

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE
Staphylococcus aureus RESISTENTES À METICILINA (MRSA)
ISOLADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Bruno Hech Dominski

Florianópolis
2018

BRUNO HECH DOMINSKI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À
METICILINA (MRSA) ISOLADOS NO ESTADO DE
SANTA CATARINA**

Trabalho de Conclusão de Curso em
Ciências Biológicas do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina submetido como requisito
para obtenção do Grau de Bacharel em
Ciências Biológicas
Orientadora: Profa. Dra. Fabienne A.
Ferreira

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Dominski, Bruno
Caracterização molecular de amostras de
Staphylococcus aureus resistentes à Meticilina
(MRSA) isolados no Estado de Santa Catarina / Bruno
Dominski ; orientadora, Fabienne Ferreira, 2018.
42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. MRSA. 3. Tipagem
Molecular. 4. Virulência. I. Ferreira, Fabienne.
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Bruno Hech Dominski

Caracterização molecular de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) isolados no Estado de Santa Catarina

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua forma final.

Florianópolis, 22 de junho de 2018.

Prof Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Fabienne Antunes Ferreira
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Thaís Cristine Marques Sincero
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a meus pais e meu irmão por todo o apoio e carinho que me deram desde meu nascimento, nada do que eu fiz seria possível sem vocês e sou eternamente grato por tudo. Eu amo muito vocês e admiro muito cada um, obrigado pela confiança em mim.

À minha orientadora Fabienne Ferreira, por me aceitar como orientando e ser uma cientista incrível, sempre estimulando o pensamento crítico e me inspirando a pesquisar e conhecer mais. Além disso, foi uma orientadora muito querida e presente, o que tornou a experiência de realizar e redigir um trabalho científico muito mais prazerosa.

Aos meus colegas de laboratório: Maria, Andressa, Juliana, Sayonara, Gabriela e professor Ricardo, por tornarem o ambiente de trabalho um lugar muito agradável e de ótimo convívio. Por todas as dúvidas técnicas e problemas em que me ajudaram a procurar soluções e também por serem amigos muito queridos, com quem partilhei muitos momentos bons e que me consolaram em momentos ruins.

Ao meu namorado Gabriel, por sempre acreditar em mim e me incentivar a ser melhor, além de todo o carinho por mim.

Aos meus amigos do “Garela”, Vinícius, Caroline, Giulia, Mariana, Ítalo, Nadine, Tatiane, Nilo, Pedro, Vitor, Ana e Bianca, que desde os tempos de colégio continuam me aturando, sempre me animando e me apoiando nos momentos mais difíceis. O carinho que tenho por vocês é gigantesco e agradeço por todos esses anos de amizade.

Aos meus amigos que fiz durante o curso, Rennan, Karin, Bryan, Angela, Mariana, João, Kathleen, Maria Eduarda, Matheus, Ézio, Gabriel e especialmente, Sofia e Isadora, por todo o convívio durante o curso, a troca de experiências, festas, trabalhos, frustrações e sucessos que tivemos juntos. Foi uma honra ter podido conhecer todos vocês.

Aos laboratórios de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA), de Protozoologia (PROTO), de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA) e laboratório de Imunobiologia (LDI), por toda a ajuda que tornou possível esse trabalho ser realizado, além da simpatia e cordialidade sempre.

Agradeço ao Prof Daniel Mansur pela concessão de bolsa de Iniciação Científica CAPES vinculada ao projeto Bio Computacional.

RESUMO

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA) são bactérias gram-positivas e um dos patógenos hospitalares mais importantes devido a sua multirresistência a diversos antimicrobianos. A capacidade de causar infecções está intimamente ligada com a expressão de genes de virulência que codificam moléculas associadas à colonização, dano tecidual às células do hospedeiro e formação de biofilme. No Estado de Santa Catarina, apenas um estudo publicado não randomizado de caracterização de amostras de MRSA foi encontrado e nele houve apenas tipagem molecular parcial, sem investigar características de virulência (Silveira et al, 2015) também reportou uma baixa prevalência (2-8%) de MRSA isolados em Santa Catarina em comparação a outras regiões do Brasil e de outros países da América Latina. Entretanto, sugere-se que os MRSA circulantes em SC são altamente patogênicos, uma vez que foram associados predominantemente a infecções clínicas graves em pacientes. Como o equilíbrio entre o *fitness* e o potencial de virulência parece ser de grande importância na dinâmica de prevalência de linhagens de MRSA, levando ao sucesso de algumas cepas em detrimento de outras, o presente estudo sugeriu a hipótese de que os MRSA circulantes em Santa Catarina (MRSA-SC) apresentam um custo biológico maior em comparação a outras cepas. Para investigar essa hipótese, foram realizados experimentos de tipagem molecular (tipagem SCCmec e MLST) e detecção de genes de virulência. Estas características foram comparadas com outras cepas de MRSA isoladas em outros países, através de análises *in silico*. As 55 amostras de MRSA isoladas em diversos hospitais de Santa Catarina foram caracterizadas molecularmente, havendo maior incidência dos SCCmec de tipo II com 49,09% (27/55), e tipo IV 24 (43,60%). Foi verificada a presença de dois genes de virulência, leucocidina DE e leucocidina de Pantón-Valentine, com 90,74% (49/55) e 23,63% (13/55) das amostras carregando esses genes, respectivamente. O MLST de uma amostra clínica foi realizado, indicando a linhagem ST105-SCCmec II, que é geneticamente relacionada ao clone NY/J, pertencente a linhagem ST5-SCCmecII. Acerca de nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a relatar o MLST e genes de virulência de amostras de MRSA-SC. É possível observar que as amostras MRSA-SC parecem estar seguindo, pelo menos em parte, a tendência brasileira quanto às tipagens realizadas e genes de virulência analisados. Entretanto mais estudos são necessários para um melhor entendimento da baixa incidência e alta virulência de MRSA em Santa Catarina.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*; MRSA; virulência; tipagem molecular.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are gram-positive bacteria and one of the most important hospital pathogens due to their multiresistance to various antimicrobials. The ability to cause infection is closely linked with the expression of virulence genes encoding molecules associated with colonization, tissue damage to host cells, and biofilm formation. In the State of Santa Catarina, only one published non-randomized characterization study of MRSA samples was found and only partial molecular typing was performed, without investigating virulence characteristics (Silveira et al, 2015). It also reported a low prevalence (2-8%) of MRSA isolated in Santa Catarina compared to other regions of Brazil and other Latin American countries. However, it is suggested that circulating MRSA in SC are highly pathogenic, since they were predominantly associated with severe clinical infections in patients. As the balance between fitness and virulence potential seems to be of great importance in the dynamics of MRSA strains prevalence, leading to the success of some strains over others, the present study suggested the hypothesis that circulating MRSA in Santa Catarina (MRSA-SC) have a higher biological cost compared to other strains. To assess this hypothesis, molecular typing experiments (SCC*mec* and MLST typing) and detection of virulence genes were performed. These characteristics were compared with other strains of MRSA isolated in other countries through *in silico* analyzes. 55 samples of MRSA isolated from several hospitals in Santa Catarina were molecularly characterized, with a higher incidence of SCC*mec* type II with 49.09% (27/55) and 24 (43.60%) type IV. The presence of two virulence genes was verified, DE leukocidin and Panton-Valentine leukocidin, with 90.74% (49/55) and 23.63% (13/55) of the samples bearing these genes, respectively. The MLST of a clinical sample was performed, indicating the ST105-SCC*mec* II lineage, which is genetically related to the NY / J clone, belonging to the ST5-SCC*mec*II lineage. To our knowledge, this is the first study to report the MLST and virulence genes from MRSA-SC isolates. It is possible to observe that the MRSA-SC isolates seem to be following, at least in part, the Brazilian tendency regarding molecular typing and virulence genes analyzed. However, more studies are needed to better understand the low incidence and high virulence of MRSA in Santa Catarina.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; MRSA, virulence; molecular typing;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC- Coleção americana de culturas-tipo (do inglês: *American Type Culture Collection*)
- CA-MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina adquiridos na comunidade (do inglês: *community acquired- Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)
- CC- Complexo clonal (do inglês: *clonal complex*)
- FbBP- Proteína ligante de fibrinogênio (do inglês: *fibrinogen-binding protein*)
- FnBP- Proteína ligante de fibronectina (do inglês: *fibronectin-binding protein*)
- HA-MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina adquiridos em hospital (do inglês: *hospital acquired- Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)
- Luk- Leucocidina (do inglês: *Leukocidin*)
- MLST- Tipagem de sequências multiloco (do inglês: *Multilocus sequence typing*)
- MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (do inglês: *Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)
- MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Meticilina (do inglês: *Methicilin-susceptible Staphylococcus aureus*)
- NT- Não tipável
- OSPC- Clone Oceania Sudoeste do Pacífico (do inglês: *Oceania Southwest Pacific Clone*)
- PBP2a- Proteína ligante de Penicilina 2a (do inglês: *Penicilin-binding protein 2a*)
- PCR- Reação em cadeia da Polimerase (do inglês: *Polymerase chain reaction*)
- PFGE- Eletroforese em gel submetido a campos elétricos alternados (do inglês: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)
- PVL- Leucocidina de Panton-Valentine (do inglês: *Panton-Valentine Leukocidin*)
- SCC*mec*- Cassete cromossômico estafilocócico *mec* (do inglês: *Staphylococcal cassette chromosome mec*)
- SE- Enterotoxinas estafilocócicas (do inglês: *Staphylococcal enterotoxins*)
- ST- sequência tipo (do inglês: *sequence typing*)
- TSST-1- Toxina da síndrome do choque tóxico-1 (do inglês: *Toxic shock syndrome toxin-1*)
- VRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Vancomicina (do inglês: *Vancomycin-resistant S. aureus*)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	O GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> E A ESPÉCIE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	11
1.2	PATOGENICIDADE DOS <i>S. AUREUS</i>	12
1.3	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTES À METICILINA (MRSA)	14
2.	JUSTIFICATIVA	19
3.	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS E CEPAS CONTROLE	22
4.2	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO	22
4.3.1	TIPAGEM <i>SCC_{mec}</i>	24
4.3.2	MLST	24
4.4	DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA	25
4.5	COMPARAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS PERFIS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA	28
5.	RESULTADOS	28
5.1	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS MRSA-SC	28
5.2	MLST	29
5.3	GENES DE VIRULÊNCIA	34
5.4	PERFIL DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA	36
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	42
7.1	CONCLUSÃO	42
7.2	PERSPECTIVAS	42
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 O GÊNERO *Staphylococcus* E A ESPÉCIE *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias Gram-positivas em forma de cocos que apresentam um arranjo semelhante a cachos de uva quando observados em microscópio óptico a partir de esfregaço corado, característica que nominou o grupo. Além disso, estes microrganismos são imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positivos, capazes de crescer em variações de temperatura de 18° a 40°C e em concentrações de até 10% de cloreto de sódio (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Os *Staphylococcus* spp. fazem parte da microbiota anfibiônica da pele e membranas mucosas de humanos e outros animais. Algumas espécies podem ser encontradas em elevadas concentrações em humanos, colonizando as axilas, mucosas nasais, períneo, e em menores quantidades na orofaringe, boca, vagina, trato intestinal e glândulas mamárias (OTTO, 2010). Cerca de 40 espécies compõem o gênero, podendo estas serem classificadas de acordo com a produção da enzima coagulase em *Staphylococcus* coagulase positiva ou negativa. Entre as espécies coagulase negativa de importância médica podemos citar o *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus lugdunensis* como exemplos mais marcantes. A bactéria coagulase positiva de maior destaque clínico para humanos é o *Staphylococcus aureus* subespécie *aureus*, mais conhecida como *Staphylococcus aureus* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Os *S. aureus* colonizam a cavidade nasal de cerca de 30% da população humana (TONG et al., 2015), porém são também reconhecidos como importantes patógenos, podendo causar desde infecções de pele e tecidos moles relativamente benignas (como furunculose, impetigo e foliculite) até infecções mais invasivas como bacteremias, pneumonias, osteomielite e endocardite (TONG et al., 2015). Os *S. aureus* estão associados tanto a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) como a infecções comunitárias, que acometem indivíduos saudáveis da comunidade, sem fatores de risco clássicos para aquisição de infecções nosocomiais (SADA; FUKUDA;

ISHIMARU,2017).

