>	<i>lukF-PV</i>	<i>lukS-PV</i>	<i>sec</i>	<i>sec3</i>	<i>sel</i>	<i>aur</i>	<i>splA</i>	<i>splB</i>	<i>splE</i>	<i>sak</i>	<i>sen</i>
MRSA 01	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 02	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 03	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 04	A	B	B	A	C	A																	A	B	B	A	A	A
MRSA 05	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 06	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 07	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 08	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 09	A	B	B	A	C	A																	A	B	B	A	A	A
MRSA 10	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 11	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 12	A	B	B	A	C	A	C	B	B														A	B	B	A	A	A
MRSA 13	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					
MRSA 14	B	A	A							B	C	B	A	A	A	A							A					A
MRSA 15	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					A
MRSA 16	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					B
MRSA 17	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					A
MRSA 18	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					A
MRSA 19	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					B
MRSA 20	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					
MRSA 21	B	A	A							B	B	B	A	A	A	A							A					A
MRSA 22	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	A	A			A
MRSA 23	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	A	A			A
MRSA 24	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 25	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 26	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 27	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 28	A	A	A	A	A					B	A	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 29	A	A	A	A	B					B	A	A	A	A	C	A	A						A	A	A			A
MRSA 30	A	A	A	A	B					B	A	A	A	B	C	A	A						A	A	A			A
MRSA 31	A	A	A	B	A		A	B	B	B	A	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 32	A	A	A	B	A		A	B	B	B	A	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 33	A	A	B	A	A		A	B	B	B	A	A	A	B	C		A						A	A	A			A
MRSA 34	A	A	B	A	A		A	B	B	B	A	A	A	B	C		A						A	A	A			A
MRSA 35	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A			C
MRSA 36	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 37	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A			A
MRSA 38	A	A	B	A	A		B	B	B	B	B	A	A	A	C		A						A	A	A			C
MRSA 39	A	A	A			A				B	B	B	A	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 40	A	A	A			A				B	B	B	B	B	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 41	A	A	A			A				B	B	B	B	A	B			A	A	A	A	C	B					A
MRSA 42	A	A	A			A				B	C	C	B	A	B			A	A	A	A	C	B					A

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 32. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas nos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT20h

ISOLADO	ELEMENTO GENÉTICO MÓVEL														
	rep20	rep7/c	repUS43	rep5a	rep16	repUS5	rep7/a	rep21	Tn6009	ISSau3	ISSau5	ISSau2	ISSep3	ISSau6	ISSau8
MRSA_01	A	B	A						B	C	C				
MRSA_02	A	B	A						B	C	C				
MRSA_03	A	B	A						B	C	C				
MRSA_04		B	A						B	C	C				
MRSA_05	A	B	A						B	C	B				
MRSA_06	A	B	A						B	C	B				
MRSA_07	A	B	A						B	C	C				
MRSA_08	A	B	A						B	C	C				
MRSA_09		B	A						B	C	B				
MRSA_10	A	B	A						B	C	C				
MRSA_11	A	B	A						B	C	B				
MRSA_12	A	B	A						B	C	C				
MRSA_13	A			C						C	C	B	C	B	
MRSA_14	A			A						C	C	B	C	B	
MRSA_15	A			A						C	C	B	C	B	
MRSA_16											C	B	C		
MRSA_17					A	B					C	B	C		
MRSA_18					A	B					C	B	C		
MRSA_19	A			A			A			C	C	B	C	B	
MRSA_20											C	B	C		
MRSA_21											C	B	C		
MRSA_22	A													C	
MRSA_23	A													C	
MRSA_24															
MRSA_25	A													C	
MRSA_26														C	
MRSA_27											C				
MRSA_28											C				
MRSA_29	A													C	
MRSA_30	A													C	
MRSA_31															B
MRSA_32	A														B
MRSA_33	A														
MRSA_34															
MRSA_35	A										C				
MRSA_36	A										C				
MRSA_37	A														
MRSA_38	A										C				
MRSA_39										C				B	C
MRSA_40										C				B	C
MRSA_41										C				B	C
MRSA_42								A		C				B	C

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 33. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas nos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT48hA

