



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V- MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ROGERIO FAULHA DE GOUVEIA FILHO

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS ILHAS GENÔMICAS EM
STAPHYLOCOCCUS AUREUS COM ÊNFASE EM GENES DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS**

**JOÃO PESSOA
2019**

ROGERIO FAULHA DE GOUVEIA FILHO

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS ILHAS GENÔMICAS EM
STAPHYLOCOCCUS AUREUS COM ÊNFASE EM GENES DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharelado em Ciências
Biológicas.

Área de concentração: Bioinformática.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a DANIELA SANTOS PONTES.

Coorientadora: Prof.^a Ms.^a NYEDJA FIALHO MORAIS BARBOSA.

**JOÃO PESSOA
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

G719i Gouveia Filho, Rogerio Faulha de.
Identificação e análise das ilhas genômicas em Staphylococcus Aureus com ênfase em genes de resistência a antibióticos. [manuscrito] / Rogerio Faulha de Gouveia Filho. - 2019.
51 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Daniela Santos Pontes , Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
"Coorientação: Profa. Ma. Nyedja Fialho Morais Barbosa. , Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
1. Staphylococcus Aureus. 2. Ilhas genômicas. 3. Transferência gênica horizontal . 4. Genes de resistência aos antibióticos. I. Título

21. ed. CDD 616.904 1

ROGERIO FAULHA DE GOUVEIA FILHO

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS ILHAS GENÔMICAS EM
STAPHYLOCOCCUS AUREUS COM ÊNFASE EM GENES DE RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS**

Trabalho de conclusão de curso (Artigo) apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Bioinformática.

Aprovada em: 05/12/2019.

BANCA EXAMINADORA

Daniela Santos Pontes
Prof.^a Dr.^a DANIELA SANTOS PONTES (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Brigida Thais Luckwu de Lucena
Prof.^a Dr.^a BRIGIDA THAIS LUCKWU DE LUCENA
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Francisco Jaime
Prof. Dr. FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JÚNIOR
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Meu trabalho é dedicado a Deus, que me proporcionou poder cursar e concluir esta importante etapa de minha vida.

Também dedico este trabalho a minha filha Maria Luiza e a minha grande amada esposa Juliana de Fátima, por acreditar em mim incondicionalmente, pelo estímulo para que eu concretizasse os meus sonhos.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”

- Chico Xavier, 1943.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da pesquisa.	18
Figura 2 - Padrões das IGs identificadas nos genomas de <i>S. aureus</i> analisados no estudo.....	22
Figura 3 – Diferença entre os isolados de <i>S. aureus</i> de acordo com a associação das infecções:	23
Figura 4 - Diferença entre os isolados AC e AH quanto ao número de genes de resistências presentes nas IGs $\geq 9,5$ Kb não relacionadas aos fagos.	26
Figura 5 – Porcentagem de <i>S. aureus</i> que adquiriram GRAs identificados nas, nos respectivos isolados, e as classes de antibióticos o qual os genes conferem resistência.....	28
Figura 6 - O mapa conceitual que exemplifica a codificação de genes identificados que determinam as bombas de efluxo em <i>S. aureus</i> pertencentes às famílias MFS e MATE, cuja proteínas de efluxo dependem do gradiente eletroquímico criado pelos íons para transporte .	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Genomas analisados pelo <i>ISLANDVIEWER4</i> . Levando em consideração sua localização e sua resistência ou sensibilidade aos antibióticos, conforme a descrição no NCBI.	19
Tabela 2 - Número de IGs identificados pelo <i>ISLANDVIEWER4</i> . Levando em consideração o tamanho das IGs.	20
Tabela 3 - Genes de: virulência, patogenicidade e resistência. identificados nos genomas estudados, e presentes nas IGs $\geq 9,5$ Kb identificados pelo ISLAND VIEWER4.....	20
Tabela 4 – Número de IGs identificadas pelo <i>ISLANDVIEWER4</i> e de regiões relacionadas a profagos identificadas pelo <i>PHASTER</i>	25
Tabela 5 – Quantidade de genes de virulência e resistência, identificados nos genomas estudados e presentes nas IGs identificados pelo <i>ISLANDVIEWER4</i> e pelo <i>PHASTER</i>	25
Tabela 6 – Genes de resistências encontrados nas IGs e os respectivos mecanismos de resistências e a classe de medicamentos para os quais os genes causam a resistência.....	27
Tabela 7 - Contagem dos genes de resistências e as respectivas classe de medicamentos resistentes identificado pelo <i>CARD</i> sobre 81 genomas.	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Mosaico das Classes de antibióticos identificadas nas IGs nos genomas de <i>S aureus</i>	30
Quadro 2- Mosaico das Classes de antibióticos conferidas por genes mutados presentes nos genomas de <i>S aureus</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>aac(6)-Ie-aph(2)-Ia</i>	Genes codificador de enzima bifuncional acetiltransferase e fosfotransferase aminoglicosídeos
AC	Infecção comunitária
AH	Infecção hospitalar
<i>ant(4)</i>	Genes codificador adenililtransferase aminoglicosídeos
<i>ant(6)</i>	Genes codificador adenililtransferase aminoglicosídeos
<i>ant(9)</i>	Genes codificador adenililtransferase aminoglicosídeos
<i>aph(3)</i>	Genes codificador fosfotransferase aminoglicosídeos
<i>arlR</i>	Genes reguladores
<i>arlS</i>	Genes reguladores
BE	Bomba de Efluxo
<i>blaZ</i>	Genes codificador da β -lactamase
CARD	The Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CPC	Center of Diseases control and Prevention
<i>DfrC</i>	Genes codificador da diidrofolato redutase
<i>DfrG</i>	Genes codificador da diidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGM	Elemento genico móvel
<i>erm</i>	erythromycin ribosome methylase
FM	Força motriz
FP G	Fator de Patogenicidade fora da Ilha genômica
FP IGs	Fator de Patogenicidade dentro da Ilha genômica
FR G	Fator de Resistencia e fora da Ilha genômica
FR IGs	Fator de Resistencia dentro da Ilha genômica
<i>fusA</i>	Genes de resistencia ao ácido fusídico mutável
<i>fusC</i>	Genes de resistencia ao ácido fusídico
FV G	Fator de Virulencia e fora da Ilha genômica
FV IGs	Fator de Virulencia dentro da Ilha genômica
GRAs	Genes de Resistencia a antibióticos
H+	Ions de hidrogenio
IGs	Ilhas Genomicas
L461K	Mutação no fator de alongamento G
MATE	Multidrug and toxic efflux
<i>mecA</i>	Genes codificador da Penicillin-binding protein 2a
<i>mecl</i>	Genes repressor da Penicillin-binding protein 2a
<i>mecR</i>	Genes tradutor de sinal
<i>MepA</i>	Genes codificador Bomba de efluxo MATE (Tetraciclina)
<i>MepR</i>	Genes repressor MepA
MFS	Major facilitator family
<i>mgrA</i>	Genes reguladores
MLE	Macrólitos, Lincosamida e Estreptogramina B
MRSA	Methicilin resistente <i>S. aureus</i>

MSSA	Methicillin sensitive S. aureus
NA+	Ions de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSSA	Oxacillin sensitive S. aureus
PBP2a	Penicillin-binding protein 2a
RGI	Resistance Gene Identifier
<i>sat4</i>	Genes codificador da acetiltransferase de estreptotricina
SDCs	Sequências de DNA codificadores
<i>Tet(38)</i>	Genes codificador da bomba de efluxo MFS (Tetraciclina)
<i>Tet(W/N/W)</i>	Genes codificador de proteção ribossômico
TGH	Tranferencia genica horizontal
VRSA	Vancomycin resistant S . aureus

LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
\geq	Maior ou igual que
<	Menor que
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. METODOLOGIA.....	16
2.1 Construção do banco de dados	16
2.2 Predição de IGs relacionadas aos profagos	16
2.3 Identificação dos mecanismos e classes de antibióticos dos GRAs presentes nas IGs e nos genomas de diferentes linhagens de <i>S. aureus</i>	17
2.4 Análises estatísticas e comparativas de IGs.	17
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	18
3.1 Características do universo de estudo dos genomas de <i>S. aureus</i>	18
3.2 Identificação e visualização das IGs nos genomas de <i>S. aureus</i>	19
3.3 Importância da quantidade de IGs nos genomas de <i>S. aureus</i>	20
3.4 Identificação e visualização das sequencias de bacteriófagos nas IGs.....	24
3.5 Aquisição de genes de resistência aos antibióticos por IGs não relacionadas aos bacteriófagos em genomas de <i>S. aureus</i>	25
3.6 Análise dos Genes de resistência presentes em <i>S. aureus</i>	26
3.6.1 Análise da resistência ao ácido fusíco presentes em <i>S. aureus</i>	29
3.6.2 Análise da resistência ao diaminopirimidina presentes em <i>S. aureus</i>	29
3.6.3 Análise dos genes de resistências aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLE) presentes em <i>S. aureus</i>	31
3.6.4 Análise da resistência aos aminoglicosídeos e estreptotricinas presentes em <i>S. aureus</i>	31
3.6.5 Análise da resistência aos β -lactâmicos presentes em <i>S. aureus</i>	34
3.6.6 Análise dos genes de resistência à tetraciclina presentes em <i>S. aureus</i>	34
4. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE A	42

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS ILHAS GENÔMICAS EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS COM ÊNFASE A GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF GENOMIC ISLANDS IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS WITH EMPHASIS ON ANTIBIOTICS RESISTANCE GENES

Rogério Faulha de Gouveia Filho¹

Nyedja Fialho Morais Barbosa²

Daniela Santos Pontes³

RESUMO

Os estafilococos são bactérias gram-positivas, comensais e parasitas comuns de seres humanos. O *Staphylococcus aureus*, devido sua enorme capacidade de adaptação e resistência à tratamentos com antibioticoterapia, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias. Essa bactéria foi considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um dos patógenos de alta prioridade para o desenvolvimento de novos antibióticos, uma vez que o desenvolvimento de novas drogas tornou-se um ponto crítico para manutenção da saúde humana e animal. O uso descomedido de antibióticos promove seleção de mutações e de segmentos de DNA que foram adquiridos por transferência gênica horizontal (TGH), esses segmentos podem ser identificados como Ilhas Genômicas (IGs). As IGs podem contribuir para a diversificação e adaptação bacteriana e para a disseminação de genes de resistências à antibióticos (GRAs). Diante da escassez de estudos comparativos sobre a presença de IGs em diferentes isolados dessa espécie, este estudo teve como objetivo caracterizar e analisar a influência das IGs no processo de TGH de GRAs. Assim, foram analisados diferentes isolados de *S. aureus* associados às infecções comunitárias (AC) e hospitalares (AH). Para as análises das IGs foram utilizados todos os 81 genomas de *S. aureus* disponíveis no servidor ISLANDVIEWER4, no qual, foram detectadas 516 IGs ≥ 9.5 Kb. Foi constatado que o tamanho dos genomas de *S. aureus* sofre influência do tamanho total de IGs e pelo número de IGs por genoma, de forma positiva e moderada (método de *Spearman*), respectivamente ($R = 0,73$, $p < 0,001$) e ($R = 0,61$, $p < 0,001$). Não foi observado diferença significativa entre linhagens AC e AH (Teste *Mann-Whitney*) para número de IGs, tamanho total das IGs por genoma e proporção da IGs no genoma respectivamente (p -valor = 0,09), (p -valor = 0,08) e (p -valor = 0,1). No entanto, existe uma diferença significativa (p -valor = 0,003) quanto ao número de GRAs presentes nas IGs não relacionadas a fagos, sendo observado o maior número de GRAs em IGs por genoma nos isolados AH. Foram encontrados 232 genes de GRAs nas IGs analisadas com prevalência dos GRAs aos macrólídeos, lincosamida e estreptogramina B (MLE), aminoglicosídeos, β -lactâmicos, tetraciclina e estreptomicina e dentre os genes menos comuns temos a resistência ao ácido fusídico e à diaminopirimidina. Os resultados mostram diversidade e variabilidade de GRAs presentes nas IGs e a contribuição das mesmas no processo de TGH, colaborando para a adaptação do *S. aureus* nos mais diferentes tipos de pressões seletivas encontradas em ambientes hospitalares e extra hospitalares. Além disso, os resultados também revelam o potencial dessas bactérias quanto fontes de disseminação desses GRAs para outras espécies bacterianas.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Ilhas genômicas, Transferência Gênica Horizontal, Genes de resistência aos antibióticos.

ABSTRACT

Staphylococci are commensal gram-positive bacteria and common human parasites. *S. aureus*, is one of the most important species in hospital and community infections due to its enormous ability to adapt and manage to survive antibiotic treatment. This bacterium was listed by the World Health Organization (WHO) as one of the high priority pathogens for which new antibiotics are urgently needed. The resistance mechanisms developed by *S. aureus* are equally relevant, since the development of new drugs has become a critical point for human and animal health. The indiscriminate use of antibiotics promotes selection of resistance-conferring mutations and DNA segments that were acquired by horizontal gene transfer (HGT). These new DNA blocks that were horizontally acquired are recognized as Genomic Islands (GI). The GIs can contribute to bacterial diversification, adaptation, and to spread of antibiotic resistance genes. In the absence of studies comparing the presence of GIs in different isolates of *S. aureus*, the aim of this study was to characterize and analyze the contribution of GIs for horizontal transfer of antibiotic resistance genes (ARGs). Thus, different *S. aureus* isolates associated with community (CA) and hospital infections (HA) were analyzed. All 81 genomes of *S. aureus* available on the ISLANDVIEWER4 server were used in this study, in which 516 IGs ≥ 9.5 Kpb were identified. It was observed that the size of the *S. aureus* genomes was influenced by the number and size of islands per genome, in a positive and moderate way ($R = 0,73$, $p < 0,001$) and ($R = 0,61$, $p < 0,001$). No significant difference was observed between CA and HA isolates considering the number of GI, total size of GI per genome and for ratio between the size of GI and genome size (p -valor = 0,09), (p -valor = 0,08) and (p -valor = 0,1). However, there was a significant difference (p -valor = 0,003) in the number of ARGs present in non-phage GI found in CA and HA strains. It was observed that HA isolates carried a greater number of ARGs in IGs per genome. We found 232 genes of ARGs in the GIs analyzed with prevalence of ARGs to macrolytes, lincosamide and streptogramin B (MLE), aminoglycosides, β -lactams, tetracycline and streptomycin, and the less common resistance genes identified were against to fusidic acid and diaminopyrimidine antibiotics. The results showed a diversity of ARGs presents in GIs and the contribution of these islands on HGT and for *S. aureus* adaptation to different types of selective pressures in hospital and extra-hospital environments. Moreover, the results also revealed the potential of these bacteria as sources of dissemination of these ARG to other bacterial species.

Keywords: Staphylococcus aureus. Genomic Islands. Horizontal Gene Transfer, Antibiotic resistance genes.

1. INTRODUÇÃO

É inquestionável a importância da intervenção médica com introdução dos antibióticos no tratamento das doenças infecciosas principalmente no que diz respeito à redução da morbidade e da mortalidade humana. No entanto, desde o início da década de 40 quando foi introduzida a antibioticoterapia, o uso indiscriminado dos antibióticos tornou-se um verdadeiro desafio para a clínica médica. O aumento drástico na frequência de infecções por

¹ Graduando, aluno, Ciências Biológicas. rogeriofaulha@gmail.com /

² Mestre, professora, Ciências Biológicas. nyedjaf@gmail.com

³ Doutorado, professora, Ciências Biológicas. danisp_bio@ccbsa.uepb.edu.br

patógenos resistentes em humanos e animais ameaçam as opções terapêuticas atualmente disponíveis. A resistência aos antibióticos reduz drasticamente a possibilidade de tratamento das infecções e aumenta o risco de complicações e mortalidade, comprometendo desta forma a saúde pública (LI, B.; WEBSTER, 2018).

A preocupação com a gravidade da disseminação dos patógenos resistentes é tão grande que os estados membros da Organização Mundial da Saúde (OMS) elaboraram uma lista de patógenos de prioridade global, com intuito de priorizar as pesquisas de desenvolvimento de novos tratamentos com antibióticos. Nesta lista encontra-se o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e à vancomicina (VRSA), que são classificados como alta prioridade. (<https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>). As linhagens MRSA podem comumente causar tanto infecções comunitárias como hospitalares (TORGERSEN et al., 2000). Essas infecções são classificadas de acordo com as diretrizes do *Center of Diseases Control and Prevention* (CDC), que consideram o tempo médio de 48hs em que o hospedeiro humano desenvolve a infecção inicial até a sua detecção. Desta forma, as infecções comunitárias (CA) são caracterizadas por infecções identificadas ou em incubação durante a admissão do paciente, desde que, não esteja relacionada à internação anterior em uma unidade hospitalar. Por sua vez, são classificadas como hospitalares (HA), as infecções adquiridas e manifestadas após 48 horas de internação, sendo essa a aquisição infecciosa relacionada com o ambiente ou procedimentos hospitalares (HENDERSON et al., 2013; ZLATIAN et al., 2018).

