

GABRIEL FREIRE IGARI

Caracterização de amostras sequenciais de
Staphylococcus aureus isoladas de colonização nasal de
pacientes internados em UTIs de um hospital universitário
durante a pandemia de COVID-19



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/ 2023

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dr^a. Kátia Regina Netto dos Santos e coorientação da Dr^a. Tamara Lopes Rocha de Oliveira

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

I24c Igari, Gabriel Freire
Caracterização de amostras sequenciais de Staphylococcus aureus isoladas de colonização nasal de pacientes internados em UTIs de um hospital universitário durante a pandemia de COVID- 19 / Gabriel Freire Igari. -- Rio de Janeiro, 2023. 85 f.

Orientadora: Kátia Regina Netto Dos Santos.
Coorientador: Tamara Lopes Rocha De Oliveira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Staphylococcus aureus. 2. COVID- 19. 3. Colonização nasal. 4. Resistência antimicrobiana. 5. Clonalidade. I. Dos Santos, Kátia Regina Netto, orient. II. De Oliveira, Tamara Lopes Rocha, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
 BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): **Gabriel Freire Igari**

DRE: **120039965**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Eliane Oliveira Ferreira (Presidente)
 Prof. Karla Rodrigues Miranda
 Prof. Fernanda Sampaio Cavalcante
 Prof. Dennis Carvalho Ferreira (Suplente)

Título da Monografia: **“Caracterização de amostras sequenciais de *Staphylococcus aureus* isoladas de colonização nasal de pacientes internados em UTIs de um hospital universitário durante a pandemia de COVID-19”**

Local: **Sala de seminários do DMM do IMPG / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **12 de dezembro de 2023 às 14:00h**

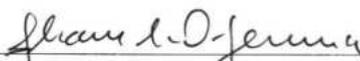
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de DEZEMBRO de 2023.

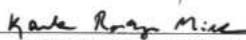
NOTA:

10,0

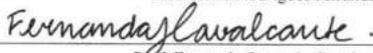
Banca Examinadora:


 Prof. Eliane Oliveira Ferreira (Presidente)

10,0


 Prof. Karla Rodrigues Miranda

10,0


 Prof. Fernanda Sampaio Cavalcante

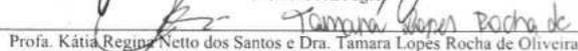
Prof. Dennis Carvalho Ferreira (Suplente)

Aluno(a):


 Gabriel Freire Igari

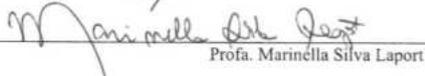
Orientador(a)

(e coorientador):


 Profa. Kátia Regina Netto dos Santos e Dra. Tamara Lopes Rocha de Oliveira

Coordenadora de

TCC:


 Profa. Marinella Silva Laport

DEDICATÓRIA

A minha mãe Maria Eunice (*in memoriam*) e a minha família, com todo meu amor. Espero que eles estejam orgulhosos de minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me sustentar e orientar em todos os momentos, além de me proporcionar a oportunidade de estudar em uma das melhores universidades do Brasil, a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Agradeço a minha família por todo apoio a mim proporcionado, todas as conversas e incentivos. Em especial agradeço as minhas três mães, que em um momento difícil me acolheram como um filho. A minha tia Maria, por me acolher, me aconselhar e me incentivar todos esses anos. A minha prima Rafaela, por estar comigo em momentos fundamentais de minha vida. A minha madrinha Viviane, por sempre estar de prontidão em todos os momentos. Vocês foram fundamentais para a conclusão de mais essa etapa em minha vida, amo vocês!

Agradeço ao meu pai Marcelo, por sempre me incentivar e me ensinar a importância dos estudos. Agradeço a minha irmã Isabele por todas as conversas, conselhos e por ser um ótimo exemplo como irmã mais velha. Agradeço a minha avó Damiana por todas as nossas conversas e histórias contadas, os almoços e cafés da tarde. Obrigado por ser a melhor avó do mundo!

Agradeço aos meus amigos: Julia (prima e irmã), Marcos (júnior), Vinícius (cacau) e Fagner por todos os passeios, conversas, risadas e peço desculpas pelos momentos de ausência nesse ano de TCC. Minha vida sem vocês não seria a mesma.

Agradeço aos amigos que fiz durante a graduação: Fabiane, Gabriela, Letícia, Lívia e Mariana. Obrigado por todas as vezes que ficamos até tarde estudando, por todas as nossas conversas, risadas, conselhos e almoços juntos. Muito obrigado por vocês alegrarem os meus dias e tornarem esses quatro anos de graduação mais leves e felizes, ainda que houvesse momentos de desespero. É com absoluta certeza que digo: Me graduar em meio a uma pandemia sem vocês seria uma missão quase impossível. Amo muito todas vocês!