1.2 PATOGENICIDADE DOS *S. aureus*

A patogênese dos *S. aureus* tem uma característica multifatorial e está, em parte, relacionada a um conjunto de fatores de virulência que são produzidos e que são importantes para a colonização bacteriana, evasão ao sistema imune e dano tecidual ao hospedeiro, bem como para formação de biofilme. Dois grupos de fatores de virulência podem ser destacados nestas bactérias: (i) as proteínas de superfície, ancoradas à parede celular e associadas principalmente a colonização bacteriana e (ii) as exoproteínas, secretadas para o meio extracelular e associadas principalmente a dano às células do hospedeiro. Entre as proteínas de superfície destacamos as proteínas ligantes de fibronectina (*fibronectin-binding proteins*; FnBPs) e a proteína ligante de fibrinogênio (*fibrinogen-binding protein*; FbBPs), que estão associadas a aderência, sendo a FnBP associada a formação de biofilme e invasão em diversas cepas; a proteína A (Spa), responsável por causar inflamação e impedir a opsonofagocitose (FOSTER et al., 2014); SasX que participa na adesão às células epiteliais e também na agregação de bactérias para formação de biofilme (LI et al., 2012) e SasG colaborando na adesão ao epitélio escamoso e formação de biofilme (GEOGHEGAN et al., 2010). Entre as exoproteínas, destacamos: a leucocidina de Panton-Valentine (PVL), citolisina de dois componentes, codificada pelos genes *lukF-PV* e *lukS-PV* e que causa lise de leucócitos por formação de poros na membrana; as Hemolisinas como a Alpha-hemolisina, que também é uma formadora de poros, porém atua em outras células do sistema imune como linfócitos e macrófagos (WATKINS; DAVID; SALATA, 2012). Dentro das exoproteínas destacamos ainda as enterotoxinas estafilocócicas (SE) que são classificadas de SEA até SEU de acordo com a variação antigênica (SERGELIDIS; ANGELIDIS, 2017). Normalmente associadas à intoxicação alimentar (síndrome emética), podem também causar febre alta, produção de citocinas e proliferação de linfócitos T, além de serem resistentes ao calor e à maioria das enzimas proteolíticas. Foi mostrado que algumas SE estão relacionadas, juntamente com a toxina da síndrome do choque tóxico-1 (*Toxic shock syndrome toxin-1*, TSST-1), com a síndrome do choque tóxico, atuando como superantígenos e estimulando liberação de fatores de necrose tumoral (THOMAS et al., 2007).

S. aureus é a causa mais comum de infecções relacionadas a

dispositivos médicos implantados, tais como cateteres vesicais e endovenosos e próteses cardíacas e ortopédicas. Estas infecções são decorrentes da formação de um biofilme bacteriano nestes dispositivos (FOSTER et al., 2014). O processo de formação de biofilme se inicia com a adesão de células bacterianas na superfície do dispositivo, através de proteínas como as FnbPs, seguido de uma fase de proliferação bacteriana, formando uma massa de células, que pode conter também proteínas da matriz extracelular e até mesmo DNA extracelular; um período de maturação e de êxodo. O desprendimento de algumas células bacterianas do biofilme que podem iniciar um foco infeccioso em outros locais (FIGUEIREDO et al., 2017).

Além dos fatores de virulência já citados que contribuem para a formação de biofilme, outras moléculas podem participar do processo, tais como o Fator clumping B (ClfB), importante para a formação de biofilme em ambientes com pouco cálcio (ABRAHAM; JEFFERSON, 2012). Essas infecções são geralmente difíceis de serem tratadas, fazendo com que o dispositivo implantado tenha que ser comumente removido, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes (JACQUELINE; CAILLON, 2014). A dificuldade em tratar infecções relacionadas à formação de biofilme está relacionada a propriedades de barreira da própria matriz do biofilme, que dificultam a difusão de antimicrobianos bem como de células e fatores imunológicos; também a ocorrência de células metabolicamente “dormentes” que tem reduzida susceptibilidade a drogas e aos fatores do sistema imune hospedeiro. Recentemente, foram identificadas subpopulações bacterianas (por volta de 1% da população), chamadas de *persisters*, altamente resistentes a antimicrobianos graças a mutações genéticas que afetam uma série de funções biológicas (FIGUEIREDO et al., 2017).

Todos esses fatores de virulência são regulados por uma complexa rede de regulação gênica em *S. aureus*. Um dos sistemas regulatórios mais conhecidos é o *quorum sensing agr* (*accessory gene regulator*). O locus *agr* é um sistema de dois componentes, que contém como molécula efetora da regulação o RNAIII, que regula negativamente a expressão de proteínas de superfície (como a proteína A e FnBP) e promove uma regulação positiva de exoproteínas (como a Alfa hemolisina e leucotoxinas) (GOMES-FERNANDES et al., 2017). Além desse, existem outros sistemas de regulação, e quase todos interagem ativando ou inibindo uns aos outros e a atividade de cada sistema é um fator importante para o fenótipo de virulência da linhagem de *S. aureus* observada (PRIEST

et al., 2012).

Acredita-se que o grande número de fatores de virulência produzidos pelos *S. aureus* e a regulação global de tais produtos sejam responsáveis pela extraordinária capacidade destes microrganismos de adaptação aos diferentes nichos do hospedeiro e ainda pela modulação da patogenicidade bacteriana, tornando assim esses microrganismos extremamente versáteis como agentes de diversas doenças hospitalares ou comunitárias (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014).

1.3 *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA (MRSA)

Historicamente, no início dos anos 40 a maioria das infecções sanguíneas causadas por *S. aureus* eram letais (SKINNER; KEEFER, 1941). Mesmo após a introdução da penicilina em 1941 como tratamento clínico, surgiram cepas resistentes a este antibiótico (RAMMELKAMP; MAXON, 1942). Na década de 60, por volta de 80% das amostras clínicas de *S. aureus* eram resistentes à penicilina, já que produziam enzimas beta-lactamases, que degradam o anel beta-lactâmico deste antimicrobiano (JESSEN et al., 1969). A necessidade de novas drogas para o tratamento das infecções estafilocócicas levou à criação de penicilinas semissintéticas como a Meticilina e a Oxacilina, que possuem um anel beta-lactâmico resistente a ação das beta-lactamases. Porém, um ano após a introdução destas drogas na clínica (1961) já foram reportadas amostras resistentes (JEVONS, 1961). Estas amostras resistentes às novas penicilinas foram chamadas de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA; do inglês: *Methicillin-resistant S. aureus*). Nos anos 70 foi estimado que entre as amostras de *S. aureus* isoladas em hospitais, apenas 2% eram MRSA. Nas décadas seguintes foi observada uma rápida difusão mundial de cepas resistentes e nos anos 2000, cerca de 60% dos *S. aureus* isolados de hospitais de diversos países eram resistentes à Meticilina (NNIS 2004). Hoje a porcentagem de MRSA no mundo é bem variável e pode chegar até 50% em países em desenvolvimento como a Índia (CENTER FOR DISEASE DYNAMICS ECONOMICS & POLICY, 2015). No Brasil não há dados epidemiológicos recentes sobre a incidência de MRSA, porém estima-se que esta taxa esteja em torno de 60% (ROSSI, 2011). Infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por MRSA tem maior taxa de mortalidade e tempo de internação prolongado quando comparado infecções por *S. aureus* sensíveis à Meticilina

(MSSA; do inglês *Methicillin-susceptible S. aureus*) (GANGA et al., 2009).

A resistência dos MRSA ocorreu devido à aquisição do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*). O *SCCmec* é um elemento genético móvel adquirido e integrado ao cromossomo dos MRSA. Essa grande sequência de DNA exógeno (20-67kb) contém o gene *mecA* (que confere a característica de resistência à maioria dos beta-lactâmicos), além de seus reguladores *mecRI* e *mecI*. O *SCCmec* também carrega o chamado complexo gene *ccr*, o qual codifica recombinases responsáveis pela mobilidade. Além disso, outros elementos genéticos móveis também podem estar presentes, como elementos de inserção, plasmídios e transposons. Pode-se observar também a presença de outros genes de resistência a antimicrobianos, além do *mecA*, sendo por isso considerado o *SCCmec* uma ilha de resistência a antimicrobianos (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). O gene *mecA* codifica para uma nova transpeptidase com baixa afinidade de ligação aos antibióticos beta-lactâmicos, denominada *Penicilin-binding protein 2a* ou *2'* (PBP2a ou PBP2'), permitindo que a síntese da parede celular bacteriana continue sendo realizada mesmo na presença de beta-lactâmicos (que bloqueiam as PBPs normais) (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Até o momento, já foram descritos onze elementos *SCCmec* distintos entre si, cada qual carregando uma combinação característica dos complexos de genes *ccr* e *mec* e do repertório de determinantes de resistência (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Já foi reportado que fatores de virulência associados ao tipo de *SCCmec* influenciam na bacteremia por MRSA, por exemplo isolados *SCCmec* II são geralmente associados a altos índices de mortalidade e tem menor sensibilidade a antimicrobianos que cepas de *SCCmec* tipo IV (GANGA et al., 2009). Os tipos mais comuns de *SCCmec* do Brasil estão representados na figura 1. Além da resistência a drogas relacionadas à aquisição do *SCCmec*, é comum que grande parte das cepas adquiram genes de resistência adicionais por transferência horizontal de genes, tornando os MRSA resistentes a outras classes de antimicrobianos além dos beta-lactâmicos, como por exemplo resistência a tetraciclina, cloranfenicol e clindamicina. Esta característica confere a certas cepas multirresistentes a denominação de “superbactérias” (FOSTER, 2004). A emergência e a ampla disseminação de amostras multirresistentes de *S. aureus* são provavelmente reflexos da evolução bacteriana acelerada, resultante da pressão seletiva decorrente da imensa quantidade de agentes antimicrobianos aplicados

mundialmente (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014).