ISOLADO	ELEMENTO GENÉTICO MÓVEL															
	rep20	rep7c	repUS43	rep5a	rep16	repUS5	rep7a	rep21	repUS19	repUS21	Tn6009	ISSau3	ISSau5	ISSau2	ISSep3	ISSau6
MRSA_01	B	B	A						B		B	C	C			
MRSA_02	B	B	C						B		C	C	C			
MRSA_03	B	B	A								B	C	B			
MRSA_04		B	A						B		B	C	C			
MRSA_05	B	B	B						B		C	C	C			
MRSA_06	B	B	B						B		C	C	C			
MRSA_07	B	B	A						B		B	C	C		C	
MRSA_08	B	B	B						B		C	C	C			
MRSA_09		B	B						B		C	C	C			
MRSA_10	A	B	A								B	C	C			
MRSA_11	B	B	B						B		C	C	C			
MRSA_12	B	B	A								C	C	B			
MRSA_13	B			B								C	C	C		B
MRSA_14	A			B								C	C	C		B
MRSA_15													C	C	C	
MRSA_16	B						A						C	C	C	
MRSA_17					B	B			B				C	C		
MRSA_18					B	B							C	C		
MRSA_19	B			A			A					C	C	C		B
MRSA_20													C	C		
MRSA_21													C	C		
MRSA_22	B															C
MRSA_23	B															C
MRSA_24										B						
MRSA_25	B									B						C
MRSA_26	B									B						B
MRSA_27										B			C			
MRSA_28										B			C			
MRSA_29	B									B						C
MRSA_30	A									B						C
MRSA_31	B									B						C
MRSA_32	B									B						C
MRSA_33	B															
MRSA_34	B									B						
MRSA_35	B						B						C			
MRSA_36	B						A						C			
MRSA_37	A						A									
MRSA_38	A						A						C			
MRSA_39								B	C			C				C
MRSA_40								B	B			C				C
MRSA_41								B	B			C				C
MRSA_42								B		B		C				C

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 34. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas nos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo ONT48hB

ISOLADO	ELEMENTO GENÉTICO MÓVEL													
	rep20	rep7c	repUS43	rep5a	rep16	repUS5	Tn6009	ISSau3	ISSau5	ISSau2	ISSep3	ISSau6	IS256	ISSau8
MRSA_01	A	B	A				B	C	C					
MRSA_02	A	B	A				B	C	B					
MRSA_03	A	B	A				B	C	C					
MRSA_04		B	A				B	C	C					
MRSA_05	A	B	A				B	C	C					
MRSA_06	A	B	A				B	C	C					
MRSA_07	A	B	A				B	C	C					
MRSA_08	C	B	A				B	C	B					
MRSA_09		B	A				B	C	C					
MRSA_10	A	B	A				B	C	C					
MRSA_11	A	B	A				B	C	C					
MRSA_12	A	B	A				C	C	C					
MRSA_13	A			A				C	C	B	C	B		
MRSA_14	A			A				C	C	B	C	B		
MRSA_15	A			A				C	C	B	C	B		
MRSA_16									C	B	C			
MRSA_17					A	B			C	B	C			
MRSA_18					A	B			C	B	C			
MRSA_19	A			A				C	C	B	C	B		
MRSA_20									C	B	C			
MRSA_21									C	B	C			
MRSA_22	A											C		
MRSA_23	A											C		
MRSA_24														
MRSA_25	A											C		
MRSA_26												C		
MRSA_27									C					
MRSA_28									B					
MRSA_29												C		
MRSA_30												C		
MRSA_31													B	
MRSA_32	A												B	
MRSA_33	A													
MRSA_34														
MRSA_35	A								C					
MRSA_36	A								B					
MRSA_37														
MRSA_38	A								C					
MRSA_39								C					B	C
MRSA_40								C					B	C
MRSA_41								C					B	C
MRSA_42								C					B	C

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 35. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas nos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo IT