Agradeço aos amigos que fiz durante minha iniciação científica no Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH): Bruna, Jefferson, Nathália e Thaís. Muito obrigado por vocês tornarem o processo de construção desse projeto mais leve através de nossas conversas, risadas e doces após o almoço. Com certeza irei levá-los comigo por toda a vida e vocês ainda terão que me aturar reclamando por muito tempo.

Muito obrigado a todos os alunos e professores que conheci no LIH: Andryelle, Camila M., Camila Q., Carol, Dennis, Evellyn, Fernanda, Gabriela, Isabella, Isabelle, Lorryne, Mariana e Priscila. Sou grato por todo conhecimento que pude adquirir nesses últimos anos com vocês.

Agradeço muitíssimo a minha coorientadora e amiga Tamara, por ter contribuído imensamente em minha formação. Muito obrigado pela paciência, pelos ensinamentos, conselhos e apoio. Desculpe-me por as vezes eu ser “cabeça dura”, desatento e pelas dezenas de relatórios surpresa. Você foi para mim, e ainda é, uma excelente professora, que me ensinou desde isolar uma amostra a fazer um PFGE. Você é uma fonte de inspiração que carregarei por toda minha jornada.

Muito obrigado professora Kátia, por ter me acolhido como seu aluno ainda durante o período de isolamento social. Agradeço por todos os ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de desenvolver junto a senhora, e demais colaboradores, esse riquíssimo trabalho. Aprendi muito com a senhora durante esses anos de iniciação científica e levarei comigo esse conhecimento por toda minha caminhada.

Agradeço a todos do departamento de microbiologia médica, especialmente aos laboratórios parceiros e seus membros representados pelos professores e técnicos: Márcia Giambiagi, Marinella Laport, Marlei Gomes e Rafael Duarte.

Agradeço aos professores Eliane de Oliveira Ferreira, Karla Rodrigues Miranda, Fernanda Sampaio Cavalcante e Dennis Carvalho Ferreira por terem prontamente aceitado participar da banca avaliadora desse projeto.

Agradeço ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e a UFRJ, por permitirem que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FAPERJ por todo o suporte financeiro necessário para a realização desse projeto.

RESUMO

GABRIEL FREIRE IGARI

Caracterização de amostras sequenciais de *Staphylococcus aureus* isoladas de colonização nasal de pacientes internados em UTIs de um hospital universitário durante a pandemia de COVID-19

Orientadoras: Katia Regina Netto dos Santos e Tamara Lopes Rocha de Oliveira

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus está presente nas narinas em cerca de 30% da população humana e a colonização prévia por este microrganismo aumenta o risco de infecção subsequente. O maior uso de antimicrobianos e saneantes na pandemia do SARS-COV-2 aumentou a pressão seletiva sobre os microrganismos, com taxas de resistência possivelmente aumentadas. Esse estudo caracterizou a susceptibilidade a antimicrobianos, a presença de genes de tolerância a saneantes e a diversidade clonal de amostras sequenciais de *S. aureus* provenientes de colonização nasal de pacientes internados em duas UTIs de um hospital do Rio de Janeiro, na pandemia de COVID-19, entre Set/2020 e Set/2021. Os swabs foram coletados semanalmente, durante a internação, com interrupção da coleta quando isolada amostra MRSA (*methicillin-resistant S. aureus*) ou por alta/óbito do paciente. A espécie foi confirmada por MALDI-TOF-MS e o perfil de susceptibilidade para 11 antimicrobianos foi determinado por disco difusão. O tipo de SCCmec, a presença dos genes *qacA/B* e *smr* (codificam para saneantes), e dos genes *erm(T)*, *scn* e *luk-PV* (marcadores do complexo clonal 398) foram investigados por PCR. A diversidade clonal foi analisada por eletroforese em gel de campo pulsado. Um total de 78 amostras de *S. aureus* foram isoladas de 33 pacientes, dos quais 14 (42,4%) eram da UTI COVID (UTIc) com 33 amostras, enquanto outros 19 (57,6%) estavam na UTI não-COVID (UTInc), com 45 amostras. As 78 amostras mostraram taxas de não-susceptibilidade superiores a 60% para penicilina, eritromicina e clindamicina e 41% apresentaram fenótipo de *multidrug resistance* (MDR). O teste de disco-aproximação mostrou que 83,3% (50/60) das amostras não susceptíveis à eritromicina possuíam o fenótipo μ MLS_b. Mudança no perfil de susceptibilidade foi observada em amostras de 14 (17,9%) pacientes durante a internação, tendo 42,9% destes apresentado amostras com aquisição de resistência à meticilina. Amostras MRSA foram detectadas em 9,1% daquelas oriundas de UTIc e em 17,8% da UTInc. O SCCmecIV foi identificado em todas as amostras MRSA da UTIc e em 71,4% das amostras da UTInc. O gene *smr* foi encontrado em 52,6% das amostras, tendo sido detectado em 42,4% dos pacientes. Grande percentual de amostras comunitárias do CC398 foi detectado no estudo, tanto entre amostras da UTIc (57,6%) quanto entre as da UTInc (48,9%), incluindo duas amostras MRSA. A análise da clonalidade das amostras de *S. aureus* revelou uma possível transmissão horizontal de amostras entre indivíduos internados na UTIc e entre pacientes da UTInc. Os resultados do estudo mostraram altos percentuais de resistência a antimicrobianos e de genes de tolerância a saneantes, além da aquisição de resistência e possível transmissão intra-hospitalar de amostras de *S. aureus* em ambas as UTIs, na pandemia de COVID-19, ressaltando a importância de medidas de controle e prevenção de colonização pelo patógeno em indivíduos hospitalizados.