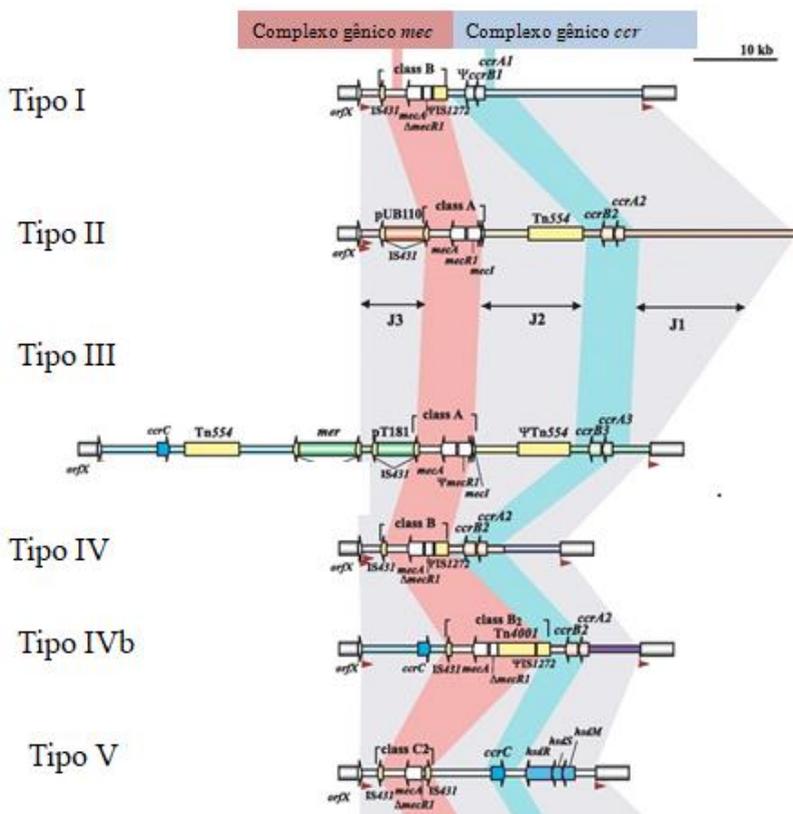


Figura 1- Representação dos principais tipos de SCC*mec*. Adaptado de IWG-SCC (2009).

Uma característica marcante entre os MRSA é sua natureza clonal. Em diversos países do mundo, amostras de MRSA geneticamente semelhantes ou mesmo iguais (mesmo tipo clonal) quanto ao padrão de PFGE (do inglês: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*; SANCHES et al., 1995); MLST (do inglês: *Multilocus sequence typing*; ENRIGHT et al., 2000), tipo de ilha SCC*mec* e de polimorfismos dos genes que codificam para a proteína A (*spa*) (HARMSSEN et al., 2003) têm sido detectadas como agentes etiológicos de infecções que ocorrem em regiões separadas por distâncias, muitas vezes, intercontinentais

(FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Atualmente, os diferentes clones de MRSA associados a infecções são classificados principalmente de acordo com os complexos clonais (CC), *sequence typing* (ST) e com o tipo de SCCmec. A tipagem do SCCmec normalmente é feita através de multiplex PCR (Reação em cadeia da Polimerase; do inglês *Polymerase chain reaction*) (BOYE et al., 2007). Os CC são obtidos a partir do ST da amostra, que é determinado através da metodologia de tipagem molecular MLST. Esta metodologia é baseada no sequenciamento de sete genes conservados bacterianos, os quais são comparados de acordo com variações sequenciais no banco de dados do MLST de *S. aureus* (<http://saureus.mlst.net/>), originando o ST correspondente, que é agrupado em grandes CCs (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Mundialmente, os clones hospitalares mais frequentes são o CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45 tendo maior prevalência CC5 e CC8. No Brasil, há maior ocorrência do CC5 e CC8, mais especificamente ST1, ST5 e ST239 (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Os principais clones de MRSA, linhagens e sua distribuição geográfica estão listados no Quadro 1.

Quadro 1- Principais clones e linhagens de MRSA e sua distribuição global.

CC	Linhagem	Clone	Distribuição geográfica
CC5	ST5-SCCmec II	USA100, NY/Japan	Austrália, Canadá, Europa, Japão, América do Sul, Coreia do Sul, EUA
	ST5-SCCmec IV	USA800, paediatric, USA800-related	Europa, América do Sul, EUA
	ST5-SCCmec I	UK-EMRSA-3	Ásia, Europa, África do Sul, América do Sul
	ST228-SCCmec I	Italian/Southern German	Europa
CC8	ST8-SCCmec IV	USA500, UK-EMRSA-2/6	Austrália, Canadá, Europa, EUA
	ST8-SCCmec IV	USA300	Ásia, Austrália, Europa, EUA
	ST247-SCCmec I	Iberian, UK-EMRSA-5	Europa e EUA
	ST239-SCCmec III	Brazilian/Hungarian, Russian-variant	Ásia, Austrália, Europa, África do Sul, América do Sul
	ST612-SCCmec IV	-	Austrália, África do Sul
CC22	ST22-SCCmec IV	UK-EMRSA-15	Austrália, Ásia, Canadá, Europa
CC30	ST36-SCCmec IV	USA200, UK-EMRSA-16	Austrália, Canadá, Reino Unido, EUA
	ST36-SCCmec II	-	Ásia, Austrália, Europa, África do Sul
	ST30-SCCmec IV	USA100, OSPC	América do Sul, EUA
CC45	ST45-SCCmec IV	USA600, Berlin	Europa, EUA

Fonte: Adaptado de Figueiredo e Ferreira (2014). Notas:CC- Complexo Clonal
SCCmec- Cassete Cromossômico Estafilocócico ST- Sequência tipo (do inglês:
“Sequence typing”

Atualmente o antimicrobiano mais utilizado no combate de infecções graves pelos MRSA multirresistentes é a vancomicina, porém isolados resistentes (VRSA; do inglês: *Vancomycin-resistant S. aureus*) já foram reportados em várias regiões do globo, inclusive no Brasil (ROSSI et al., 2014), tornando o tratamento das infecções estafilocócicas preocupante. Em 2014, foi estimado pelo CDC que o número de infecções invasivas causadas pelos MRSA seria de aproximadamente 72.000 por ano nos Estados Unidos, com cerca de 9.000 mortes reportadas (JOHNSON et al., 2014). Porém, estima-se que a incidência de MRSA em países em desenvolvimento seja mais elevada quando comparada aos países desenvolvidos (JONES et al., 2013). Embora no Brasil raros estudos tenham reportado o impacto real dos MRSA nas infecções, um estudo de Gales e colaboradores (2009) com amostras clínicas coletadas em diversos estados brasileiros classificou os *S. aureus* com o agente mais incidente em bacteremias e infecções de pele e tecidos moles hospitalares e o segundo agente etiológico entre as pneumonias nosocomiais (GALES et al., 2009). Estes dados reforçam a importância destes microrganismos como um grave problema de saúde pública.

Em Santa Catarina, estudos envolvendo amostras MRSA são ainda mais escassos, tendo sido encontrado somente um trabalho publicado (SILVEIRA et al., 2015b). Neste estudo, através de análise não randomizada, Silveira e colaboradores (2015) apontaram que a incidência de MRSA no estado de Santa Catarina parece ser extremamente baixa quando comparada com as taxas encontradas em outras regiões do Brasil, incluindo outros Estados da região Sul (PEREZ; D'AZEVEDO, 2008; ROSSI, 2011; SILVEIRA et al., 2015a). Surpreendentemente, este grupo de pesquisa apresentou índices de MRSA em Florianópolis e Blumenau comparáveis com as taxas encontradas em países da Escandinávia (WHO, 2015), em torno de 2-8% entre todos os *S. aureus* (Silveira et al, 2015). A baixa incidência de MRSA nestes países é justificada pela existência de políticas públicas efetivas que atuam no controle da disseminação das infecções microbianas. Porém, no Brasil, estes tipos de políticas públicas ainda não são amplamente praticados (GERSCHMAN, 2008). O avanço de técnicas terapêuticas e diagnósticas, as características intrínsecas dos pacientes (extremos de idade, imunocomprometimento ou doenças de base), além do grande número de componentes de virulência desses microrganismos, são fatores importantes que levaram o MRSA a ser um dos principais patógenos

em incidência e gravidade nas IRAS no Brasil e em diversos países do mundo (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Em contrapartida, em Santa Catarina, a causa da baixa incidência de MRSA circulantes ainda precisa ser estabelecida. Adicionalmente, Silveira et al (2015b) reportaram que 70,2% das infecções associadas às amostras de MRSA circulantes em Santa Catarina (MRSA-SC) foram invasivas, incluindo infecções no trato respiratório inferior, osteomielite e bacteremias, sugerindo um alto potencial patogênico entre as amostras.

2. JUSTIFICATIVA

O ponto de partida do estudo se baseia inicialmente em dados de Silveira e colaboradores (2015b). Apesar de ser um estudo não randomizado, é o único publicado sobre caracterização de MRSA em Santa Catarina, acerca de nosso conhecimento. Neste trabalho foi observada uma baixa incidência destas amostras com relação a outros estados brasileiros (PEREZ; D'AZEVEDO, 2008; ROSSI, 2011; SILVEIRA et al., 2015a). Por outro lado, Silveira e colaboradores (2015) observaram que 70,2% das amostras MRSA coletadas em Florianópolis e Blumenau estavam relacionadas a infecções invasivas e graves (37,1% associadas a infecções no trato respiratório inferior, 19,4% de osteomielite e 13,7% a partir de bacteremia), sugerindo um alto potencial patogênico. Outro dado relevante deste estudo foi a tipagem de 54% das amostras de MRSA-SC como SCCmecIII. Este tipo de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCCmec) é, quando comparado aos demais tipos de SCCmec descritos, o maior em tamanho, carregando diversos genes adicionais a bactéria (inclusive associados a resistência bacteriana), além do gene *mecA* (ITO et al., 2009). Amostras de MRSA geneticamente relacionadas a esta linhagem (caracterizadas como ST239-SCCmecIII) já foram detectadas em hospitais do Rio de Janeiro e, apesar de não ser a linhagem predominante nos últimos anos na região, foi reportado que estas cepas apresentam comumente características de múltipla resistência a drogas (AMARAL et al., 2005; ROZENBAUM et al., 2009) e habilidade aumentada para produzir biofilme e aderir e invadir células epiteliais brônquicas humanas (AMARAL et al., 2005). A partir destes dados, a hipótese do estudo é a de que os MRSA-SC expressam um maior número de fatores de virulência que impactam negativamente o *fitness*

