



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

MATHEUS LUIS DUARTE

**DETECÇÃO DA LINHAGEM CC5-ST105-SCC*meclI* (clone RdJ) EM  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À  
METICILINA (MRSA) EM SANTA CATARINA**

Florianópolis,  
2023

MATHEUS LUIS DUARTE

**DETECÇÃO DA LINHAGEM CC5-ST105-SCC*meclI* (clone RdJ) EM  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À  
METICILINA (MRSA) EM 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: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabienne A. Ferreira

Florianópolis,  
2023

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

Duarte, Matheus Luis

DETECÇÃO DA LINHAGEM CC5-ST105-SCCmecII (clone RdJ) EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA (MRSA) EM SANTA CATARINA / Matheus Luis Duarte ; orientadora, Fabienne Antunes Ferreira, 2023.

41 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. MRSA. 4. Clone RdJ. 5. Infecções de corrente sanguínea. I. Ferreira, Fabienne Antunes. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Matheus Luis Duarte

**Detecção da linhagem CC5-ST105-SCC*meclI* (clone RdJ) em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em Santa Catarina**

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

Florianópolis, 17 de novembro de 2023.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Cristina de Toni  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabienne Antunes Ferreira  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jussara Kasuko Palmeiro  
Avaliadora

---

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon  
Avaliador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos protagonistas da minha vida, meus pais, Luís Carlos Duarte e Márcia Patrício Duarte, pelo apoio incondicional e por serem minha maior referência de consistência, disciplina e fé absoluta. Agradeço à minha irmã, Carolina, e ao meu sobrinho, Arthur. Testemunho neste documento de forma permanente meu amor pela minha família.

À minha orientadora Fabienne A. Ferreira, pelo acolhimento imediato e por confiar em meu potencial. Você rapidamente se tornou uma referência de tudo o que eu almejo ser enquanto profissional. Confesso a ti minha admiração e guardo no peito uma coleção de memórias positivas enquanto seu aluno. Ao prof. Ricardo Mazzon, também pelo acolhimento em minha entrada ao laboratório e por servir de ponte para tudo ter acontecido. Agradeço a todos os demais colegas do GeMBac e do grupo de pesquisa. Vocês facilitaram minha experiência com sua companhia.

À força-tarefa de pesquisadores responsáveis por esta pesquisa ter acontecido: Profa. Agnes Figueiredo (UFRJ), professores e usuários do Laboratório de Protozoologia (UFSC).

À Ludmila e à Chris do setor de Biologia Molecular do HU. Minha experiência com vocês foi um capítulo importante para minha jornada acadêmica e pessoal. Ao me abrigarem como estagiário no hospital, vocês me ajudaram a encontrar meu caminho. Nunca subestimarei isso.

Agradeço a Fernanda Komorowski, Vitor Censi, Érica Scherner, Lauren Fontoura, Gabriel Diks e a todos os demais amigos que conheci durante minha nova vida na ilha de Florianópolis. Vocês mostraram que através dos outros nos tornamos nós mesmos e sua companhia foi combustível para minha jornada.

Agradeço a todos os fracassos e vitórias. A tudo o que quebrou meu espírito e a tudo que ajudou a consertá-lo. Agradeço à vida, por me fazer vencedor até nas piores derrotas.

À Thalía Sborz, por ter me reencontrado nesta vida. Espero continuar esbarrando em você em todas as outras.

## Lista de Figuras

- Figura 1** – Comparação das estruturas de SCC*mec* I-V em MRSA..... **16**
- Figura 2** – Esquema de leitura dos resultados em gel de agarose para a PCR multiplex..... **23**
- Figura 3** – Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando os produtos de PCR para 3 dos 26 isolados clínicos de MRSA ..... **26**

## **Lista de Quadros**

<b>Quadro 1 – Iniciadores utilizados na reação de PCR multiplex. ....</b>	<b>22</b>
---	-----------

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Resultado do PCR multiplex realizado a partir de 26 isolados clínicos MRSA SCC <i>meclI</i> . .....	25
Tabela 2 – Perfil MLST do isolado MRSA sequenciado 16007.....	27
Tabela 3 – Perfil SCC <i>mec</i> do isolado de MRSA sequenciado 16007... ..	27
Tabela 4 – Tipagem <i>spa</i> .....	28
Tabela 5 – Perfil de virulência do isolado de MRSA sequenciado 16007. .....	29



## RESUMO

*Staphylococcus aureus* são bactérias de alta incidência e severidade em uma diversidade de infecções humanas, que podem apresentar difícil tratamento devido à origem de cepas resistentes como os MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Um clone de MRSA denominado Clone Rio de Janeiro (Clone RdJ), pertencente à linhagem ST105-SCC*meclI*-t002, foi recentemente identificado como causa de diversas infecções em pacientes, associado principalmente a infecções de corrente sanguínea. Este clone tem maior eficácia na evasão da resposta imune relacionada a monócitos quando comparado a outros clones, representando ameaça à saúde da população. A incidência deste clone em Santa Catarina (SC) era até então desconhecida, mas sua presença era sugestiva devido a estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que detectaram MRSA isolados de hemoculturas e pertencentes ao SCC*meclI*, incluindo um isolado ST105. Assim, este estudo visou a identificação do clone RdJ entre a coleção de 26 isolados clínicos SCC*meclI* de MRSA do laboratório, oriundos de pacientes atendidos em SC. Para isso, foi utilizado um protocolo de detecção baseado em PCR (*Polymerase chain reaction*) multiplex para os genes *aur*, *agrII* e *mecA*, além de restrição enzimática do DNA com a endonuclease *BglI*. Adicionalmente, foi analisado o genoma de um isolado da coleção (16-007), anteriormente classificado como ST105-SCC*meclI*. O protocolo permitiu a identificação do clone RdJ em 11 (42%) dos isolados, sendo 4 (36,4%) isolados de sangue. O isolado 16007 foi classificado como CC5-não RdJ, confirmado pela análise do genoma, já que não possui a mutação no gene *aur*, característica que faz parte da definição do clone. Os isolados confirmados como RdJ apresentaram multirresistência em testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) e sua presença no estado é preocupante. Estes dados servem de horizonte para posteriores pesquisas referentes à questão de saúde pública envolvendo a detecção do clone RdJ em SC, especialmente para avaliar os riscos clínicos e epidemiológicos associados, além da base biológica envolvida em sua disseminação.

**Palavras-chave:** clone RdJ, infecções de corrente sanguínea, MRSA, *Staphylococcus aureus*, tipagem molecular.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a high incidence and severity bacterial pathogen in a variety of human infections, which are challenging to treat due to the emergence of resistant strains such as MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). A MRSA clone referred as Rio de Janeiro Clone (Clone RdJ) from the ST105-SCC*meclI*-t002 lineage has recently been identified as the cause of multiple infections in patients, primarily in bloodstream. When compared to other clones, the RdJ clone exhibits a higher efficiency in evading the host-immune response, particularly in relation to monocytes, which poses a threat to public health. The incidence of this clone in Santa Catarina (SC) was previously unknown, but its presence was suggested based on prior studies conducted by our research group, which detected MRSA isolates from blood cultures that belonged to SCC*meclI*, with one of them typed as ST105. Therefore, this study aimed to identify the RdJ clone among a collection of 26 clinical SCC*meclI* MRSA isolates from the laboratory, sourced from patients treated in SC. To achieve this, a detection protocol based on multiplex *Polymerase Chain Reaction* (PCR) was used for the *aur*, *agrII*, and *mecA* genes, alongside of DNA restriction using the *BglI* endonuclease. Additionally, the genome of one isolate from the collection (16-007), previously classified as ST105-SCC*meclI*, was analyzed. The protocol allowed the identification of the RdJ clone in 11 (42%) of the isolates, with 4 (36.4%) of them being blood isolates. Isolate 16-007 was classified as CC5-non RdJ, confirmed by genome analysis, as it did not present the *aur* gene mutation, a recognizing characteristic for the clone's detection. The confirmed RdJ isolates exhibited multi-drug resistance in antibiotic sensitivity tests (AST), and their presence in the state is concerning. These data provide a foundation for future research concerning the public health scenario related to the RdJ clone detection in SC, particularly to assess the clinical and epidemiological risks associated with it, as well as the biological basis involving its spreading.

**Keywords:** RdJ clone, bloodstream infections, MRSA, *Staphylococcus aureus*, molecular typing.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CC** – Complexo clonal (do inglês: *Clonal complex*)
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *Deoxyribonucleic acid*)
- EUA** – Estados Unidos da América
- IgG** – Imunoglobulina G
- MLST** – Tipagem de sequências multilocus (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*)
- 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*)
- RdJ** – Rio de Janeiro
- RJ** – Rio de Janeiro (estado)
- SC** – Santa Catarina
- SCCmec** – Cassete cromossômico estafilocócico *mec* (do inglês: *Staphylococcal cassette chromosome mec*)
- ST** – Sequência Tipo (do inglês: *sequence typing*)
- TSA** – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
- UFC** – Unidades Formadoras de Colônia
- UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 Gênero <i>Staphylococcus</i> e Espécie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.2 Patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA).....	15
1.4 Epidemiologia dos MRSA.....	18
1.5 Clone Rio de Janeiro .....	18
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Isolados Clínicos de MRSA .....	21
4.2 Extração do DNA dos isolados .....	21
4.3 Protocolo de detecção do clone RdJ .....	22
4.4 Sequenciamento de genoma completo e análise de bioinformática .....	24
<b>5. RESULTADOS</b> .....	25
5.1 Identificação do clone RdJ.....	25
5.2 Análise <i>in silico</i> do genoma sequenciado .....	26
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	34
7.1 Conclusão.....	34
7.2 Perspectivas .....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>APÊNDICE A – Classificação da resistência antimicrobiana de acordo</b>	

com os padrões preconizados pelo BrCAST para cada amostra.....	40
<b>APÊNDICE B – Árvore filogenética de máxima verossimilhança do complexo clonal 5 (CC5). .....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Gênero *Staphylococcus* e Espécie *Staphylococcus aureus*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à microbiota residente de humanos e outros animais, e possuem potencial de se tornarem patógenas. São bactérias de morfologia esférica (cocos) que se arranjam, geralmente, em um padrão de estafilococos. Dentro do gênero, existem aproximadamente 87 espécies descritas até o momento (PARTE et al., 2023), podendo estas serem categorizadas de acordo com a produção da enzima coagulase em *Staphylococcus* coagulase positiva ou negativa. Das espécies coagulase negativa de relevância clínica para humanos estão: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus lugdunensis* como exemplos importantes. A bactéria coagulase positiva de maior destaque clínico para humanos é *Staphylococcus aureus* subespécie *aureus*, mais conhecida como *Staphylococcus aureus* (TAYLOR et UNAKAL, 2022).