Para compreender melhor a importância do *S. aureus* para saúde pública, é necessário verificar a capacidade adaptativa desse patógeno em resposta à introdução de agentes antimicrobianos no ambiente clínico. Essa bactéria Gram-positiva é capaz de colonizar a pele e a mucosa do nariz, podendo causar uma variedade de infecções, principalmente infecções de pele, de tecidos moles, ósseo e sanguíneo. Junto a sua capacidade de infecção, *S. aureus* foi capaz de praticamente anular a eficiência da penicilina no início da década de 40, devido a aquisição do gene da β -lactamase. Em 1960, após a introdução dos β -lactâmicos no tratamento de infecções de *S. aureus* resistentes à penicilina, logo foram identificados os primeiros isolados de MRSA em amostras clínicas. Em 1980, os clones epidêmicos do MRSA adquiriram características multirresistentes e se espalharam pelo mundo tornando-se um dos mais importantes agentes causadores de infecções hospitalares. No início dos anos 2000, cepas de MRSA resistentes à vancomicina foram identificadas em ambientes clínicos (TORGERSEN et al., 2000). No mesmo período em que as cepas de MRSA começaram a ser identificadas em isolados relacionados a infecções comunitárias (LENCASTRE, DE; OLIVEIRA; TOMASZ, 2007). Diante disso as infecções por MRSA exigem tratamentos com antibióticos amplo espectro, que são mais caros e apresentam maiores riscos de efeitos colaterais graves aos pacientes. Dessa forma é aconselhável a monitorização durante o tratamento e isso também eleva os custos terapêuticos (GAJDÁCS, 2019; LUNA et al., 2010). Mediante a relevância do surgimento de patógenos multirresistentes os cientistas voltaram-se para as pesquisas que ajudassem a compreender os fatores que influenciavam o surgimento, a mobilização, a disseminação e manutenção de genes de resistência a antibióticos no ambiente.

As bactérias patogênicas desenvolvem resistência aos antibióticos por mutações ou pela aquisição de genes de resistência a antibióticos (GRAs) de outros microrganismos por meio da transferência gênica horizontal (TGH) (JUHAS et al., 2009; JUTKINA et al., 2016; MARTÍNEZ, 2012). A exposição a antibióticos aumenta a frequência da seleção de mutação e GRAs associados a elementos gênicos móveis (EGM) que garantem resistência aos antimicrobianos (GILLINGS, 2013; GILLINGS; STOKES, 2012). Porém a aquisição de GRAs pode estar associada ao custo adaptativo relacionado aos processos de replicação, transcrição e tradução dos novos genes de resistência. O custo adaptativo pode ser constatado na redução da taxa de crescimento das bactérias resistentes na ausência da pressão seletiva

quando comparado as bactérias sensíveis (antibiótico)(ANDERSSON; HUGHES, 2010). A aquisição de GRAs nem sempre resulta na manutenção dos GRAs na população bacteriana, a menos que haja uma pressão seletiva para mantê-los ou que o custo da resistência seja desprezível ou compensado (BENGTSSON-PALME; KRISTIANSOON; LARSSON, 2018;HÄNDEL et al., 2013).

No entanto, as bactérias podem frequentemente se adaptar e evoluir para reduzir esse custo adaptativo da resistência, através de mutações compensatórias ou pela aquisição de genes reguladores da expressão da resistência. Essa compensação permite então que a bactéria resistente persista mesmo após a interrupção do uso de antibióticos (KEMPF; ZEITOUNI, 2012). Martínez et al usam algumas regras para determinar o risco de transferência de GRAs presentes em resistoma ambientais para patógenos humanos. Os autores sugerem que os GRAs já conhecidos por contribuir para o fracasso do tratamento com antibióticos, e associados a elementos gênicos móveis (EGM) em patógenos humanos, são classificados como risco 1 (alto risco) no ranking dos GRAs (MARTÍNEZ; COQUE; BAQUERO, 2015). Desta forma, mostraram a importância do conhecimento dos diferentes genes já depositados em bancos de dados, seus mecanismos de ação e de TGH na disseminação da resistência definindo os reais riscos à saúde pública.

Neste contexto a identificação de agrupamentos de genes, que possivelmente foram adquiridos por TGH tornou-se extremamente importante. Os blocos de DNA, de tamanhos que variam entre 10Kb até 200 Kb (JUHAS et al., 2009;LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2010) são denominados ilhas genômicas (IGs). Essas ilhas podem estar relacionadas com EGM, previamente conhecidos como: elementos integrativos e conjugativos (ICEs), transposons conjugativos, integrons e aos profágos. As IGs podem ser classificadas de acordo com adaptação dos genes que as compõem, podendo ser: de patogenicidade, simbiose, metabólica e resistência (JUHAS et al., 2009). Como pode-se constatar as IGs constituem importantes componentes do genoma na adaptação e evolução bacteriana (BUSH et al., 2018;LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2010). Essas regiões podem ser transferidas para outras linhagens não relacionadas por TGH por três processos distintos: transformação, conjugação ou transdução. A transformação é um mecanismo que permite que a bactéria incorpore DNA livre ao seu genoma. A conjugação ocorre através do contato direto entre uma célula doadora e uma célula receptora, e permite a transferência unidirecional de material genético através de um aparelho especializado que consiste em um canal citoplasmático. A transdução, por sua vez, é o processo de transferência de DNA via bacteriófagos (JUHAS et al., 2009). Os bacteriófagos tem mostrado um papel importante na TGH de fatores de virulência em *S. aureus* (DEGHORAIN; MELDEREN, VAN, 2012).

Atualmente diversas ferramentas computacionais têm sido desenvolvidas para identificar e analisar IGs. Essas ferramenta realizam a previsão das IGs através da análise de alguns caracteres, como por exemplo: a identificação de diferenças no conteúdo G + C em comparação com o resto do genoma hospedeiro, a identificação de genes que codificam RNA transportadores (tRNA) e repetições diretas flanqueando as IG, assim como a identificação dos EGM (HACKER, J.; CARNIEL, 2001;LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2010). Atualmente temos o ISLANDVIEWER como uma das ferramentas com melhor avaliação para predição de IGs em genomas bacterianos, pois integra três diferentes métodos de predição (BERTELLI et al., 2017;FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2012;LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2010).

Considerando a importância das IGs e o papel dessas regiões em modular o tamanho e estruturar os genomas bacterianos, agregando um conjunto diversificado de genes que podem melhorar a aptidão das bactérias em determinadas circunstâncias, este trabalho, teve como principal objetivo de caracterizar e analisar a influência das IGs para a resistência em patógenos de *S. aureus* associados a infecções comunitárias (AC) e hospitalares (AH). A

análise das IGs nos diferentes isolados de *S. aureus* AC e AH podem revelar a contribuição dessas ilhas na aquisição de GRAs por TGH nos isolados resistentes, e as consequências que podem advir para saúde pública e ambiental.

2. METODOLOGIA

2.1 Construção do banco de dados

Foram incluídos neste trabalho um total de 81 genomas completos de *S. aureus* disponíveis no *ISLANDVIEWER4* (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/browse/>), selecionados no período de abril a maio de 2017. Para caracterização dos 81 genomas completos, foi utilizado o *GENBANK*, através do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os isolados bacterianos selecionados foram caracterizados quanto sua localização geográfica, origem da infecção (comunitária ou hospitalar) e de onde foram isolados (humanos, animais ou alimento).

A presença de IGs nos 81 genomas de *S. aureus* foram preditas pelo *ISLANDVIEWER4*. O programa computacional é gratuito e integra vários métodos distintos e complementares para identificação e visualização de IGs (LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2008), o que torna a ferramenta precisa e eficiente na predição das IGs (BERTELLI et al., 2017). A ferramenta integra os métodos de predição SIGI-HMM (WAACK et al., 2006) e IslandPath-DIMOB (HSIAO et al., 2003) que se baseiam na composição de sequências de nucleotídeos e no método IslandPick que baseia-se na comparação dos genomas (LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2008). O SIGI-HMM fundamenta-se na análise do códon de cada gene para identificação de genes exógenos, e ainda realiza vários testes através do método Hidden Markov Model (HMM) para identificação de possíveis IGs. Apesar de conter análises de IGs já identificadas, a ferramenta é muito sensível para a identificação de IGs em genomas bacterianos (WAACK et al., 2006). A ferramenta IslandPath-DIMOB busca identificar um conjunto de caracteres que são considerados assinaturas de identificação das IGs como: genes codificadores de tRNA, localização de elementos móveis e porcentagem de conteúdo C+G (HSIAO et al., 2003).

Como refino manual, selecionamos neste trabalho somente as ilhas com tamanho ≥ 9.5 Kb, critério estabelecido em estudo anterior (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2012). As sequências de nucleotídeos referentes às IGs ≥ 9.5 Kb foram baixadas e salvas em arquivos fasta para análises posteriores.

2.2 Predição de IGs relacionadas aos profagos

Para identificação de sequências de profagos dentro das IGs selecionadas neste trabalho, os 81 genomas de *S. aureus* foram submetidos a interface da web, através da ferramenta PHASTER, acessando o site, <http://phaster.ca/>. O programa identifica a presença de sequências de profagos dentro de genomas bacterianos (ARNDT et al., 2016). Foram analisadas as regiões que apresentaram a sobreposição com IGs identificadas pelo *ISLANDVIEWER*.

2.3 Identificação dos mecanismos e classes de antibióticos dos GRAs presentes nas IGs e nos genomas de diferentes linhagens de *S. aureus*.

Para identificação dos mecanismos e classes de antibióticos presentes nas IGs, foram utilizadas as sequências de nucleotídeos das IGs selecionadas, que foram exportadas em forma de arquivo fasta, e submetidas a interface da web, *Comprehensive Antibiotic Resistance Database(CARD)* (JIA et al., 2017), acessando o site, <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>. Para identificação dos mecanismos e classes de antibióticos presentes nos genomas completos dos isolados de *S. aureus* selecionados. Foi utilizada a ferramenta de Identificação de Genes de Resistência (RGI), disponível na plataforma CARD. Nesse processo foi utilizado como critério de seleção padrão, apenas os genes que apresentaram correspondências rigorosas ou perfeitas com as sequências do banco de dados.

Foram analisadas a inter-relação entre GRAs presentes em IGs de isolados AH (hospitalares) e AC (extra hospitalares), bem como o padrão qualitativo originado diferentes combinações e quantitativo proporção GRAs encontrados nos vários isolados de *S. aureus*, usando a versão Bioestat 5.0 (AYRES, MANUEL; AYRES JÚNIOR, MANUEL; AYRES, DANIEL LIMA; SANTOS, 2007).

2.4 Análises estatísticas e comparativas de IGs.

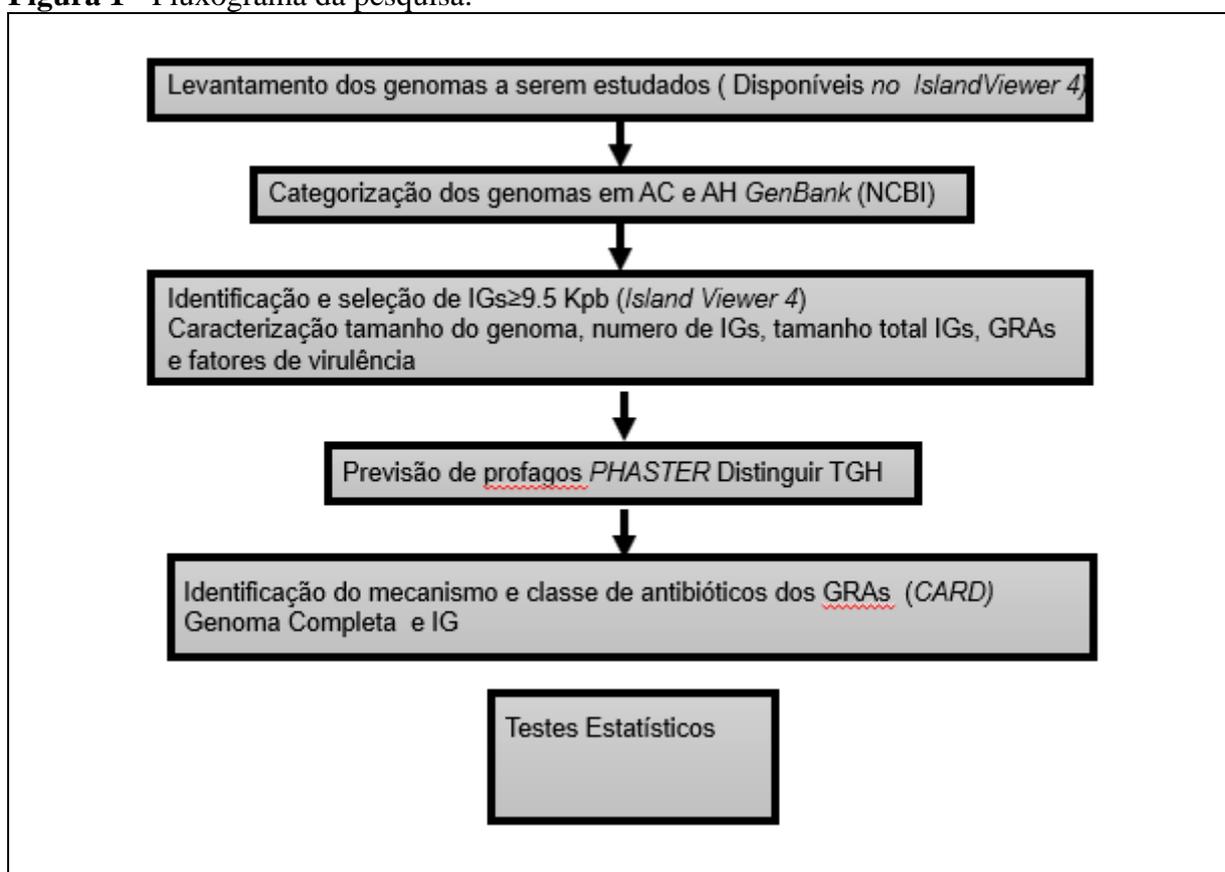
Foi realizada a análise de regressão linear como modelo estatístico para descrever a relação da variação do tamanho do genoma bacteriano em função da aquisição de IGs por TGH. Primeiramente foi verificada a relação linear entre as variáveis dependentes, através do diagrama de dispersão, utilizando o programa R (versão 3.5.1)(R CORE TEAM, 2018). O programa calculou a reta que melhor representa a relação entre as variáveis, tendo como teste do modelo, ANOVA, no qual admitiu-se o p-valor $< 0,05$ para aceitação do modelo. Além deste teste, outros dois testes foram utilizados, com objetivo de garantir o modelo selecionado e determinar o coeficiente de correlação: o TESTE KOLMOGOROV SMIRNOV (KS) (SHAPIRO; WILK; CHEN, 1968) e o TESTE BARTLETT (CONAGIN et al., 1993), que serviram respectivamente, para verificar os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade, admitindo o p-valor $> 0,05$.

A correlação não paramétrica foi utilizada para medir a relação entre as variáveis, utilizando o método de Spearman (RESTREPO BETANCUR; GONZÁLEZ L., 2007). Foi utilizado como critério: $0 > R < 0,5$ para correlação fraca, $0,5 > R < 0,8$ para correlação moderada e $0,8 > R < 1,0$ para uma correlação forte, ao nível de significância de 5%. A correlação foi utilizada para descrever a relação entre (i) a variação da soma dos tamanhos das IGs do genoma em função do número de IGs, (ii) a variação do tamanho do genoma de *S. aureus* em função da soma dos tamanhos das IGs do genoma (iii) a variação do tamanho do genoma de *S. aureus* em função do número de IGs.

O teste MANN WHITNEY foi utilizado, com o objetivo de identificar diferenças significativas entre o grupo dos isolados associados a infecções comunitárias (AC) e grupo de isolados associados a infecções hospitalares (AH)(CARMO, 2012), em três níveis: (i) a diferença na variação da razão entre o tamanho do genoma e a soma dos tamanhos das IGs, (ii) proporção de IGs não relacionadas aos fagos e por fim, (iii) o número de genes de resistência presentes nas IGs não relacionadas aos fagos. Para o teste admitimos a existência de diferenças significativas entre os grupos para p-valor $< 0,05$.

A figura 1 representa todas as etapas da metodologia utilizada neste trabalho.