ISOLADO	ELEMENTO GENÉTICO MÓVEL																
	rep20	rep7c	repUS43	rep5a	rep16	repUS5	rep7a	rep21	repUS19	repUS21	Tn6009	ISSau3	ISSau5	ISSau2	ISSau6	IS256	ISSau8
MRSA_01	A	B	A						A		B		B				
MRSA_02	A	B	A						A		B		B				
MRSA_03	A	B	A						A		B		B				
MRSA_04		B	A						C		B		B				
MRSA_05	A	B	A										B				
MRSA_06	A	B	A						A		B		B				
MRSA_07	A	B	A						C		B	C	B				
MRSA_08	A	B	A								B		B				
MRSA_09		B	A						A		B		B				
MRSA_10	A	B	A								B		B				
MRSA_11	A	B	A								B		B				
MRSA_12	A	B	A								B		B				
MRSA_13	A			A									B	B	B		
MRSA_14	A			A									B	B	B		
MRSA_15	A			A								C	B	B	B		
MRSA_16													B	B			
MRSA_17					A	B							B	B			
MRSA_18					A	B							B	B			
MRSA_19	A			A			C						B	B	B		
MRSA_20													B	B			
MRSA_21													B	B			
MRSA_22	A														C		
MRSA_23	A														C		
MRSA_24										C							
MRSA_25	A									C					C		
MRSA_26	A									C					C		
MRSA_27													B				
MRSA_28													B				
MRSA_29	A									A					C		
MRSA_30	A									C					C		
MRSA_31	A															B	
MRSA_32	A															B	
MRSA_33	A																
MRSA_34	A																
MRSA_35	A																
MRSA_36	A												B				
MRSA_37	A																
MRSA_38	A												B				
MRSA_39								A								B	C
MRSA_40								C									C
MRSA_41								C									C
MRSA_42								C								B	C

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 36. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas nos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* com genomas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos por meio do protocolo Híbrido

ISOLADO	ELEMENTO GENÉTICO MÓVEL																	
	rep20	rep7c	repUS43	rep5a	rep16	repUS5	rep7a	rep21	repUS19	repUS21	Tn6009	ISSau3	ISSau5	ISSau2	ISSep3	ISSau6	IS256	ISSau8
MRSA_01	A	B	A						A		B	C	B					
MRSA_02	A	B	A						C		B	C	B					
MRSA_03	A	B	A						A		B	C	B					
MRSA_04		B	A						A		B	C	B					
MRSA_05	A	B	A								B	C	B					
MRSA_06	A	B	A						A		B	C	B					
MRSA_07	A	B	A						A		B	C	B					
MRSA_08	A	B	A								B	C	B					
MRSA_09		B	A						C		B	C	B					
MRSA_10	A	B	A								B	C	B					
MRSA_11	A	B	A								B	C	B					
MRSA_12	A	B	A								B	C	B					
MRSA_13	A			A								C	B	B	C	B		
MRSA_14	A			A								C	B	B	C	B		
MRSA_15	A			A								C	B	B	C	B		
MRSA_16													B	B	C			
MRSA_17					A	B							B	B	C			
MRSA_18					A	B							B	B	C			
MRSA_19	A			A			A					C	B	B		B		
MRSA_20													B	B	C			
MRSA_21													B	B	C			
MRSA_22	C															C		
MRSA_23	C															C		
MRSA_24										A								
MRSA_25	C									C						C		
MRSA_26	C									C						C		
MRSA_27													B					
MRSA_28													B					
MRSA_29	C															C		
MRSA_30	C															C		
MRSA_31	A																B	
MRSA_32	A																B	
MRSA_33	A																	
MRSA_34	A																	
MRSA_35	A												B					
MRSA_36	A												B					
MRSA_37	A																	
MRSA_38	A												B					
MRSA_39								C				C					B	C
MRSA_40								C				C					B	C
MRSA_41								C				C					C	C
MRSA_42												C					B	C

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 37. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas nos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo ONT20h

ISOLADO	ELEMENTO GENÉTICO MÓVEL																	
	IncFIB(K)	IncFII(K)	Col440I	IncFIA(pBK30683)	IS6100	ISKpn14	ISKpn33	ISEcl1	ISKpn26	IS102	IS903	ISKpn142	ISKpn263	ISEc33	ISSen4	ISEch12	Tn5403	IS26
Kp_01	B	B			A	B	A	B	B	B	B	B	B	B	C	C		
Kp_02	B	B			A	C	C	C	C	C	C			C	C	C		
Kp_03			B	B	A					C						C	C	A
Kp_04			B	B						C						C	C	A
Kp_05			B	B	A					C						C	C	A
Kp_06			B	B	A					C						C	C	A

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 38. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas nos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo ONT48hB

ISOLADO	ELEMENTO GENÉTICO MÓVEL																	
	IncFIB(K)	IncFII(K)	IncFIA(pBK30683)	IS6100	ISKpn14	ISKpn33	ISEcl1	ISKpn26	IS102	IS903	ISEc33	ISSen4	ISEch12	Tn5403	IS26	IS5075	IS5	IS262
Kp_01	B	B		A	B	C	B	B	B	B	B	C	C					
Kp_02	B	B		A	B	C	B	B	B	C	B	C	C		A			
Kp_03			B						C				C	C	A	B	B	A
Kp_04			B						C				C	C	B	B	B	A
Kp_05			B	A					C				C	C	A	B	B	
Kp_06			B	A					C				C	C	A	B	B	

A Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada ≠ tamanho do gene de referência, identidade ≤ 100%

Apêndice 39. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas nos serviços *PlasmidFinder* e *MobileElementFinder* com genomas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), obtidos por meio do protocolo IT

ISOLADO	ELEMENTO GENÉTICO MÓVEL		
	ISEch12	ISEc52	IS5
Kp_01	C		
Kp_02	C		
Kp_03	C	C	
Kp_04	C		B
Kp_05	C		B
Kp_06	C		B

A	Categoria A (verde escuro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade = 100%
B	Categoria B (verde claro): tamanho do gene no genoma de entrada = tamanho do gene de referência, identidade < 100%
C	Categoria C (cinza): tamanho do gene no genoma de entrada $\neq$ tamanho do gene de referência, identidade $\leq$ 100%

ANEXOS

ANEXO A – Informações epidemiológicas e genótípicas dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) analisados neste estudo. A data da coleção representa o mês e o ano em que houve o isolamento da bactéria de amostras clínicas.

A identificação do surto descreve os isolados entre surtos (S) ou casos esporádicos (E), seguido por um número (1, 2, 3 ou 4) representando a linhagem (de acordo com métodos genotípicos aplicados anteriormente; quarta coluna) e letra (A, B, C, D ou E) representando diferentes surtos. Adaptado de Ferreira *et al.* (2021)

Isolado	Data da coleta	Identificação do surto	Linhagem
MRSA_01	Fev-2004	S-1A	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_02	Ago-2004	S-1B	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_03	Out-2004	S-1B	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_04	Abr-2005	S-1E	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_05	Jun-2007	S-1C	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_06	Jun-2007	S-1C	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_07	Jun-2007	S-1C	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_08	Jul-2007	S-1C	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_09	Jul-2007	S-1C	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_10	Ago-2010	S-1D	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_11	Ago-2010	S-1D	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_12	Nov-2012	E-1	ST8-t304-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 1)
MRSA_13	Ago-2010	S-2D	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_14	Dez-2010	S-2E	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_15	Mar-2011	S-2D	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_16	Jul-2011	S-2C	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_17	Fev-2012	S-2B	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_18	Mar-2012	S-2B	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_19	Jun-2012	S-2C	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_20	Ago-2012	S-2A	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_21	Ago-2012	S-2A	t223-PVLneg (linhagem 2)
MRSA_22	Out-2006	S-3B	ST5-t002-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_23	Nov-2006	S-3B	ST5-t002-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_24	Dez-2006	S-3G	ST5-t002-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_25	Jan-2007	S-3G	ST5-t002-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_26	Jan-2007	S-3G	ST5-t002-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_27	Set-2007	S-3F	ST5-t002-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_28	Set-2007	S-3F	ST5-t002-SCCmecIV-PVLneg (linhagem 3)

Continua

Isolado	Data da coleta	Identificação do surto	Linhagem
MRSA_29	Nov-2007	S-3E	ST5-t002-SCC <i>mecIV</i> -PVLneg (linhagem 3)
MRSA_30	Nov-2007	S-3E	ST5-t002-SCC <i>mecIV</i> -PVLneg (linhagem 3)
MRSA_31	Dez-2009	S-3D	ST1637-t002-SCC <i>mecIV</i> -PVLneg (linhagem 3)
MRSA_32	Dez-2009	S-3D	ST1637-t002-SCC <i>mecIV</i> -PVLneg (linhagem 3)
MRSA_33	Jan-2011	S-3C	t002-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_34	Jan-2011	S-3C	t002-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_35	Out-2011	S-3A	t002-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_36	Out-2011	S-3A	t002-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_37	Out-2011	S-3A	t002-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_38	Out-2011	S-3A	t002-PVLneg (linhagem 3)
MRSA_39	Out-2004	E-4	ST772-t657-SCC <i>mecV</i> -PVLpos (linhagem 4)
MRSA_40	Ago-2013	E-4	ST772-t657-SCC <i>mecV</i> -PVLpos (linhagem 4)
MRSA_41	Dez-2013	S-4A	ST772-t657-SCC <i>mecV</i> -PVLpos (linhagem 4)
MRSA_42	Jan-2014	S-4B	ST772-t657-SCC <i>mecV</i> -PVLpos (linhagem 4)

ST, *Sequence Typing*; t, *spa*-typing); PVLpos/neg, corresponde a detecção (positiva) ou não (negativa), respectivamente, dos genes codificantes da toxina Leucocidina de Pantón-Valentine.