(capacidade de adaptação ou custo biológico) do patógeno. Como não há nenhum dado relacionado à biologia de amostras MRSA isoladas em Santa Catarina, inicialmente, o estudo investigou alguns fatores biológicos que podem estar envolvidos na baixa prevalência e alta patogenicidade dos MRSA-SC. Estes dados contribuirão para ampliar os dados epidemiológicos sobre MRSA em Santa Catarina e compreender um pouco da virulência das amostras do Estado, auxiliando no futuro controle e tratamento das infecções.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) isoladas de pacientes hospitalizados no Estado de Santa Catarina (MRSA-SC).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a tipagem molecular de amostras clínicas de MRSA, através da tipagem *SCCmec*;
- Realizar a tipagem molecular de uma amostra clínica MRSA, através da tipagem MLST;
- Detectar por PCR (reação em cadeia da polimerase; do inglês: *Polymerase chain reaction*) a presença dos genes *lukDE* e *lukSPVL* e *lukFPVL* nas amostras.
- Analisar genes de virulência *in silico* presentes em genomas completamente sequenciados de outras cepas de MRSA isoladas em diversas regiões do mundo, utilizando a ferramenta *online* VirulenceFinder.
- Analisar genes de resistência *in silico* presentes em genomas completamente sequenciados de outras cepas de MRSA isoladas em diversas regiões do mundo, utilizando a ferramenta *online* ResistanceFinder.
- Comparar os dados do perfil de virulência e resistência da análise *in silico* para com as amostras MRSA-SC para predição de outras características de virulência e de sensibilidade aos antimicrobianos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS E CEPAS CONTROLE

As amostras clínicas de MRSA foram obtidas a partir de pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) em Florianópolis e do Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC), que recebe amostras clínicas MRSA de pacientes oriundos de diversos hospitais do Estado. As amostras foram coletadas durante o período de Dezembro de 2016 até Outubro de 2017, totalizando 55 amostras de diversos sítios clínicos e setores dentro do hospital. 21 (38,18%) destas eram amostras relacionadas a infecções de pele e tecidos moles (Pé diabético, secreção de ferida, abscesso, swab de lesão ulcerada), 16 (29,09%) foram coletadas de infecções de corrente sanguínea, 12 (21,81%) amostras foram coletadas de secreções do trato respiratório (Secreção traqueal, aspirado traqueal, swab nasal), 3 (5,45%) osteomielites, 1 (1,81%) coletada de tecido nervoso, 1 (1,81%) de secreção ocular e 1 (1,81%) coletada da urina. A coleta dos espécimes clínicos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) sob número 53562716.4.0000.0121, em colaboração com a Prof^a Thais Sincero. As cepas MRSA que foram utilizadas como controles experimentais são USA300 (ST8-SCC_{mec} IV), USA400 (ST1-SCC_{mec} IV), EMRSA 15 (ST22-SCC_{mec} IV), EMRSA 16 (ST36-SCC_{mec} IV), New York/Japan (ST5-SCC_{mec} II), Pediatric (ST5-SCC_{mec} IV) e foram doadas pela Prof^a Thais Sincero (UFSC) e BMB9393 (ST239-SCC_{mec} III) doada pela Prof^a Agnes Marie Sá Figueiredo (UFRJ).

4.2 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO

As amostras coletadas já previamente identificadas como MRSA pelos hospitais tiveram a identificação confirmada no laboratório. As amostras recebidas foram semeadas em meio seletivo e diferencial Ágar manitol salgado (Kasvi[®]), que identifica presuntivamente amostras de *S. aureus* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Em seguida, realizamos o teste de detecção da coagulase, coletando 2 colônias amarelas isoladas em manitol salgado

e em seguida inoculando no meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB; Kasvi®), com agitação (200rpm) à 37°C por 20h e adicionando plasma de coelho (Laborclin) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009) na proporção 1:4. Após incubação em banho-maria à 37°C por no máximo 24h, analisando o tubo de hora em hora nas primeiras 4h, as amostras que formaram um coágulo visível foram consideradas positivas. Também foi feita a reação em cadeia da polimerase (PCR) para os genes *mecA*, para confirmação como MRSA e *rrna16S* para confirmação como *S. aureus*. Os iniciadores utilizados estão listados na tabela 2 (GUIMARÃES et al., 2015).

O DNA para as reações foi extraído das amostras com o método de lise térmica adaptado de Pacheco et al (1997). As amostras foram crescidas em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA) em estufa à 37°C por 20h, 2 colônias isoladas da placa foram transferidas para uma solução de 1ml de TE (solução com TRIS 1M e EDTA 0,5M que solubiliza o material genético e protege de degradação, na concentração de 1:10) em um microtubo de 2ml. Após isso foram feitas duas centrifugações (14.000rpm por 2min) e lavagens com TE e fervura à 100°C por 10 min das amostras. Após isso foi feita mais uma centrifugação, o sobrenadante da solução foi coletado e armazenado à -20°C para ser usado nas reações.

Para o volume de 25µL de reação foram utilizados Tampão 5x *Gotaq Flexi* (Promega®), 200µM de cada dNTP (Promega®), 1U de DNA polimerase *GoTaq* (Promega®), 1,0µM de MgCl₂, 0,01µM de cada iniciador e 2µL de DNA. O termociclador utilizado para as reações foi *SimpliAmp™ Thermal Cycler* (Thermo Fisher Cientific®). As condições de reação de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos; 30 ciclos começando com desnaturação à 94°C por 30 segundos, seguido de 30 segundos à 55°C para que ocorra a hibridação dos iniciadores e 1 minuto e 30 segundos à 72°C para extensão da fita; Por fim, 72°C por 4 minutos para extensão final. A cepa ATCC 25923, que é uma MSSA, foi usada como controle positivo para *rrna16S* e controle negativo para o gene *mecA*. A amostra USA300 foi usada como controle positivo do gene *mecA*. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% com voltagem de 100V e amperagem de 400Å durante 30 minutos. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o modelo K9-1000L com 1kb (Kasvi®).

4.3.1 TIPAGEM SCC*mec*

A tipagem SCC*mec* dos tipos I ao V (engloba os mais comuns no Brasil que são II, III, IV) foi feita com o uso de PCR multiplex com quatro pares de iniciadores de acordo como descrito por Boye e colaboradores em 2007 e que estão listados na tabela 2. Os DNAs bacterianos foram obtidos de acordo com o protocolo descrito no item 4.2.

A PCR teve um volume final de 25µL e foi realizada segundo protocolos descritos por Boye et al (2007), com 5x *Gotaq* Flexi buffer (Promega®), 200µ M de cada dNTP, 1U de *GoTaq* DNA polymerase (Promega®), 1,5µ M de MgCl₂ e 50-300ng de DNA. Os iniciadores com as seguintes concentrações: α e β 0,2µ M cada; *ccrCF* e *ccrCR* 0,25µ M cada; 1272F1 e 1272R1 0,08µ M cada e 5R*mecA* e 5R431 0,1µ M cada. A sequência de cada iniciador consta na tabela 2. O tipo de SCC*mec* foi determinado pelo padrão de bandas observado em eletroforese em gel de agarose 1,0% nas mesmas condições citadas no item 4.2. A interpretação das bandas foi feita conforme Boye et al (2007). As cepas OSPC (SCC*mec* IV), BMB9393 (SCC*mec* III) e New York/Japan (SCC*mec*II) foram utilizadas como controles positivos de cada tipo e a cepa ATCC25923 como controle negativo.

4.3.2 MLST

Para realizar o MLST da amostra clínica escolhida como representante do SCC*mec* II e PVL negativa, foi utilizado um protocolo de extração de DNA com NaCl adaptado (ABRÃO et al., 2005), que resulta em um DNA de melhor qualidade. A amostra foi crescida em meio de cultura TSA e incubada em estufa à 37°C por 20h, após isso foram coletadas 5 colônias e dissolvidas em uma solução com Tampão de lise TES (composto por Tris-HCl 1M pH8,0; EDTA 0,5M pH8,0; e SDS 20%). A solução é fervida por 10 min e adicionamos proteinase K para a lise da parede. Após isso, NaCl 6M é adicionado e a solução centrifugada com 14,000rpm por 2 min, o sobrenadante resultante é transferido a um novo tubo e são feitas lavagens com etanol absoluto. Uma última centrifugação com 14,000rpm por 5 min é feita, o sobrenadante é descartado e o sedimento ressuspenso em H₂O MiliQ.

A PCR teve um volume final de 50µl utilizando 5x *Gotaq* Flexi buffer (Promega®), 200µ M de cada dNTP, 1U de *GoTaq* DNA

polymerase (Promega®), 1,0µM de MgCl₂, 0,01µM de cada iniciador e 50-100ng de DNA. Os 7 “housekeeping genes” que foram amplificados são: carbamato quinase (*arcC*), chiquimato desidrogenase (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilato quinase (*gmk*), fosfato acetiltransferase (*pta*), triosephosphate isomerase (*tpi*) e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*). As sequências dos iniciadores e os respectivos amplicons estão na tabela 2. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, com voltagem de 100V, amperagem de 400Å por 30 minutos para verificação do sucesso da amplificação. Após isso, o DNA amplificado foi purificado utilizando o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Life Sciences®). A quantificação dos produtos de PCR após a purificação foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% com os parâmetros já citados anteriormente e utilizando o marcador de tamanho molecular K9-1000L com 1kb (Kasvi®) para comparação.

Após adequação da quantidade de DNA baseada na quantificação feita, as amostras foram enviadas para sequenciamento pela empresa Myleus Biotecnologia. Após recebimento do sequenciamento, foi feito o upload das sequencias no banco de dados de *S. aureus* do site do MLST (<http://saureus.mlst.net/>) que encontrou por similaridade de bases qual alelo correspondia a cada gene de nossa amostra. Cada alelo tem um número e a sequência desses números que vai indicar o ST.

4.4 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Para detecção dos genes de virulência foram realizadas PCRs a partir do DNA das amostras clínicas extraído como descrito no item 4.2 para PVL (*lukSPVL* e *lukFPVL*) e leucocidina LukDE (*lukDE*). Os iniciadores e temperaturas de anelamento que serão usados estão listados na tabela 2. Para o volume de 25 µ l de reação foram utilizados 5x *Gotaq* Flexi buffer (Promega®), 200µM de cada dNTP, 1Ude *GoTaq* DNA polymerase (Promega®), 1,0µM de MgCl₂, 0,01µM de cada iniciador e 50-300ng de DNA. O programa de reação será o mesmo utilizado por Guimarães e colaboradores (2015). O produto da PCR será analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0%, como citado no item 4.2. A cepa controle positivo para PVL foi OSPC e controle positivo para LukDE foi a cepa USA400.

Quadro 2- Iniciadores que foram utilizados no presente estudo (Continua).