### 1.2 Patogenicidade de *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* são importantes patógenos bacterianos humanos que causam uma ampla variedade de manifestações clínicas. Quanto à virulência, frequentemente produzem toxinas citolíticas e enterotoxinas, além de potencialmente produtoras de biofilme, característica correlacionada a infecções de dispositivos médicos implantáveis (KRONING et al., 2016). Essa espécie é o agente causador de infecções humanas diversas, como a infecção de corrente sanguínea, endocardite infecciosa, infecções de pele e tecidos moles, osteomielite, artrite séptica, infecções pulmonares, gastroenterite, meningite, síndrome de choque tóxico e infecções do trato urinário (TONG et al., 2015). As infecções acontecem tanto em ambientes comunitários, quanto em hospitais e de atendimento em saúde, e o tratamento continua sendo um desafio para gerenciar, devido ao surgimento de cepas resistentes a vários antimicrobianos, como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, do inglês: *Methicillin-resistant S. aureus*). Indivíduos colonizados por MRSA (ou seja, a presença de bactérias que não causam dano celular ou sinais e sintomas clínicos detectáveis) têm um risco aumentado de infecção subsequente por esta bactéria, e são uma importante fonte de disseminação de pessoa para pessoa (LEE et al., 2018).

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

É notória a capacidade de *S. aureus* em desenvolver resistência a antimicrobianos. A resistência é geralmente adquirida por mecanismos de transferência horizontal de genes, embora a mutação e a recombinação também sejam importantes (VESTERGAARD et al., 2019).

Estabelecimentos de atendimento em saúde acolhem, comumente, pessoas predispostas a infecções, e são ambientes com alta pressão de seleção de antimicrobianos e contato frequente entre indivíduos. Essas condições facilitam a disseminação epidêmica de MRSA. Com isso, *S. aureus* pode espalhar-se rapidamente entre indivíduos, e sua presença é motivo de preocupação, devido à resistência a vários antimicrobianos, que limita o tratamento clínico (LEE et al., 2018). Adicionalmente, as infecções causadas por cepas de MRSA estão associadas a taxas de mortalidade mais altas do que as infecções causadas por cepas sensíveis à meticilina (MSSA; do inglês *Methicillin-susceptible S. aureus*) (LAKHUNDI et ZHANG, 2018). As cepas de MRSA carregam o gene *mecA*, que é um componente do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), inserido no cromossomo bacteriano, conferindo resistência a antimicrobianos da classe dos betalactâmicos (CAMPBELL et al., 2021). Esse elemento genético móvel é a característica definidora das cepas MRSA e é responsável por conferir a resistência a praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos. A alta diversidade na organização estrutural e no conteúdo genético desses elementos resultou em sua classificação em, até o momento, 14 tipos de SCC*mec* diferentes, os quais podem ser classificados utilizando metodologias de tipagem molecular do SCC*mec* (LIU et al., 2016; YOUSEFF et al., 2022). Ainda, os SCC*mec* compartilham de características estruturais comuns, a exemplo da figura 1.

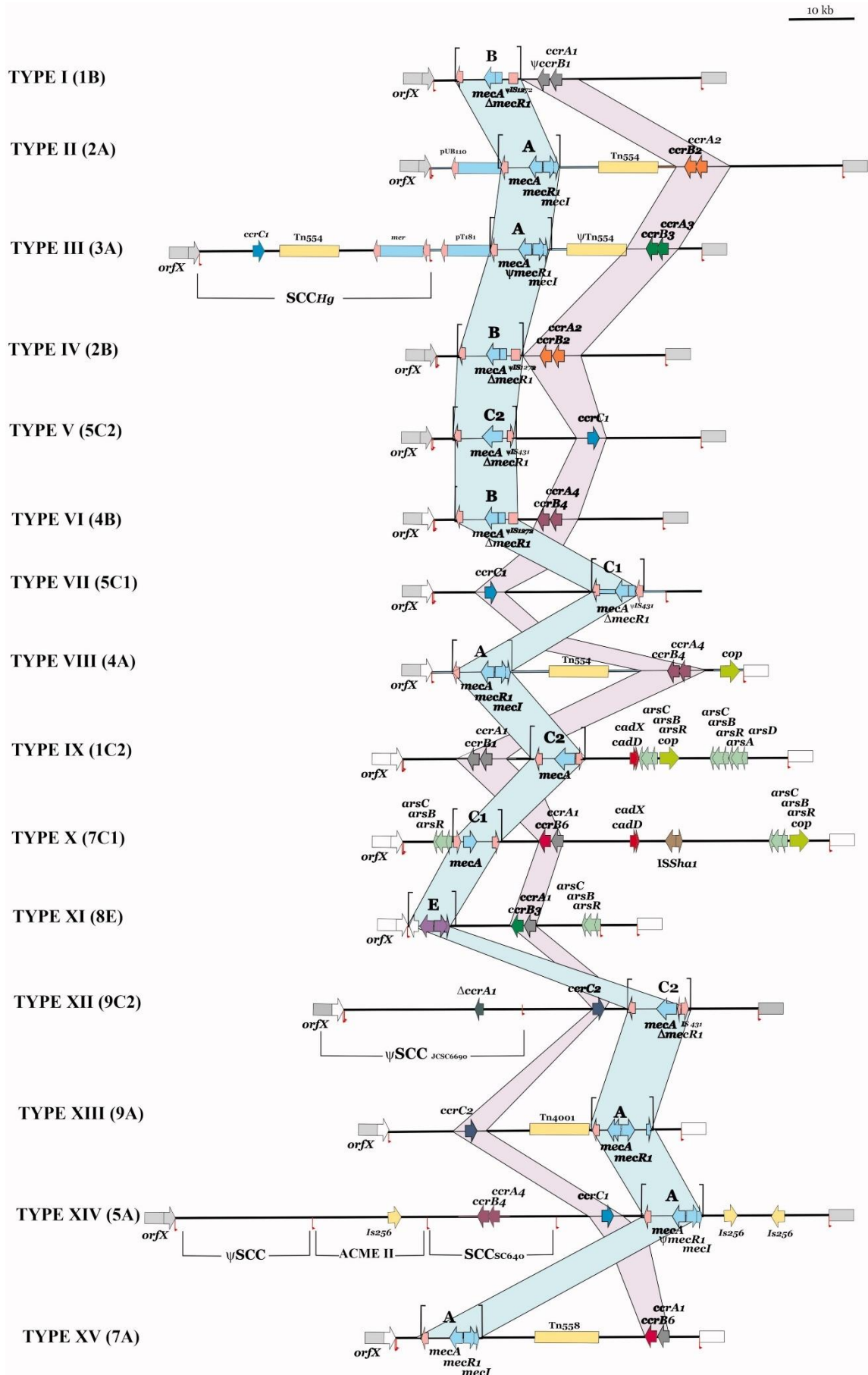


Figura 1 – Comparação das estruturas de SCCmec I-XV em MRSA. SCCmec deve conter o complexo genes *mec* (destacado em azul) e o complexo de genes *ccr* (destacado em lilás), com sequência do



local de integração e repetições diretas em ambas as extremidades. Cada tipo varia de acordo com o tamanho e arranjo das sequências de DNA. Fonte: WOLSKA-GEARZVESKA et al., 2023.

Em linhas gerais, os elementos *SCCmec* compartilham quatro características comuns: (1) portam o complexo genético *mec*; (2) o complexo do gene *ccr*; (3) são flanqueados por sequências nucleotídicas características, repetições invertidas e repetições diretas, em ambas as extremidades; e (4) são integrados na sequência do local de integração (ISS) para SCC, localizada na extremidade 3' do *orfX* ou na extremidade do elemento SCC. O complexo de genes *mec* contém os genes *mec* (*mecA*, *mecB*, *mecC* e/ou *mecD*) e seus elementos reguladores, que controlam sua expressão (*mecR1*, que codifica uma proteína transdutora de sinal, e *mecI*, uma proteína repressora). O complexo de genes *ccr* é essencial para a excisão e integração do *SCCmec* no genoma da bactéria, pois codifica proteínas recombinases (*ccrAB* e/ou *ccrC*) que catalisam a recombinação entre o *SCCmec* e o cromossomo bacteriano. Isso permite que o *SCCmec* seja removido do genoma bacteriano (excisão) ou integrado a ele (integração) (WANG et al., 2010). As regiões de junção são as áreas onde o elemento *SCCmec* se liga ao genoma, críticas para a mobilidade do *SCCmec* entre cepas ou no cromossomo da própria bactéria (UEHARA et al., 2022).

A resistência de MRSA é atribuída à capacidade do gene *mecA* presente no *SCCmec* de codificar uma proteína de ligação à penicilina modificada (denominada PBP2a), uma enzima que catalisa a ligação de unidades de peptidoglicano na parede celular bacteriana. A PBP2a bacteriana tem uma afinidade menor para se ligar a antimicrobianos beta-lactâmicos, quando comparada a outras PBPs normais, de modo que a PBP2a continua a catalisar a síntese da parede celular bacteriana, mesmo na presença de antimicrobianos. Como resultado, cepas de *S. aureus* que sintetizam PBP2a podem crescer na presença da grande maioria dos betalactâmicos disponíveis, exibindo resistência a diversos destes. Em especial, as cepas de MRSA são resistentes a antimicrobianos frequentemente administrados, como as penicilinas naturais e semi-sintéticas (amoxicilina, oxacilina), monobactâmicos, cefalosporinas (exceto às de quinta geração e posteriores) e carbapenêmicos (LAKHUNDI et ZHANG., 2018).

MRSA são caracterizados pela estrutura clonal de populações bacterianas, que se disseminam mundialmente em algumas linhagens genéticas altamente bem-sucedidas (MCGUINNESS et al., 2018). Um clone de MRSA pode ser definido como uma população ou grupo de bactérias que compartilham características genéticas muito semelhantes ou idênticas, o que indica uma origem comum e uma história evolutiva relacionada (TURNER et al 2019). Um clone pode estar associado a uma

linhagem, que pode ser definida por métodos de tipagem molecular. Entre esses métodos, os mais comuns são a tipagem do *SCCmec*, tipagem de sequências multilocus (MLST; do inglês: *Multilocus Sequence Typing*; em que é definido a sequência tipo; ST) e tipagem do gene codificante da proteína A (gene *spa*) (CAMPBELL et al., 2021). O MLST se refere ao sequenciamento de sete genes ou loci conservados dentro do genoma bacteriano, conhecidos como genes *housekeeping*, e uma sequência tipo (ST) é atribuída ao comparar o conjunto de alelos sequenciados com outros perfis de isolados de MRSA. Com base em estudos evolutivos, alguns ST, podem ser agrupados em complexos clonais (CCs), que percorrem ondas de dominância. Em diversos países do mundo, amostras de MRSA geneticamente semelhantes ou até mesmo iguais (mesmo clone) quanto ao MLST, tipo de *SCCmec* e dos polimorfismos dos genes *spa* têm sido identificadas como agentes etiológicos de infecções que ocorrem em regiões separadas por distâncias intercontinentais (SILVEIRA et al., 2018; TURNER et al 2019).