Figura 1 - Fluxograma da pesquisa.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Características do universo de estudo dos genomas de *S. aureus*

Dos 81 genomas de *S. aureus* disponíveis no ISALANDVIEWER4, 18 isolados estão associados a infecções comunitárias e 63 associados a infecções hospitalares, todos isolados em humanos, conforme descrições obtidas no NCBI. Como se pode verificar na Tabela 1, linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são amplamente disseminadas tanto em ambientes hospitalares e extra hospitalares. No universo desse estudo elas representaram 79,4% dos isolados AC e 94,4% dos isolados AH. Foi possível verificar a sua ampla distribuição continental, como já retratados e descritos pela OMS em seu relatório divulgado em 2014 (www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/). A maior parte dos isolados foram da América, Ásia e Europa. A resistência a vancomicina foi observada em 20,00% dos isolados AH.

Tabela 1- Genomas analisados pelo *ISLANDVIEWER4*. Levando em consideração sua localização e sua resistência ou sensibilidade aos antibióticos, conforme a descrição no NCBI.

Continentes	Genomas		Total Geral
	AC	AH	
América do Norte	4	10	14
MRSA	4	5	9
MRSA e VRSA		2	2
MSSA		2	2
VRSA		1	1
América do Sul	1	20	21
MRSA	1	18	19
MRSA e VRSA		1	1
MSSA e VRSA		1	1
Ásia	10	11	21
MRSA	10	5	15
MRSA e VRSA		2	2
VRSA		4	4
Europa	2	19	21
MRSA	1	13	14
MRSA e VRSA		1	1
MRSA, penicilina e tetraciclina		1	1
MSSA	1	2	3
OSSA		1	1
VRSA		1	1
Oceania	1	3	4
ácido fusídico RSA		1	1
MRSA	1	2	3
Total Geral	18	63	81

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

AC-Infecção Comunitária, AH- Infecção Hospitalar, MRSA-S.aureu resistentes à Meticilina, VRSA-S.aureu resistente à Vancomicina, MSSA- S. aureu sensível à Meticilina e OSSA- S aureu sensível Oxacilina.

3.2 Identificação e visualização das IGs nos genomas de *S. aureus*

O *ISLANDVIEWER4* é considerado uma das melhores ferramentas para identificação e visualização de IGs (LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2008), pois sua interface integra vários métodos de identificação como: *IslandPick*, *SIGI-HMM* e *IslandPath-DIMOB*, o que torna a ferramenta bastante sensível na predição das IGs. Muitas IGs menores identificadas por um dos métodos estão inseridas em IGs maiores identificadas pelo outro método, conforme os dados mostrados (Tabela 2), onde se verifica a variação dos tamanhos das IGs e suas localizações nos genomas analisados.

Tabela 2 - Número de IGs identificados pelo *ISLANDVIEWER4*. Levando em consideração o tamanho das IGs.

	Nº Gen	Nº IGs	Nº IGs $\geq 9,5\text{Kb}$	Nº IGs $< 9,5\text{Kb}$	Nº IGs sobrepostas
AC	18	155	97	58	15
AH	63	725	419	306	113
Total	81	880	516	364	128

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

AC-Infecção Comunitária, AH- Infecção Hospitalar, Nº Gen- - número de genomas analisados. Nº IGs sobrepostas – número de IGs $< 9,5\text{Kb}$ sobreposta ao número de IGs $\geq 9,5\text{Kb}$

Levando em consideração que os tamanhos das IGs descritas em trabalhos anteriores variam entre 10kb a 200kb (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2012; JUHAS et al., 2009; LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2010), foram selecionado para análise neste trabalho um total de 516 IG $\geq 9,5\text{Kb}$ cujos tamanhos variaram entre 9,8 Kb a 130,0Kb.

Tabela 3 - Genes de: virulência, patogenicidade e resistência. identificados nos genomas estudados, e presentes nas IGs $\geq 9,5\text{Kb}$ identificados pelo *ISLANDVIEWER4*.

	Nº Gen	FV G	FR G	IGs $\geq 9,5\text{Kb}$	FV IGs	FR IGs
AC	18	1475	482	97	42	26
AH	63	4984	1863	419	149	238
Total	81	6459	2345	516	191	264

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

AC-Infecção Comunitária, AH- Infecção Hospitalar, Nº Gen- - número de genomas analisados; FV G – número de genes de virulência identificados nos genomas completos; FR G – número de genes de resistência identificados nos genomas completos; ; FV IGs – número de genes de virulência identificados nas IGs $\geq 9,5\text{Kb}$; FR G – número de genes resistência identificados nas IGs $\geq 9,5\text{Kb}$.

Analisando as IGs $\geq 9,5\text{Kb}$ (Tabela 3) foi possível aferir que essas ilhas abrigavam 3,0% de todos os genes associados a virulência identificados nos genomas analisados, distribuídos em 50,0% AC e 50,0% AH. No que concerne aos genes associados a resistência, foi possível aferir que as IGs $\geq 9,5\text{Kb}$ abrigavam 11,3% de todos GRAs, nos quais, 27,6% destes genes estavam relacionados às infecções comunitárias e 72,4% relacionados às infecções hospitalares. Os genes de virulência presentes nas IGs estão bem distribuídos nas linhagens hospitalares e extra hospitalares. Esses genes podem garantir vantagens adaptativas para as bactérias (HACKER, Jörg; CARNIEL, 2001), pois garantem sua sobrevivência e capacidade de infecção em humanos e animais. O resultado sugere ainda, que a aquisição de GRAs pode ser responsável por gerar maiores vantagens adaptativas dessas bactérias nos ambientes hospitalares, onde a pressão seletiva é determinada pelo uso de antibióticos (COUCE; BLÁZQUEZ, 2009; GILLINGS; STOKES, 2012)

3.3 Importância da quantidade de IGs nos genomas de *S. aureus*

Foram detectadas 516 IGs $\geq 9,5\text{Kb}$, que abrangiam um total de 12,02 Mb. O tamanho total das IGs encontradas por genoma, em isolados associados às infecções comunitárias variou entre 43,7 à 188,4Kb e correspondiam a 1,6% a 6,6% da fração dos genomas e em relação aos genomas associados as infecções hospitalares entre 40,0 à 403,5Kb e correspondiam a 1,5% a 13,4% da fração dos genomas. Como esperado, o tamanho total das IGs por genoma foi positivamente e fortemente associado à quantidade de IGs por genoma ($R = 0,84$, $p < 0,001$) (Figura 2 a). Por sua vez, a correlação passou a ser positiva e moderada para

associação do tamanho do genoma em função do tamanho total das IGs por genoma ($R = 0,73$, $p < 0,001$) (Figura 2 b), assim como, associação do tamanho do genoma em função do número de IGs ($R = 0,61$, $p < 0,001$) (Figura 2 c). A alta variabilidade intraespecífica do tamanho das IGs e a correlação aqui mostrada, já foi evidenciado no estudo realizado por Fernández-Gomez et al, ao analisar o padrão e arquitetura de ilhas genômicas em bactérias marinhas. Vale apenas ressaltar que variabilidade no número e no tamanho das ilhas podem ter implicações para evolução e diversidade de *S. aureus* (HACKER, J.; CARNIEL, 2001), pois aquisição de IGs pode determinar a disseminação de genes de resistência a antibióticos, virulência e formação de diferentes vias catabólicas, que codificam características adaptativas que podem ser benéficas para bactérias sob certas condições de crescimento ou ambientais (JUHAS et al., 2009).

Mediante o fato dos isolados AC e AH sofrerem diferentes pressões seletivas, foi aplicado o *Teste Mann-Whitney*, para avaliar as variáveis independentes (número de IGs, tamanho total das IGs por genoma e para razão entre o tamanho das IGs e o tamanho do genoma) com objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre as duas categorias (AC e AH).

É possível constatar que os genomas isolados AH, apresentam as maiores variações no tamanho total das IGs, entre 40Kb a 403,5Kb (mediana 148,2Kb) enquanto os isolados AC, 43,7Kb a 188,4Kb (mediana 119,5Kb) (Figura 3 a). Maior variação no tamanho do genoma em ambientes hospitalares pode ser atribuída a aquisição de GRAs determinando desta forma vantagens adaptativas sobre as pressões seletiva determinada pelos antibióticos.

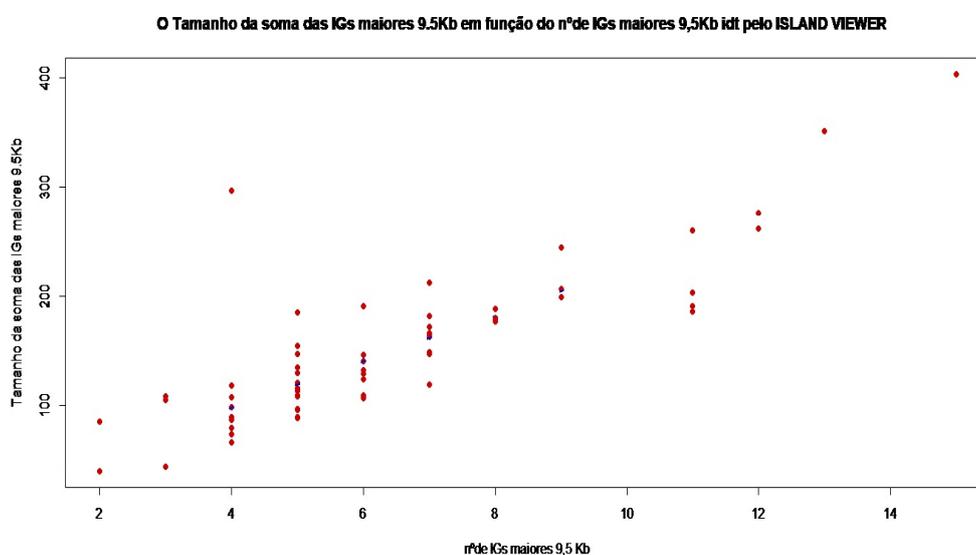
Também foi constatado a variação do número de IGs por genoma (Figura 3b), variando entre 2 a 8 IGs por genoma (mediana 5) nos isolados AC e entre 2 a 15 (mediana 7) nos isolados AH.

A fração do genoma representada por IGs (Figura 3c) variou de 1,6% e 6,6% (mediana 4,2%) entre os isolados AC analisados e entre 1,5% a 13,2% (mediana 5,1%) entre isolados AH. Os resultados sugerem que os genomas, em ambos os ambientes extra hospitalares e hospitalares, sofrem influência do meio, seja na aquisição de IGs, seja na seleção de vantagens adaptativas adquiridas por estas ilhas. As maiores variações observadas nos isolados AH, sugerem que a pressão seletiva exercida pelo antibiótico determina diminuição da evidência do custo adaptativos. A aquisição de uma resistência a um determinado antibiótico, seja por mutação ou pela aquisição de genes exógenos, pode ser favorável para a população bacteriana quando permite sua sobrevivência na presença de antibiótico. Contudo quando a pressão seletiva determinada pelo antibiótico é interrompida, normalmente a aquisição de genes pode passar a ter um custo para a bactéria manter a replicação dos mesmos, o que reduz a competitividade entre bactérias resistentes e sensíveis (KEMPF; ZEITOUNI, 2012).

As variáveis independentes (o número de IGs, tamanho total das IGs por genoma e fração do genoma representada por IGs) apresentaram grandes variações nos isolados associados AH. O *Teste Mann-Whitney* não permitiu excluir da hipótese de igualdade das medianas, P-valores $> 0,05$, desta forma, não sendo possível afirmar a existência de uma diferença significativa entre os grupos AC e AH. Ou seja, o aumento do tamanho do genoma promovido pelas IGs, ocorre na mesma proporção em ambos os ambientes hospitalares e extra-hospitalares. O resultado é preocupante, uma vez que sugere que as pressões seletivas que equilibram o custo adaptativo das IGs em ambientes hospitalares passam a ser semelhantes às que ocorrem em ambientes extra hospitalares, possivelmente sendo determinada pela poluição ou uso indiscriminado de agentes antimicrobianos nos ambientes extra hospitalares (GILLINGS; STOKES, 2012)

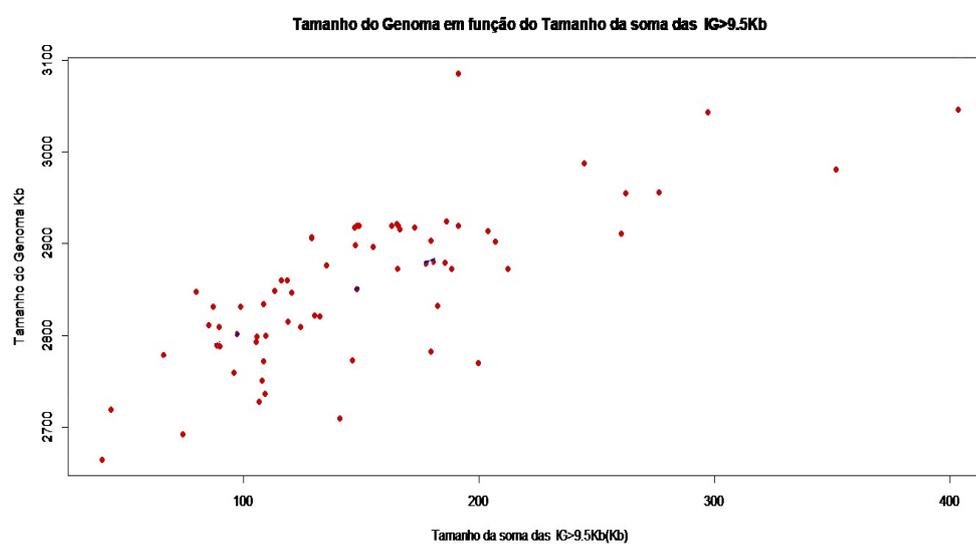
Figura 2 - Padrões das IGs identificadas nos genomas de *S. aureus* analisados no estudo.

A)



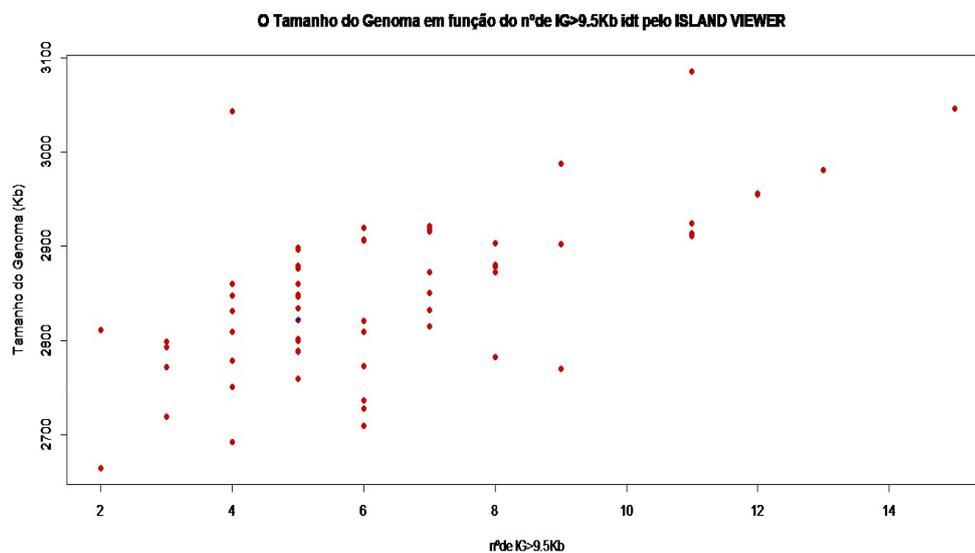
ANOVA (p-valor)	Teste Kolmogorov	Teste Bartlett	Correlação (R) método Spearman
p<0,001	p<0,05	p<0,001	0,84

B)



ANOVA (p-valor)	Teste Kolmogorov	Teste Bartlett	Correlação (R) método Spearman
p<0,001	p>0,05	p<0,001	0,73

C)



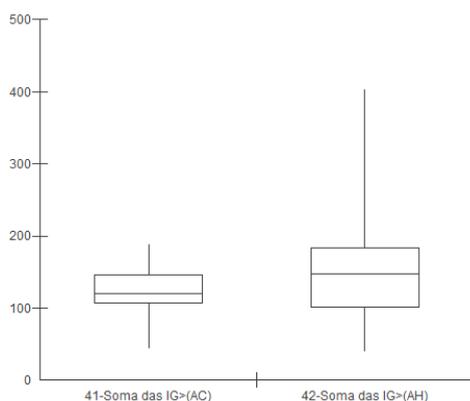
ANOVA (p-valor)	Teste Kolmogorov (KS)	Teste Bartlett	Correlação (R) método Spearman
p<0,001	p>0,05	p<0,001	0,61

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

A) Relação entre o número de IGs $\geq 9,5$ Kb do genoma bacteriano com tamanho total das IGs. B) Relação entre genoma bacteriano e tamanho total das IGs $\geq 9,5$ Kb e C) Relação entre o tamanho do genoma e o número de IGs $\geq 9,5$ Kb.

Figura 3– Diferença entre os isolados de *S. aureus* de acordo com a associação das infecções: A).