Técnica	Gene	Iniciador	Sequência Forward/Reverse (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência
Identificação	<i>mecA</i>	MECA	CCAGATTACAACCTTCACCA GG	55	162	Guimarães et. al. (2015)
		MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAAC G			
Identificação	<i>rma16S</i>	rrna16SF	AGAGATAGAGCCTTCCCCT T	55	84	Ferreira et. al. (2013)
		rrna16SR	TTAACCCAACATCTCACGA CA			
Virulência	<i>lukSPVL</i> <i>lukFPVL</i>	NewPVL-1	ATCATTAGGTAAAATGTCT GGACATGATCCA	55	433	Guimarães et. al. (2015)
		NewPVL-2	GCATCAAGTGTATTGGATA GCAAAAGC			
Virulência	<i>lukE-lukD</i>	LUKDE-1	CCATCGTTTATCACTACACT AT	55	601	Guimarães et. al.(2015)
		LUKDE-2	CATAGTCAACAACATTTAC AGC			
SCC <i>mec</i>	<i>ccrA2-B</i>	B	ATTGCCTTGATAATAGCCT TCT	55	937	Boye et. al. (2007)
		α3	TAAAGGCATCAATGCACAA ACACT			
	<i>ccrC</i>	ccrCF	CGTCTATTACAAGATGTTA AGGATAAT	55	518	Boye et. al. (2007)
		ccrCR	CCTTTATAGACTGGATTATT CAAAATAT			
<i>IS1272</i>	1272F1	GCCACTCATAACATATGGA A	55	415	Boye et. al. (2007)	
	1272R1	CATCCGAGTGAAACCCAAA				
<i>mecA-IS431</i>	5R <i>mecA</i>	TATACCAAACCCGACAAC TAC	55	359	Boye et. al. (2007)	
	5R431	CGGCTACAGTGATAACATC C				

Quadro 2- Iniciadores que foram utilizados no presente estudo (Continuação).

Técnica	Gene	Iniciador	Sequência Forward/Reverse (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência
MLST	<i>arc</i>	arcC-Up	TTGATTCACCAGCGCGTAT	55	456	Enright et. al. (2000)
		arcC-Dn	TGTC AGGTATCTGCTTCAATCAG CG			
	<i>aroE</i>	aroE-Up	ATCGGAAATCCTATTTCAC	55	456	Enright et. al. (2000)
		aroE-Dn	ATTC GGTGTGTATTAATAACGA TATC			
	<i>glpF</i>	glpF-Up	CTAGGAAC TGCAATCTTAA	55	465	Enright et. al. (2000)
		glpF-Dn	TCC TGGTAAAATCGCATGTCCA ATTC			
	<i>gmk</i>	gmk-Up	ATCGTTTTATCGGGACCAT	55	429	Enright et. al. (2000)
gmk-Dn		C TCATTA ACTACAACGTAAT CGTA				
<i>pta</i>	pta-Up	GTTAAAATCGTATTACCTG	55	474	Enright et. al. (2000)	
	pta-Dn	AAGG GACCCTTTTGTGAAAAGC TTAA				
<i>tpi</i>	tpi-Up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGT	55	402	Enright et. al. (2000)	
	tpi-Dn	GAA TTTGCACCTTCTAACAATTG TAC				
<i>yqiL</i>	yqiL-Up	CAGCATA CAGGACACCTAT	55	516	Enright et. al. (2000)	
	yqiL-Dn	TGGC CGTTGAGGAATCGATACTG GAAC				

Fonte: o Autor (2018)

4.5 COMPARAÇÃO *IN SILICO* DOS PERFIS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

Após a detecção dos genes de virulência das amostras MRSA-SC realizada através de PCR, foi feita uma busca por genomas representativos dos principais clones completamente sequenciados de MRSA clínicos isolados no Brasil e em outros países no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/154>), de forma a compararmos a presença dos genes detectados *in vitro* nas nossas amostras com as várias cepas incidentes em diversas regiões. Para análise dos genes de virulência nestes genomas, realizamos uma análise *in silico* do viruloma bacteriano (conjunto de genes de virulência), utilizando as ferramentas online VirulenceFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) e ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Foi feito o download dos arquivos dos genomas e posterior upload nas duas plataformas citadas. O site realizou uma comparação com os genes de virulência e resistência registrados no banco de dados e forneceu um perfil de quais desses genes estão presentes em cada genoma que foi enviado.

5. RESULTADOS

5.1 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS MRSA-SC

Das 55 amostras coletadas durante o estudo, todas foram confirmadas como MRSA, sendo positivas no crescimento em manitol, teste da coagulase e PCR para os genes *mecA* e *rrna16S*. 52 amostras foram tipadas de acordo com seu SCC*mec*, por PCR multiplex, havendo maior incidência dos SCC*mec* tipo II com 27 amostras (49,09%), 24 (43,60%) são do tipo IV, uma (1,81%) foi tipada como SCC*mec* I e 3 (5,45%) não puderam ser tipadas pela metodologia utilizada. Entre as amostras de infecção de pele ou tecidos moles, 12 (60%) carregavam SCC*mec* IV, 6 (30%) SCC*mec* II, 1 (5%) SCC*mec* I e 1 (5%) não foi tipada. Dos isolados de infecções de corrente sanguínea 9 (56,25%) carregavam SCC*mec* tipo II, 6 (37,5%) carregavam o tipo IV e uma (6,25%) não foi tipada. Nas originadas de secreções do trato respiratório inferior, 6 (54,54%) foram tipadas como SCC*mec* II e 5 (45,45%)

SCC*mec* IV. Das osteomielites 2 (66,66%) eram SCC*mec* II e uma (33,33%) não foi tipável. A amostra de tecido nervoso e a de secreção ocular carregavam SCC*mec* de tipo II, enquanto que a de urina carregava tipo IV. Mais de 50% das amostras SCC*mec* IV foram isoladas de infecções de pele e entre as infecções invasivas a maioria foi SCC*mec* II. O resultado está apresentado na tabela 3 e figura 1.

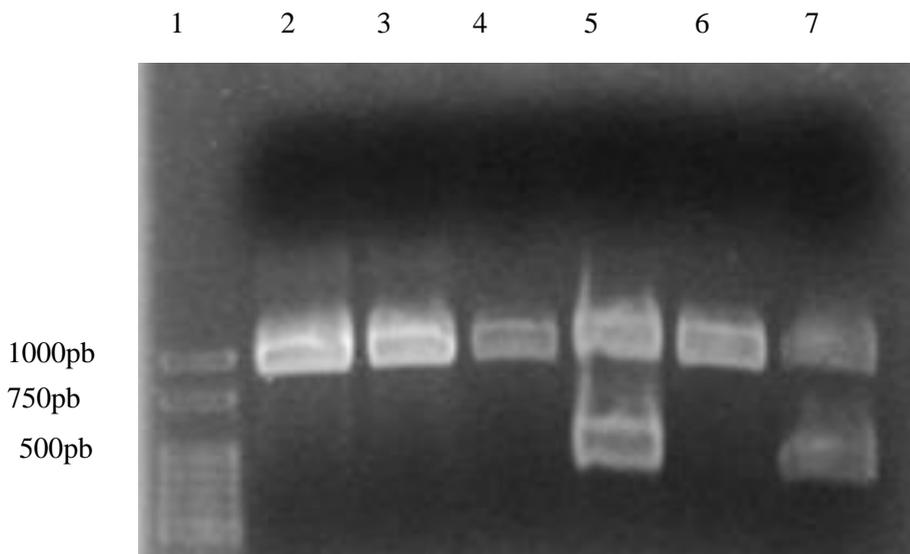


Figura 2- Gel de agarose 1% representativo da tipagem SCC*mec*. A coluna 1 contém o marcador de peso molecular de 50pb (Ludwig®), colunas 2 a 6 contém bandas das amostras clínicas 17032, 17033, 17034(todas SCC*mec* II, 937pb), 17035 (SCC*mec* IV, 937 e 415pb) e 17007, coluna 7 contém o controle positivo OSPC (SCC*mec* IV). Interpretação conforme Boye et al (2007).

5.2- MLST

Foi realizado o MLST da amostra clínica 16007 representativa de SCC*mec* tipo II, PVL negativa e obtivemos o seguinte perfil alélico 1-4-1-4-12-1-28 indicando ST105, um clone já detectado no Brasil e que é

relacionado geneticamente ao clone New York/Japan(linhagem ST5-SCC*mecII*) (DABUL; CAMARGO, 2014). O resultado da PCR para os 7 genes está representado na figura 1.

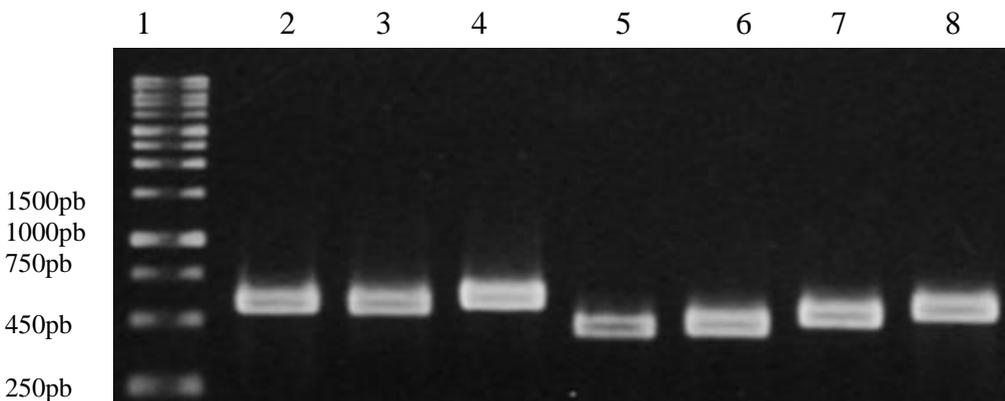


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1%%, mostrando os produtos das PCRs dos 7 “housekeeping genes” da amostra clínica 16007 representativa escolhida. A coluna 1 contém o marcador de peso molecular de 1kb (Kasvi®), colunas 2-8 contém bandas para os genes: *pta* (474pb), *glpF* (465pb), *yqil* (516pb), *tpi* (402pb), *gmk* (429pb), *arcC* (456pb) e *aroE* (456pb), respectivamente.