Palavras-chave: *S. aureus*, COVID-19, colonização, resistência antimicrobiana, clonalidade.

ABSTRACT

GABRIEL FREIRE IGARI

Characterization of sequential isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal colonization of patients admitted to ICUs at a university hospital during the COVID-19 pandemic

Orientadoras: Katia Regina Netto dos Santos e Tamara Lopes Rocha de Oliveira

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus is present in the nostrils of around 30% of the human population and previous colonization by this pathogen increases the risk of subsequent infection. The increased use of antimicrobials and sanitizers in the SARS-COV-2 pandemic has increased selective pressure on microorganisms, with possibly increased resistance rates. This study characterized the susceptibility to antimicrobials, the presence of disinfectant tolerance genes and the clonal diversity of sequential isolates of *S. aureus* from nasal colonization of patients admitted to two ICUs of a hospital in Rio de Janeiro, during the COVID-19 pandemic, between Sep/2020 and Sep/2021. Swabs were collected weekly, during hospitalization, with collection interrupted when MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) was isolated or upon discharge/death of the patient. The species was confirmed by MALDI-TOF-MS and the susceptibility profile for 11 antimicrobials was determined by disk diffusion. The type of SCC*mec*, the presence of the *qacA/B* and *smr* genes (coding for sanitizing), and the *erm(T)*, *scn* and *luk-PV* genes (markers of the 398 clonal complex) were investigated by PCR. Clonal diversity was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. A total of 78 *S. aureus* isolates were obtained from 33 patients, of which 14 (42.4%) were from the COVID ICU (cICU) with 33 isolates, while another 19 (57.6%) were from the non-COVID ICU (ncICU), with 45 isolates. The 78 isolates showed non-susceptibility rates greater than 60% for penicillin, erythromycin, and clindamycin and 41% presented a multidrug resistance (MDR) phenotype. The disk approximation test showed that 83.3% (50/60) of the erythromycin not susceptible isolates had the μ MLS_b phenotype. Change in the susceptibility profile was observed in isolates from 14 (17.9%) patients during hospitalization, with 42.9% of these presenting isolates with acquisition of methicillin resistance. MRSA isolates were detected in 9.1% of those from the cICU and in 17.8% from the ncICU. SCC*mec* type IV was identified in all MRSA isolates from the cICU and in 71.4% of the ncICU isolates. The *smr* gene was found in 52.6% of the isolates and was detected in 42.4% of the patients. A large percentage of CC398 community isolates was detected in the study, both among isolates from the cICU (57.6%) and those from the ncICU (48.9%), including two MRSA isolates. Analysis of the clonality of *S. aureus* revealed a possible horizontal transmission of isolates between individuals admitted to the cICU and between patients in the ncICU. The results of the study showed high percentages of resistance to antimicrobials and tolerance genes to sanitizers, in addition to the acquisition of resistance and possible intra-hospital transmission of *S. aureus* isolates in both ICUs, in the COVID-19 pandemic, highlighting the importance of measures to control and prevent colonization by the pathogen in hospitalized individuals.

Keywords: *S. aureus*, COVID-19, colonization, antimicrobial resistance, clonality.

RESUMO PARA LEIGOS

GABRIEL FREIRE IGARI

Caracterização de amostras sequenciais de *Staphylococcus aureus* isoladas de colonização nasal de pacientes internados em UTIs de um hospital universitário durante a pandemia de COVID-19