#### **1.4 Epidemiologia Molecular dos MRSA**

Durante o final da década de 1990, o clone endêmico brasileiro (CEB), que pertence à linhagem ST239-*SCCmecIII* (CC8), compreendia aproximadamente 80% dos isolados de MRSA em hospitais no Brasil (TEIXEIRA et al., 1995). Nos anos 2000, isolados da linhagem ST1-*SCCmecIV* (CC1) superaram CEB em hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro (SILVA-CARVALHO et al., 2007). Análises mais recentes sugerem que isolados CC5 podem estar aumentando em prevalência no Brasil (CHAMON et al., 2016). Um estudo por Viana et al. (2021) caracterizou 600 isolados de MRSA coletados de 51 hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro e identificou um novo clone de MRSA pertencente à linhagem ST105-*SCCmecII* (CC5) e tipagem *spa* t002, denominado clone do Rio de Janeiro (RdJ). O clone RdJ foi associado principalmente a infecções de corrente sanguínea (VIANA et al., 2021).

#### **1.5 Clone Rio de Janeiro**

A fagocitose bacteriana é um processo pelo qual células fagocíticas do hospedeiro, como os neutrófilos e macrófagos, capturam e internalizam bactérias patogênicas. Isso é fundamental para a resposta imunológica do hospedeiro, pois ajuda a remover as bactérias invasoras, limitando a disseminação da infecção e desencadeando respostas imunológicas adaptativas (JAUSLIN et al., 2021). Isolados

representativos do clone RdJ apresentam taxas baixas de fagocitose (2,9%) em comparação com representantes de outras linhagens CC5, como ST5(CC5)-SCC*meclI*-t539 (41,3%) e ST5(CC5)-SCC*meclV*-t002 (35,8%). Além disso, isolados do clone RdJ evidenciam taxas de sobrevivência mais altas (5,58%) do que das outras linhagens em ensaios de interação com monócitos (células THP-1), evidenciando capacidade de evasão aumentada aos mecanismos do sistema imune contra infecções (VIANA et al., 2021).

Através do alinhamento de sequências genômicas, uma pesquisa anterior por Esteves et al. (2023) identificou um polimorfismo existente no gene *aur* entre cepas de MRSA pertencentes ao clone RdJ, que não está presente nos isolados que pertencem ao mesmo complexo clonal, mas que não são clone RdJ (CC5-Não RdJ). Trata-se de uma mutação de apenas um único nucleotídeo, na posição 1106 (A1106G). Tal pesquisa revelou que essa mutação leva à criação de um sítio para a enzima de restrição *BglI*, presente no alelo *aur* mutado nos genomas do clone RdJ, enquanto tal sítio não é presente no alelo *aur* selvagem de demais amostras. Assim, identificando o gene *aur* mutante como um biomarcador apomórfico do clone RdJ, é possível diferenciar amostras do clone RdJ de amostras não-RdJ através de PCR (do inglês: *Polymerase chain reaction*), sem a necessidade de uma metodologia cara como o sequenciamento de DNA (ESTEVES et al., 2023).

## 2 JUSTIFICATIVA

Foram encontrados 2.534 artigos que contêm a palavra *Staphylococcus* nas entradas do MEDLINE em 2002, e um terço destes contêm a palavra meticilina (DYKE, 2003). Com esse volume de produtividade em pesquisa, era de se esperar que as infecções estafilocócicas estivessem suficientemente elucidadas, mas o crescimento ainda contínuo de publicações, alcançando 7.836 apenas em 2023, sugere o contrário (MEDLINE via PubMed, 2023). Existem poucos estudos sobre a epidemiologia molecular de MRSA no Brasil e em outros países da América do Sul; com limitações em número de isolados. Como resultado, a extensão de disseminação do clone RdJ (genótipo ST105-SCC*meclI*-t002) na América Latina é desconhecida, incluindo no estado de Santa Catarina (SC) (VIANA et al., 2021).

Segundo o estudo de Silveira e colaboradores (2015), a prevalência de MRSA em SC é extremamente baixa (2-8%), comparável às taxas encontradas nos países escandinavos. É importante notar que a ocorrência de MRSA em SC parece diferir muito de outras regiões do Brasil, que apresentam taxas de MRSA maiores, alcançando 30-60%. Entretanto, apesar da baixa prevalência de MRSA em SC, o

estudo reportou que 70,2% das infecções associadas às amostras de MRSA circulantes em Santa Catarina foram invasivas, sugerindo alto potencial patogênico entre as amostras (SILVEIRA et al., 2015). Paralelamente, de acordo com estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, cerca de 30% da coleção de cepas clínicas MRSA isoladas em SC são provenientes de corrente sanguínea. Entre estas, cerca de 56% carregam o SCC $meclI$ . Adicionalmente, uma destas cepas foi classificada como ST105 (CC5). Portanto, considerando este isolado de MRSA previamente tipado como ST105-SCC $meclI$  e coletado a partir de infecção sanguínea (DOMINSKI, 2018), a presença do clone RdJ no acervo de isolados clínicos do nosso grupo de pesquisa é sugestiva, e sua confirmação indicaria que o RdJ está causando infecções em SC.

A resistência antibiótica é uma ameaça global à saúde pública. A epidemiologia bacteriana ajuda a monitorar a prevalência de resistência em diferentes regiões. Isso influencia a formulação de recomendações de uso prudente de antimicrobianos, incluindo restrições ao uso desnecessário e promoção de prescrição responsável. Simultaneamente, a identificação de surtos bacterianos e uma rápida resposta são críticas para evitar a disseminação de doenças. Tal conhecimento epidemiológico permite, portanto, a implementação de estratégias de rastreamento e controle desses surtos, principalmente ao que se refere à identificação de prováveis fontes de contaminação, e à tomada de medidas de prevenção (RILEY et al., 2018).

A principal motivação desta pesquisa foi o risco em saúde pública que a presença do clone RdJ representa ao estado de Santa Catarina. Estes dados podem futuramente contribuir para a gestão de recursos em saúde pública para a prevenção, controle e pesquisa a respeito do clone RdJ, incluindo a alocação de financiamento para programas de vigilância, laboratórios de pesquisa e infraestrutura de saúde.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Detectar o clone RdJ (linhagem CC5-ST105-SCC $meclI$ ) entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) oriundos de pacientes atendidos em Santa Catarina.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar a tipagem molecular de isolados clínicos de MRSA por meio de PCR multiplex.
- Analisar *in silico* o genoma sequenciado de um isolado clínico de MRSA e comparar com o resultado da PCR multiplex.

- Comparar o perfil de resistência a antimicrobianos entre as linhagens dos isolados clínicos de MRSA

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Isolados Clínicos de MRSA**

Os isolados clínicos de MRSA já faziam parte da coleção do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (GeMBac) da UFSC, sob coordenação da Prof<sup>a</sup>. Fabienne Ferreira e do Prof. Ricardo Mazzon. Os isolados foram obtidos a partir de pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) em Florianópolis e, também, obtidas do LACEN-SC (Laboratório Central de Saúde Pública de SC), que recebe amostras clínicas MRSA de pacientes oriundos de diversos hospitais do Estado. Este projeto é aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) sob o número de protocolo 53562716.4.0000.0121, em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Thais Sincero da UFSC. Os isolados foram coletados durante o período de dezembro de 2016 até outubro de 2017 e identificados com um código numérico, sendo os prefixos numéricos (16 ou 17) referentes ao ano da coleta da amostra em específico (Tabela 1). Os isolados estão estocados a -80°C em glicerol 10% (p/v). Até o momento, 55 isolados desta coleção foram caracterizados, em estudos anteriores do laboratório (DOMINSKI, 2018; PROVENZI, 2022). Entre os isolados clínicos da coleção, 26 foram selecionados para este estudo, em razão de terem sido classificados como SCC $_{medII}$ , portanto, sugestivos da linhagem do clone RdJ (Tabela 1).

### **4.2 Extração do DNA dos isolados**

A partir do estoque, os isolados MRSA foram semeados pela técnica do esgotamento, em placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar, ou Ágar Soja Trypticase, Kasvi<sup>®</sup>). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 a 24 horas. Após isso, unidades formadoras de colônia (UFC) isoladas foram utilizadas para extração. O DNA dos isolados foi extraído conforme o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante, com exceção da etapa inicial de lise da parede celular bacteriana, que foi realizada adicionando a enzima lisostafina (10 mg/mL; Sigma<sup>®</sup>), incubada a 37°C por 30min. O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue<sup>™</sup> (Biochrom, EUA) a 260nm.

### 4.3 Protocolo de detecção do clone RdJ

O protocolo de tipagem molecular para identificação do clone RdJ entre os isolados de MRSA do estudo foi realizado através da técnica de PCR multiplex, seguido de tratamento dos produtos de PCR (*amplicons*) por uma enzima de restrição, cujo resultado foi revelado através de uma corrida em gel de agarose. Este protocolo foi desenvolvido e validado por Esteves et al. (2023).

A etapa de PCR multiplex foi realizada da seguinte forma: para alcançar um volume final de 25µl a cada reação, foi adicionado 1 unidade do Kit GoTaq Colorless Master Mix (Promega®), 0,2µM de dNTP (Promega®), para atingir uma concentração final de 0,4µM, 0,2µM dos pares de iniciadores (*primers*) *mecA* e *aur*, 0,4µM dos pares de iniciadores *agrII*, 300ng de DNA bacteriano, além de água de Milli-Q estéril q.s.p. 25µL. O programa de amplificação em termociclador consiste na desnaturação inicial a 95°C por 5 min; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 52°C por 45s e extensão a 72°C por 60 s; com extensão final a 72°C por 7 min. As sequências dos iniciadores utilizados e suas características principais encontram-se descritas no quadro 1.