Quadro 3– Amostras de MRSA de Santa Catarina (Continua)

Ano	Amostra	Sítio clínico	Origem	rRNA			Tipo de	PVL	lukDE
				16S	<i>mecA</i>	Coagulase	<i>Sccmec</i>		
2017	17003	Secreção de Ferida	HU	+	+	+	I	-	+
2016	16001	Secreção Traqueal	HU	+	+	+	II	-	+
2016	16006	Sangue	HU	+	+	+	II	-	+
2016	16007	Sangue	HU	+	+	+	II	-	+
2016	16009	Escarro	LACEN	+	+	+	II	-	+
2016	16011	Secreção de ferida operatória	LACEN	+	+	+	II	-	+
2016	16012	Secreção de membro inferior	LACEN	+	+	+	II	-	+
2016	16013	Sangue	LACEN	+	+	+	II	-	+
2016	16014	Fragmento ósseo	LACEN			+	II	-	+
2017	17001	Sangue	HU	+	+	+	II	-	+
2017	17006	Secreção ocular	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17007	Secreção lesão de pele	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17011	Biópsia do tórax	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17012	LVA	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17013	Sangue	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17014	Secreção de ferida operatória	LACEN	+	+	+	II	-	+

Quadro 3 – Amostras de MRSA de Santa Catarina(Continua)

Ano	Amostra	Sítio clínico	Origem	rRNA			Tipo de		
				16S	<i>mecA</i>	Coagulase	<i>Sccmec</i>	PVL	lukDE
2017	17015	Secreção de lesão	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17018	Aspirado traqueal	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17019	Frag. Tecido ósseo	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17021	Swab de estroma traqueal	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17024	Sangue	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17026	Secreção traqueal	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17028	Sangue	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17031	Sangue	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17032	Aspirado traqueal	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17033	Tecido nervoso	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17034	Segmento de tendão	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17039	Hemocultura	HU	+	+	+	II	-	+
2017	17011	Biópsia do tórax	LACEN	+	+	+	II	-	+
2017	17012	LVA	LACEN	+	+	+	II	-	+
2016	16003	Secreção Traqueal	HU	+	+	+	IV	-	+
2016	16004	Ferida Operatória	HU	+	+	+	IV	+	+

Quadro 3 – Amostras de MRSA de Santa Catarina(Continua)

Ano	Amostra	Sítio clínico	Origem	rRNA			Tipo de		
				16S	<i>mecA</i>	Coagulase	<i>Sccmec</i>	PVL	lukDE
2016	16005	Secreção de Ferida Sacral	HU	+	+	+	IV	-	+
2016	16008	Secreção de Ferida	HU	+	+	+	IV	-	+
2016	16010	Frag. reg. perianal	LACEN	+	+	+	IV	+	+
2017	17002	Abscesso	HU	+	+	+	IV	+	+
2017	17004	Urina	HU	+	+	+	IV	-	+
2017	17005	Impetigo	HU	+	+	+	IV	+	+
2017	17008	Sangue	LACEN	+	+	+	IV	+	+
2017	17010	Secreção nasofaríngea	LACEN	+	+	+	IV	-	+
2017	17016	Secreção Traqueal	LACEN	+	+	+	IV	-	-
2017	17017	Secreção Traqueal	LACEN	+	+	+	IV	-	-
2017	17020	swab nasal	LACEN	+	+	+	IV	-	+
2017	17023	Abscesso	LACEN	+	+	+	IV	+	-
2017	17025	Swab de lesão ulcerada em região parietal esquerda	LACEN	+	+	+	IV	-	+
2017	17027	Abscesso de pé direito	LACEN	+	+	+	IV	+	+
2017	17029	Lesão de úlcera não ulcerada	LACEN	+	+	+	IV	+	+
2017	17030	Sangue	LACEN	+	+	+	IV	-	-

Quadro 3 – Amostras de MRSA de Santa Catarina(Continuação)

Ano	Amostra	Sítio clínico	Origem	rRNA			Tipo de		
				16S	<i>mecA</i>	Coagulase	<i>Sccmec</i>	PVL	lukDE
2017	17035	Sangue	HU	+	+	+	IV	+	+
2017	17036	Abscesso	HU	+	+	+	IV	+	+
2017	17037	Hemocultura	HU	+	+	+	IV	+	+
2017	17038	Hemocultura	HU	+	+	+	IV	-	+
2017	17040	Abscesso	HU	+	+	+	IV	+	+
2017	17041	Hemocultura	HU	+	+	+	IV	+	+
2016	16002	Pé Diabético	HU	+	+	+	nt	-	+
2017	17009	Sangue	LACEN	+	+	+	nt	-	-
2017	17022	Fragmento ósseo de fêmur	LACEN	+	+	+	nt	-	-

Fonte: o Autor (2018)

5.3- GENES DE VIRULÊNCIA

Entre as amostras estudadas, 49 (90,74%) carregavam o gene para a leucocidina LuKDE, sendo 20 (95,23%) dos isolados de infecções de pele e tecidos moles, 14 (87,5%) das infecções sanguíneas, 10 (83,33%) das amostras coletadas de secreções do trato respiratório, 2 (66,66%) de osteomielite, 1 (100%) de urina, 1(100%) de tecido nervoso e 1 (100%) de secreção ocular.

Das 13 (23,63%) amostras que carregavam o gene para a leucocidina Panton-Valentine, todas foram *SCCmec* IV e correspondendo a 54,16% das amostras desse tipo. Nove (69,23%) destas foram isoladas de infecções de pele e tecidos moles, correspondendo à 42,85% de todas as infecções desse tipo, quatro (30,76%) foram coletadas do sangue do paciente, sendo 25% do total de infecções sanguíneas.

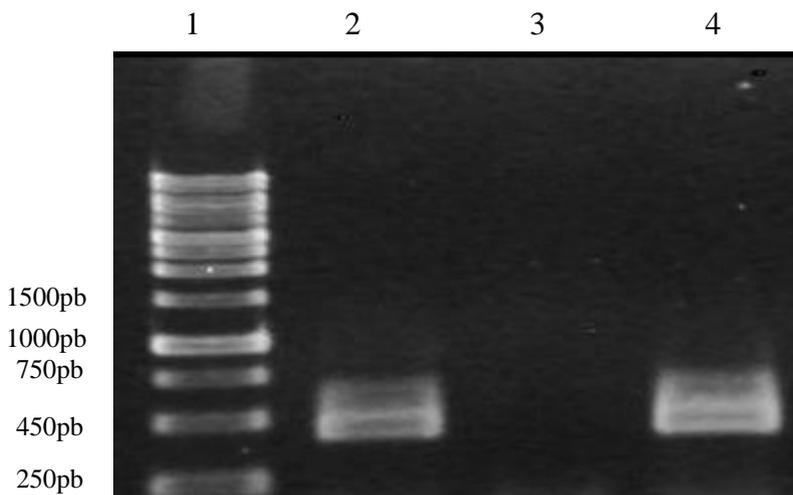


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1%, exemplificando produtos de PCR para o gene da PVL (433pb). Coluna 1 contém o marcador de peso molecular de 1kb (Kasvi®), coluna 2 a cepa controle positivo OSPC, colunas 3 e 4, amostras clínicas negativa 16003 e positiva 16004 para o gene, respectivamente.

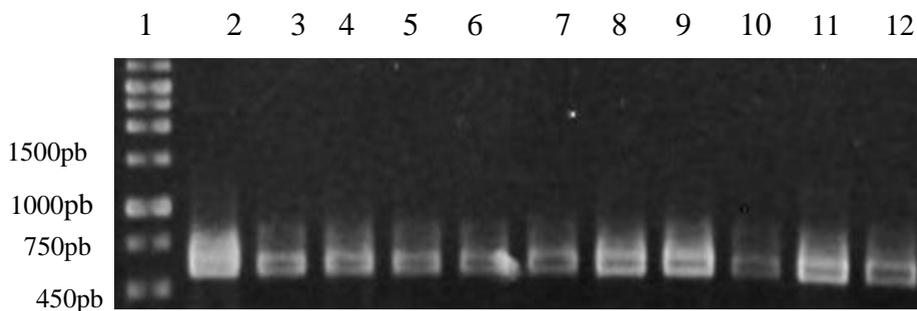


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1%, exemplificando produtos de PCR para o gene *lukDE* (601pb). Coluna 1 contém o marcador de peso molecular de 1kb (Kasvi®), coluna 2 contém a cepa controle positivo USA400, colunas 3 a 12 são de cepas clínicas positivas para a presença do gene. Dessas amostras, as colunas 3 a 8 correspondem às amostras 16009 a 160014 e as colunas 9-12, as

amostras 17001 a 17004, em ordem crescente.

5.4 PERFIL DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

Para a obtenção do viruloma e resistoma, foram escolhidos 5 genomas completos depositados no NCBI representativos dos principais tipos de *SCCmec* encontrados no estudo (cepas de MRSA: MW2 (ST1-*SCCmec* IV), USA400 0051 (ST1-*SCCmec* IV), Mu50 (ST5-*SCCmec* II), N315 (ST5-*SCCmec* II) e MRSA252 (ST36-*SCCmec* II). Os resultados individuais foram analisados e compilados no quadro 2. Todas as amostras carregam o gene da estafiloquinase e o do inibidor de complemento estafilocócico. As cepas carregando *SCCmec* do tipo II possuem mais genes para enterotoxinas do que as do tipo IV, tendo pelo menos 11 dos 17 genes presentes. Apenas as cepas com *SCCmec* IV possuem genes para leucocidina de Pantone-Valentine e todas, exceto MRSA252, apresentam o gene para leucocidina *lukE-lukD*, os dados obtidos nesse estudo também mostraram que poucas amostras (10,90%) não carregavam esse gene. De acordo com a tabela 4, fica claro que cepas MRSA de diferentes linhagens de *SCCmec* possuem genes de virulência diferentes, e mesmo dentro de um mesmo tipo e mesmo ST podem haver diferenças, ainda que pequenas. Assim como observado no viruloma gerado, as amostras *SCCmec* II do estudo foram negativas para PVL. Mais de metade (54,16%) das nossas amostras *SCCmec*IV carregavam esse gene. É possível que o perfil de virulência das cepas Mu50 e N315 (ST5-*SCCmec* II) seja similar ao de nossas amostras, visto que a linhagem ST105-*SCCmec* II, que determinamos com o MLST, é relacionada ao ST dessas cepas.

Apesar do presente estudo não ter obtido o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras MRSA coletadas, as informações sobre o resistoma de cepas MRSA pertencentes aos mesmos tipos de *SCCmec* das amostras isoladas em Santa Catarina podem trazer uma ideia de tendência de susceptibilidade de cada linhagem. De acordo com o resistoma obtido no presente estudo (Quadro 3), observa-se que todos os 5 genomas analisados carregam o gene *mecA* que confere resistência aos beta-lactâmicos e por isso são classificados como MRSA. Apenas a cepa N315 não possui gene de resistência a Fluoroquinolona. Interessantemente, as cepas que carregam *SCCmec*II carregam também genes de resistência aos aminoglicosídeos (*spc* e *aadD*) e o gene *erm(A)*, enquanto que as cepas *SCCmec*IV tendem a ser mais sensíveis de acordo com o perfil

de genes de resistência avaliados.