Orientadoras: Katia Regina Netto dos Santos e Tamara Lopes Rocha de Oliveira

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus é um tipo de micróbio, especificamente uma bactéria. Esse micróbio pode ser encontrado em diversas partes do corpo, como as narinas, mas também pode causar infecções graves. A presença dessa bactéria no corpo é chamada de colonização e as pessoas que estão colonizadas têm maiores chances de desenvolver infecções. Para combater essas infecções é necessário o uso de antibióticos. Contudo esse micróbio consegue adquirir resistência a muitos deles, dificultando o tratamento do paciente. Durante a pandemia de COVID-19, houve um maior uso de antibióticos, o que pode ter favorecido o aparecimento de bactérias mais resistentes. Além disso, *S. aureus* são divididos em linhagens, termo muito parecido com as raças que usamos para os cães. Essas linhagens podem ter se espalhado em hospitais entre os pacientes já debilitados. Esse estudo teve como objetivo comparar características associadas às amostras de *S. aureus* isoladas durante a pandemia de duas Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) diferentes, uma para pacientes com COVID-19 e outra para pacientes sem a doença. Nosso estudo mostrou que aqueles internados na UTI COVID-19 foram mais rapidamente colonizados por amostras de *S. aureus* do que pacientes sem a doença, apesar das taxas de resistência aos antimicrobianos terem sido altas em ambas as UTIs investigadas, sem diferença entre elas. Observamos também que a maioria das amostras desenvolveu um tipo de resistência à eritromicina que só aparece quando usamos, previamente, este antibiótico ou outro muito parecido. Além disso, detectamos entre alguns pacientes amostras de *S. aureus* que se mostraram mais resistentes a antibióticos durante a internação. Outros fatos interessantes foram a possível transmissão de linhagens de *S. aureus* entre indivíduos com COVID-19 e entre aqueles sem a doença, e a detecção de uma mesma linhagem comunitária entre muitos pacientes. Portanto, nossos resultados ressaltam a importância de medidas de controle e prevenção de colonização por *S. aureus* em indivíduos hospitalizados, destacando-se períodos pandêmicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo	16
Figura 2.	Fluxograma do estudo	28
Figura 3.	Distribuição das amostras MDR de acordo com a UTI	37
Figura 4.	Distribuição dos tipos de SCC <i>mec</i> de acordo com o tipo de UTI	38
Figura 5.	Gel de eletroforese representativo dos tipos de SCC <i>mec</i>	38
Figura 6.	Distribuição do gene <i>smr</i> de acordo com o tipo de UTI	39
Figura 7.	Gel de eletroforese representativo da presença dos genes <i>smr</i> e <i>qacA/B</i>	40
Figura 8.	Gel de eletroforese representativo dos controles dos genes <i>erm(T)</i> , <i>scn</i> e <i>luk-PV</i>	43
Figura 9.	Dendrograma do perfil genômico das 11 amostras tratadas com a enzima <i>SmaI</i> e características demográficas e microbiológicas relacionadas a cada amostra	45
Figura 10.	Dendrograma do perfil genômico das 25 amostras tratadas com as enzimas <i>SmaI</i> e <i>ApaI</i> e características demográficas e microbiológicas relacionadas a cada amostra	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Amostras controles que foram utilizadas no presente estudo	15
Tabela 2.	Descrição do significado de cada faixa de <i>score</i> utilizada para interpretação dos resultados emitidos na técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo – espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS)	17
Tabela 3.	Descrição das categorias de susceptibilidade e seus respectivos pontos de corte para interpretação dos valores de halo de inibição para amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> de acordo com o <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (CLSI, 2023) e segundo o <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (BrCast, 2023).	19
Tabela 4.	Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR multiplex para tipagem do SCCmec (Milheiriço <i>et al.</i> , 2007)	22
Tabela 5.	Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos nas PCR utilizadas para a detecção dos genes relacionados a bombas de efluxo	23
Tabela 6.	Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos nas PCR utilizadas para a detecção dos genes associados ao CC398	24
Tabela 7.	Características associadas aos 33 pacientes internados em UTIs durante a pandemia de COVID-19 em um hospital do Rio de Janeiro e que apresentaram amostras sequenciais nasais de <i>Staphylococcus aureus</i> .	29
Tabela 8.	Taxas de não- susceptibilidade das 78 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> aos 11 antimicrobianos testados segundo os critérios apresentados pelo CLSI (2023)	31
Tabela 9.	Comparação dos perfis de susceptibilidade das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> aos 11 antimicrobianos testados segundo os critérios apresentados pelo CLSI (2023) e BrCAST (2023).	32
Tabela 10.	Distribuição dos fenótipos MLS _B encontrados em 60 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> não sensíveis à eritromicina de acordo com o tipo de Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) e susceptibilidade a meticilina.	34
Tabela 11.	Perfil de susceptibilidade de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> sequenciais de um mesmo paciente com aquisição/perda de resistência antimicrobiana em pacientes com diagnóstico de COVID- 19.	35
Tabela 12.	Perfil de susceptibilidade das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> sequenciais de um mesmo paciente com aquisição/perda de resistência antimicrobiana em pacientes sem diagnóstico de COVID- 19.	36