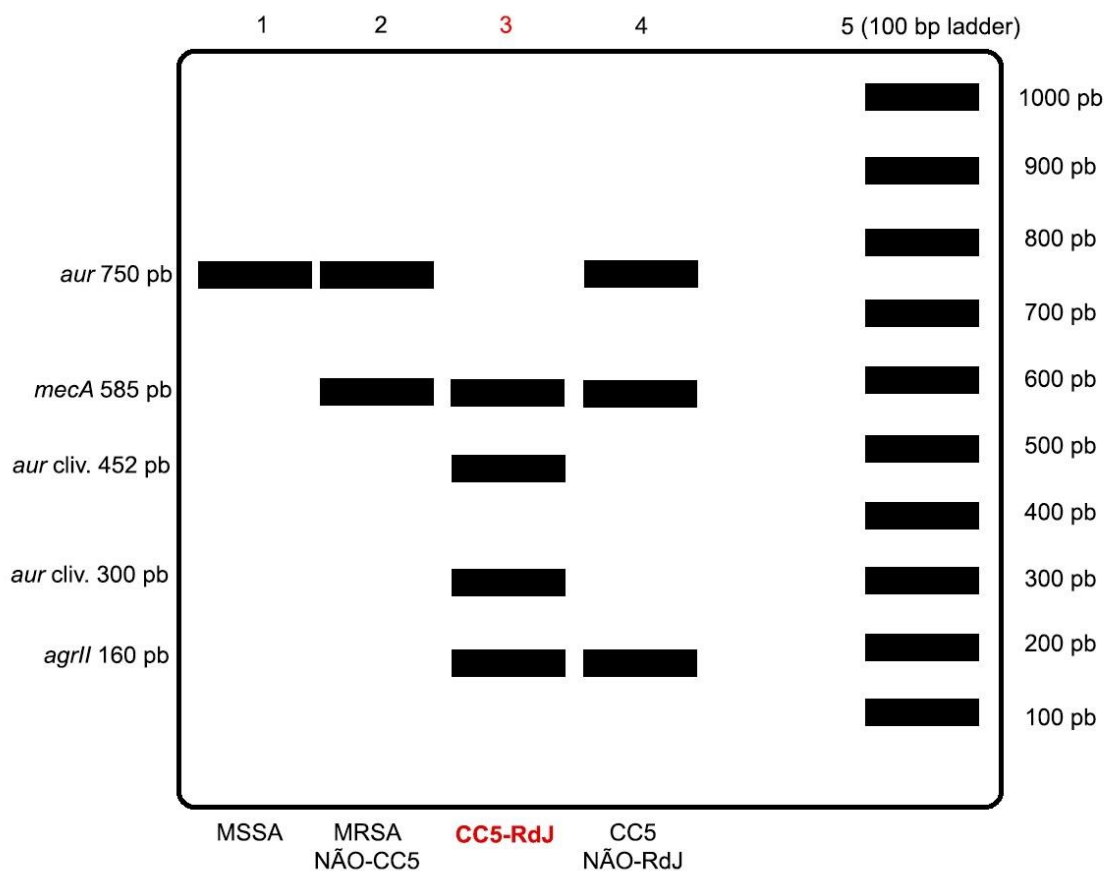
**Quadro 1 – Iniciadores utilizados na reação de PCR multiplex.**

Denominação	Sequência (5'- 3')	Tamanho do <i>amplicon</i> em pares de bases (pb)	Referência
<i>agrII</i>	Direto ( <i>forward</i> ) ATGGTGCTCATGCAAAG TCTT	160	Beltrame et al., 2012
	Reverso ( <i>reverse</i> ) CAGGTGCATAAATAACA ACGG		
<i>mecA</i>	Direto ( <i>forward</i> ) AGATGATACCTTCGTTC CACT	585	Esteves et al., 2023
	Reverso ( <i>reverse</i> ) CTGGTGAAGTTGTAATC TGGA		
<i>Aur</i>	Direto ( <i>forward</i> ) ACTTGCGATACAAAAG ATATCA	752	Esteves et al., 2023
	Reverso ( <i>reverse</i> ) ATTCCGTTAATGCTCGGT AGT		

Fonte: autoria própria (2023).

Para o discernimento entre amostras de clone RdJ e CC5-Não RdJ, foi realizada uma clivagem dos *amplicons* utilizando 10U da enzima endonuclease de restrição *BglII* (Promega®), aplicada em 15µL do produto de PCR multiplex, 1x NE Buffer e de água

Milli-Q estéril q.s.p 20µL. Após incubação a 37°C por 1h, foi utilizado uma alíquota de 5µL do produto de PCR multiplex tratado para a eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v). A corrida foi realizada em tampão TAE 1X (Tris-acetato 20 mM, EDTA 0,5 mM [pH 8,0]) a 110 V por 45 min. As bandas de DNA obtidas foram comparadas com um padrão de peso molecular (100bp DNA ladder; Promega®). O gel foi corado com brometo de etídio a 10X por 30 min e a visualização dos resultados foi realizada através de transiluminador de luz ultravioleta. A interpretação se baseou no protocolo de Esteves et al. (2023) e uma simulação dos possíveis resultados está ilustrada na Figura 2.



**Figura 2 – Esquema de leitura dos resultados em gel de agarose para a PCR multiplex.** A indicação “100pb ladder” à direita representa o padrão de peso molecular (Promega®). Os números indicados à esquerda e à direita do gel representativo indicam o tamanho das bandas em pares de bases (bp) esperados na visualização. Fonte: Autoria própria (2023).

Na ilustração representativa dos possíveis resultados da PCR multiplex (Figura 2), a coluna 1 representa um isolado de *S. aureus* sensível à meticilina (positivo apenas para a banda *aur* de 750 pb). A coluna 2 representa um isolado de MRSA pertencente ao complexo clonal 5 (CC5) (positivo para as bandas *aur* de 750 pb e *mecA* de 585 pb). A coluna 3, em vermelho, representa um isolado do clone RdJ (positivo para a banda *mecA* de 585 pb, tendo o fragmento *aur* clivado em duas bandas de 452 e 300

pb, além de *argII* de 160 pb). A coluna 4 representa um isolado pertencente ao complexo clonal 5 (CC5), que não é o clone RdJ (positiva para as bandas *mecA* de 585 pb e *argII* de 160 pb, mas a banda do gene *aur* não está clivada, permanecendo com 750pb). A coluna 5 representa o marcador de peso molecular 100 pb (100pb DNA ladder; Promega®).

#### 4.4 Sequenciamento de genoma completo e análise de bioinformática

O genoma completo do isolado clínico de MRSA identificado com o código 16007 (Tabela 1) foi sequenciado em colaboração com o pesquisador Nilton Lincopan da Universidade de São Paulo (USP) e a Prof<sup>a</sup>. Thaís Sincero do Departamento de Análises clínicas da UFSC. Este isolado foi selecionado para sequenciamento em razão de ter sido anteriormente classificado como ST105-SCC*mecII* (DOMINSKI, 2018), sugerindo pertencer ao clone RdJ. O DNA genômico foi extraído usando o kit PureLink™ Genomic DNA Mini (Thermo Fisher Scientific, EUA). A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) e fluorômetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA), respectivamente. A biblioteca genômica foi construída usando o kit Nextera DNA Prep (Illumina, San Diego, CA, EUA) e sequenciada usando a plataforma NextSeq550 de leituras (*reads*) pareadas (2 × 75 pb). Os *reads* sequenciados foram tratados com o Trimmomatic v0.40 (BOLGER et al., 2014) e o genoma foi montado usando o CLC Genomics Workbench 12.0.3 (QIAGEN, Aarhus, Dinamarca). O genoma foi analisado quanto à cobertura e à qualidade da montagem e atingiu parâmetros suficientes, segundo as análises do grupo do Lincopan.

Com genoma *draft*, o presente estudo realizou a análise *in silico* através de serviços de bioinformática de domínio público, online e gratuitos (Center for Genomic Epidemiology). Para a confirmação da tipagem SCC*mec*, foi utilizado o SCC*mec*Finder v.1.2 (<https://cge.food.dtu.dk/services/SCCmecFinder/>). Para a confirmação da sequência tipo (ST), foi utilizado o MLST v.2.0.9 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>), cujos dados das sequências de alelos e perfil do MLST são obtidos pelo PubMLST.org (atualizado pela última vez em junho de 2023). A análise do gene *spa* foi feita através do spaTyper v.1.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/spaTyper/>), cujo banco de dados foi atualizado em junho de 2023. Por fim, foram analisados os genes de virulência presentes no genoma, incluindo o gene *aur*, utilizando o VirulenceFinder v.2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>). Todos os serviços do CGE foram utilizados com suas configurações padrões (*default*).



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação do clone RdJ

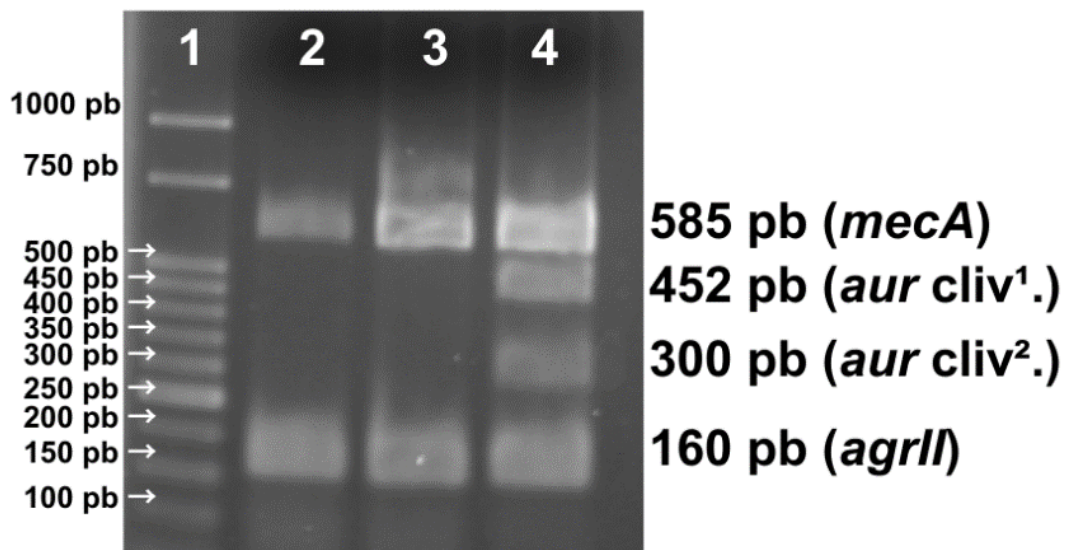
Dos 26 isolados clínicos de MRSA previamente tipados como SCC*meclI*, 15 (57,7%) foram classificados pelo protocolo de PCR multiplex como CC5-Não RdJ, ou seja, apresentaram os genes *mecA*, *agrII* e *aur* (gene acessório ausente em alguns isolados), sem a clivagem do *aur* em 2 bandas. Os outros 11 isolados (42,3%) foram classificados como clone RdJ, por apresentarem os genes *mecA* e *agrII*, além da clivagem do gene *aur* indicando a mutação. Dentre os isolados confirmados como clone RdJ, 5 (55%, ou 5/9) são oriundos de infecções de corrente sanguínea (Tabela 1). O resultado de três isolados da coleção pode ser observado na Figura 3. Surpreendentemente, o isolado 16007 (classificado anteriormente como ST105-SCC*meclI*; DOMINSKI, 2018), exibiu um perfil CC5-nãoRdJ (Figura 3, coluna 3).

Tabela 1 – Resultado do PCR multiplex realizado a partir de 26 isolados clínicos MRSA SCC*meclI*.