ANEXO B. Quadro de resultados das análises genômicas realizadas no programa *1928 Diagnostics*, com dados brutos de sequenciamento de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, obtidos via Oxford Nanopore Technology (20h). Análises executadas pelo grupo de pesquisa norueguês, sob coordenação da Dra. Hege Aamot

ISOLADO	GENE															
	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>sat4</i>	<i>blaI</i>	<i>blaR I</i>	<i>mecA</i>	<i>fosB</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>mph(C)</i>	<i>msr(A)</i>	<i>mepA</i>	<i>blaZ</i>	<i>tet(38)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>dfrC</i>	<i>dfrG</i>
MRSA_01				P	P	P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_02				P	P	P	P				P	P	P	P		
MRSA_03				P	P	P	P				P	P	P	P		
MRSA_04						P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_05				P	P	P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_06				P	P	P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_07				P	P	P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_08				P	P	P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_09						P	P				P		P	P	P	
MRSA_10				P	P	P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_11				P	P	P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_12				P	P	P	P				P	P	P	P	P	
MRSA_13				P	P	P					P	P	P			
MRSA_14				P	P	P		P			P	P	P			
MRSA_15				P	P	P					P	P	P		P	
MRSA_16				P	P	P					P	P	P		P	
MRSA_17																
MRSA_18				P	P	P		P			P	P	P			
MRSA_19				P	P	P					P	P	P		P	
MRSA_20						P		P			P		P			
MRSA_21				P	P	P		P			P	P	P			
MRSA_22				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_23				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_24						P	P				P	P	P		P	
MRSA_25				P	P	P	P				P	P	P		P	
MRSA_26				P	P	P	P				P	P	P		P	
MRSA_27						P	P				P		P			
MRSA_28						P	P				P		P			
MRSA_29				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_30				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_31	P			P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_32	P			P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_33				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_34				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_35				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_36				P		P	P				P	P	P			
MRSA_37				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_38				P	P	P	P				P	P	P			
MRSA_39	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P			P
MRSA_40	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P			P
MRSA_41	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P			P
MRSA_42	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P			P
P	P = Gene detectado															

P

P = Gene detectado

ANEXO C. Quadro de resultados do teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos, realizado com isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. S = Sensível – dosagem padrão; I = Sensível – aumentando a exposição; R = Resistente. Valores entre parênteses indicam, em milímetros, o halo de inibição. Testes realizados pelo grupo de pesquisa norueguês, sob coordenação da Dra. Hege Aamot