Tabela 13	Distribuição dos genes associados ao CC398 encontrados nas 78 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> de acordo com o tipo de Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) e susceptibilidade a meticilina.	42
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABC	Do inglês: <i>ATP-binding cassette superfamily</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Do inglês: <i>American Type Culture Collection</i>
Bap	Do inglês: <i>Biofilm associated protein</i>
BHI	Do inglês: <i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CA-MRSA	Do inglês: <i>Community Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
CLSI	Do inglês: <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cifs	Do inglês: <i>Clumping Factors</i>
CNA	Do inglês: <i>Collagen Adhesin</i>
COVID-19	Do inglês: <i>Coronavirus Disease 2019</i>
DO	Densidade Óptica
EGM	Elemento Genético Móvel
<i>Erm</i>	Do inglês: <i>Erythromycin Ribosome Methylase</i>
ETA	Do inglês: <i>Exfoliative Toxin A</i>
ETB	Do inglês: <i>Exfoliative Toxin B</i>
FnBPA	Do inglês: <i>Fibronectin Binding Protein A</i>
FnBPB	Do inglês: <i>Fibronectin Binding Protein B</i>
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LIH	Laboratório de Infecção Hospitalar
MALDI-TOF-MS	Do inglês: <i>Matrix Associated Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MATE	Do inglês: <i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family</i>
MDR	Do inglês: <i>Multidrug-Resistant</i>
MFS	Do inglês: <i>Major Facilitator Superfamily</i>
MLST	Do inglês: <i>Multilocus Sequence Type</i>
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	Do inglês: <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Do inglês: <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
MSSA	Do inglês: <i>Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NAG	Ácido N- acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Pares de base
PBP	Do inglês: <i>Penicillin-Binding Proteins</i>
PCR	Do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	Do inglês: <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PIA	Do inglês: <i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i>
PHEIC	Do inglês: <i>Public Health Emergency of International Concern</i>
P/V	Peso/ Volume
PVL	Do inglês: <i>Panton- Valentine leukocidin</i>
RND	Do inglês: <i>Resistance-Nodulation-Cell Division Superfamily</i>

Rpm	Rotações por minuto
SARS-CoV-2	Do inglês: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SCC _{mec}	Do inglês: <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos
SE	Do inglês: <i>Staphylococcal enterotoxin</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SMR	Do inglês: <i>Small Multidrug Resistance Family</i>
SpA	<i>Staphylococcal protein A</i>
ST	Sequência Tipo
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TBE	Tris/Borato/EDTA
TSA	Do inglês: <i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	Do inglês: <i>Trypticase Soy Broth</i>
TSST-1	Do inglês: <i>Toxic Shock Syndrome Toxin- 1</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTI _c	Unidade de Terapia Intensiva COVID-19
UTI _{nc}	Unidade de Terapia Intensiva não-COVID-19
V	Volts
V/cm	Volt/cm
V/v	Volume/ Volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> e as infecções relacionadas à assistência à saúde	3
1.1.2.	Susceptibilidade aos antimicrobianos beta- lactâmicos	4
1.1.3.	Susceptibilidade a macrolídeos, lincosamidas e aminoglicosídeos	5
1.1.4.	Tolerância a saneantes	7
1.1.5.	Tipagem molecular	8
1.2.	Pandemia de COVID-19	10
2.	JUSTIFICATIVA	12
3.	OBJETIVO	13
3.1.	Estratégias	13
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1.	Desenho e fluxograma do estudo	14
4.2.	Identificação das amostras	16
4.3.	Determinação do perfil de susceptibilidade	17
4.4.	Métodos moleculares	19
4.4.1.	Obtenção do DNA	19
4.4.2.	Determinação do tipo de SCCmec	20
4.4.3.	Detecção de genes relacionados a bombas de efluxo	22
4.4.4.	Detecção dos genes relacionados aos marcadores do ST398	23
4.4.5.	Caracterização das linhagens clonais das amostras sequenciais através da análise dos perfis de fragmentação do DNA por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE, <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>) após tratamento com as enzimas de restrição <i>SmaI</i> e <i>ApaI</i>	25
4.5.	Dados clínicos dos pacientes	27
4.6.	Análise estatística	27
5.	Resultados	28
5.1.	Caracterização dos dados clínicos e demográficos dos pacientes	28
5.2.	Identificação das amostras através da técnica de MALDI-TOF MS	30
5.3.	Determinação da susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos	30
5.4.	Detecção do tipo de SCCmec	37
5.5.	Detecção dos genes relacionados às bombas de efluxo	39
5.6.	Detecção de genes marcadores do CC398	40
5.7.	Estudo do aspecto de fragmentação do DNA genômico das amostras por meio de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE, <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>) depois do tratamento com as enzimas de restrição <i>SmaI</i> e <i>ApaI</i>	43
6.	Discussão	47
7.	Conclusões	55
8.	Referências	56
	ANEXO 1	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus spp. é um gênero bacteriano pertencente à família *Staphylococcaceae*, que apresenta mais de 60 espécies descritas (LPSN, 2023). As bactérias pertencentes a esse gênero apresentam-se como cocos Gram positivos não formadores de endosporos, com formato arredondado e com uma espessa parede celular composta, majoritariamente, de peptidoglicano, ácido teicóico e proteínas associadas (Rohde, 2019). Quando submetidos à coloração de Gram e observados ao microscópio, esses microrganismos apresentam uma coloração arroxeada e agrupam-se em formato de cacho de uva, característica que nomeia esse gênero bacteriano de *Staphylococcus* (do latim *staphylos*, “cachos” e *kokkos*, “semente”). São organismos altamente versáteis quanto a sua forma de crescimento, podendo crescer em elevadas concentrações de cloreto de sódio (por ex. NaCl 7,5 %), em condições aeróbias e anaeróbias e em temperaturas que variam de 18 °C a 40 °C (Madhaiyan, Wirth e Saravanan, 2020). Além disso, eles têm como característica a produção da enzima catalase, a qual catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigênio gasoso (O₂) e permite diferenciá-lo de outras bactérias Gram positivas (Buvelot *et al.*, 2017).