Cepa	SCCmec	ST	Fator de virulência																									
			Exoenzimas				Imunidade do hospedeiro				Toxinas																	
			<i>splB</i>	<i>splA</i>	<i>splE</i>	<i>aur</i>	<i>scn</i>	<i>sak</i>	<i>lukF-PV</i>	<i>lukS-PV</i>	<i>lukD</i>	<i>lukE</i>	<i>seg</i>	<i>sen</i>	<i>seu</i>	<i>sei</i>	<i>sem</i>	<i>seo</i>	<i>sea/sep</i>	<i>hly</i>	<i>sel</i>	<i>sec</i>	<i>tst</i>	<i>hlgA</i>	<i>hlgC</i>	<i>hlgB</i>	<i>sek</i>	<i>seq</i>
MW2	IV	1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
USA400 0051	IV	1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Mu50	II	5	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
N315	II	5	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
MRSA252	II	36	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	

Quadro 4- Viruloma dos 5 genomas representativos. Notas: *SCCmec*: Cassete Cromossômico Estafilocócico; *ST*- Sequence typing; *splB*- serine protease B; *splA*- serine protease A; *splE*- serine protease E; *aur*- aureolisina; *scn*- inibidor de complemento estafilocócico; *sak*- estafilokinase; *lukF-PV*- subunidade F da leucocidina de Panton-Valentine; *lukS-PV*- Subunidade P da leucocidina de Panton-Valentine; *lukD*- componente D de leucocidina; *lukE*- componente E de leucocidina; *seg*- enterotoxina G; *sen*- enterotoxina N; *seu*- enterotoxina U; *sei*- enterotoxina I; *sem*- enterotoxina M; *seo*- enterotoxina O; *hly*- beta hemolisina; *sel*- enterotoxina L; *sec*- enterotoxina C; *tst*- Toxina da Síndrome do choque tóxico; *hlgA*- precursor de cadeia II de gama hemolisina; *hlgC*- componente C da gama hemolisina; *hlgB*- precursor do componente B da gama hemolisina; *sek*- enterotoxina K; *seq*- enterotoxina Q; *seh*- enterotoxina H; Fonte: o Autor (2018)

Cepa	SCCmec	ST	Gene de Resistência							
			Beta Lactâmico		Aminoglicosídeo			MLS	Fluoroquinolona	Tetraciclina
			<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>spc</i>	<i>aadD</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>erm(A)</i>	<i>norA</i>	<i>tet(M)</i>
MW2	IV	1	+	-	-	-	-	-	+	-
USA400 0051	IV	1	+	-	-	-	-	-	+	+
Mu50	II	5	+	-	+	+	+	+	+	-
N315	II	5	+	-	+	+	-	+	-	-
MRSA252	II	36	+	+	+	+	-	+	+	-

Quadro 5- Resistoma dos 5 genomas representativos. Notas: MLS- Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B; Fonte: o Autor (2018)

6. DISCUSSÃO

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina são um dos mais importantes patógenos da atualidade, devido à sua multirresistência aos antimicrobianos β -lactâmicos decorrente de forte pressão seletiva pelo uso indiscriminado desses fármacos, causando tanto infecções nos hospitais como na comunidade (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Com uma característica clonal marcante, cepas pertencentes ao mesmo clone tem sido detectadas em regiões muito distantes e, por muitas vezes, intercontinentais (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Um dos marcadores utilizados para rastrear a clonalidade de MRSA é o tipo de *SCCmec* carregado pela bactéria, em conjunto com outras técnicas moleculares, como o MLST (BOYE et al., 2007; ENRIGHT et al., 2000

HARMSSEN et al., 2003) .

Nossos resultados mostram uma maior prevalência de amostras carreando *SCCmecII* e *SCCmecIV*, em discordância com o que foi visto no trabalho de Silveira (2015) em Santa Catarina. Das 124 amostras de MRSA analisadas em seu estudo 54% carreavam *SCCmec III*, 21,8% eram *SCCmec II* e 16,1% *SCCmec IV*. Dados recentes publicados no Brasil indicam uma predominância dos *SCCmec II* e *IV* em amostras de MRSA isoladas no Rio de Janeiro (CHAMON et al., 2017). Foi relatado que em um dos hospitais desse estudo 69% (22/32) das amostras carreavam *SCCmec* de tipo II, no outro hospital houve uma maior incidência (69%, 9/13) do tipo IV enquanto que apenas uma amostra de *SCCmec III* foi identificada no trabalho. Isso pode estar relacionado à mudança epidemiológica que vem sendo observada no Brasil, em que o Brazilian Endemic Clone (BEC, ST239-*SCCmecIII*), que predominava no início da década passada, está sendo substituído por amostras *SCCmecIV* e *SCCmecII* (ARIAS et al., 2017; CHAMON et al., 2017; DA SILVEIRA et al., 2018; FERREIRA-MACHADO et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018; SILVA-CARVALHO et al., 2009). No estudo conduzido por Arias e colaboradores (2017), foi verificado que em 3 hospitais de São Paulo e Porto Alegre 89% (112/126) das amostras de MRSA causando bacteremia eram da linhagem NY/Japan ST5-*SCCmec II*. O trabalho de Caiaffa-Filho (2013) também mostrou uma maior incidência de *SCCmec* tipos II e IV, com 60% (30/50) e 24% (12/50) das amostras de cada tipo, respectivamente. Apenas 10% (5/50) foram tipadas como *SCCmec* tipo III, evidenciando a substituição já citada. Na tipagem *SCCmec* do presente estudo, três amostras foram classificadas como não tipáveis (NT), mesmo com a confirmação da identificação e três réplicas biológicas do experimento de tipagem. Uma hipótese é de que estas amostras sejam variantes de *SCCmec* que não podem ser tipadas pela metodologia utilizada (BOYE et al., 2007). Outra possibilidade é de que estas amostras carreguem um dos tipos de *SCCmec* (VI ao XI) dos quais não possuíamos iniciadores para detectar em uma PCR.

Uma única amostra *SCCmecII* foi tipada através de MLST no presente estudo (amostra 16-007), sendo classificada como ST105. A linhagem ST105-*SCCmecII* está relacionada ao clone NewYork/Japan (linhagem ST5-*SCCmecII*). No estudo de Caiaffa-Filho (2017) já citado anteriormente, foi visto que dos *SCCmec II* analisados 4 de 6 isolados eram da linhagem ST105-*SCCmec II*. Este clone é tipicamente hospitalar e acredita-se que a aquisição do *SCCmec II* tenha ocorrido múltiplas vezes em diferentes ST5 MSSAs que já eram hospitalares, o

que explica em parte a rápida disseminação desse ST globalmente (ENRIGHT et al., 2002; FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; NUBEL et al., 2008).

Foi observado no presente estudo que 54,16% das amostras SCCmec IV apresentavam o gene codificante da Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL), que é uma toxina de 2 componentes, formadora de poros e que se liga em leucócitos polimorfonucleados (BOYLE-VAVRA; DAUM, 2007; CARDOSO et al., 2015). Esse fator de virulência está associado principalmente à infecções de pele e tecidos moles, sendo carregado por 42,85% (9/21) das amostras dessas infecções no presente estudo, mas também em casos clínicos mais severos como pneumonia necrotizante e bacteremia. (ABADI et al., 2017; BOYLE-VAVRA; DAUM, 2007; DEURENBERG et al., 2007). Consistente com esse último dado, 25% (4/16) das amostras de infecções sanguíneas analisadas neste trabalho carregavam esse gene. A PVL já foi proposta como um marcador de MRSA comunitários, uma vez que inicialmente esta leucocidina era detectada apenas em cepas CA-MRSA (BOYLE-VAVRA; DAUM, 2007; VANDENESCH et al., 2003). Porém estudos recentes já relataram a presença de PVL em amostras isoladas de pacientes hospitalizados, embora esta leucocidina permaneça sendo detectada em linhagens derivadas de CA-MRSA que entraram nos hospitais (Figueiredo & Ferreira, 2014; LIMA et al., 2014). No Brasil, as linhagem PVL positivas, que já foram detectadas no Rio de Janeiro, são ST30-SCCmecIV (OSPC) , ST1-SCCmec IV e ST5-SCCmec IV (Pediatric) (CAVALCANTE et al., 2015; FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; SCRIBEL et al., 2009; SILVA-CARVALHO et al., 2009). Um estudo de revisão que foi feito por Evangelista (2015) analisou 10 trabalhos com MRSA comunitários em grandes centros urbanos do Sudeste e Sul do Brasil e constatou que o clone mais comumente isolado era o OSPC (ST30-SCCmecIV), não sendo encontrado em apenas um dos estudos analisados e, da mesma maneira, o SCCmec de tipo IV só não foi detectado em um estudo. É possível que nossas amostras pertençam a esse ST ou ao ST1-SCCmec IV, visto que esse são os ST's mais comumente encontrados no Brasil e que apenas as nossas amostras de SCCmec tipo IV carregavam o gene para PVL.

A outra leucocidina formadora de poros analisada no presente estudo, LukDE, ao contrário da PVL (que está presente em cerca de 2 a 3% de todas as cepas de *S. aureus*) está presente em cerca de 70% delas (ALONZO; TORRES, 2014). Esse gene já foi detectado em 87% das cepas clínicas, incluindo cepas MRSA (YOONG; TORRES, 2014) e sua principal influência na patogenicidade é na evasão imune, por atacar

células imunes específicas como neutrófilos, macrófagos, células NK e dendríticas. (ALONZO; TORRES, 2014). Muitos estudos com fatores de virulência tem mostrado uma grande incidência desse gene nas amostras clínicas, Liu (2015) detectou o gene em 91,3% (168/184) dos isolados em seu estudo, Jiang (2018) relatou que 97,49% (252/259) de suas amostras carregavam o gene e Guimarães (2015), no Brasil, também mostrou uma alta prevalência com 98,4% (59/60) de seus isolados positivos para a leucocidina. Do mesmo modo, nosso estudo demonstrou uma prevalência alta com 90,74% (49/55) das amostras carregando o gene.

O perfil exato de sensibilidade aos antimicrobianos para determinada amostra clínica é difícil de ser predito com base em análises *in silico* comparativas com outras amostras, uma vez que cepas hospitalares apresentam características individuais de resistência. Porém, de acordo com dados da literatura científica, as linhagens MRSA, em geral, seguem uma tendência de perfil de susceptibilidade (Cavalcante et al 2013; Figueiredo & Ferreira, 2014). Por exemplo, as amostras clínicas da linhagem ST1-SCC*mec*IV, que tem origem comunitária, apresentam maior susceptibilidade aos antimicrobianos (sendo resistente a apenas antibióticos beta-lactâmicos em grande parte dos casos) que a linhagem ST239-SCC*mec*III, que é uma linhagem tipicamente hospitalar e resistente a pelo menos 3 classes de antimicrobianos além dos beta-lactâmicos (OLIVEIRA et al., 2001). No presente estudo, foi possível observar esta tendência no resistoma, uma vez que as cepas ST1-SCC*mec*IV apresentaram maior perfil de sensibilidade quando comparadas com as cepas SCC*mec*II, que é um tipo de SCC*mec* tipicamente hospitalar (ST5 relacionado ao clone NY/J e ST36). Entretanto, foi sugerido, a partir de experimentos em animais, que MRSA de origem comunitária possa ser mais virulenta que de origem hospitalar (DAY et al., 2012; MONTGOMERY; DAUM, 2009). O estudo de Silveira e colaboradores (2015) também fornece informações a respeito da sensibilidade aos antimicrobianos de amostras MRSA isoladas em Santa Catarina: foi observado que as percentagens de resistência entre as amostras analisadas eram consideravelmente menores quando comparadas a percentagens de resistência reportadas em estudos multicêntricos. Assim, é possível supor que as cepas MRSA analisadas aqui sigam esta mesma tendência, porém, esta hipótese precisa ser confirmada através de análises *in vitro*. Cavalcante (2013) sugeriu o uso de Trimethoprim/sulfamethoxazole e tetraciclina como marcadores de resistência para SCC*mec* de tipos III e IV, em seu estudo ele constatou que o tipo III é resistente a ambos antimicrobianos,

enquanto que o tipo IV são sensíveis a ambos ou um deles. Porém, como nossa análise *in silico* mostrou, a cepa USA400 0051 de SCCmec IV carrega um gene de resistência para tetraciclina, portanto o uso desse antimicrobiano como marcador desse tipo pode ser problemático.