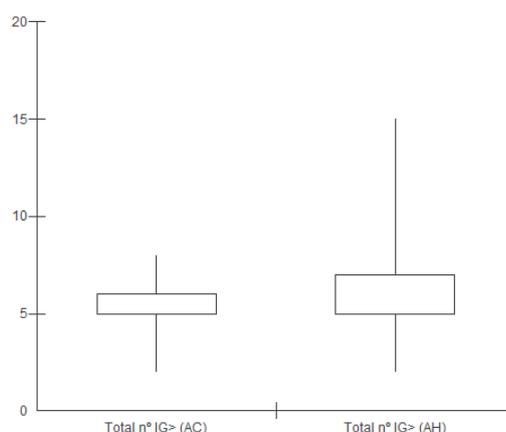
Tamanho total das IGs por genoma



Teste Mann-Whitney	Tamanho da amostra - 18 - (AC)	Tamanho da amostra - 63 - (AH)
Mediana	119,50	148,20
P-valor (bilateral)	0,09	

B)

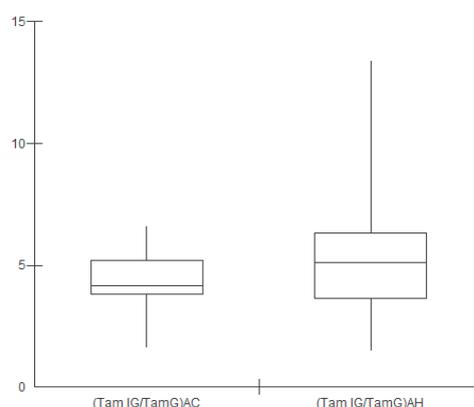
Número de IGs por genoma



Teste Mann-Whitney	Tamanho da amostra - 18 - (AC)	Tamanho da amostra - 63 - (AH)
Mediana	5	7
P-valor (bilateral)	0,08	

c)

Razão entre o Tamanho do Genoma e o Tamanho da IG



Teste Mann-Whitney	Tamanho da amostra - 18 - (AC)	Tamanho da amostra - 63 - (AH)
Mediana	4,15	5,10
P-valor (bilateral)	0,1	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Os gráficos mostram: a mediana (linha horizontal), o quartil superior e inferior (retângulo) e os valores máximo e mínimo pela (linha contínua) A) Tamanho total das IGs por genoma B) número de IGs por genoma e C) proporção do genoma pelo tamanho das IGs.

3.4 Identificação e visualização das sequências de bacteriófagos nas IGs

Para a identificação das sequências de profagos nos genomas estudados submetemos os 81 genomas a interface da web PHASTER. Na Tabela 4 constata-se a presença de profagos dentro de IGs.

Tabela 4 – Número de IGs identificadas pelo *ISLANDVIEWER4* e de regiões relacionadas a profagos identificadas pelo *PHASTER*.

	Nº Gen	Nº IGs ≥9,5Kb	Nº Reg Idt PHASTER	Nº Reg. PHASTER sobreposição IGs ≥9,5Kb
AC	18	97	59	40
AH	63	419	240	153
Total	81	516	299	193

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

AC-isolado associado a infecção comunitária, AH-isolado associado a infecção hospitalar, Nº Gen - número de genomas analisados; Nº IGs ≥9,5Kb – número de IGs ≥9,5Kb; Nº Reg Idt PHASTER – número de regiões identificadas como profagos ; e Nº Reg. PHASTER sobreposição IGs ≥9,5Kb - número de regiões identificadas como profagos sobrepostos as IGs ≥9,5Kb

Foram identificadas 299 regiões relacionadas as frações de profagos nos genomas analisados, destas 193 regiões sobrepunham as IGs ≥9,5Kb identificadas pelo *ISLANDVIEWER4*, o que corresponde a 37,4% do total de IGs identificadas.

Tabela 5 – Quantidade de genes de virulência e resistência, identificados nos genomas estudados e presentes nas IGs identificados pelo *ISLANDVIEWER4* e pelo *PHASTER*.

	Nº Gen	FV IGs	FR IGs	FV Reg/ IGs	FR Reg/ IGs
AC	18	42	26	36	0
AH	63	149	238	139	21
Total	81	191	264	175	21

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

AC- associado a infecção comunitária, AH- associado a infecção hospitalar, Nº Gen - número de genomas analisados; FV IGs – número de genes de virulência identificados nas IGs ≥9,5Kb; FR IGs – número de genes de resistência identificados nas IGs ≥9,5Kb; FV Reg/ IGs – número de genes de virulência identificados nas IGs ≥9,5Kb sobrepostas as Regiões identificadas pelo PHASTER e FR Reg/ IGs – número de genes resistência identificados nas IGs ≥9,5Kb sobrepostas as Regiões identificadas pelo PHASTER

Como já visto, 37,4% das IGs foram relacionadas aos profagos, estas por sua vez, abrigavam 91,6% dos genes associados a virulência identificados nas IGs, bem diferente do que é observado na transferência dos genes associados a resistência, onde somente 8,0% dos GRAs, encontraram-se alocados nas regiões identificadas pelo *PHASTER*. O resultado confirma, que os GRAs raramente são encontrados em bacteriófagos, porém esses podem cooptar GRAs, move-los por TGH (transdução) e integrá-los nos cromossomos dos hospedeiros (GILLINGS; STOKES, 2012). O resultado também corrobora, a importância dos bacteriófagos na TGH para os genes de virulência, tema já discutidos em outro trabalho (ILCZYSZYN; KOSECKA-STROJEK; MIE, 2018; XIA; WOLZ, 2014)

3.5 Aquisição de genes de resistência aos antibióticos por IGs não relacionadas aos bacteriófagos em genomas de *S. aureus*

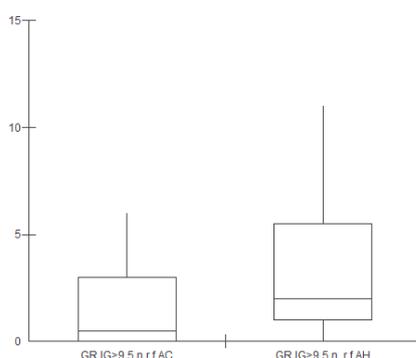
A presença dos genes de resistência garante vantagens adaptativas a bactéria, sob condições de pressão seletiva exercida pelos antibióticos. Foram analisados os GRAs alocados nas IGs que não foram relacionadas aos bacteriófagos, o objetivo é evidenciar a contribuição da TGH promovida pela conjugação e/ou transformação nos isolados AC e AH.

Comparando a quantidade de genes de resistência identificados em IGs não associadas aos fagos nos isolados AH e AC, foi observado que as IGs abrigam um maior número de

GRAs em linhagens isoladas AH. A diferença entre os isolados AH e AC é estatisticamente significativa, apresentando variação, entre 0 e 11 (mediana 2,0) e entre 0 e 6 (mediana 0,5) respectivamente (Figura 4). Vale a pena ressaltar que o teste também foi realizado incluindo as outras IGs, onde apresentaram significância (P-valor (bilateral)= 0,049). Esse resultado mostra a importância das IGs quanto a TGH dos GRAs. Estudos anteriores mostraram que as IGs encontradas em *S. aureus* podem alterar seu potencial de resistência, contribuindo para a sobrevivência e persistência dessas bactérias nos ambientes hospitalares, aonde é elevada a pressão seletiva exercida pelos antibióticos (LI, H. et al., 2013; MCCLURE et al., 2018).

Figura 4 - Diferença entre os isolados AC e AH quanto ao número de genes de resistências presentes nas IGs $\geq 9,5$ Kb não relacionadas aos fagos.

O número genes de resistência em IGs não relacionadas ao Fago



Teste Mann-Whitney	Tamanho da amostra - 18 - (AC)	Tamanho da amostra - 63 - (AH)
Mediana	0,5	2,0
P-valor (bilateral)	0,003	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

O gráfico mostra a mediana (linha horizontal), o quartil superior e inferior (retângulo) e os valores máximo e mínimo pela (linha contínua).

3.6 Análise dos Genes de resistência presentes em *S. aureus*

Foi realizada a análise dos GRAs adquiridos por TGH via IGs, assim como a identificação dos GRAs encontrados no genoma das linhagens de *S. aureus* fora das IGs (Apêndice Quadro 2). Também foram identificadas as classes de medicamentos, o qual os genes analisados conferem resistência, assim como os mecanismos de resistência associados aos respectivos genes. Objetivo é evidenciar plasticidade determinada pela IGs na aquisição de novos mecanismos e classes de antibióticos.

Nessa análise foram identificados um total de 232 GRAs presentes em IGs em todos os genomas selecionados. Desses genes, 20 GRAs foram identificados dentro das IGs das linhagens AC e 212 GRAs dentro das IGs associadas as linhagens AH (Tabela 6).

Como é possível observar a resistência adquirida por TGH pelas IGs é bem diversificada (Tabela 6). Em ambos os grupos (AC e AH), dentre os GRAs, os mais comuns são aqueles que apresentam resistência aos antibióticos da classe MLE (macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina), aminoglicosídeos, β -lactâmicos, tetraciclina e estreptomicina e dentre os genes menos comuns temos a resistência ao ácido fusídico e à diaminopirimidina.

Tabela 6 – Genes de resistências encontrados nas IGs e os respectivos mecanismos de resistências e a classe de medicamentos para os quais os genes causam a resistência.

Mecanismo de Resistência	Genes de Resistência	AC	AH	Total	Antibiótico
Alteração do alvo	<i>Erm</i>	4	73	77	MLE
Inativação do antibiótico	<i>Fusc</i>	2	0	2	Ácido fusídico
	<i>ant (6)</i>	1	3	4	
	<i>ant (9)</i>	3	74	77	
	<i>aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia</i>	1	5	6	
	<i>aph (3')</i>	2	6	8	Estreptotricina
	<i>sat4</i>	1	5	6	
	<i>blaZ</i>	3	8	11	
Proteção contra alvo do antibiótico	<i>Tet (W/N/W)</i>	2	12	14	Tetraciclina
Alteração no sítio do alvo antibiótico	<i>DfrG e DfrC</i>	0	20	20	Diaminopirimidina
	<i>PBP2</i>	1	6	7	β -lactâmicos
		20	212	232	

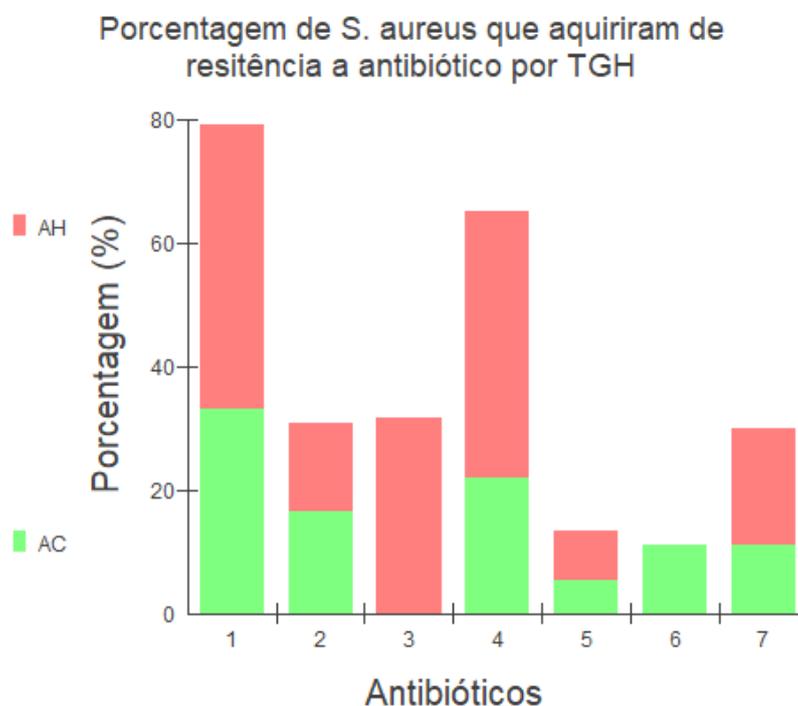
Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

MLE-antibiótico Macrólitos, Lincosamida e Estreptogramina B; β -lactâmico- Penicilina, β -lactâmico – meticilina, penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos e cefamicina.

A Figura 5 mostra a proporção da aquisição de GRAs, presentes nas IGs, nos diferentes isolados AC e AH. Os genes de resistência ao ácido fusídico só foram identificados nas linhagens AC e genes de resistência as diaminopirimidina identificados apenas nas linhagens AH, ressaltando que esses genes foram identificados em baixa frequência nas IGs. Todos os outros genes de resistência identificados são encontrados em ambas as linhagens AC e AH, destacando a maior frequência para os GRAs aos aminoglicosídeos e da classe MLE. Os perfis de genes de resistência encontrados nas IGs analisadas não mostram uma distinção clara das linhagens AC e AH. Esses resultados podem ser um reflexo da introdução no ambiente hospitalar das linhagens AC e isso parece ter influenciado a identificação e distinção das doenças comunitárias das hospitalares (NAIMI et al., 2003). No passado, os testes de susceptibilidade a antibióticos eram utilizados associados a outras análises para determinar se a origem da infecção era comunitária ou hospitalar. Atualmente, o trânsito migratório das linhagens AC para dentro dos hospitais e linhagens AH para comunidade, essa discriminação entre infecções AC e AH parece não mais servir como um critério importante de identificação (MCCARTHY et al., 2010).

O quadro 1 mostra a distribuição dos GRAs presentes em IGs, os quadrados azuis significam ausência de GRAs e os vermelhos a presença do GRAs, a numeração de 1 à 7, representam as resistências aos antibióticos, conforme a legenda. Foi constatado a presença de GRAs em IGs em 50 % das linhagens de *S. aureus* AC e 82,54% AH. Nas linhagens AH foi observado uma maior diversidade de genes de resistência por linhagem, variando a resistência entre 1 à 5 antibióticos diferentes, enquanto as linhagem AC apresentaram resistência entre 1 a 3 antibióticos (Quadro 1). Esses resultados mostram e reafirmam a importância das IGs na aquisição de genes de resistência por TGH (Figura 5 e Quadro1), principalmente em linhagens de *S. aureus* multiresistentes.

Figura 5 – Porcentagem de *S. aureus* que adquiriram GRAs identificados nas, nos respectivos isolados, e as classes de antibióticos o qual os genes conferem resistência



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. 1-Antibiótico Aminoglicosídico, 2- Antibiótico β -Lactâmicos 3- Antibiótico Diaminopirimidina, 4- Antibióticos Lincosamida, Macrolídeo e Estreptogramina (MLE), 5-Antibiótico Estreptomomicina, 6-Ácido Fusídico, 7-Antibiótico Tetraciclina.

Nos isolados associados as infecções hospitalares podemos perceber uma diversidade de combinações de diferentes GRAs, o que permitiu concluir, que o uso do antibiótico representa provavelmente a força que impulsiona o processo adaptativo dos isolados AH, uma vez, que a seleção privilegia as bactérias que adquiriram GRAs. Observando a figura 5 e quadro 1, foi verificado que a pressão seletiva promovida pelos antibióticos também ocorre sobre isolados comunitários promovendo a seleção de linhagens resistentes aos antibióticos fora dos ambientes hospitalares. No entanto é questionável se esta seleção está sendo intensificada pela disseminação de antibióticos nos ambientes extra hospitalares ou se a seleção ocorre nos ambientes hospitalares e são disseminados por contaminação para outros ambientes externos ao hospital (HOCQUET; MULLER; BERTRAND, 2016).

Posteriormente os 81 genomas foram submetidos a interface CARD com objetivo de identificar a diversidade de genes resistência presentes fora das IGs e comparar com os genes identificados dentro das IGs (Tabela 7). O programa identificou 212 GRAs associados aos genomas isolados AC e 889 GRAs associados aos genomas isolados AH, onde respectivamente 9,4% e 23,8% dos GRAs foram identificados dentro de IGs pelo ISLANDVIEWER.

Verificando os GRAs nas linhagens de *S. aureus* AC e AH (tabela7), foi contatado um conjunto de GRAs identificados fora das IGs. Os GRAs associados a resistência a daptomicina, mupirocina, cloranfenicol e rifamicina, foram identificados em baixa frequência em linhagens AH e não foram identificados em linhagens AC. Desta análise foi possível ainda verificar, que os genes de resistência a tetraciclina estavam presentes em 100% das linhagens analisadas, seguido da metilina em 61,11% das linhagens AC e em 88,89% das AH,

fosfomicina 61,11% das AC e 52,38% das AH e fluoroquinolona 27,78% das AC e 74,60 das AH. A alta frequência dos GRAs reflete a importância desses genes para prevalência nos ambientes

3.6.1 Análise da resistência ao ácido fusídico presentes em *S. aureus*

Comparando as informações das IGs identificadas pelo *ISLANDVIEWER4* e os genes de resistência identificados pelo *CARD*, foi possível constatar a aquisição dos GRAs *fusC* por TGH, em isolados AC (Quadro 1), um isolado na Europa, (MSSA476) e outro isolado na Ásia (FORC_026). O gene *fusC* também foi identificado fora das IGs, em um isolado AH, na Oceania (NZAK3), assim como genes *fusA* mutado por substituição de aminoácido Leu461→Lis em um isolado AC na Ásia, (FORC_27) (Apêndice - Quadro2). Ambos os genes conferem resistência ao ácido fusídico, por mecanismos distintos. O gene *fusC* codifica uma proteína que inativa o antibiótico e o gene *fusA* confere resistência por alteração do sítio de ligação (EDSLEV et al., 2018; LANNERGÅRD; NORSTRÖM; HUGHES, 2009; O'NEILL et al., 2007).