Código de Identificação	Sítio de Coleta	Origem Hospitalar	Resultado da PCR
16001	Sangue	HU	Clone RdJ
16006	Sangue	HU	Clone RdJ
16007 (ST105)	Escarro	HU	CC5-Não RdJ
16009	Secreção de ferida pós-operatória	LACEN	Clone RdJ
16011	Secreção de membro inferior	LACEN	Clone RdJ
16012	Sangue	LACEN	CC5-Não RdJ
16013	Fragmento ósseo	LACEN	Clone RdJ
16014	Secreção ocular	LACEN	CC5-Não RdJ
17006	Sangue	LACEN	Clone RdJ
17007	Secreção de lesão cutânea	LACEN	Clone RdJ
17011	Biópsia de tórax	LACEN	Clone RdJ
17012	LVA	LACEN	CC5-Não RdJ
17013	Sangue	LACEN	Clone RdJ
17014	Secreção de ferida pós-operatória	LACEN	CC5-Não RdJ
17015	Secreção de lesão	LACEN	CC5-Não RdJ
17018	Aspirado traqueal	LACEN	CC5-Não RdJ

17019	Fragmento de tecido ósseo	LACEN	CC5-Não RdJ
17021	Swab de estroma traqueal	LACEN	<b>Clone RdJ</b>
17024	Sangue	LACEN	<b>Clone RdJ</b>
17026	Secreção traqueal	LACEN	CC5-Não RdJ
17028	Sangue	LACEN	CC5-Não RdJ
17031	Sangue	LACEN	CC5-Não RdJ
17032	Aspirado traqueal	LACEN	CC5-Não RdJ
17033	Tecido nervoso	LACEN	CC5-Não RdJ
17034	Segmento de tendão	LACEN	CC5-Não RdJ
17039	Sangue	HU	CC5-Não RdJ

**Legenda:** Os dígitos 16 e 17 no início do código dos isolados se referem ao ano da coleta, 2016 e 2017, respectivamente. Fonte: autoria própria (2023).



**Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando os produtos de PCR para 3 dos 26 isolados clínicos de MRSA.** A coluna 1 contém o marcador de peso molecular 100pb (Promega®), as colunas 2 e 3 apresentam isolados pertencentes ao complexo clonal 5, mas não são clones RdJ pois não possuem o gene *aur* mutado. A última coluna (4) confirma um clone RdJ pela clivagem do gene *aur* em duas bandas (452<sup>1</sup> e 300<sup>2</sup> pb).

## 5.2 Análise *in silico* do genoma sequenciado

A análise *in silico* confirmou que o isolado 16007 pertence à sequência tipo ST105 (Tabela 2). A identidade representa a porcentagem do que é idêntico entre a sequência do banco de dados genômico PubMLST e do DNA sequenciado do isolado 16007, demonstrando 100% de compatibilidade entre as sequências, sem a presença

de variantes genômicas ou *gaps* (possui similaridade em todas as posições do alinhamento).

**Tabela 2 – Perfil MLST do isolado MRSA sequenciado 16007.**

Locus	Identidade	Cobertura	Comprimento do Alinhamento	Comprimento do Alelo	Gaps	Alelos
AcrC	100	100	456	456	0	acrC_1
AroE	100	100	456	456	0	aroE_4
GlpF	100	100	465	465	0	glpF_1
Gmk	100	100	417	417	0	gmk_4
Pta	100	100	474	474	0	pta_12
Tpi	100	100	402	402	0	tpi_1
YqiL	100	100	516	516	0	yqiL_28

Fonte: MLST 2.0, PubMLST (Center for Genomic Epidemiology, 2023).

Quanto à tipagem *SCCmec* (Tabela 3), o genoma analisado mostrou a melhor homologia para o *SCCmecII*. O gene *mecA* foi detectado, o que é característico de MRSA. No entanto, nenhum elemento *SCCmec* por completo foi identificado. Ainda, assumindo que o cassete com a melhor homologia foi *SCCmecII* (99,57% de cobertura) e este é a melhor correspondência, então os seguintes genes/complexos estão ausentes: *ccrA2* e *ccrB2*. Os resultados sugerem uma possível variabilidade genética no contexto do MRSA isolado em questão, falhas no sequenciamento/montagem do genoma ou falhas no banco de dados da plataforma utilizada.

**Tabela 3 – Perfil *SCCmec* do isolado de MRSA sequenciado 16007.**

Template	Score	Esperado	Valor z	Valor P	Cobertura Querty [%]	Cobertura de Template [%]	Kmers do Template
SCCmec_typ e_II(2A)  gb CP00073 6	116979	59248	328.9	3.6e-25	2.10	99.54	117483
SCCmec_typ e_II(2A)  gb D86934.2	111700	57716	311.8	3.6e-25	2.00	67.60	114446
SCCmec_typ e_II(2A)	102348	52918	298.7	3.6e-25	1.84	97.54	104932

gb AP00932 4	SCCmec_typ e_II(2A)	102316	52902	298.7	3.6e-25	1.84	97.54	104900
gb BA00001 7	SCCmec_typ e_II(2A)	101891	58781	246.5	3.6e-25	1.83	87.42	116558
gb BX57185 6								

Fonte: SCCmecFinder (Center for Genomic Epidemiology, 2023).

A análise *in silico* indica correspondência do sequenciamento do isolado 16007 com o tipo *spa* t002 (tabela 4). Desse modo, a linhagem do genoma sequenciado deste isolado é ST105-SCCmecII-t002. A t002 foi também a tipagem *spa* detectada por Viana et al. (2021) nos isolados RdJ coletados no Rio de Janeiro.

**Tabela 4 – Tipagem *spa***

Tipo <i>spa</i>	Posição no genoma	Orientação
T002	16645-16922	Negativa

Fonte: spaTyper 1.0 (Center for Genomic Epidemiology, 2023).

Quanto ao perfil de virulência do isolado 16-007, observou-se a presença de 19 genes, conforme apresentado na tabela 5. Foram detectados três genes codificantes de hemolisinas (*hlga*, *hlgb* e *hlgc*), dois genes codificantes da leucocidina LukED (*lukD* e *lukE*, sendo o *lukE* encontrado duplicado), nove genes codificantes de diferentes enterotoxinas (*sed*, *seg*, *sei*, *sej*, *sem*, *sem*, *seo*, *ser* e *seu*, sendo o gene *sei* encontrado duplicado), o gene *aur* codificante da aureolisina e os genes *spIA* e *spIB*, codificantes de exoenzimas. O gene *aur* deste isolado sequenciado apresentou identidade de 100% com a versão selvagem do banco de dados e, portanto, não evidencia mutação. A mutação também não foi encontrada utilizando o protocolo de detecção do clone RdJ, pois não houve a clivagem do fragmento de *aur* amplificado.

O isolado carece do gene *sep*, que codifica a enterotoxina P, e do gene *SpID*, que codifica uma serina protease, conforme esperado para um isolado ST105(CC5)-SCCmecII, pois o ST105 é caracterizada pela ausência de genes de virulência que são comuns às outras linhagens dentro do CC5 (CHALLAGUNDLA et al., 2018).

Tabela 5 – Perfil de virulência do isolado de MRSA sequenciado 16007.

Database	Fator de virulência	Identidade	Comprimento do Template / Query	Posição na seqüência contínua	Função Proteica
s.aureus_toxin	<i>hlgA</i>	100	930 / 930	544..1473	Precursor da cadeia II da gama-hemolisina
s.aureus_toxin	<i>hlgB</i>	100	977 / 977	2989..3965	Precursor do componente B da gama-hemolisina
s.aureus_toxin	<i>hlgC</i>	100	948 / 948	2040..2987	Componente C da gama-hemolisina
s.aureus_toxin	<i>lukD</i>	100	984 / 984	7666..8649	Componente D de leucocidina
s.aureus_toxin	<i>lukE</i>	100	936 / 936	8651..9586	Componente E de leucocidina
s.aureus_toxin	<i>lukE</i>	100	936 / 936	8651..9586	Componente E de leucocidina
s.aureus_toxin	<i>Sed</i>	100	775 / 775	14649..15423	Enterotoxina D
s.aureus_toxin	<i>Seg</i>	99.87	777 / 777	14729..15505	Enterotoxina G
s.aureus_toxin	<i>sei</i>	100	729 / 729	17507..18235	Enterotoxina I
s.aureus_toxin	<i>sei</i>	100	729 / 729	17507..18235	Enterotoxina I
s.aureus_toxin	<i>sej</i>	99.88	807 / 807	12948..13754	Enterotoxina J
s.aureus_toxin	<i>Sem</i>	100	720 / 720	18270..18989	Enterotoxina M
s.aureus_toxin	<i>Sem</i>	100	777 / 777	15788..16564	Enterotoxina N
s.aureus_toxin	<i>Seo</i>	100	783 / 783	19270..20052	Enterotoxina O
s.aureus_toxin	<i>ser</i>	99.36	780 / 780	12079..12858	Enterotoxina R
s.aureus_toxin	<i>Seu</i>	99.61	772 / 771	16582..17353	Enterotoxina U
s.aureus_exoenzyme	<i>aur</i>	100	1530 / 1530	8896..10425	Aureolisina
s.aureus_exoenzyme	<i>spIA</i>	100	708 / 708	2828..3535	Protease serina <i>spIA</i>
s.aureus_exoenzyme	<i>spIB</i>	100	723 / 723	1981..2703	Protease serina <i>spIB</i>

Fonte: VirulenceFinder 2.0 (Center for Genomic Epidemiology, 2023).

## 6. DISCUSSÃO

O ambiente hospitalar, apesar de trazer o cuidado necessário aos pacientes, também pode estar associado com o surgimento e disseminação de infecções que são motivo de preocupação diária aos profissionais de saúde e às redes de assistência (NASCIMENTO et al., 2022). O presente estudo detectou 11 isolados pertencentes ao clone RdJ, dentre os 26 isolados clínicos de MRSA obtidos de pacientes atendidos em diversos hospitais de SC. O grupo de pesquisa de Viana e colaboradores (2021), que originalmente detectou e nomeou o clone RdJ, encontrou que a distribuição das linhagens de MRSA está associada ao local de infecção, sendo a linhagem CC5-

SCC*meclI* mais comumente encontrada em infecções sanguíneas (115/245 ou 46,9%) do que não-sanguíneas (62/245 ou 25,3%) e swabs nasais (68/245 ou 27,8%). Em contraste, nossos resultados verificaram que a linhagem CC5-SCC*meclI* está mais associada a infecções não-sanguíneas (61,5%) do que sanguíneas (34,6%), discordância que pode ser explicada por este estudo ter um número de amostras quase dez vezes menor que o de Viana e colaboradores. Também, não possuímos isolados SCC*meclI* coletados a partir de swabs nasais. Apesar dessa limitação em número de amostras, ainda foi possível verificar resultados em comum entre as duas pesquisas. Viana e colaboradores identificaram através de sequenciamento genômico que o genótipo dominante entre seus isolados CC5 especificamente oriundos de sangue (175) foi o do clone RdJ, que compreende 41,9% (ou 75/179) destes. Quando consideramos apenas os nossos isolados CC5 de sangue (9), verificamos também uma incidência superior do clone RdJ (55,5% ou 5/9, Tabela 1). Portanto, em concordância com Viana et al. (2021), o clone RdJ (genótipo ST105-SCC*meclI*-t002) é dominante entre os isolados CC5 coletados a partir de infecções sanguíneas.