O gênero *Staphylococcus* pode ser dividido em dois grandes grupos bacterianos, os produtores e os não produtores de coagulase, uma proteína que reage com a protrombina plasmática, convertendo o fibrinogênio em fibrina, ou seja, formando coágulos. Os *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) tem como principal representante a espécie *Staphylococcus aureus*, enquanto *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* são as espécies mais frequentes do grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) (Becker *et al.*, 2014).

A diversidade de fatores de virulência apresentada pelo *S. aureus* facilita os processos de colonização e possível desenvolvimento de infecção. Amostras dessa espécie bacteriana apresentam cápsula, proteínas de superfície celular, além de produzirem diferentes tipos de toxinas. A cápsula estafilocócica é composta por polissacarídeos e auxilia as amostras de *S. aureus* a escaparem da fagocitose (Visansirikul *et al.*, 2020). A maior parte das proteínas presentes na superfície celular e associadas a camada de peptidoglicano estão relacionadas com a adesão bacteriana (Foster *et al.*, 2014). Algumas proteínas fazem parte de uma superfamília denominada de “componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva” (MSCRAMMs – do inglês, *microbial surface componentes recognizing adhesive matrix molecules*), as quais incluem as proteínas A e B de ligação à fibronectina (FnBPA e

FnBPB – do inglês, *fibronectin binding protein A* e *fibronectin binding protein B*), a proteína adesiva de colágeno (CNA – do inglês, *collagen adhesin*) e a proteína que se liga ao fibrinogênio (ClfA e ClfB – do inglês, *clumping factors A and B*), e a proteína ligadora de elastina de *S. aureus* (EbpS, do inglês, *elastin-binding protein of S. aureus*). Essas proteínas promovem a adesão do *S. aureus* ao tecido do hospedeiro, ligando-se a fibronectina, ao colágeno e ao fibrinogênio respectivamente, facilitando, assim, a colonização (Li *et al.*, 2016; Madani *et al.*, 2017; Cheung *et al.*, 2021). Ademais, na superfície das células estafilocócicas há a proteína A estafilocócica (SpA – do inglês, *Staphylococcal protein A*), uma proteína que consegue se ligar a porção Fc das imunoglobulinas, impedindo que estas se liguem às células fagocíticas, interferindo assim na fagocitose da célula bacteriana (Votintseva *et al.*, 2014)

As toxinas de *S. aureus* estão associadas à lise de diversos tipos celulares, degradação das junções de células epiteliais e a ativação de células T sem que haja a apresentação de antígenos, resultando em uma ativação policlonal (Grumann; Nübel; Bröker, 2014, Ahmad-Mansour *et al.*, 2021). Dentre as toxinas que degradam as junções das células epiteliais há as toxinas alfa, beta, gama e delta. A alfa-toxina é a mais estudada e possui atividade hemolítica, citotóxica e dermonecrótica e tem como mecanismo de ação a formação de poros em diferentes tipos celulares (Craven, *et al.*, 2009; Inoshima, *et al.*, 2011). As toxinas esfoliativas A e B (ETA e ETB – do inglês, *esfoliative toxin A* e *esfoliative toxin B*), hidrolisam uma proteína responsável por manter a junção intercelular, a desmogleína-1. Assim, essas toxinas causam a síndrome da pele escaldada estafilocócica, além de causarem o impetigo bolhoso (Oliveira; Borges; Simões, 2018). *S. aureus* também pode produzir superantígenos, os quais causam uma ativação policlonal de linfócitos T, com uma elevada produção de citocinas pró- inflamatórias como os fatores de necrose tumoral alfa e beta (TNF- alfa e TNF- beta– do inglês, *tumor necrosis factor- alfa* e *tumor necrosis factor- beta*). Esses superantígenos podem ser tanto enterotoxinas (SE – do inglês, *Staphylococcal enterotoxin*) que vão de A até T, quanto a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1 – do inglês, *toxic shock syndrome toxin- 1*). As enterotoxinas estão associadas às infecções causadas no trato gastrointestinal (TGI), pois são resistentes à altas temperaturas e à degradação enzimática na mucosa gástrica. Já a TSST-1 é produzida em ambientes aeróbios com pH por volta de 7,0 e, pode causar efeitos sistêmicos por sua capacidade de transpassar barreiras de mucosas (Schlievert; Davis, 2020; Argudín; Mendoza; Rodicio, 2010). Por fim, a produção de citotoxinas, especialmente, a leucocidina de Pantón- Valentine (PVL), que provoca a formação de poros nas células afetadas, o que leva a um desequilíbrio osmótico celular, com conseqüente morte celular (Spaan *et al.*, 2017).