O ácido fusídico inibe a síntese proteica bacteriana por bloqueio do fator G de alongação (EF-G), impedindo assim sua ligação com os ribossomos e GTP (guanosina trifosfato) e, dessa forma, interrompendo o fornecimento de energia para o processo de síntese. O gene *fusA* mutado, altera o sítio de ligação ao EF-G, impedindo assim a ligação do antibiótico, permitindo a síntese proteica bacteriana, na presença do antibiótico (BESIER et al., 2003) (CASTANHEIRA et al., 2010). O gene *fusA* mutado (Leu461→Lis) foi descrito como altamente resistente ao ácido fusídico (BESIER et al., 2003).

O resultado mostra que a aquisição do GRA *fusC* ocorreu por TGH. O gene *fusA* mutado foi identificado em uma linhagem AC desse trabalho. Contudo, o gene *fusA* mutado foi anteriormente descrito somente em isolados AH (NAGAEV et al., 2001). Nagaev et al (2001) analisaram a estabilidade de diferentes mutações pontuais do gene *fusA* e sugeriram que a estabilidade de algumas mutações clínicas, estão relacionadas as mutações compensatórias (NAGAEV et al., 2001).

3.6.2 Análise da resistência ao diaminopirimidina presentes em *S. aureus*

A aquisição dos genes de resistência *DfrG* e *DfrC* por TGH (Quadro 1), conferem resistência aos antibióticos diaminopirimidina através da modificação da enzima diidrofolato redutase, em isolados AH. O gene *DfrC* foi identificado em apenas uma das linhagens (JKD6008), e o gene *DfrG* foi identificado em 19 linhagens, duas isoladas na Ásia (Z172 e V521), uma na Europa (TW20) e 16 isoladas na América do Sul, sendo uma delas isolada no Brasil, (HOU1444-VR) e as demais no Suriname, (USA300-SUR9, SUR10, SUR11, SUR12, SUR13, SUR14, SUR15, SUR16, SUR17, SUR19, SUR20, SUR21, SUR22, SUR23, SUR24)). Dos isolados do Suriname, 14 foram identificados pelo PHASTER e apresentavam correlação com o Fago *Bacillus G*. Esse resultado sugere que o Fago *Bacillus G* possa ser o responsável pela mobilização do gene *DfrG* entre os isolados do Suriname. Os genes *DfrG* até o momento não possuem sua origem esclarecida conforme descrito no trabalho (NURJADI et al., 2014; REEVE et al., 2016)

Quadro 1 Mosaico das Classes de antibióticos identificadas nas IGs nos genomas de *S aureus*

Continentes	Nº idt NCBI	cepa	Origem	1	2	3	4	5	6	7	
América do Norte	NC_017342.1	TCH60									
América do Norte	NZ_CP014791.1	MCRF184									
América do Norte	NZ_CP007176.1	EUA300-ISMMS1									
América do Norte	NZ_CP009361.1	ATCC 25923									
América do Norte	NZ_CP013231.1	UTSW MRSA 55									
América do Norte	NZ_CP019590.1	C2406									
América do Sul	NZ_CP012593.1	HOU1444-VR									
América do Sul	NZ_CP007657.1	V2200									
Europa	NC_016912.1	VC40									
Europa	NC_002951.2	COL									
Europa	NZ_CP007690.1	UA-S391_EUA300									
Oceania	NZ_LT615218.1	AUS0325									
América do Sul	NZ_CP014392.1	USA300-SUR9					3				
América do Sul	NZ_CP014397.1	USA300-SUR10					3				
América do Sul	NZ_CP014402.1	USA300-SUR11					3				
América do Sul	NZ_CP014407.1	USA300-SUR12					3				
América do Sul	NZ_CP014409.1	USA300-SUR13					3				
América do Sul	NZ_CP014412.1	USA300-SUR14					3				
América do Sul	NZ_CP014415.1	USA300-SUR15					3				
América do Sul	NZ_CP014420.1	USA300-SUR16					3				
América do Sul	NZ_CP014423.1	USA300-SUR17					3				
América do Sul	NZ_CP014429.1	USA300-SUR19					3				
América do Sul	NZ_CP014432.1	USA300-SUR20					3				
América do Sul	NZ_CP014435.1	USA300-SUR21					3				
América do Sul	NZ_CP014438.1	USA300-SUR22				3					
América do Sul	NZ_CP014441.1	USA300-SUR23				3					
América do Sul	NZ_CP014444.1	USA300-SUR24				3					
Europa	NC_022222.1	6850			2						
Oceania	NZ_LT009690.1	NZAK3			2						
América do Norte	NZ_AP017320.1	MI	HA	1			4				
América do Norte	NC_009487.1	JH9		1			4				
América do Norte	NC_009632.1	JH1		1			4				
América do Norte	NZ_CP007499.1	2395 EUA500			2						7
América do Sul	NZ_CP011147.1	FCFHV36		1			4				
América do Sul	NZ_CP009681.1	Gv69		1	2		4	5			
Ásia	NC_002745.2	N315		1			4				
Ásia	NZ_CP011685.1	ZJ5499		1			4				
Ásia	NC_017347.1	T0131		1							7
Ásia	NZ_AP014652.1	TMUS2126			2						
Ásia	NZ_AP014653.1	TMUS2134			2						
Europa	NC_017340.1	ST225		1			4				
Europa	NC_002952.2	MRSA252		1			4				
Europa	NC_017763.1	HO 5096 0412			2						
Europa	NC_020529.1	ST228/10388		1			4				
Europa	NC_020564.1	ST228/10497		1			4				
Europa	NC_020532.1	ST228/15532		1			4				
Europa	NC_020533.1	ST228/16035		1			4				
Europa	NC_020566.1	ST228/16125		1			4				
Europa	NC_020536.1	ST228/18341		1			4				
Europa	NC_020537.1	ST228/18412		1			4				
Europa	NC_020568.1	ST228/18583		1			4				
Europa	NZ_CP010402.1	GR2		1				5			
Europa	NC_017333.1	ST398			2						7
Europa	NZ_CP020020.1	ATCC 6538	1			4					
Ásia	NC_002758.2	Mu50	1			4				7	
Ásia	NC_009782.1	Mu3	1			4				7	
Ásia	NZ_CP013953.1	NCCP14558	1			4				7	
Ásia	NZ_CP013955.1	NCCP14562	1			4				7	
Europa	NC_017331.1	TW20	1			3	4			7	
Oceania	NC_017341.1	JKD6008	1			3	4			7	
América do Sul	NC_021670.1	Bmb9393	1	2			4	5		7	
Ásia	NC_022604.1	Z172	1			3	4	5		7	
Ásia	NZ_CP013957.1	V521	1			3	4	5		7	

América do Norte	NC_003923.1	MW2	CA								
América do Norte	NC_007793.1	EU300_FPR3757									
América do Sul	NZ_CP007670.1	M121									
Ásia	NZ_CP009828.1	MS4									
Ásia	NC_016928.1	M013									
Ásia	NC_022226.1	CN1									
Ásia	NC_022442.1	SA957									
Ásia	NC_022443.1	SA40									
Oceania	NC_017338.1	JKD6159									
Ásia	NZ_CP019563.1	SR434			1						
Europa	NC_002953.3	MSSA476								6	
América do Norte	NC_021554.1	CA-347			1			4			
Ásia	NZ_CP006630.1	SA268			1			4			
Ásia	NZ_CP013132.1	FORC_026							5	6	
Ásia	NZ_CP010526.1	DAR4145			1	2					
América do Norte	NC_018608.1	08BA02176				2		4			7
Ásia	NZ_CP012692.1	FORC_027			1			4			7
Europa	NC_017351.1	11819-97			1	2			5		

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. quadro 1 mostra a distribuição dos GRAs presentes em IGs, os quadrados azuis significam ausência de GRAs e os vermelhos a presença do GRAs, a numeração de 1 à 7, representam as resistências aos antibióticos: 1Aminoglicosídico, 2 β -lactâmicos, 3 Diaminopirimidina, 4L M E, 5Estreptomicina, 6Acido Fusídico e 7Tetraciclina

3.6.3 Análise dos genes de resistências aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLE) presentes em *S. aureus*

Entre as resistências mais comuns, temos a resistência aos antibióticos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLE), apesar destes antimicrobianos serem quimicamente distintos, eles têm efeito inibitório similar na síntese proteica bacteriana (SADERI; EMADI; OWLIA, 2011), Os genes *ermA* e *ermB* (*erythromycin ribosome methylase*) são um dos responsáveis pela resistência aos antibióticos MLE. Foram identificados em 22,2% dos isolados AC e 43,6% dos isolados AH, os genes em sua maior parte identificados em IGs (Quadro 1). Os genes codificam a enzima adenina-N6-metiltransferase, esta por sua vez, modifica o sítio de ação do antibiótico, na porção 23s RNAr do ribossomo bacteriano (MATSUOKA et al., 2002). A modificação pela metilase reduz a ligação dos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B na subunidade 50S ribossomal, resultando na resistência MLE(SADERI; EMADI; OWLIA, 2011;SZCZUKA et al., 2016). Os genes foram identificados em isolados da América, Europa, Ásia e Oceania (Quadro 1).

3.6.4 Análise da resistência aos aminoglicosídeos e estreptotricinas presentes em *S. aureus*

Analisando a resistência aos aminoglicosídeos (Tabela 7) foram observados 5 genes, sendo 4 desses genes: *ant* (6), *ant* (9), *aac* (6') - *Ie-aph* (2'') - *Ia*, *aph* (3') identificados dentro de IGs e o genes *ant* (4') fora da IGs. O resultado mostra a diversidade de genes adquiridos por TGH relacionados a resistência aos aminoglicosídeos. Sabe-se que a resistência a esses antibióticos se dá por modificação enzimática (N-acetiltransferases, O-Adeniltransferases e O-Fosfotransferases) (KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000;SHAW et al., 1993). Dentre os genes adquiridos temos o gene, *aac* (6') - *Ie-aph* (2'') - *Ia*, que codifica uma enzima bifuncional, AAC (6') - APH (2''), que confere resistência a um amplo espectro de aminoglicosídeos, por acetilação e fosforilação do antibiótico (BEHNOOD et al., 2013). Ainda dentro dos aminoglicosídeos adquiridos, temos dois genes: *ant* (6) e *ant* (9), que codificam enzimas nucleotidiltransferases, respectivamente (ANT (6) e ANT (9)) e o gene *aph* (3') que codifica a fosfotransferase APH (3').

Tabela 7 - Contagem dos genes de resistências e as respectivas classe de medicamentos resistentes identificado pelo *CARD* sobre 81 genomas.

Mecanismo da Resistência	Genes de Resistência	AC		AH		Antibióticos
		GC	IG	GC	IG	
Alteração Alvo Antibiótico	<i>fus A</i> (L461K)	1				Ácido Fusídico
	<i>ErmA</i>	7	3	73	73	MLE
	<i>ErmB</i>	1	1			
	<i>parC</i> (S80Y, E84G)			3		Fluoroquinolona
	<i>parC</i> (S80Y)	3		19		
	<i>parC</i> (S80F)	2		25		
	<i>parE</i> (D434N)			1		
	<i>parE</i> (P587S)	2		1		
	<i>mprF</i> (T345I)			1		
	<i>walK</i> (R263C)			1		
	<i>glpT</i> (A100V)	8		2		Fosfomicina
	<i>glpT</i> (A100V, F3I)	1		1		
	<i>glpT</i> (V213I, A100V)			3		
	<i>murA</i> (E291D, D278E)	1		4		
	<i>murA</i> (E291D, T396N)	8		2		
	<i>murA</i> (G257D)	2		27		
	<i>ileS</i> (V588F)			2		
	<i>gyrA</i> - (S85P, S84L)			3		Nibomicina e Fluoroquinolona
	<i>gyrA</i> - (E88K, S84L)			1		
	<i>gyrA</i> - (S84L)	5		43		
Efluxo de Antibióticos	<i>tet(K)</i> -(MFS)			4		Tetraciclina
	<i>tet(38)</i> - (MFS)	18		63		
	<i>qacA</i> - (MFS)			1		Fluoroquinolona
	<i>arIR</i> - (MFS)	18		64		
	<i>arIS</i> - (MFS)	19		64		

	<i>mgrA</i> - (MFS)	18	64		Fluoroquinolona, Tetraciclina	
	<i>mepA</i> - (MATE)	18	63		Glicilciclina, Tetraciclina	
	<i>mepR</i> - (MATE)	18	63			
Inativação Antibiótico	<i>Fusc</i>	2	2	1	Ácido Fusídico	
	<i>ant (4') - Ib</i>	3		12		
	<i>ant (6)</i>	1	1	3	3	
	<i>ant (9) -Ia</i>	7	3	77	74	Aminoglicosídico
	<i>AAC (6') -Ie-APH (2') - Ia</i>	1	1	5	5	
	<i>APH (3') - IIIa</i>	3	2	6	6	
	<i>Cat</i>			1		Cloranfenicol
	<i>sat-4</i>	3	1	6	5	Estreptomicina
	<i>blaZ</i>	4	3	15	8	β-lactâmico
	<i>Mph</i>	2			Macrolídeo	
Proteção contra o Alvo	<i>msrA</i>	2			Estreptogramina, Macrolídeo	
	<i>tet (W/N/W)</i>	2	2	12	12	Tetraciclina
Alteração do sítio do Alvo Antibiótico	<i>dfrG</i>	2		19	19	Diaminopirimidina
	<i>dfrC</i>			1	1	
	<i>mecA</i> - (PBP2)	16		56	3	Meticilina
	<i>mecI</i> - (PBP2)	3		18		
	<i>mecR1</i> - (PBP2)	11	1	55	3	
Alteração do Alvo Antibiótico	<i>rpoB</i> - (H481N)			3	Rifamicina e Peptídeo	
	<i>rpoB</i> -(L466S, H481N)			1		
		212	20	889	212	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. GC- Genomas completos das Linhagens , IG Ilhas Genomicas.

Estudos anteriores mostraram que os genes *aph* (3') e *ant* (6) flanqueiam o gene *sat4* que codifica a acetiltransferase de estreptotricina, que determina a resistência ao antibiótico estreptotricina, estes genes são carregados por transposons (DERBISE; AUBERT; SOLH, EL, 1997) e podem estar ligados ao genes *EmrB*, conforme verificado nesse trabalho (WERNER; HILDEBRANDT; WITTE, 2003). Os genes foram identificados em IGs e fora destas, dentre os genomas estudados, 3 genomas associados a infecções comunitárias (Europa – 11819-97, Ásia – SA268 e FORC_26) e 6 associados a infecções hospitalares (América do Sul – Bmb9393 e Gv69, Ásia – Z172 e V521 e Europa - TW20 e GR2). O agrupamento gênico *aph* (3'), *sat4* e *ant* (6) também foi identificado em outro trabalho, que analisou 72 isolados de *Enterococcus faecium* de diferentes origens (isolado em fezes de animais e humanos, carne animal e esgoto). O estudo chama a atenção para uma espécie que abriga genes de resistência cuja infecções não eram tratadas com estreptomicina tanto em animais como em humanos (WERNER; HILDEBRANDT; WITTE, (2001)). Dessa forma, reforçando a importância da TGH para as linhagens de *S. aureus*, na corrida “armamentista” contra a introdução de novos antibióticos.