No contexto internacional, Esteves e colaboradores (2023) observaram que ST105-SCC*meclI* não-RdJ (*aur* alelo selvagem, sem a mutação) são comuns em outros países, já a mutação G369D no *aur* é uma variante filogenética de amostras ST105-SCC*meclI*-t002 emergentes e encontradas majoritariamente em isolados de hemocultura de pacientes hospitalares no Rio de Janeiro (clone RdJ). É importante ressaltar que, apesar de que 11 isolados desta pesquisa foram identificados como Clone RdJ pela PCR multiplex, é possível que existam diferenças nas características biológicas entre clones primeiramente identificados no RJ por Viana e colaboradores e os clones identificados nesta pesquisa (SC). Isso se deve ao fato de que um clone pode adquirir características locais quando disseminado em outro contexto geográfico, a depender do tipo de pressão evolutiva o qual está submetido (GUIMARÃES et al., 2015). Por exemplo, o clone USA400 (linhagem CC8-ST1-SC*meclIV*) originou-se nos Estados Unidos e, poucos meses depois, a mesma linhagem foi detectada no Brasil, porém com maior número de marcadores de resistência antimicrobiana, menos genes de virulência detectados e menor virulência observada em modelo de infecção *in vivo* (Guimarães et al 2015). Assim, de acordo com os resultados reportados aqui, não podemos afirmar que o clone RdJ detectado em SC têm as mesmas características observadas no RJ, incluindo a habilidade de evadir resposta imunológica relacionada à monócitos. Adicionalmente, como o genoma sequenciado (isolado 16007) não é um clone RdJ por não possuir a mutação no gene *aur*, não foi possível compararmos os genomas do RJ e o do isolado 16007 (CC5-não RdJ).

As linhagens de MRSA podem ser agrupadas em grandes complexos clonais (CC), que apresentam ondas de dominância e são determinados por proximidade filogenética. Estimativas indicam que o CC5 pode estar aumentando em prevalência no Brasil (CHAMON et al., 2016). Análises filogenéticas anteriores agruparam linhagens ST5 e ST105, como ST105-SCC*meclI*-t002, ST5-SC*meclI*-t539 e ST5-SCC*meclV*-t002, ao CC5. Portanto, mesmo se tratando de sequências tipo diferentes, ST5 e ST105 definem linhagens pertencentes ao mesmo complexo clonal (CC5), conforme o apêndice B (VIANA et al., 2021). Viana e colaboradores (2021) avaliaram a distribuição de genótipos entre 600 isolados MRSA no Rio de Janeiro, sendo a maioria categorizados como CC5-SCC*meclI* (245/600; 40,8%) ou CC5-SCC*meclV* (137/600; 22,8%). A segunda linhagem mais comum pertence ao CC30 (117/600; 19,5%), e as linhagens previamente dominantes como CC1-SCC*meclV* (79/600; 13,2%) e o CEB (7/600; 1,2%) foram menos frequentes. Além disso, observaram baixas frequências de STs relacionadas a linhagens internacionais (VIANA et al., 2021). Isolados do genótipo ST105(CC5)-SCC*meclI*-t002 foram agrupados em um clado (clado RdJ), que é encontrado principalmente no Rio de Janeiro, mas grupos próximos a este clado são compostos por isolados previamente sequenciados de São Paulo, Porto Alegre (PANESSO et al., 2015) e da América do Norte. Essa diversidade sugere múltiplas introduções desta linhagem no Brasil e, através de análise bayesiana do clado RdJ, Viana e colaboradores (2021) sugerem uma data de introdução recente, provavelmente em 2009.

Considerando que tanto os isolados desta pesquisa quanto os de Viana e colaboradores (2021) foram coletados em uma época próxima (2016-2017 e 2014-2017, respectivamente), ainda não é certo em qual região o clone RdJ se originou de fato. Além disso, sua origem foi estimada próxima ao ano de 2009 (VIANA et al., 2021), e os isolados desta pesquisa (coletados em 2016-2017) e de Viana e colaboradores (2014-2017) foram coletados em no mínimo 5 anos a partir da estimada origem do RdJ. Considerando o surgimento de variantes genômicas ao longo do tempo (GUIMARÃES et al., 2015), uma questão a ser levantada é de como a mutação do *aur* se comporta na história evolutiva da linhagem RdJ. Nossa análise *in silico*, por exemplo, verificou no isolado 16007 o genótipo correspondente à linhagem ST105-SCC*meclI*-t002, sem a mutação no *aur*, portanto trata-se de um clone CC5-Não RdJ. Caso a mutação em *aur* tenha sido perdida com o tempo, este isolado poderia se tratar de uma variante genética posterior ao RdJ. Também, considerando que Esteves e colaboradores (2023) indicam que a mutação *aur* não está presente em ancestrais

CC5, este isolado poderia também se tratar de uma variante anterior ao RdJ. Essa problemática indica a necessidade de novas análises filogenéticas a respeito da linhagem RdJ e seus clones associados. Os dados da presente pesquisa podem contribuir para a elucidação da ancestralidade, estimativa do local de origem e datação mais provável do clone RdJ propriamente dito.

No que tange a virulência do isolado sequenciado (16007), os genes *sep* e *SpID* não foram encontrados na análise *in silico* (Tabela 5). Um diferencial da ST105 é a ausência de genes de virulência comuns a outras cepas do CC5. Estudos anteriores de Viana e colaboradores (2021) indicam que isolados ST105(CC5)-SCC*meclI* carecem do gene *sep*, que codifica a enterotoxina P, como também observado por Challagundla e colaboradores (2015). Além de suas propriedades eméticas, a enterotoxina P é um superantígeno que induz a proliferação de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias. Os isolados ST105(CC5)-SCC*meclI* também carecem do gene que codifica a serina protease *SpID*. Embora o papel específico de *SpID* na patogênese de *S. aureus* não seja elucidado, existem propostas de que serina proteases *SpI* podem usar a proteólise para modular proteínas hospedeiras essenciais à patogênese da própria bactéria (ZDZALIK et al., 2013). Nesse contexto, por mais que isolados RdJ sejam ST105-SCC*meclI* e, portanto, careçam destes genes de virulência, comparados a outras linhagens do CC5 (ST5-SCC*meclI*-t539 e ST5-SCC*meclV*-t002), isolados do clone RdJ demonstram uma maior capacidade de evasão dos mecanismos de fagocitose após exposição *in vitro* a monócitos, embora seja um mecanismo ainda não elucidado (VIANA et al., 2021). Esta capacidade de evasão é provavelmente multifatorial, ligada à produção de diversas moléculas bacterianas (FLANNAGAN et al., 2015). Cabe ressaltar que o perfil de virulência dos MRSA não pode ser observado apenas em uma perspectiva quantitativa, visto que alguns genes são interdependentes para a mesma função biológica, o que também propõe uma análise qualitativa. Por exemplo, os genes *lukE* e *lukD* identificados na análise *in silico* codificam para proteínas estruturalmente separadas, mas que compõem a leucotoxina bicomponente *lukED*, formando um hetero-oligômero e atuando em sinergia para romper as células hospedeiras. Esse sistema bicomponente forma poros que alteram a permeabilidade da membrana a certos íons, modificando seu potencial de membrana e pressão osmótica. Além das leucotoxinas, a análise *in silico* detectou genes (*HlgA*, *HlgB* e *HlgC*) que codificam para  $\gamma$ -hemolisinas bicomponentes (*HlgC/HlgB* e *HlgA/HlgB*), que são outras toxinas formadoras de poros codificadas por múltiplos genes, mas que agem em sinergia para induzir uma resposta



em comum, formando homo-oligômeros para a ligação e lise da membrana de eritrócitos (SUGAWARA et al., 2015; STAALI et al., 2021).

O gene *aur* codifica a zinco metaloprotease aureolisina (ESTEVEZ et al., 2023), que atua na evasão da fagocitose ao interferir no processo de opsonização pelo sistema complemento (FLANNAGAN et al., 2015). O sistema de complemento é uma cascata proteolítica de proteínas plasmáticas essencial para a defesa do hospedeiro contra bactérias invasoras. O reconhecimento de bactérias leva à formação do complexo C3 convertase, que cliva a proteína C3, um evento crítico na ativação do complemento que resulta na liberação do anafilatoxina C3a e na deposição de C3b na superfície bacteriana. As moléculas de C3b opsonizam a bactéria, facilitando eventos de ataque à membrana, de atração e ativação de fagócitos pela anafilatoxina C5, bem como a fagocitose e apresentação de antígenos (LAARMAN et al., 2011). *S. aureus* utilizam suas proteases para atenuar a resposta do complemento. Especificamente, a aureolisina inativa a proteína central do complemento, o C3, e, assim, bloqueia respostas importantes dependentes do complemento, como a fagocitose e a ativação de neutrófilos (LAARMAN et al., 2011). Estudos anteriores identificaram diferentes estratégias bacterianas de evasão do complemento, como a produção de uma cápsula para evitar seu reconhecimento, atração de reguladores do complemento do hospedeiro para a superfície bacteriana, além de secreção de proteínas que inativam proteínas do complemento (BLOM et al., 2008; LAMBRIS et al., 2008 & GEISBRECHT et al., 2008). Neste cenário, a mutação no gene *aur* poderia estar relacionada à capacidade aumentada da linhagem RdJ de evadir a resposta imune relacionada a monócitos, em comparação a linhagens CC5-Não RdJ. Adicionalmente, a proteína A, codificada pelo gene *spa*, desempenha um papel importante nas interações entre *S. aureus* e o sistema imunológico do hospedeiro, pois contribui para sua capacidade de se ligar à porção Fc das imunoglobulinas G (IgG). Ao se ligar às IgG, a proteína A pode interferir nas respostas imunológicas, possibilitando à bactéria evadir a resposta do sistema complemento (RIGI et al., 2019). Uma outra questão a ser levantada é se a mutação em *aur* conjunta do tipo *spa* t002 encontrada nos clones RdJ seria uma configuração responsável pela sua maior evasão fagocitária. De qualquer forma, ainda são necessários estudos específicos para afirmar a relevância do gene *aur* mutado neste processo de evasão aprimorada dos clones RdJ, como por exemplo ensaios de deleção de *aur*.