A capacidade de formar biofilme é um fato que deve ser enfatizado nesta espécie. O biofilme consiste numa comunidade microbiana estruturada, na qual esse microrganismo consegue aderir-se a superfícies bióticas e/ ou abióticas por meio de suas proteínas de superfície, como as MSCRAMMs (Foster *et al.*, 2020). Para a proliferação e aderência de novas células bacterianas em camadas é necessária a expressão da adesina intercelular polissacarídica (PIA – do inglês, *polysaccharide intercellular adhesin*) (Tu Quoc *et al.*, 2007). Contudo, amostras MRSA produzem biofilme PIA-independente, apresentando um biofilme majoritariamente proteico. Neste caso, as proteínas FnBPA e FnBPB e a proteína G de superfície (SasG) são comumente descritas e desempenham funções essenciais para acúmulo celular e manutenção desta estrutura (Houston *et al.*, 2011). Após a adesão inicial há a formação da estrutura do biofilme, o qual é composta por células aderidas e compostos extracelulares que podem ser proteínas, polissacarídeos ou DNA extracelular (Patsilinakos *et al.*, 2019).

1.1.1. *Staphylococcus aureus* e as infecções relacionadas à assistência à saúde

Staphylococcus aureus coloniza cerca de 30% da população mundial (Lee *et al.*, 2018), podendo compor a microbiota nasal e da pele destes indivíduos (Almeida *et al.*, 2021; Khalili *et al.*, 2021). Contudo, pode ser um patógeno oportunista e agente de infecções superficiais e invasivas, como infecções de pele e tecidos moles, endocardites, osteomielites e infecções de corrente sanguínea (Tong *et al.*, 2015; Plumet *et al.*, 2022). A colonização prévia por *S. aureus* é um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções causadas por este microrganismo (Nurjadi *et al.*, 2020), principalmente infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). *Staphylococcus aureus* é membro do grupo de patógenos denominados ESKAPE – *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.* – os quais são os principais agentes de IRAS ao redor do mundo. (O'Toole 2021; Edwin *et al.*, 2022).

IRAS são infecções relacionadas com o ambiente hospitalar e outros ambientes de saúde (OMS, 2011). Essas podem se manifestar durante a internação, ou em até 72 horas após alta médica (Luyt *et al.*, 2018). Infecções pulmonares, de ferida cirúrgica, do trato geniturinário e de corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateter são os principais exemplos de IRAS, as quais são associadas a maiores custos (Lv *et al.*, 2019). Em 2021, De Mello Freitas e colaboradores, em uma revisão sistemática que incluiu 15 estudos brasileiros, relataram que *S. aureus* foi o segundo microrganismo mais frequentemente associado às infecções relacionadas à assistência à saúde em unidades de cuidado intensivo neonatal, com uma taxa de isolamento de 13,2%.

A aquisição de IRAS pode ser facilitada por alguns fatores, como uso prévio de antimicrobianos, internação prévia, uso de dispositivos médicos invasivos como cateter venoso central e aparelho de assistência ventilatória, além da colonização prévia por qualquer bactéria (Cristina *et al.*, 2021). See e colaboradores, 2023, em estudo clínico envolvendo 1.381 pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) realizado na França, demonstraram que ventilação mecânica foi o segundo maior fator associado ao desenvolvimento de infecções por *S. aureus*. A colonização prévia por *S. aureus* tem sido relacionada ao desenvolvimento posterior de infecções causadas pelo patógeno, principalmente, cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA – do inglês, *methicillin resistant S. aureus*) (Butterly, A. *et al.*, 2010; Sharara, S. L., Maragakis, L. L., & Cosgrove, S. E., 2021). Além disso, é importante enfatizar o papel dos profissionais de saúde como possíveis carreadores desse microrganismo, tendo em vista que estes estão constantemente expostos à aquisição do patógeno, e podem transferi-lo facilmente entre os pacientes (Da Silva *et al.*, 2020). Kinnavey e colaboradores, 2021, observaram através de um estudo envolvendo 326 profissionais de saúde e 388 pacientes, realizado na Irlanda entre 2017 e 2019 potenciais casos de transmissão de MRSA entre os profissionais de saúde, os pacientes e o ambiente.