3.6.5 Análise da resistência aos β -lactâmicos presentes em *S. aureus*

Observando ainda a tabela 7, podemos ainda aferir os genes, que conferiam resistência aos β -lactâmicos. temos o gene *blaZ*, que codifica a enzima β -lactamase, que hidrolisa o anel de β -lactâmico e inativa o antibiótico (PEACOCK; PATERSON, 2015) e os genes *mecA*, *mecI* e *mecR1*, que são responsáveis por alteração do sítio de ligação das proteínas de ligação a penicilina (PBP) ou transpeptidase, proteína responsável pela fase final da síntese da parede celular bacteriana (transpeptidação) (PEACOCK; PATERSON, 2015). Pelo menos um ou mais genes relacionados a resistência dos β -lactâmicos (Penicilina e meticilinas) foram identificados em 92,10 % dos 63 isolados AH e 88,90 % dos 18 isolados AC. O gene *blaZ* foi identificado dentro de IGs em maior proporção em ambos isolados, bem diferente do complexo *SCC mec*, composto pelos genes *mecA* (transcrição do PBP2' ou PBP2a), *mecI* (repressor transcricional) e *mecR1*(codifica proteína transmembrana sinalizadora β -lactâmicos), localizados em sua maior parte fora das IGs. No entanto vale ressaltar que o surgimento de linhagens estafilocócicas resistentes à meticilina está relacionado com a aquisição e inserção do elemento *SCC mec* no cromossomo de cepas suscetíveis (ITO et al., 2009). A presença do *SCCmec* dentro de IGs é de alta relevância para compreensão da alta frequência da linhagem MRSA em ambientes hospitalares e extra hospitalares, provavelmente relacionado ao baixo custo metabólico e adaptativo (LEE et al., 2007).

3.6.6 Análise dos genes de resistência à tetraciclina presentes em *S. aureus*

A tetraciclina inibe a síntese proteica, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA ao ribossomo bacteriano (FOLLOWING; THERAPY, 2001), os genes *Tet* (W/N/W) (tabela 7) codificam uma proteína de proteção ribossômica que impede a tetraciclina de se ligar a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, comprometendo a síntese proteica (OLIVIER et al., 2016)(NOMENCLATURE, 2005). Os genes foram identificados em 11,11% das linhagens AC (América do Norte-08BA02176 e Ásia-FORC_027) e em 19,04% das linhagens AH (América do Norte-2395EUA500, América do Sul -Bmb9393, Ásia – Mu50/ Mu3/ T0131/ Z172/ NCCP14558/ NCCP14562/ V521, Europa – TW20/ST398 e Oceania-JKD6008). É importante ressaltar que os genes *Tet*(W) e *Tet*(N) já foram identificados em bactérias intestinais humana (FLÓREZ et al., 2006), associados a transposons (OLIVIER et al., 2016),

o que corrobora para hipótese de que a microbiota intestinal não patogênica de humanos e animais possa atuar como um reservatório de GRAs e estes podem ser transferidos para patógenos (OLIVIER et al., 2016).

Por fim, foi analisado os genes adquiridos por TGH que determinaram a expressão, de um novo mecanismo de resistência ao antibiótico tetraciclina. Os genes *Tet (W/N/W)* são responsáveis por agregar um novo mecanismo de resistência, cuja resistência anteriormente eram determinadas por duas classes de bombas de efluxo (BE) (figura 6), classificadas na Superfamília Facilitadora Maioritária (MFS) e na Família de Múltiplas Drogas e Extrusão de Compostos Tóxicos (MATE), respectivamente expressas pelos genes cromossômicos *Tet(38)* e *MepA*. As proteínas pertencentes à família MATE e MFS são semelhantes, ambas são antiporte, transportadores secundários, a diferença está na força motriz (FM) utilizada para o transporte da droga para fora da bactéria, em quanto a proteína pertencente a MATE utiliza como FM o gradiente de sódio (Na⁺) transmembrana (efluxo da droga associado com o influxo de Na⁺), as proteínas pertencente MFS associam-se com influxo de H⁺ (LEKSHMI et al., 2018; NIKAIDO; LI, 2009) (Figura 10).

Neste trabalho foi identificado em 100% dos isolados estudados, a presença do gene cromossômico *Tet(38)*, cuja expressão é regulada pelo gene *mgrA* (DING et al., 2008). Este regulador é descrito em outros trabalhos como um regulador global em *S. aureus* que controla a expressão de diferentes genes, associados a fatores de virulência e transportadores de efluxo de resistência a múltiplos fármacos (GUPTA et al., 2013; TRUONG-BOLDUC; HOOPER, 2010), associados na autólise (LUONG; LEE, 2006) e na formação de biofilme (JIN et al., 2019; TROTONDA et al., 2008). No entanto, a expressão do gene *mgrA* dependente da expressão dos genes *arlS* e *arlR* (DING et al., 2008), estes inicialmente descritos associados a regulação de fatores de virulência (FOURNIER; KLIER; RAPOPORT, 2001).

Outra BE envolvida na resistência da tetraciclina, é expressa pelo gene *MepA*, cuja expressão envolve o repressor MepR (HUET et al., 2008; KAATZ; DEMARCO; SEO, 2006).

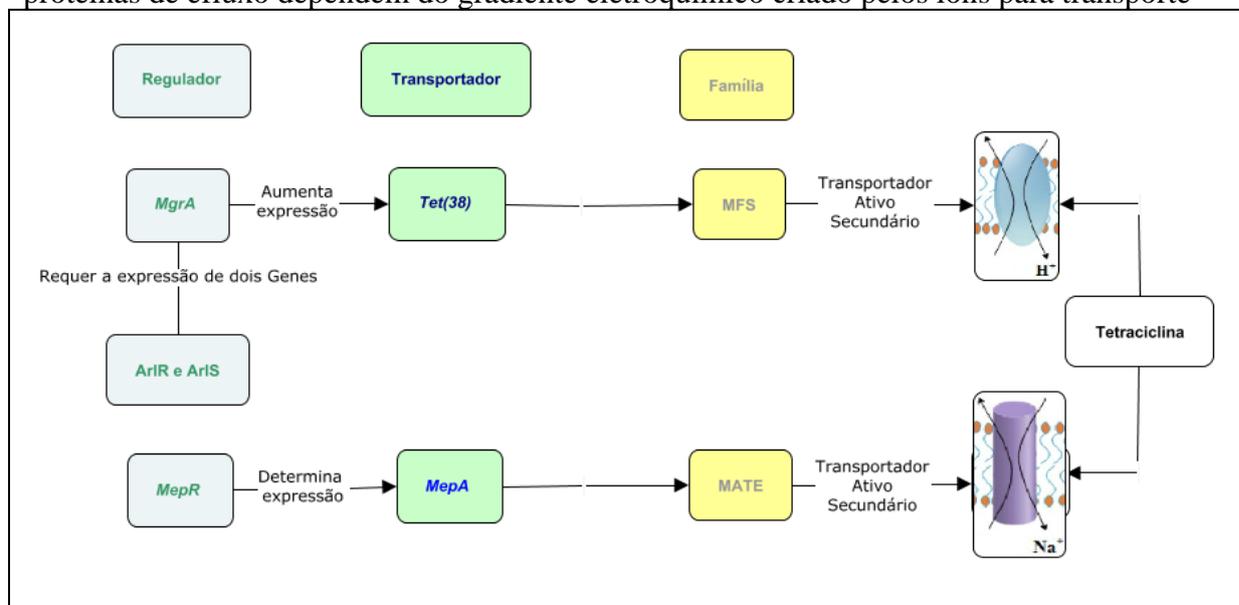
Os resultados mostram não somente a importância da TGH na diversificação dos mecanismos de resistência ao antibiótico tetraciclina como também na multiplicidade de bombas de efluxo em *S. aureus*, cuja a complexidade de regulação das mesmas, define a sua importância para a fisiologia e adaptação do *S. aureus*.

4. CONCLUSÃO

As IGs são fatores importantes para disseminação de genes de resistência pelo *S. aureus*. Foi notável a presença de um maior número e diversidade de genes de resistência nas linhagens AH, embora esses genes também sejam disseminados nas linhagens AC. Não foi notado nenhum padrão de resistência específico nas IGs comparando os isolados AH e AC, o que mostra a alta disseminação da resistência entre as bactérias de diferentes ambientes, fora o hospitalar. Além disso a aquisição dessas ilhas, embora possam aumentar o custo adaptativo da bactéria em situações de não exposição aos antibióticos, podem favorecê-las em condições de pressão seletiva intensa tanto por antibióticos quanto pela exposição a outras substâncias. A TGH observada em *S. aureus* pela aquisição das IGs mostra o dinamismo do patógeno na variação do seu fenótipo, e conseqüentemente da sua adaptação aos diferentes ambientes e circunstâncias. Os fagos mostraram ser peças importantes nas IGs para aquisição de genes de virulência, embora possam também, em menor frequência, carrear e transferirem genes de resistência. O tamanho e o número de IGs também influenciam o tamanho do genoma de *S. aureus*. Dessa forma, fica evidente o papel dessas ilhas na adaptação e evolução desses patógenos e do sucesso de sobrevivência dos mesmos frente aos tratamentos com antibióticos hoje existentes. Esses resultados mostram a importância das IGs na multirresistência do *S. aureus* e alerta ao problema da resistência para saúde pública atual. O presente estudo de

caracterização de IGs é importante para uma melhor compreensão da disseminação dos genes de resistência entre os diversos isolados e para o desenvolvimento de medidas futuras que ajudem a conter o problema da resistência.

Figura 6 - O mapa conceitual que exemplifica a codificação de genes identificados que determinam as bombas de efluxo em *S. aureus* pertencentes às famílias MFS e MATE, cuja proteínas de efluxo dependem do gradiente eletroquímico criado pelos íons para transporte



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. **Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance?** *Nature Reviews Microbiology*, [s.l.], v. 8, nº 4, p. 260–271, 2010. ISSN: 17401526, DOI: 10.1038/nrmicro2319.
- ARNDT, D. et al. **PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool.** *Nucleic acids research*, [s.l.], v. 44, nº W1, p. W16–W21, 2016. ISSN: 13624962, DOI: 10.1093/nar/gkw387.
- AYRES, MANUEL; AYRES JÚNIOR, MANUEL; AYRES, DANIEL LIMA; SANTOS, A. S. dos. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Belém: MCT; IDSM; CNPq. [s.l.]: [s.n.], 2007.
- BEHNOOD, A. et al. **Prevalence of aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia resistance gene and its linkage to Tn5281 in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates from Tabriz hospitals.** *Iranian Journal of Microbiology*, [s.l.], v. 5, nº 3, p. 203–208, 2013. ISSN: 20083289.
- BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSOON, E.; LARSSON, D. G. J. **Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance.** *FEMS Microbiology Reviews*, [s.l.], v. 42, nº 1, p. 68–80, 2018. ISSN: 15746976, DOI: 10.1093/femsre/fux053.

- BERTELLI, C. et al. **IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 45, n° W1, p. W30–W35, 2017. ISSN: 13624962, DOI: 10.1093/nar/gkx343.
- BESIER, S. et al. **Molecular analysis of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*.** *Molecular microbiology*, [s.l.], v. 47, n° 2, p. 463–9, 2003. ISSN: 0950-382X.
- BUSH, E. C. et al. **xenoGI: Reconstructing the history of genomic island insertions in clades of closely related bacteria.** *BMC Bioinformatics*, [s.l.], v. 19, n° 1, p. 1–11, 2018. ISSN: 14712105, DOI: 10.1186/s12859-018-2038-0.
- CARMO, V. **Teste de Mann-Whitney.** *Universidade Federal de Santa Catarina*, [s.l.], 2012.
- CASTANHEIRA, M. et al. **Occurrence and molecular characterization of fusidic acid resistance mechanisms among *Staphylococcus* spp . from European countries (2008).** [s.l.], n° April, p. 1353–1358, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq094.
- CONAGIN, A. et al. **Efeito da falta de normalidade em testes de homogeneidade das variâncias.** *Bragantia*, [s.l.], 1993. ISSN: 0006-8705, DOI: 10.1590/s0006-87051993000200010.
- COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J. **Side effects of antibiotics on genetic variability.** *FEMS Microbiology Reviews*, [s.l.], v. 33, n° 3, p. 531–538, 2009. ISSN: 01686445, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00165.x.
- DEGHORAIN, M.; MELDEREN, L. VAN. **The staphylococci phages family: An overview.** *Viruses*, [s.l.], v. 4, n° 12, p. 3316–3335, 2012. ISSN: 19994915, DOI: 10.3390/v4123316.
- DERBISE, A.; AUBERT, S.; SOLH, N. EL. **Mapping the regions carrying the three contiguous antibiotic resistance genes *aadE*, *sat4*, and *aphA-3* in the genomes of staphylococci.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 41, n° 5, p. 1024–1032, 1997. ISSN: 00664804.
- DING, Y. et al. **NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses.** *Journal of Bacteriology*, [s.l.], v. 190, n° 21, p. 7123–7129, 2008. ISSN: 00219193, DOI: 10.1128/JB.00655-08.
- EDSLEV, S. M. et al. **Genomic analysis reveals different mechanisms of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus* from Danish atopic dermatitis patients.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [s.l.], v. 73, n° 4, p. 856–861, 2018. ISSN: 14602091, DOI: 10.1093/jac/dkx481.
- FERNÁNDEZ-GÓMEZ, B. et al. **Patterns and architecture of genomic islands in marine bacteria.** *BMC Genomics*, [s.l.], v. 13, n° 1, 2012. ISSN: 14712164, DOI: 10.1186/1471-2164-13-347.
- FLÓREZ, A. B. et al. **Molecular analysis of *tet(W)* gene-mediated tetracycline resistance in dominant intestinal *Bifidobacterium* species from healthy humans.** *Applied and Environmental Microbiology*, [s.l.], v. 72, n° 11, p. 7377–7379, 2006. ISSN: 00992240, DOI: 10.1128/AEM.00486-06.
- FOLLOWING, R.; THERAPY, H. **Tetracycline Antibiotics: Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, [s.l.], v. 65, n° 2, p. 232–260, 2001. DOI: 10.1128/MMBR.65.2.232.
- FOURNIER, B.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. **The two-component system *ArlS-ArlR* is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*.** *Molecular Microbiology*, [s.l.], v. 41, n° 1, p. 247–261, 2001. ISSN: 0950382X, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02515.x.
- GAJDÁCS, M. **The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*.** *Antibiotics*, [s.l.], v. 8, n° 2, 2019. ISSN: 20796382, DOI: 10.3390/antibiotics8020052.

- GILLINGS, M. R. **Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome.** *Frontiers in Microbiology*, [s.l.], v. 4, n° JAN, p. 1–10, 2013. ISSN: 1664302X, DOI: 10.3389/fmicb.2013.00004.
- GILLINGS, M. R.; STOKES, H. W. **Are humans increasing bacterial evolvability?** *Trends in Ecology and Evolution*, [s.l.], v. 27, n° 6, p. 346–352, 2012. ISSN: 01695347, DOI: 10.1016/j.tree.2012.02.006.
- GUPTA, R. K. et al. **NgrA activates expression of capsule genes, but not the α -toxin gene in experimental staphylococcus aureus endocarditis.** *Journal of Infectious Diseases*, [s.l.], v. 208, n° 11, p. 1841–1848, 2013. ISSN: 00221899, DOI: 10.1093/infdis/jit367.
- HACKER, J.; CARNIEL, E. **Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes.** *EMBO reports*, [s.l.], v. 2, n° 5, p. 376–381, 2001. ISSN: 1469-221X, DOI: 10.1093/embo-reports/kve097.
- HACKER, Jörg; CARNIEL, E. **Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity.** *EMBO Reports*, [s.l.], v. 2, n° 5, p. 376–381, 2001. ISSN: 1469221X, DOI: 10.1093/embo-reports/kve097.
- HÄNDEL, N. et al. **Compensation of the metabolic costs of antibiotic resistance by physiological adaptation in escherichia coli.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 57, n° 8, p. 3752–3762, 2013. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.02096-12.
- HENDERSON, K. L. et al. **Community-acquired, healthcare-associated and hospital-acquired bloodstream infection definitions in children: A systematic review demonstrating inconsistent criteria.** *Journal of Hospital Infection*, [s.l.], v. 85, n° 2, p. 94–105, 2013. ISSN: 01956701, DOI: 10.1016/j.jhin.2013.07.003.
- HOCQUET, D.; MULLER, A.; BERTRAND, X. **What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems.** *Journal of Hospital Infection*, [s.l.], v. 93, n° 4, p. 395–402, 2016. ISSN: 15322939, DOI: 10.1016/j.jhin.2016.01.010.
- HSIAO, W. et al. **IslandPath: Aiding detection of genomic islands in prokaryotes.** *Bioinformatics*, [s.l.], v. 19, n° 3, p. 418–420, 2003. ISSN: 13674803, DOI: 10.1093/bioinformatics/btg004.
- HUET, A. A. et al. **Multidrug efflux pump overexpression in Staphylococcus aureus after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes.** *Microbiology*, [s.l.], v. 154, n° 10, p. 3144–3153, 2008. ISSN: 13500872, DOI: 10.1099/mic.0.2008/021188-0.
- ILCZYSZYN, W. M.; KOSECKA-STROJEK, M.; MIE, J. **Phage-Associated Virulence Determinants of Staphylococcus aureus.** [s.l.], p. 173–183, 2018. ISBN: 9780128135471, DOI: 10.1016/B978-0-12-813547-1.00014-5.
- ITO, T. et al. **Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 53, n° 12, p. 4961–4967, 2009. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.00579-09.
- JIA, B. et al. **CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 45, n° D1, p. D566–D573, 2017. ISSN: 13624962, DOI: 10.1093/nar/gkw1004.
- JIN, Z. et al. **The ArIR-MgrA regulatory cascade regulates PIA-dependent and protein-mediated biofilm formation in Rbf-dependent and Rbf-independent pathways.** *International Journal of Medical Microbiology*, [s.l.], v. 309, n° 2, p. 85–96, 2019. ISSN: 16180607, DOI: 10.1016/j.ijmm.2018.12.006.
- JUHAS, M. et al. **Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution.** *FEMS Microbiology Reviews*, [s.l.], v. 33, n° 2, p. 376–393, 2009. ISSN: 01686445, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x.
- JUTKINA, J. et al. **An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that**