ISOLADO	Antimicrobiano																	
	Ampicilina	Mupirocina	Cefoxitina	Ciprofloxacina	Eritromicina	Ácido fusídico	Gentamicina	Clindamicina	Cloranfenicol	Linezolida	Oxacilina-1	Penicilina G	Rifampicina	Tetoplanina	Tetraciclina	Sulfametoxazol-trimetoprima	Vancomicina	Tigeciclina
MRSA 01	R	S (34)	R (6)	I (23)	S (28)	S (30)	S (25)	S (28)	S (24)	S (27)	R (6)	R (6)	S (33)	S (0,5)	R (6)	S (27)	S (1,0)	S (24)
MRSA 02	R	S (36)	R (11)	I (23)	S (28)	S (32)	S (25)	S (28)	S (23)	S (25)	R (6)	R (6)	S (34)	S (0,5)	R (8)	S (31)	S (1,0)	S (25)
MRSA 03	R	S (34)	R (11)	I (22)	S (28)	S (32)	S (24)	S (27)	S (24)	S (34)	R (6)	R (6)	S (34)	S (0,5)	R (8)	S (29)	S (1,0)	S (24)
MRSA 04	R	S (38)	R (21)	I (24)	S (27)	S (33)	S (23)	S (28)	S (24)	S (24)	R (16)	R (23)	S (33)	S (0,5)	R (13)	S (23)	S (0,5)	S (25)
MRSA 05	R	S (40)	R (21)	I (24)	S (26)	S (34)	S (23)	S (24)	S (26)	S (28)	R (14)	R (6)	S (34)	S (0,5)	R (13)	S (21)	S (0,5)	S (25)
MRSA 06	R	S (38)	R (21)	I (23)	S (28)	S (34)	S (24)	S (24)	S (26)	S (28)	R (16)	R (6)	S (34)	S (0,5)	R (13)	S (22)	S (0,5)	S (27)
MRSA 07	R	S (39)	R (21)	I (25)	S (27)	S (33)	S (23)	S (25)	S (26)	S (26)	R (17)	R (6)	S (36)	S (0,5)	R (13)	S (25)	S (0,5)	S (26)
MRSA 08	R	S (39)	R (21)	I (26)	S (28)	S (36)	S (24)	S (26)	S (24)	S (27)	R (16)	R (6)	S (36)	S (0,5)	R (13)	S (24)	S (0,5)	S (28)
MRSA 09	R	S (40)	R (21)	I (26)	S (27)	S (34)	S (24)	S (25)	S (25)	S (26)	R (17)	R (22)	S (35)	S (0,5)	R (13)	S (24)	S (0,5)	S (28)
MRSA 10	R	S (39)	R (21)	I (25)	S (28)	S (34)	S (22)	S (26)	S (24)	S (27)	R (16)	R (6)	S (35)	S (0,5)	R (13)	S (24)	S (0,5)	S (27)
MRSA 11	R	S (37)	R (21)	I (24)	S (26)	S (34)	S (22)	S (25)	S (24)	S (26)	R (16)	R (6)	S (33)	S (0,5)	R (19)	S (24)	S (0,5)	S (27)
MRSA 12																		
MRSA 13	R	S (35)	R (13)	I (25)	S (26)	S (32)	S (24)	S (27)	S (26)	S (25)	R (16)	R (6)	S (32)	S (1,0)	S (29)	S (30)	S (1,0)	S (24)
MRSA 14	R	S (35)	R (14)	I (23)	S (27)	S (30)	S (25)	S (25)	S (24)	S (24)	R (14)	R (6)	S (32)	S (0,5)	S (27)	S (29)	S (0,5)	S (25)
MRSA 15	R	S (41)	R (21)	I (27)	S (26)	S (35)	S (24)	S (25)	S (24)	S (26)	R (15)	R (9)	S (36)	S (0,5)	S (31)	S (27)	S (0,5)	S (26)
MRSA 16	R	S (34)	R (13)	I (25)	S (27)	S (30)	S (24)	S (26)	S (24)	S (25)	R (10)	R (6)	S (28)	S (1,0)	S (32)	S (26)	S (0,5)	S (22)
MRSA 17	R	S (35)	R (14)	I (28)	S (29)	S (30)	S (26)	S (25)	S (23)	S (25)	R (6)	R (6)	S (32)	S (1,0)	S (28)	S (32)	S (0,5)	S (23)
MRSA 18	R	S (35)	R (14)	I (26)	S (28)	S (28)	S (25)	S (25)	S (22)	S (24)	R (6)	R (6)	S (32)	S (0,5)	S (27)	S (30)	S (0,5)	S (23)
MRSA 19	R	S (35)	R (13)	I (27)	S (28)	S (30)	S (25)	S (27)	S (23)	S (24)	R (6)	R (6)	S (36)	S (1,0)	R (10)	S (20)	S (0,5)	S (24)
MRSA 20																		
MRSA 21	R	S (34)	R (14)	I (28)	S (27)	S (29)	S (24)	S (24)	S (22)	S (24)	R (6)	R (6)	S (28)	S (1,0)	S (23)	S (30)	S (0,5)	S (23)
MRSA 22	R	S (35)	R (14)	I (27)	S (27)	S (28)	S (23)	S (25)	S (23)	S (24)	R (14)	R (15)	S (32)	S (1,0)	S (26)	S (29)	S (1,0)	S (23)
MRSA 23	R	S (33)	R (13)	I (25)	S (28)	S (30)	S (24)	S (27)	S (23)	S (25)	R (6)	R (6)	S (32)	S (1,0)	S (27)	S (31)	S (1,0)	S (24)