Acerca do perfil de resistência dos MRSA, isolados de SCC<sub>meclI</sub> tem maior probabilidade de possuírem multirresistência, que é definida como resistência a três

ou mais classes de antimicrobianos não- $\beta$ -lactâmicos, quando comparados a isolados de outras linhagens clonais frequentes dentro do CC5 (VIANA et al., 2021). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa analisaram o perfil de sensibilidade e resistência de 55 isolados de MRSA tipados como SCC*meclI* e SCC*meclIV*. Através de testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA), foi verificado que as cepas de SCC*meclI* mostraram-se mais resistentes aos antimicrobianos em comparação às cepas de tipagem SCC*meclIV* (PROVENZINI, 2022). A presente pesquisa lançou mão do mesmo acervo de isolados clínicos de MRSA testado por Provenzini (2022), utilizando apenas os isolados SCC*meclI* (26), pelo potencial de serem clones RdJ. Assim, já estava elucidado o perfil de resistência dos isolados previamente ao protocolo de PCR multiplex (APÊNDICE A). Na pesquisa de Provenzini (2022), o isolado 17013 apresentou resistência a 5 classes de antimicrobianos não-betalactâmicos, com sensibilidade apenas para gentamicina. Na presente pesquisa, este isolado foi um dos onze a apresentar a mutação no gene *aur*, comum ao RdJ (ESTEVES et al., 2023). Ainda, os isolados não-multirresistentes (16012, 16014 e 17012) não apresentaram a mutação característica, sendo classificados como CC5-não RdJ. Viana e colaboradores (2021) observaram que as cepas ST105(CC5)-SCC*meclI*-t002 mostram resistência a fluoroquinolonas, macrolídeos e lincosamidas. Dos nossos isolados tipados como clone RdJ pela PCR, 11 (100%) apresentam resistência à ciprofloxacino (fluoroquinolona), clindamicina (lincosamina) e à eritromicina (macrolídeo), 1 (9%) apresenta resistência a gentamicina, 1 (9%) apresenta resistência a rifampicina e 2 (18%) apresentam resistência a sulfametoxazol-trimetoprim (PROVENZINI, 2022). Todos os 11 isolados tipados como clone RdJ são multirresistentes, pois apresentam em geral resistência a 3 classes de antimicrobianos além dos betalactâmicos, com exceção dos isolados 17006 e 17021, resistentes a 4 classes, e do isolado 17013, que apresentou resistência a 5 classes de antimicrobianos além dos betalactâmicos (APÊNDICE A). Por outro lado, 90,9% dos clones RdJ apresentaram sensibilidade a gentamicina e/ou rifampicina.

Acerca do nosso conhecimento, esta é a primeira pesquisa a detectar o clone RdJ e a linhagem ST105-SCC*meclI* em isolados de MRSA no estado de Santa Catarina.

## **7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

### **7.1 Conclusão**

Os resultados deste estudo identificaram isolados de clone RdJ (linhagem CC5-ST105-SCC*meclI*-t002) em Santa Catarina. Entretanto, ainda não é possível afirmar

que os clones RdJ nesta pesquisa possuem as mesmas características biológicas dos clones RdJ primeiramente identificados no Rio de Janeiro, pois diferenças geográficas podem gerar variantes biológicas. De qualquer forma, o padrão de resistência dos isolados confirmados como RdJ se mostrou preocupante, devido à multirresistência observada em 100% destes. Por outro lado, foi possível identificar que 90,9% dos clones RdJ-SC são sensíveis a gentamicina e/ou a rifampicina. Os presentes dados têm a intenção de servir como horizonte para um efêmero campo de pesquisa, frente a uma delicada questão de saúde pública envolvendo o manejo de infecções por MRSA.

## 7.2 Perspectivas

Estudos recentes de Viena e colaboradores (2022) descobriram que algumas cepas de MRSA possuem uma mutação em um dos genes que identificam *SCCmecII* pela metodologia de Boye e colaboradores (2007), de modo que certos isolados de MRSA na coleção do nosso grupo de pesquisa podem ter sido erroneamente classificados como *SCCmecIV*. Assim, para os isolados tipados como *SCCmecIV* pela metodologia de Boye (24 amostras), será feita uma retipagem baseada em PCR simples para o gene *KDP*, que confirma o tipo *SCCmecII*, conforme o protocolo de Oliveira et al. (2001). Isolados retipados como *SCCmecII* serão utilizados em futuras detecções do clone RdJ na nossa coleção, além de estudos acerca de sua biologia.

Por fim, a detecção de clones relacionados ao RdJ em nossos isolados abre caminho para o grupo de pesquisa traçar estudos referentes aos mecanismos que contribuíram para a associação do clone RdJ às infecções de corrente sanguínea, a como a mutação *aur* pode estar contribuindo para sua patogenicidade, e de que modo a mutação está se comportando ao longo da história evolutiva da linhagem ST105-*SCCmecII*.

## REFERÊNCIAS

- BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics**, btu170. 2014.
- 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
- BLOM, AM; HALLSTRÖM, T; RIESBECK, K. Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. **Mol. Immunol.** 2009. 46: 2808–2817.
- CAMPBELL C, FINGLETON C, ZEDEN MS, BUENO E, GALLAGHER LA, SHINDE D, AHN, J, OLSON HM, FILLMORE TL, ADKINS JN, RAZVI F, BAYLES KW, FEY PD, THOMAS VC, CAVA F, CLAIR GC, O’GARA JP. Accumulation of Succinyl Coenzyme A Perturbs the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Succinylome and Is Associated with Increased Susceptibility to Beta-Lactam Antibiotics. **mBio**. 2021 Jun 29;12(3):e0053021. doi: 10.1128/mBio.00530-21. Epub 2021 Jun 29. PMID: 34182779; PMCID: PMC8437408.
- CHAMON RC, RIBEIRO SD, da COSTA TM, NOUÉR SA, dos SANTOS KRN. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**. 2017;21:185–9. [https://doi.org/ 10.1016/j.bjid.2016.09.015](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.015).
- DOMINSKI, BH. Caracterização molecular de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) isolados no Estado de Santa Catarina. 2018. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018
- DYKE KGH. *Staphylococcus* research. **Microbiology** (Reading). 2003 Oct;149(Pt 10):2697-2699. doi: 10.1099/mic.0.26676-0. PMID: 14523102.
- ESTEVES, M de AC; VIANA, AS; VIÇOSA, GN; BOTELHO, AMN; MOUSTAFA, AM; RAPOSO, F; FERREIRA, ALP; VERMELHO, AB; FERREIRA-CARVALHO, BT; PLANET, PJ; FIGUEIREDO, AM. RdJ detection tests to identify a unique MRSA clone of ST105-SCCmecII lineage and its variants disseminated in the metropolitan region of Rio de Janeiro. **Frontiers in Microbiology**. 2023. doi: 10.3389/fmicb.2023.1275918
- FIGUEIREDO, AM. High frequency of increased triclosan MIC among CC5 MRSA and risk of misclassification of the SCCmec into types. **J Antimicrob Chemother**. 2022 Nov 28;77(12):3340-3348. doi: 10.1093/jac/dkac322. PMID: 36173394; PMCID: PMC9704425.
- FLANNAGAN, RS; HEIT, B; HEINRICHS, DE. Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**. 2015 Nov 27;4(4):826-68. doi: 10.3390/pathogens4040826. PMID: 26633519; PMCID: PMC4693167.
- GEISBRECHT, BV. Staphylococcal complement inhibitors: biological functions, recognition of complement components, and potential therapeutic implications. **Adv. Exp. Med. Biol**. 632: 221–236. 2008.
- GUIMARÃES, MA; RAMUNDO, MS; AMÉRICO, MA; de MATTOS, MC; SOUZA, RR; RAMOS-JÚNIOR, ES; COELHO, LR; MORROT, A; MELO, PA; FRACALANZZA, SE; FERREIRA, FA et FIGUEIREDO, AM. A comparison of virulence patterns and in vivo fitness between hospital- and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to the USA400 clone. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2015 Mar;34(3):497-509. doi: 10.1007/s10096-014-2253-1. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25311987.
- JAUSLIN T, LAMRABET O, CRESPO-YAÑEZ X, MARCHETTI A, AYADI I, IFRID E, GUILHEN C, LEIPPE M, COSSON P. How Phagocytic Cells Kill Different Bacteria: a Quantitative Analysis

Using *Dictyostelium discoideum*. **mBio**. 2021 Feb 16;12(1):e03169-20. doi: 10.1128/mBio.03169-20. PMID: 33593980; PMCID: PMC8545105.

KRONING IS, IGLESIAS MA, SEHN CP, GANDRA TKV, MATA MM, da SILVA WP. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. **Food Microbiol**. 2016;58:105–111. doi: 10.1016/j.fm.2016.04.001.

LAARMAN AJ, RYUKEN M, MALONE CL, VAN STRIIP JA, HORSWILL AR, ROOIJAKKERS SH. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. **J Immunol**. 2011 Jun 1;186(11):6445-53. doi: 10.4049/jimmunol.1002948. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21502375.

LAMBRIS, JD; RICKLIN, D; GEISBRECHT, B. Complement evasion by human pathogens. **Nat. Rev. Microbiol**. 2008. 6: 132–142.

LAKHUNDI S, ZHANG K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clin Microbiol Rev**. 2018 Sep 12;31(4):e00020-18. doi: 10.1128/CMR.00020-18. PMID: 30209034; PMCID: PMC6148192.

LEE AS, DE LENCASTRE H, GARAU J, KLUYTMANS J, MALHOTRA-KUMAR S, PESCHEL A, HARBARTH S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat Rev Dis Primers**. 2018 May 31;4:18033. doi: 10.1038/nrdp.2018.33. PMID: 29849094.

LIU J, CHEN D, PETERS BM, LI L, LI B, XU Z, SHIRLIF ME. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microb Pathog**. 2016 Dec;101:56-67. doi: 10.1016/j.micpath.2016.10.028. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27836760.

MEDLINE - Medical Literature Analysis and Retrieval System Online. 1966 – [citado 2023 Out 01]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

NASCIMENTO, LCGB do; ALVES JUNIOR GL; PEREIRA, VM.; RODRIGUES, G da S; SILVA JÚNIOR, AB; LEMOS, ALC; SANTOS, RV de S; NASCIMENTO, AB. Bacterial resistance in the treatment of pneumonia in hospital patients: a systematic review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 13, p. e25111334930, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i13.34930. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/34930>.

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**. v. 5, n. 4, p. 163–70, 2001.

PANESSO, D; PLANET, PJ; DIAZ, L; HUGONNET, JE; TRAN, TT; NARECHANIA, A. Methicillin-susceptible, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Brazil. **Emerg Infect Dis**. 2015;21:1844–8. 10.3201/eid2110.141914

PARTE, AC; SARDÀ CARBASSE, J, MEIER-KOLTHOFF, JP, REIMER, LC et GÖKER, M. (2023). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70, 5607-5612; DOI: 10.1099/ijsem.0.004332

PROVENZI, MA. Caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência de amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) isoladas no Estado de Santa Catarina. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

RIGI G, GHAEDMOHAMMADI S, AHMADIAN G. A comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): Its production and applications. **Biotechnol Appl Biochem**. 2019 May;66(3):454-464. doi: 10.1002/bab.1742. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30869160.