- drive horizontal transfer of resistance.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 548–549, p. 131–138, 2016. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.044.
- KAATZ, G. W.; DEMARCO, C. E.; SEO, S. M. **MepR, a repressor of the Staphylococcus aureus MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 50, n° 4, p. 1276–1281, 2006. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.50.4.1276-1281.2006.
- KEMPF, I.; ZEITOUNI, S. **Coût biologique de la résistance aux antibiotiques : Analyse et conséquences.** *Pathologie Biologie*, [s.l.], v. 60, n° 2, p. 9–14, 2012. ISSN: 03698114, DOI: 10.1016/j.patbio.2009.10.013.
- KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. **Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 44, n° 12, p. 3249–3256, 2000. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000.
- LANGILLE, M. G. I.; HSIAO, W. W. L.; BRINKMAN, F. S. L. **Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach.** *BMC Bioinformatics*, [s.l.], v. 9, p. 1–10, 2008. ISSN: 14712105, DOI: 10.1186/1471-2105-9-329.
- _____. **Detecting genomic islands using bioinformatics approaches.** *Nature Reviews Microbiology*, [s.l.], v. 8, n° 5, p. 373–382, 2010. ISSN: 17401526, DOI: 10.1038/nrmicro2350.
- LANNERGÅRD, J.; NORSTRÖM, T.; HUGHES, D. **Genetic determinants of resistance to fusidic acid among clinical bacteremia isolates of Staphylococcus aureus.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 53, n° 5, p. 2059–2065, 2009. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.00871-08.
- LEE, S. M. et al. **Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus by way of continuous culture.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 51, n° 4, p. 1497–1499, 2007. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.01239-06.
- LEKSHMI, M. et al. **Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in Staphylococcus aureus.** *AIMS Microbiology*, [s.l.], v. 4, n° 1, p. 1–18, 2018. ISSN: 2471-1888, DOI: 10.3934/microbiol.2018.1.1.
- LENCASTRE, H. DE; OLIVEIRA, D.; TOMASZ, A. **Adaptative resistance S.aureus.** *Current Opinion in Microbiology*, [s.l.], v. 10, n° 5, p. 428–435, 2007. DOI: 10.1016/j.mib.2007.08.003. Antibiotic.
- LI, B.; WEBSTER, T. J. **Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections.** *Journal of Orthopaedic Research*, [s.l.], v. 36, n° 1, p. 22–32, 2018. ISSN: 1554527X, DOI: 10.1002/jor.23656.
- LI, H. et al. **Identification of Gene Clusters Associated with Host Adaptation and Antibiotic Resistance in Chinese Staphylococcus aureus Isolates by Microarray-Based Comparative Genomics.** *PLoS ONE*, [s.l.], 2013. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0053341.
- LUNA, C. M. et al. **Treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Latin America.** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, [s.l.], v. 14, n° SUPPL. 2, 2010. ISSN: 14138670, DOI: 10.1590/s1413-86702010000800007.
- LUONG, T. T.; LEE, C. Y. **The arl locus positively regulates Staphylococcus aureus type 5 capsule via an mgrA-dependent pathway.** *Microbiology*, [s.l.], v. 152, n° 10, p. 3123–3131, 2006. ISSN: 13500872, DOI: 10.1099/mic.0.29177-0.
- MARTÍNEZ, J. L. **Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens.** *Frontiers in Microbiology*, [s.l.], v. 2, n° JAN, p. 1–6, 2012. ISSN: 1664302X, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00265.
- MARTÍNEZ, J. L.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. **What is a resistance gene? Ranking**

- risk in resistomes.** *Nature Reviews Microbiology*, [s.l.], v. 13, n° 2, p. 116–123, 2015. ISSN: 17401534, DOI: 10.1038/nrmicro3399.
- MATSUOKA, M. et al. **New erm gene in Staphylococcus aureus clinical isolates.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 46, n° 1, p. 211–215, 2002. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.46.1.211-215.2002.
- MCCARTHY, N. L. et al. **Health care-associated and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: A comparison of definitions.** *American Journal of Infection Control*, [s.l.], v. 38, n° 8, p. 600–606, 2010. ISSN: 01966553, DOI: 10.1016/j.ajic.2010.01.006.
- MCCLURE, J. A. M. et al. **Genomic comparison of highly virulent, moderately virulent, and avirulent strains from a genetically closely-related MRSA ST239 sub-lineage provides insights into pathogenesis.** *Frontiers in Microbiology*, [s.l.], 2018. ISSN: 1664302X, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01531.
- NAGAEV, I. et al. **Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant Staphylococcus aureus.** [s.l.], v. 40, 2001.
- NAIMI, T. S. et al. **Comparison of Community- and Health Care - Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection.** *Journal of the American Medical Association*, [s.l.], v. 290, n° 22, p. 2976–2984, 2003. ISSN: 00987484, DOI: 10.1001/jama.290.22.2976.
- NIKAIDO, H.; LI, X.-Z. **Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update.** *Drugs*. [s.l.]: [s.n.], 2009. v. 69, 1555–1623 p. ISBN: 1131703000000, DOI: 10.2165/11317030-000000000-00000.Efflux-Mediated.
- NOMENCLATURE, G. **Letters to the Editor Hybrid tet Genes and tet Gene Nomenclature: Request for Opinions.** [s.l.], v. 49, n° 3, p. 1265–1266, 2005. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1265.
- NURJADI, D. et al. **Emergence of trimethoprim resistance gene dfrG in Staphylococcus aureus causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [s.l.], v. 69, n° 9, p. 2361–2368, 2014. ISSN: 14602091, DOI: 10.1093/jac/dku174.
- O'NEILL, A. J. et al. **Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 51, n° 5, p. 1737–1740, 2007. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.01542-06.
- OLIVIER, S. et al. **Diversity of the Tetracycline Mobilome Within a Chinese Pig Manure Sample Downloaded from <http://aem.asm.org/> on September 12, 2018 by guest.** [s.l.], v. 82, n° August, p. 6454–6462, 2016. DOI: 10.1128/AEM.01754-16.
- PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. **Mechanisms of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus.** *Annual Review of Biochemistry*, [s.l.], v. 84, n° 1, p. 577–601, 2015. ISSN: 0066-4154, DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034516.
- R CORE TEAM. **R software: Version 3.5.1.** *R Foundation for Statistical Computing*, [s.l.], 2018. ISBN: 978-3-540-74685-0, ISSN: 16000706, DOI: 10.1007/978-3-540-74686-7.
- REEVE, S. M. et al. **MRSA Isolates from United States Hospitals Carry dfrG and dfrK Resistance Genes and Succumb to Propargyl-Linked Antifolates.** *Cell chemical biology*, [s.l.], v. 23, n° 12, p. 1458–1467, 2016. ISSN: 2451-9448, DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.11.007.
- RESTREPO BETANCUR, L.; GONZÁLEZ L., J. **De Pearson a Spearman.** *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, [s.l.], 2007. ISSN: 0120-0690.
- SADERI, H.; EMADI, B.; OWLIA, P. **Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran, Iran.** *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, [s.l.], v. 17, n° 2, p. BR48-53, 2011. ISSN:

1643-3750.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B.; CHEN, H. J. **A Comparative Study of Various Tests for Normality.** *Journal of the American Statistical Association*, [s.l.], 1968. ISSN: 01621459, DOI: 10.2307/2285889.

SHAW, K. J. et al. **Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes.** *Microbiological reviews*, [s.l.], v. 57, n° 1, p. 138–63, 1993. ISSN: 0146-0749.

SZCZUKA, E. et al. **Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus hominis* strains isolated from clinical specimens.** *Folia Microbiologica*, [s.l.], v. 61, n° 2, p. 143–147, 2016. ISBN: 1222301504196, ISSN: 18749356, DOI: 10.1007/s12223-015-0419-6.

TORGERSEN, H. et al. **antimicrobial resistance: the example of SA.** *Journal of Biolaw and Business*, [s.l.], v. 3, n° 3, p. 53–59, 2000. ISSN: 10955127, DOI: 10.1172/JCI200318535.In.

TROTONDA, M. P. et al. **MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*.** *Infection and Immunity*, [s.l.], v. 76, n° 12, p. 5645–5654, 2008. ISSN: 00199567, DOI: 10.1128/IAI.00735-08.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; HOOPER, D. C. **Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Bacteriology*, [s.l.], v. 192, n° 10, p. 2525–2534, 2010. ISSN: 00219193, DOI: 10.1128/JB.00018-10.

WAACK, S. et al. **Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models.** *BMC Bioinformatics*, [s.l.], v. 7, p. 1–12, 2006. ISSN: 14712105, DOI: 10.1186/1471-2105-7-142.

WERNER, G.; HILDEBRANDT, B.; WITTE, W. **Linkage of erm (B) and aadE-sat4-aphA-3 in Multiple-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates of Different Ecological Origins .** *Microbial Drug Resistance*, [s.l.], v. 9, n° supplement 1, p. 9–16, 2003. ISSN: 1076-6294, DOI: 10.1089/107662903322541847.

WOODFORD, N. **Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci.** *Clinical Microbiology and Infection*, [s.l.], v. 11, p. 2–21, 2005. ISSN: 1198743X, DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01140.x.

XIA, G.; WOLZ, C. **Infection , Genetics and Evolution Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution.** *Infection, Genetics and Evolution*, [s.l.], v. 21, p. 593–601, 2014. ISSN: 1567-1348, DOI: 10.1016/j.meegid.2013.04.022.

ZLATIAN, O. et al. **Antimicrobial resistance in bacterial pathogens among hospitalised patients with severe invasive infections.** *Experimental and Therapeutic Medicine*, [s.l.], v. 16, n° 6, p. 4499–4510, 2018. ISSN: 17921015, DOI: 10.3892/etm.2018.6737.

Aminoglycoside-streptothricin resistance gene cluster aadE-sat4-aphA-3 disseminated among multiresistant isolates of *enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 45, n° 11, p. 3267–3269, 2001. ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.45.11.3267-3269.2001.

APÊNDICE A

Ord	N° idt NCBI	cepa	Origem	Continente	Tam G Cp Kb	Total Gen G cp	Total FV Gen cp	PAG Gen cp	Total R Gen cp
43	NZ_CP009828.1	MS4	CA	Ásia	2709.8	2605	85	2	23
40	NC_003923.1	MW2	CA	América do Norte	2820.4	2767	95	0	25
69	NC_002953.3	MSSA476	CA	Europa	2799.8	2742	91	0	23
46	NC_007793.1	EUA300_FPR3757	CA	América do Norte	2872.8	2869	84	0	26
44	NC_017338.1	JKD6159	CA	Oceania	2811.4	2750	84	1	26
42	NC_017351.1	11819-97	CA	Europa	2846.5	2818	87	2	31
49	NC_016928.1	M013	CA	Ásia	2788.6	2711	84	1	22
45	NC_018608.1	08BA02176	CA	América do Norte	2782.3	2694	72	2	28
41	NC_021554.1	CA-347	CA	América do Norte	2850.4	2811	83	0	34
48	NC_022226.1	CN1	CA	Ásia	2751.3	2699	80	0	27
50	NC_022442.1	SA957	CA	Ásia	2789.5	2713	85	1	25
51	NC_022443.1	SA40	CA	Ásia	2728.3	2623	82	0	24
54	NZ_CP006630.1	SA268	CA	Ásia	2833.8	2778	84	1	28
52	NZ_CP007670.1	M121	CA	América do Sul	2896.1	2663	79	0	25
53	NZ_CP012692.1	FORC_027	CA	Ásia	2903.4	2998	78	0	33
71	NZ_CP013132.1	FORC_026	CA	Ásia	2719.3	2731	83	0	25
47	NZ_CP010526.1	DAR4145	CA	Ásia	2860.5	2599	69	0	35
70	NZ_CP019563.1	SR434	CA	Ásia	2809.1	2854	70	0	22
	Total		18			49425	1475	10	482

Ord	N° idt NCBI	cepa	Origem	Continente	Total nº IG>9.5Kb	Soma Tam IG>9.5Kb	G V IG>9.5Kb	PAG IG	G R IG>9.5Kb
43	NZ_CP009828.1	MS4	CA	Ásia	6	140.8	2	2	0
40	NC_003923.1	MW2	CA	América do Norte	6	132.5	3	0	0
69	NC_002953.3	MSSA476	CA	Europa	5	109.4	2	0	0
46	NC_007793.1	EUA300_FPR3757	CA	América do Norte	8	188.4	5	0	1
44	NC_017338.1	JKD6159	CA	Oceania	2	85.3	3	1	0
42	NC_017351.1	11819-97	CA	Europa	5	120.5	0	1	3
49	NC_016928.1	M013	CA	Ásia	5	89.8	2	1	0
45	NC_018608.1	08BA02176	CA	América do Norte	8	179.4	1	2	6
41	NC_021554.1	CA-347	CA	América do Norte	7	148.0	3	0	4
48	NC_022226.1	CN1	CA	Ásia	4	107.9	3	0	2
50	NC_022442.1	SA957	CA	Ásia	5	88.7	4	1	0
51	NC_022443.1	SA40	CA	Ásia	6	106.7	3	0	0
54	NZ_CP006630.1	SA268	CA	Ásia	5	108.4	2	1	3
52	NZ_CP007670.1	M121	CA	América do Sul	5	155.1	2	0	0
53	NZ_CP012692.1	FORC_027	CA	Ásia	8	179.4	5	0	3
71	NZ_CP013132.1	FORC_026	CA	Ásia	3	43.7	0	0	0
47	NZ_CP010526.1	DAR4145	CA	Ásia	4	118.5	0	0	3
70	NZ_CP019563.1	SR434	CA	Ásia	6	124.3	2	0	1
Total			18		98		42	9	26

Ord	N° idt NCBI	cepa	Origem	Continente	Tam G Cp Kb	Total Gen G cp	Total FV Gen cp	PAG Gen cp	Total R Gen cp
1	NC_017340.1	ST225	HA	Europa	2821.5	2777	83	0	34
2	NC_002745.2	N315	HA	Ásia	2814.8	2755	82	0	35
3	NC_002758.2	Mu50	HA	Ásia	2878.4	2851	82	0	35
4	NC_009782.1	Mu3	HA	Ásia	2880.0	2852	82	0	34
7	NC_016912.1	VC40	HA	Europa	2692.6	2647	77	0	24
8	NC_022222.1	6850	HA	Europa	2736.4	2661	79	0	24
9	NC_017331.1	TW20	HA	Europa	3043.2	3054	82	1	39
10	NC_021670.1	Bmb9393	HA	América do Sul	2980.5	2988	80	1	37
11	NZ_CP011147.1	FCFHV36	HA	América do Sul	2848.9	2581	79	0	31
12	NZ_CP012593.1	HOU1444-VR	HA	América do Sul	2798.4	2766	82	0	24
13	NC_017342.1	TCH60	HA	América do Norte	2802.0	2718	82	0	23
14	NZ_CP014791.1	MCRF184	HA	América do Norte	2664.6	2571	78	0	23
15	NZ_AP017320.1	MI	HA	América do Norte	2860.3	2840	79	0	33
16	NZ_CP011685.1	ZJ5499	HA	Ásia	2848.0	2813	78	0	33
17	NC_002952.2	MRSA252	HA	Europa	2902.6	2850	76	0	34
28	NC_002951.2	COL	HA	Europa	2809.4	2788	78	0	25
37	NC_009487.1	JH9	HA	América do Norte	2906.7	2895	82	0	33
38	NC_009632.1	JH1	HA	América do Norte	2906.5	2894	71	0	42
18	NC_017341.1	JKD6008	HA	Oceania	2924.3	2921	81	1	40
19	NC_017347.1	T0131	HA	Ásia	2913.9	2902	82	1	33
20	NC_017763.1	HO 5096 0412	HA	Europa	2832.2	2785	63	1	29
21	NC_020529.1	ST228/10388	HA	Europa	2759.5	2703	80	0	34
22	NC_020564.1	ST228/10497	HA	Europa	2759.5	2703	80	0	34
23	NC_020532.1	ST228/15532	HA	Europa	2759.9	2703	80	0	34
39	NC_022604.1	Z172	HA	Ásia	2988.0	3014	83	1	38
24	NZ_CP007176.1	EUA300-ISMMS1	HA	América do Norte	2921.1	2923	83	0	26
25	NZ_CP007690.1	UA-S391_EUA300	HA	Europa	2872.9	2866	84	0	25
26	NZ_CP007499.1	2395 EUA500	HA	América do Norte	2955.6	2983	79	0	30
40	NZ_CP009361.1	ATCC 25923	HA	América do Norte	2778.9	2709	76	0	23
27	NZ_CP009681.1	Gv69	HA	América do Sul	3046.2	3094	78	2	36
29	NC_020533.1	ST228/16035	HA	Europa	2759.8	2703	80	0	34
30	NC_020566.1	ST228/16125	HA	Europa	2759.5	2703	80	0	34