Como a análise de bioinformática mostra, as cepas MW2 e USA400-0051 possuem menos genes de resistência em relação aos outros genomas analisados, isso já era esperado uma vez que o ST1-SCCmecIV, do qual elas pertencem, tem uma origem comunitária e isolados comunitários são geralmente mais suscetíveis à antimicrobianos (FERREIRA et al., 2013; FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; OTTO, 2013). Entretanto, Silva-Carvalho (2009) encontrou que dentro das amostras hospitalares multirresistentes (resistentes à mais de três antimicrobianos não-beta-lactâmicos) analisadas, 56% (58/104) pertenciam ao ST1-SCCmec IV

Acerca de nosso conhecimento, o presente trabalho constitui o primeiro estudo publicado a reportar o MLST e genes de virulência em amostras de MRSA isoladas em hospitais de Santa Catarina. Conforme relatado por Silveira e colaboradores (2015) este Estado parece ter uma epidemiologia diferencial com relação a outros Estados brasileiros, já que apresenta baixa incidência de amostras MRSA. Assim, o estudo da biologia dos MRSA-SC é crucial para a compreensão deste panorama. Embora o trabalho tenha obtido apenas dados parciais de caracterização, é possível observar que as amostras MRSA-SC parecem estar seguindo, pelo menos em parte, a tendência brasileira com relação a tipagem SCCmec e MLST e também dos genes de virulência analisados. São necessários mais estudos para uma melhor compreensão sobre a baixa incidência de amostras MRSA em Santa Catarina.

Entre as limitações principais observadas no estudo, podemos citar: (i) trata-se de um estudo não randomizado, com pequeno número de amostras isoladas em 12 meses e de apenas alguns hospitais de Santa Catarina; (ii) Devido a restrições financeiras, só foi possível a obtenção do MLST de apenas uma amostra, restringindo a determinação da linhagem MRSA para todas as amostras; (iii) A caracterização da virulência bacteriana apenas reportou a incidência de dois genes relacionados a dano tecidual no hospedeiro e não levou em consideração a expressão gênica e funcionalidade das leucocidinas (iv). Não foi possível determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, o que poderia complementar a caracterização e comparação com os dados *in silico*.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1. CONCLUSÃO

- As amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina de Santa Catarina parecem estar seguindo a tendência brasileira com relação à tipagem SCCmec e MLST e aos genes para PVL e LukDE.

7.2. PERSPECTIVAS

- Realizar a detecção e análise de mais genes associados a virulência bacteriana visando uma melhor compreensão dos fatores biológicos que podem estar associados a epidemiologia diferenciada do estado;

- Realizar a tipagem MLST de mais amostras para que possamos ter uma noção melhor de quais linhagens as MRSA de Santa Catarina pertencem;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABADI, M. S. S. et al. Epidemiology of panton-valentine leukocidin harbouring *Staphylococcus aureus* in cutaneous infections from Iran: A systematic review and meta-analysis. **Infezioni in Medicina**, v. 25, n. 3, p. 217–223, 2017.

ABRAHAM, N. M.; JEFFERSON, K. K. *Staphylococcus aureus* clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 158, n. 6, p. 1504–1512, 2012.

ABRÃO, M. G. et al. [Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978–82, 2005.

ALONZO, F.; TORRES, V. J. The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 199–230, 2014.

AMARAL, M. M. et al. The Predominant Variant of the Brazilian

Epidemic Clonal Complex of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Has an Enhanced Ability to Produce Biofilm and to Adhere to and Invade Airway Epithelial Cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 5, p. 801–810, 2005.

ARIAS, C. A. et al. A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of *Staphylococcus aureus* bacteremia in nine Latin American countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. 1–12, 2017.

BOYE, K. et al. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 7, p. 725–727, 2007.

BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Pantone-Valentine leukocidin. **Laboratory Investigation**, v. 87, n. 1, p. 3–9, 2007.

CAIAFFA-FILHO, H. H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 518–520, 2013.

CARDOSO, R. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates carrying the Pantone-Valentine leukocidin genes from Rio de Janeiro hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 4, p. 331–334, 2015.

CARDOSO, R. et al. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 185–189, 2016.

CAVALCANTE, F. S. et al. High prevalence of methicillin resistance and PVL genes among *Staphylococcus aureus* isolates from the nares and skin lesions of pediatric patients with atopic dermatitis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 48, n. 7, p. 588–94, 2015.

CENTER FOR DISEASE DYNAMICS ECONOMICS & POLICY. The State of the world's antibiotics 2015. **Centre for Disease Dynamics, Economics & Policy, CDDEP: Washington, D.C.**, p. 1–84, 2015.

CHAMON, R. C. et al. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of**

Infectious Diseases, v. 21, n. 2, p. 185–189, 2017.

DA SILVEIRA, M. et al. Nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among elderly living in nursing homes in Brazil: risk factors and molecular epidemiology. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 17, n. 1, p. 18, 2018.

DABUL, A. N. G.; CAMARGO, I. L. B. C. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 3, p. 479–483, 2014.

DAY, S. R. et al. Community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* virulence toward *Caenorhabditis elegans* compared. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 576–82, 2012.

DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 222–235, 2007.

ENRIGHT, M. C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1008–1015, 2000.

ENRIGHT, M. C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 11, p. 7687–92, 2002.

FERREIRA-MACHADO, A. B. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. x x, p. 1–5, 2017.

FERREIRA, F. A. et al. Impact of agr dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) variant of the lineage ST1-SCCmec IV. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 93, 2013.

FIGUEIREDO, A. M. S. et al. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 1–19, 2017.

FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 265–278, 2014.

FOSTER, T. J. The *Staphylococcus aureus* “Superbug”. **Journal of**

Clinical Investigation, v. 114, n. 12, p. 1693–96, 2004.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 12, n. 1740–1534 (Electronic), p. 49–62, 2014.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 90–98, 2009.

GANGA, R. et al. Role of *SCCmec* type in outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single medical center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 590–595, 2009.

GEOGHEGAN, J. A. et al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 21, p. 5663–5673, 2010.

GERSCHMAN, S. Políticas comparadas de saúde suplementar no contexto de sistemas públicos de saúde: União Européia e Brasil. **Ciência&SaúdeColetiva**, v. 13, n. 5, p. 1441– 1451, 2008.

GOMES-FERNANDES, M. et al. Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–14, 2017.

GUIMARÃES, M. A. et al. A comparison of virulence patterns and in vivo fitness between hospital- and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to the USA400 clone. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 497–509, 2015.

HARMSSEN, D. et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5442–5448, 2003.

ITO, T. et al. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*): Guidelines for reporting novel *SCCmec* elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 4961–4967, 2009.

JACQUELINE, C.; CAILLON, J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. **Journal of**

Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, n. SUPPL1, p. 37–40, 2014.

JESSEN, Ove et al. Changing Staphylococci and Staphylococcal Infections. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 281, n. 12, p.627-635, 18 set. 1969. *New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)*.

JEVONS, M. P. “Celbenin”- Resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v. 1, p. 124–125, 1961.

JIANG, B. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a burn center: A 5-year study. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 176–179, 2018.

JOHNSON, N. B. et al. CDC National Health Report: leading causes of morbidity and mortality and associated behavioral risk and protective factors--United States, 2005-2013. **MMWR SurveillSumm.**, v. 63 Suppl 4, n. 1545–8636 (Electronic), p. 3–27, 2014.

JONES, R. N. et al. Susceptibility rates in Latin American nations: Report from a regional resistance surveillance program (2011). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 672–681, 2013.

LI, M. et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. v. 18, n. 5, p. 816–819, 2012.

LIMA, D. F. et al. Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene carriage among *Staphylococcus aureus* strains with SCC*mec* types I, III, IV, and V recovered from cystic fibrosis pediatric patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 59–62, 2014.

LIU, C. et al. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 5, p. 490–496, 2015.

MELLO, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400 / ST1 and USA800 / ST5 SCC *mec* type IV and USA100 / ST5 SCC *mec* type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 3, p. e21–e26, 2013.

MONTGOMERY, C. P.; DAUM, R. S. Transcription of inflammatory genes in the lung after infection with community-associated

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A role for Panton-Valentine leukocidin? **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2159–2167, 2009.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Maryland: Elsevier, 2009. 604 p.

NASCIMENTO, T. C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 16–23, 2018.

NNIS, A Report From The Nnis. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **American Journal Of Infection Control**, [s.l.], v. 32, n. 8, p.470-485, dez. 2004.

NUBEL, U. et al. Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 37, p. 14130–14135, 2008.

OLIVEIRA, G. A et al. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 163–70, 2001.

O'NEILL, E. et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 3835–3850, 2008.

OTTO, M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. **Expert Review of Dermatology**, v. 5, n. 2, p. 183–195, 2010.

OTTO, M. Community-associated MRSA: What makes them special? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 324–330, 2013.

PACHECO, A N. A B. F. et al. Random Amplification of Polymorphic DNA Reveals Serotype- Specific Clonal Clusters among Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. **Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1521–1525, 1997.

PEREZ, L. R. R.; D'AZEVEDO, P. A. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in south Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 135–137, 2008.

PRIEST, N. K. et al. From genotype to phenotype: can systems biology be used to predict *Staphylococcus aureus* virulence?

- Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 791–797, 2012.
- RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 51, n. 3, p. 386–389, 1942.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.
- ROZENBAUM, R. et al. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 8, p. 756–760, 2009.
- SADA, R.; FUKUDA, S.; ISHIMARU, H. Toxic shock syndrome due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: Two case reports and a literature review in Japan. **IDCases**, v. 8, n. October 2016, p. 77–80, 2017.
- SANCHES, I. S. et al. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1243–1246, 1995.
- SCRIBEL, L. V. et al. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmecIV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 4, p. 457–461, 2009.
- SERDELIDIS, D.; ANGELIDIS, A. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food-borne pathogen. **Letters in Applied Microbiology**, p. 409–418, 2017.
- SILVA-CARVALHO, M. C. et al. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 3, p. 300–305, 2009.
- SILVEIRA, A. C. DE O. et al. Molecular epidemiology of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 466–472, 2015a.
- SILVEIRA, A. C. O. et al. MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: Intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 384–389, 2015b.
- SKINNER, D.; KEEFER, C. Significance of Bacteremia Caused by *Staphylococcus aureus*.

Archives of Internal Medicine, v. 68, n. 5, p. 851–875, 1941.

THOMAS, D. et al. Diversity in *Staphylococcus aureus* exotoxins. **ChemImmunol Allergy**, v. 93, p. 24–41, 2007.

THURLOW, Lance R.; JOSHI, Gauri S.; RICHARDSON, Anthony R.. Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Fems Immunology & Medical Microbiology**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.5-22, jun. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2012.00937.x>.

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.

VANDENESCH, F. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying panton-valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 978–984, 2003.

WATKINS, R. R.; DAVID, M. Z.; SALATA, R. A. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. PART 9, p. 1179–1193, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance – global report on surveillance**. World Health Organization; 2014.22

YOONG, Pauline; TORRES, Victor J. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.63-69, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.012>.