MRSA 24	R	S (34)	R (12)	I (25)	S (27)	S (30)	S (24)	S (26)	S (23)	S (25)	R (6)	R (6)	S (31)	S (1,0)	S (26)	S (28)	S (1,0)	S (23)
MRSA 25	R	S (35)	R (12)	I (26)	S (28)	S (28)	S (24)	S (27)	S (23)	S (23)	R (6)	R (6)	S (35)	S (0,5)	S (28)	S (28)	S (1,0)	S (24)
MRSA 26	R	S (37)	R (14)	I (27)	S (28)	S (32)	S (27)	S (29)	S (25)	S (27)	R (15)	R (6)	S (34)	S (0,5)	S (30)	S (30)	S (1,0)	S (24)
MRSA 27	R	S (35)	R (13)	I (23)	S (28)	R (23)	S (24)	S (26)	S (23)	S (24)	R (13)	R (18)	S (32)	S (1,0)	S (28)	S (30)	S (1,0)	S (23)
MRSA 28	R	S (33)	R (14)	I (22)	S (28)	R (22)	S (23)	S (27)	S (22)	S (24)	R (11)	R (22)	S (28)	S (0,5)	S (26)	S (30)	S (1,0)	S (23)
MRSA 29	R	S (35)	R (13)	I (25)	S (28)	S (28)	S (24)	S (28)	S (23)	S (24)	R (13)	R (6)	S (33)	S (0,5)	S (25)	S (31)	S (1,0)	S (23)
MRSA 30	R	S (35)	R (13)	I (25)	S (28)	S (30)	S (24)	S (28)	S (24)	S (28)	R (13)	R (6)	S (34)	S (1,0)	S (27)	S (32)	S (0,5)	S (24)
MRSA 31	R	S (35)	R (16)	I (25)	S (30)	S (28)	R (9)	S (28)	S (24)	S (24)	R (13)	R (12)	S (31)	S (0,5)	S (28)	S (32)	S (1,0)	S (24)
MRSA 32	R	S (35)	R (18)	I (28)	S (26)	S (28)	R (10)	S (26)	S (24)	S (24)	R (12)	R (11)	S (30)	S (1,0)	S (27)	S (31)	S (1,0)	S (24)
MRSA 33																		
MRSA 34																		
MRSA 35	R	S (35)	R (13)	R (6)	S (27)	S (28)	S (24)	S (27)	S (24)	S (26)	R (6)	R (6)	S (30)	S (0,5)	S (27)	S (30)	S (1,0)	S (24)
MRSA 36	R	S (35)	R (13)	R (6)	S (26)	S (32)	S (25)	S (27)	S (25)	S (25)	R (6)	R (6)	S (32)	S (0,5)	S (26)	S (29)	S (0,5)	S (24)
MRSA 37	R	S (34)	R (13)	R (6)	S (28)	S (30)	S (23)	S (26)	S (22)	S (23)	R (6)	R (6)	S (30)	S (1,0)	S (25)	S (30)	S (1,0)	S (22)
MRSA 38	R	S (34)	R (12)	R (6)	S (28)	S (30)	S (23)	S (27)	S (23)	S (25)	R (6)	R (6)	S (30)	S (1,0)	S (26)	S (29)	S (1,0)	S (22)
MRSA 39	R	S (34)	R (16)	R (16)	R (17)	S (30)	R (9)	S (27)	S (23)	S (24)	R (6)	R (6)	S (31)	S (1,0)	S (26)	S (22)	S (1,0)	S (23)
MRSA 40	R	S (33)	R (13)	R (13)	R (18)	S (30)	R (9)	S (27)	S (24)	S (24)	R (6)	R (6)	S (30)	S (1,0)	S (26)	S (20)	S (1,0)	S (23)
MRSA 41																		
MRSA 42																		

R	R - Resistente
I	I - Sensível - Aumentando a exposição
S	S - Sensível - Dosagem padrão

ANEXO D. Quadro de resultados do teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos realizado com isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL). S = Sensível – dosagem padrão; I = Sensível – aumentando a exposição; R = Resistente. Testes realizados pelo grupo de pesquisa norueguês, sob coordenação da Dra. Hege Aamot

ISOLADO	Antimicrobiano											
	Amoxicilina-clavulanato	Ampicilina	Aztreonam	Cefotaxima	Ceftazidima	Cefuroxima	Piperacilina-tazobactam	Ciprofloxacina	Gentamicina	Meropenem	Sulfametoxazol-trimetoprima	Cefepima
Kp_01	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
Kp_02	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
Kp_03	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R
Kp_04	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R
Kp_05	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R
Kp_06	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R

R	R - Resistente
I	I - Sensível - Aumentando a exposição
S	S - Sensível - Dosagem padrão