Ord	Nº idt NCBI	cepa	Origem	Continente	Total nº IG>9.5Kb	Soma Tam IG>9.5Kb	G V IG>9.5Kb	PAG IG	G R IG>9.5Kb
1	NC_017340.1	ST225	HA	Europa	5	130.3	3	0	3
2	NC_002745.2	N315	HA	Ásia	7	118.9	3	0	11
3	NC_002758.2	Mu50	HA	Ásia	8	177.2	0	0	6
4	NC_009782.1	Mu3	HA	Ásia	8	180.4	0	0	6
7	NC_016912.1	VC40	HA	Europa	4	74.1	0	0	1
8	NC_022222.1	6850	HA	Europa	6	109.2	2	0	2
9	NC_017331.1	TW20	HA	Europa	4	297.1	2	1	7
10	NC_021670.1	Bmb9393	HA	América do Sul	13	351.5	3	1	9
11	NZ_CP011147.1	FCFHV36	HA	América do Sul	5	113.1	0	0	4
12	NZ_CP012593.1	HOU1444-VR	HA	América do Sul	3	105.6	3	0	1
13	NC_017342.1	TCH60	HA	América do Norte	5	97.0	3	0	0
14	NZ_CP014791.1	MCRF184	HA	América do Norte	2	40.0	3	0	0
15	NZ_AP017320.1	MI	HA	América do Norte	5	115.9	0	0	4
16	NZ_CP011685.1	ZJ5499	HA	Ásia	4	79.8	0	0	4
17	NC_002952.2	MRSA252	HA	Europa	9	206.9	0	0	4
28	NC_002951.2	COL	HA	Europa	4	89.7	2	0	1
37	NC_009487.1	JH9	HA	América do Norte	6	128.9	0	0	4
38	NC_009632.1	JH1	HA	América do Norte	6	128.9	0	0	4
18	NC_017341.1	JKD6008	HA	Oceania	11	186.0	2	1	7
19	NC_017347.1	T0131	HA	Ásia	11	203.6	2	1	4
20	NC_017763.1	HO 5096 0412	HA	Europa	7	182.3	2	1	2
21	NC_020529.1	ST228/10388	HA	Europa	5	96.0	0	0	8
22	NC_020564.1	ST228/10497	HA	Europa	5	96.0	0	0	8
23	NC_020532.1	ST228/15532	HA	Europa	5	96.0	0	0	8
39	NC_022604.1	Z172	HA	Ásia	9	244.5	2	1	7
24	NZ_CP007176.1	EUA300-ISMMS1	HA	América do Norte	7	165.0	2	0	1
25	NZ_CP007690.1	UA-S391_EUA300	HA	Europa	7	165.5	5	0	1
26	NZ_CP007499.1	2395 EUA500	HA	América do Norte	12	276.4	2	0	5
40	NZ_CP009361.1	ATCC 25923	HA	América do Norte	4	66.0	1	0	0
27	NZ_CP009681.1	Gv69	HA	América do Sul	15	403.5	3	2	10
29	NC_020533.1	ST228/16035	HA	Europa	5	96.0	0	0	8
30	NC_020566.1	ST228/16125	HA	Europa	5	96.0	0	0	8

Ord	Nº idt NCBI	cepa	Origem	Continente	Tam G Cp Kb	Total Gen G cp	Total FV Gen cp	PAG Gen cp	Total R Gen cp
31	NC_020536.1	ST228/18341	HA	Europa	2759.5	2703	80	0	34
32	NC_020537.1	ST228/18412	HA	Europa	2759.3	2704	80	0	34
33	NC_020568.1	ST228/18583	HA	Europa	2759.3	2704	80	0	34
34	NZ_CP007657.1	V2200	HA	América do Sul	2831.0	2782	83	0	25
41	NZ_CP010402.1	GR2	HA	Europa	2792.8	2706	81	2	28
35	NZ_AP014652.1	TMUS2126	HA	Ásia	2770.2	2711	76	0	27
36	NZ_AP014653.1	TMUS2134	HA	Ásia	2770.2	2710	77	0	28
42	NZ_CP013953.1	NCCP14558	HA	Ásia	2955.1	2936	73	0	34
43	NZ_CP013955.1	NCCP14562	HA	Ásia	2910.9	2863	77	0	33
44	NZ_CP013957.1	V521	HA	Ásia	3085.6	3114	80	1	39
67	NC_017333.1	ST398	HA	Europa	2872.6	2822	73	2	29
45	NZ_CP013231.1	UTSW MRSA 55	HA	América do Norte	2898.3	2884	83	0	26
48	NZ_CP014392.1	USA300-SUR9	HA	América do Sul	2918.0	3010	80	0	25
46	NZ_CP014397.1	USA300-SUR10	HA	América do Sul	2918.0	3010	80	0	25
47	NZ_CP014402.1	USA300-SUR11	HA	América do Sul	2918.0	3010	81	0	25
49	NZ_CP014407.1	USA300-SUR12	HA	América do Sul	2876.3	2945	80	0	26
50	NZ_CP014409.1	USA300-SUR13	HA	América do Sul	2919.7	3011	80	0	25
51	NZ_CP014412.1	USA300-SUR14	HA	América do Sul	2919.8	3014	81	0	26
52	NZ_CP014415.1	USA300-SUR15	HA	América do Sul	2919.9	2731	80	0	26
53	NZ_CP014420.1	USA300-SUR16	HA	América do Sul	2919.8	3014	81	0	26
54	NZ_CP014423.1	USA300-SUR17	HA	América do Sul	2919.8	3015	81	0	26
56	NZ_CP014429.1	USA300-SUR19	HA	América do Sul	2919.8	3014	81	0	26
57	NZ_CP014432.1	USA300-SUR20	HA	América do Sul	2915.4	3007	80	0	26
58	NZ_CP014435.1	USA300-SUR21	HA	América do Sul	2919.7	3010	80	0	25
59	NZ_CP014438.1	USA300-SUR22	HA	América do Sul	2915.4	3007	79	0	26
60	NZ_CP_014441.1	USA300-SUR23	HA	América do Sul	2915.4	3007	79	0	26
61	NZ_CP014444.1	USA300-SUR24	HA	América do Sul	2919.9	3014	80	0	26
62	NZ_CP020020.1	ATCC 6538	HA	Europa	2773.0	2794	67	0	18
55	NZ_CP019590.1	C2406	HA	América do Norte	2878.9	2942	80	0	24
64	NZ_LT009690.1	NZAK3	HA	Oceania	2831.7	2802	80	0	27
65	NZ_LT615218.1	AUS0325	HA	Oceania	2771.6	2731	70	0	25
	Total		63			179740	4984	13	1863

Ord	Nº idt NCBI	cepa	Origem	Continente	Total nº IG>9.5Kb	Soma Tam IG>9.5Kb	G V IG>9.5Kb	PAG IG	G R IG>9.5Kb
31	NC_020536.1	ST228/18341	HA	Europa	5	96.0	0	0	8
32	NC_020537.1	ST228/18412	HA	Europa	5	96.0	0	0	8
33	NC_020568.1	ST228/18583	HA	Europa	5	96.0	0	0	8
34	NZ_CP007657.1	V2200	HA	América do Sul	4	98.6	2	0	1
41	NZ_CP010402.1	GR2	HA	Europa	3	105.2	0	1	3
35	NZ_AP014652.1	TMUS2126	HA	Ásia	9	199.7	4	0	2
36	NZ_AP014653.1	TMUS2134	HA	Ásia	9	199.7	4	0	2
42	NZ_CP013953.1	NCCP14558	HA	Ásia	12	262.3	2	0	7
43	NZ_CP013955.1	NCCP14562	HA	Ásia	11	260.4	4	0	4
44	NZ_CP013957.1	V521	HA	Ásia	11	191.2	1	1	9
67	NC_017333.1	ST398	HA	Europa	7	212.4	0	2	3
45	NZ_CP013231.1	UTSW MRSA 55	HA	América do Norte	5	147.3	5	0	1
48	NZ_CP014392.1	USA300-SUR9	HA	América do Sul	7	147.2	4	0	2
46	NZ_CP014397.1	USA300-SUR10	HA	América do Sul	7	147.2	2	0	2
47	NZ_CP014402.1	USA300-SUR11	HA	América do Sul	7	172.5	4	0	2
49	NZ_CP014407.1	USA300-SUR12	HA	América do Sul	5	135.2	6	0	2
50	NZ_CP014409.1	USA300-SUR13	HA	América do Sul	7	148.9	4	0	2
51	NZ_CP014412.1	USA300-SUR14	HA	América do Sul	7	148.2	4	0	2
52	NZ_CP014415.1	USA300-SUR15	HA	América do Sul	7	165.8	6	0	2
53	NZ_CP014420.1	USA300-SUR16	HA	América do Sul	6	191.2	4	0	2
54	NZ_CP014423.1	USA300-SUR17	HA	América do Sul	7	148.9	4	0	2
56	NZ_CP014429.1	USA300-SUR19	HA	América do Sul	7	163.0	4	0	2
57	NZ_CP014432.1	USA300-SUR20	HA	América do Sul	7	166.4	7	0	2
58	NZ_CP014435.1	USA300-SUR21	HA	América do Sul	7	148.9	4	0	2
59	NZ_CP014438.1	USA300-SUR22	HA	América do Sul	7	166.4	5	0	2
60	NZ_CP_014441.1	USA300-SUR23	HA	América do Sul	7	166.4	7	0	2
61	NZ_CP014444.1	USA300-SUR24	HA	América do Sul	7	165.8	6	0	2
62	NZ_CP020020.1	ATCC 6538	HA	Europa	6	146.2	2	0	1
55	NZ_CP019590.1	C2406	HA	América do Norte	5	185.6	5	0	1
64	NZ_LT009690.1	NZAK3	HA	Oceania	4	87.1	3	0	2
65	NZ_LT615218.1	AUS0325	HA	Oceania	3	108.4	1	0	0
	Total		63		418		149	12	238

Quadro 2- Mosaico das Classes de antibióticos conferidas por genes mutados presentes nos genomas de *S aureus*

Contínente	Nº idt NCBI	cepa	Origem	Fus																			
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
América do Norte	NC_017342.1	TCH60	HA																				
América do Norte	NZ_CP014791.1	MCRF184													12			16					
América do Norte	NZ_AP017320.1	MI					4				9												
América do Norte	NC_009487.1	JH9			2						9												
América do Norte	NC_009632.1	JH1			2						9												
América do Norte	NZ_CP007176.1	EUA300-ISMMS1					3				9											17	
América do Norte	NZ_CP007499.1	2395 EUA500					4				9											17	
América do Norte	NZ_CP009361.1	ATCC 25923														14	15						
América do Norte	NZ_CP013231.1	UTSW MRSA 55					3															17	
América do Norte	NZ_CP019590.1	C2406					3				9											17	
América do Sul	NC_021670.1	Bmb9393					3				9											17	19
América do Sul	NZ_CP011147.1	FCFHV36			2						8												
América do Sul	NZ_CP009681.1	Gv69					4				9						15					18	19
América do Sul	NZ_CP007657.1	V2200																				17	
América do Sul	NZ_CP014392.1	USA300-SUR9					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014397.1	USA300-SUR10					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014402.1	USA300-SUR11					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014407.1	USA300-SUR12					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014409.1	USA300-SUR13					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014412.1	USA300-SUR14					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014415.1	USA300-SUR15					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014420.1	USA300-SUR16					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014423.1	USA300-SUR17					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014429.1	USA300-SUR19					3				9											17	
América do Sul	NZ_CP014432.1	USA300-SUR20				3				9											17		
América do Sul	NZ_CP014435.1	USA300-SUR21				3				9											17		
América do Sul	NZ_CP014438.1	USA300-SUR22				3				9											17		
América do Sul	NZ_CP014441.1	USA300-SUR23				3				9											17		
América do Sul	NZ_CP014444.1	USA300-SUR24				3				9											17		
Ásia	NC_002758.2	Mu50				4				9													
Ásia	NC_009782.1	Mu3				4				9													
Ásia	NZ_CP011685.1	ZJ5499				3				9													
Ásia	NC_017347.1	T0131				4				9											17	20	
Ásia	NC_022604.1	Z172				4	5		7		10	11									19		
Ásia	NZ_CP013953.1	NCCP14558				4																	
Ásia	NZ_CP013955.1	NCCP14562				4			7														
Ásia	NZ_CP013957.1	V521				4															17		
Europa	NC_017340.1	ST225				4		6		9													
Europa	NC_022222.1	6850												12				16					
Europa	NC_017331.1	TW20				4				9											17	18	
Europa	NC_002952.2	MRSA252				4				9						14	15						
Europa	NC_017763.1	HO 5096 0412				4				9													
Europa	NC_020529.1	ST228/10388				4				9													
Europa	NC_020564.1	ST228/10497				4				9													
Europa	NC_020532.1	ST228/15532				4				9													
Europa	NZ_CP007690.1	UA-S391_EUA300																			17		
Europa	NC_020533.1	ST228/16035				4				9													
Europa	NC_020566.1	ST228/16125				4				9													
Europa	NC_020536.1	ST228/18341				4				9													
Europa	NC_020537.1	ST228/18412				4				9													
Europa	NC_020568.1	ST228/18583				4				9													
Europa	NC_017333.1	ST398				4				9				13		15							
Oceania	NC_017341.1	JKD6008				4				9											17		
América do Norte	NC_007793.1	EUA300_FPR3757	CA			3				9											17		
América do Norte	NC_018608.1	08BA02176													13		15						
América do Norte	NC_021554.1	CA-347					4		6		9				12						16		
América do Sul	NZ_CP007670.1	M121																				17	
Ásia	NZ_CP009828.1	MS4													12							16	
Ásia	NC_016928.1	M013													12							16	
Ásia	NC_022226.1	CN1					4		6		9				12							16	
Ásia	NC_022442.1	SA957													12							16	
Ásia	NC_022443.1	SA40													12							16	
Ásia	NZ_CP006630.1	SA268													12							16	
Ásia	NZ_CP012692.1	FORC_027			1		4				9												
Ásia	NZ_CP010526.1	DAR4145									9												
Oceania	NC_017338.1	JKD6159					3				9				12							16	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. O quadro 2 mostra a distribuição dos GRAs mutados identificados fora das IGS, os quadrados azuis significam ausência de GRAs e os vermelhos a presença do GRAs, a numeração de 1 à 20, representam GRAs mutável e a resistência de antibiótico por este conferida, conforme a legenda Ácido Fusídico – 1.fusA (L461K). Fluoroquinolona – 2.parC (S80Y, E84G); 3.parC (S80Y); 4.parC (S80F); 5.parE (D434N); 6.parE(P587S); 7. gyrA - (S85P, S84L) e 8. gyrA - (E88K, S84L).Daptomicina – 10.mprF (T345I); 11.walK (R263C).Fosfomicina – 12.GlpT (A100V); 13.GlpT (A100V, F3I); 14.GlpT (V213I, A100V); 15.murA

(E291D, D278E); 16.*murA* (E291D, T396N); 17.*murA* (G257D). Mupiroicina 18.*ileS* (V588F); Rifamicina 19.*rpoB*- (H481N); 20. *rpoB*-(L466S, H481N)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa por sempre compreender minha ausência, e pela dedicação na criação do maior presente das nossas vidas, a Maria Luiza, demonstrando assim o seu grande amor.

Agradeço aos amigos Leonardo, Ingrid, Firmino, Guedes e Fidelis por cobri a minha ausência no trabalho no período de edição deste trabalho e pela amizade. Agradeço aos amigos Jesarela, Otoniel, Marine, Filipe, Maria Helena, Valesca e Misael pelo incentivo e por comporem o grupo de estudo nas horas de dificuldades.

Agradeço aos professores com consciência de que toda a minha gratidão não seria suficiente para retribuir a dedicação que tiveram comigo durante toda a graduação.

Finalmente, agradeço à professora Dr^a. Daniela Santos Pontes e Ms Nyedja Fialho Moraes Barbosa, pelas inesquecíveis lições, pela paciência e pela amizade nos momentos de dificuldade e aos professores membros da banca examinadora, pela leitura do trabalho.