RILEY, LW. Laboratory Methods in Molecular Epidemiology: Bacterial Infections. **Microbiol Spectr**. 2018 Nov;6(6). doi: 10.1128/microbiolspec.AME-0004-2018. PMID: 30387415.

ROBERTS RB, CHUNG M, de LENCASTRE H, HARGRAVE J, TOMASZ A, NICOLAU DP, JOHN JF Jr, KORZENIOWSKI, O; Tri-State MRSA Collaborative Study Group. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. **Microb Drug Resist**. 2000 Fall;6(3):245-51. doi: 10.1089/mdr.2000.6.245. PMID: 11144425.

SILVEIRA, ACO. 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.

SUGAWARA T, YAMASHITA D, KATO K, PENG Z, UEDA J, KANEKO J, KAMIO Y, TANAKA Y et YAO M. Structural basis for pore-forming mechanism of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin. **Toxicon**. 2015 Dec 15;108:226-31. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.09.033. Epub 2015 Sep 30. PMID: 26428390.

STAALI L, COLIN DA. Bi-component *HlgC/HlgB* and *HlgA/HlgB*  $\gamma$ -hemolysins from *S. aureus*: Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels activity through a differential mechanism. **Toxicon**. 2021 Oct 15;201:74-85. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.08.007. Epub 2021 Aug 17. PMID: 34411591.

TAYLOR TA, UNAKAL CG. *Staphylococcus aureus*. 2022 Jul 18. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL)**: StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 28722898.

TEIXEIRA LA, RESENDE CA, ORMONDE LR, ROSENBAUM R, FIGUEIREDO AM, de LENCASTRE H, et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **J Clin Microbiol**. 1995;33:2400–4. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2400-2404.1995>

TONG SY, DAVIS JS, EICHENBERGER E, HOLLAND TL, FOWLER VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clin Microbiol Rev**. 2015 Jul;28(3):603-61.

TURNER NA, SHARMA-KUINKEL BK, MASKARINEC SA, EICHENBERGER EM, SHAH PP, CARUGATI M, HOLLAND TL, FOWLER VG Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nat Rev Microbiol**. 2019 Apr;17(4):203-218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4. PMID: 30737488; PMCID: PMC6939889.

UEHARA Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). **Antibiotics**. 2022; 11(1):86. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010086>

VESTERGAARD M, FREES D, INGMER H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. **Microbiol Spectr**. 2019 Mar;7(2). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018. PMID: 30900543.

VIANA AS et al. Multidrug-Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Bacteremia and Monocyte Evasion, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**. 2021;27(11):2825-2835. doi: 10.3201/eid2711.210097. PMID: 34670645; PMCID: PMC8544994.

VIANA AS, BOTELHO AMN, FEDER A, et al. High frequency of increased triclosan MIC among CC5 MRSA and risk of misclassification of the SCC*mec* into types. **The Journal of**

**Antimicrobial Chemotherapy.** 2022 Nov;77(12):3340-3348. DOI: 10.1093/jac/dkac322. PMID: 36173394; PMCID: PMC9704425.

WANG L, ARCHER GL. Roles of CcrA and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome *mec*, a *Staphylococcus aureus* genomic island. **J Bacteriol.** 2010 Jun;192(12):3204-12. doi: 10.1128/JB.01520-09. Epub 2010 Apr 9. PMID: 20382769; PMCID: PMC2901700.

WOLSKA-GEBARZEWSKA M, MIEDZOBRODZKI J, KOSECKA-STROJEK M. Current types of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in clinically relevant coagulase-negative staphylococcal (CoNS) species. **Crit Rev Microbiol.** 2023 Oct 26:1-17. doi: 10.1080/1040841X.2023.2274841. Epub ahead of print. PMID: 37882662.

YOUSEFF CRB, KADRY AA, EL-GANINY AM. Investigating the relation between resistance pattern and type of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Iran J Microbiol.** 2022 Feb;14(1):56-66. doi: 10.18502/ijm.v14i1.8802. PMID: 35664709; PMCID: PMC9085552.

ZDZALIK, M; KALINSKA, M; WYSOCKA, M; STEC-NIEMCZYK, J; CICHON, P; STACH, N; GRUBA, N; STENNICKE, HR; JABAIAH, A; MARKIEWICZ, M; KEDRACKA-KROK, S; WLADYKA, B; DAUGHERTY, PS; LESNER, A; ROLKA, K; DUBIN, A; POTEMPA, J; DUBIN, G. Biochemical and structural characterization of SplD protease from *Staphylococcus aureus*. **PLoS One.** 2013 Oct 9;8(10):e76812. doi: 10.1371/journal.pone.0076812. PMID: 24130791; PMCID: PMC3793935.

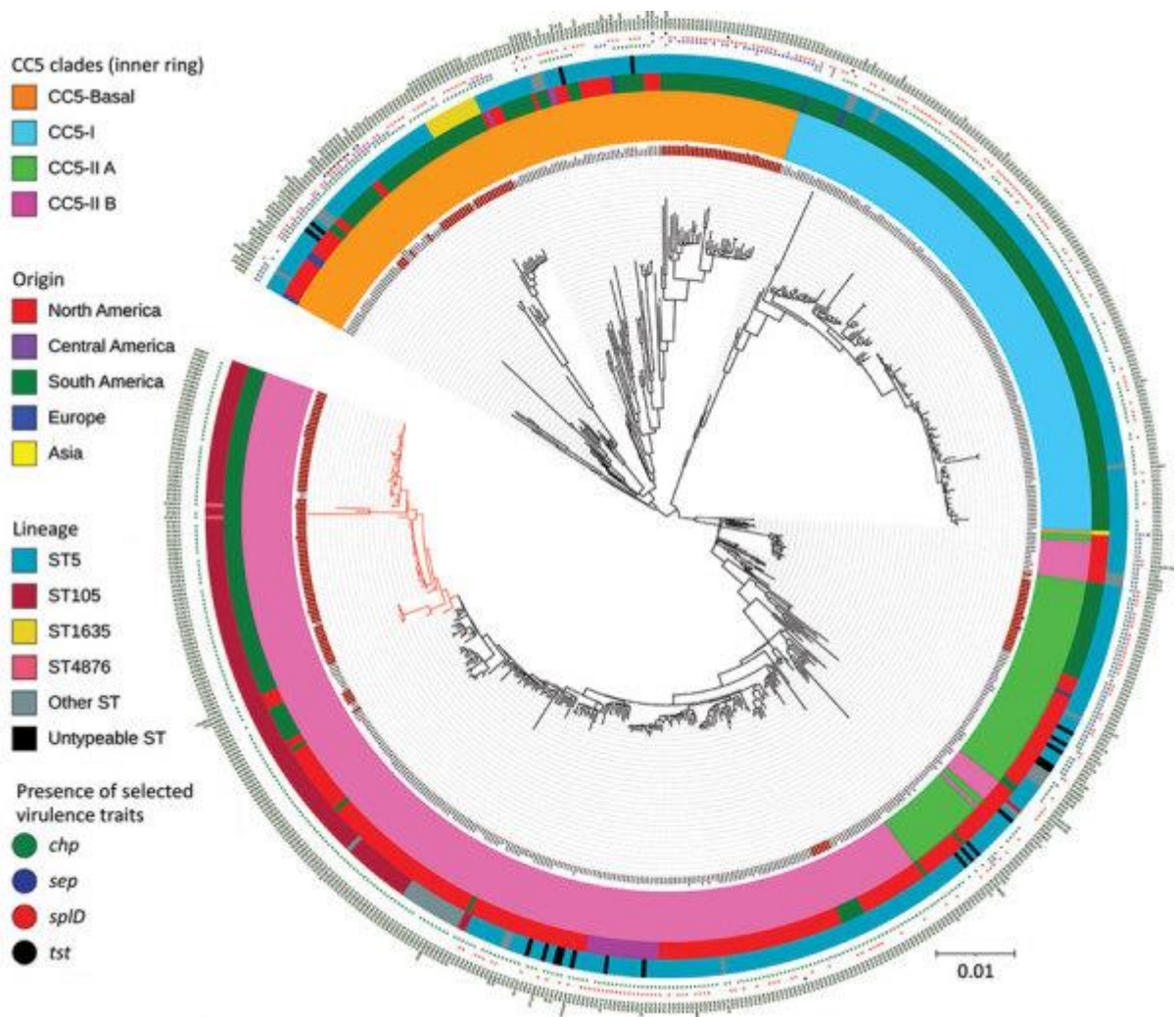
**APÊNDICE A – Classificação da resistência antimicrobiana de acordo com os padrões preconizados pelo BrCAST para cada isolado SCC*mecII* do estudo. Em cinza estão destacados os isolados identificados como Clone RdJ.**

Amostra	Antimicrobianos utilizados no TSA					
	Classificação BrCAST					
	CIP	CMN	ERY	GMN	RIF	SXT
16001	R	R	R	S	S	S
16006	R	R	R	S	S	S
16007	R	R	R	S	S	S
16009	R	R	R	S	S	S
16011	R	R	R	S	S	S
16012	I	S	R	S	S	S
16013	R	R	R	S	S	S
16014	I	S	R	S	S	S
17006	R	R	R	R	S	S
17007	R	R	R	S	S	S
17011	R	R	R	S	S	S
17012	R	S	R	S	S	S
17013	R	R	R	S	R	R
17014	R	R	R	S	S	S
17015	R	R	R	S	S	R
17017	I	S	S	S	S	S
17018	R	R	R	R	S	S
17019	R	R	R	S	S	S
17021	R	R	R	S	S	R
17024	R	R	R	S	S	S
17026	R	R	R	S	S	R
17028	R	R	R	S	S	S
17030	I	S	R	S	S	S
17031	R	R	R	S	S	S
17032	R	R	R	S	S	S
17033	R	R	R	S	S	S
17034	R	R	R	S	S	S
17039	R	R	R	S	S	S

**Legenda:** CIP: Ciprofloxacino; CMN: Clindamicina; ERY: Eritromicina; GMN: Gentamicina; RIF: Rifampicina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim; S: Sensível, dose padrão; I: Sensível, aumentando a exposição; R: Resistente. **Fonte:** Provenzini (2021, adaptada)



**APÊNDICE B – Árvore filogenética de máxima verossimilhança do complexo clonal 5 (CC5).**



**Legenda:** Árvore filogenética de máxima verossimilhança com 179 isolados de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) do complexo clonal CC5 do Rio de Janeiro, Brasil, 2014-2017 (em vermelho) e 482 genomas de referência. Os ramos vermelhos indicam o clone do Rio de Janeiro da linhagem ST105(CC5)-SCC*meclI*-t002. A escala indica substituições por sítio. CC, complexo clonal; SCC, cassete cromossômico estafilocócico; ST, tipo de sequência. **Fonte:** Viana e colaboradores (2021).