1.1.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos foram descobertos na década de 1920, com a caracterização da penicilina G por Alexander Fleming (Lima *et al.*, 2020), viabilizando o tratamento de infecções bacterianas. Essa classe de antimicrobianos é caracterizada por possuir um anel beta-lactâmico em sua molécula, e seu mecanismo de ação se dá por meio da inibição da síntese da parede bacteriana. Em Gram positivos, a parede é composta majoritariamente de peptidoglicano, cuja constituição é de ácido N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), que se ligam por meio de uma transglicosilação, formando um dissacarídeo aminado (Kim; Chang; Singh, 2015). Ainda na síntese da parede celular, ocorre a transpeptidação, uma ligação cruzada entre resíduos D-alanina presentes no polipeptídeo da molécula de NAM, fornecendo maior estabilidade à parede celular. Ambas as reações são catalisadas por uma enzima chamada de proteína ligadora de penicilina (PBP – do inglês, *penicillin binding protein*) (Sauvage *et al.*, 2008). O beta-lactâmico liga-se de maneira covalente e irreversível à PBP, de modo a tornar essa enzima inativa, impedindo a síntese de novas camadas de peptidoglicano. Dessa forma, haverá a geração de células que não possuem uma parede celular composta de peptidoglicano, e essas acabarão sofrendo lise osmótica (Lima *et al.*, 2020)

Cepas de *S. aureus* resistentes às penicilinas, devido a produção de beta- lactamases, como penicilinases, foram descritas 20 anos após a descoberta de Fleming e dois anos após a aprovação para uso clínico (Deurenberg *et al.*, 2008). A partir disso, no final da década de 1950, foram produzidas penicilinas semissintéticas, como a meticilina e a oxacilina, as quais possuem maior estabilidade e são resistentes à penicilinases, um tipo de beta-lactamase. Essa enzima quebra o sítio ativo do beta- lactâmico, ou seja, cliva o anel beta- lactâmico e, assim, o fármaco torna-se inativo e não consegue ligar-se à PBP2 (Peacock; Paterson, 2015). Todavia, aproximadamente um ano após a descoberta das penicilinas semissintéticas, houve o isolamento das primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA – do inglês, *methicilin resistant Staphylococcus aureus*) (Harkins *et al.*, 2017). Cepas MRSA produzem uma proteína alterada de ligação à penicilina, a PBP2a, que apresenta uma menor afinidade aos beta-lactâmicos. Assim, a cepa de *S. aureus* que apresenta a PBP2a adquire resistência a todas as subclasses de beta- lactâmicos, como penicilinas, carbapenemas, monobactâmicos e cefalosporinas, a exceção das cefalosporinas de quinta geração, também chamadas de anti-MRSA, como a ceftarolina (Turner *et al.*, 2019).

A proteína PBP2a é codificada em um elemento genético móvel (EGM) denominado de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec* – do inglês, staphylococcal cassette chromosome *mec*), o qual é composto por um complexo *mec*, um complexo *ccr* e uma região J (Katayama; Ito; Hiramatsu, 2000). O complexo *mec* é responsável por codificar a PBP2a e seus homólogos, além de seus reguladores, *mecI* e *mecR1*. Neste complexo pode haver o gene *mecA*, *mecB*, *mecC* (dividido em C1 e C2) ou *mecD*, sendo o *mecA* o primeiro a ser descrito em *S. aureus*, seguido do *mecC* e *mecB*. O gene *mecD* ainda não foi descrito em *S. aureus* (Małyszko; Schwarz; Hauschild, 2014, Becker *et al.*, 2018). O complexo *ccr* tem função de recombinase, ou seja, esse complexo é responsável pela remoção e inserção do SCC*mec* no genoma bacteriano (Wang; Archer, 2010). Já a região J é uma parte não essencial do SCC*mec*, todavia nela pode haver genes adicionais de resistência a outros antimicrobianos (Liu *et al.*, 2016).

Em virtude de haver grande complexidade na constituição do SCC*mec* foi proposto que esses fossem agrupados em tipos de acordo com sua composição e organização, isto é, através da combinação dos tipos de complexo *mec*, tipos de *ccr* e composição da região J. Atualmente, existem 15 tipos de SCC*mec* já descritos, os quais tem destaque os tipos I, II, III relacionados ao ambiente hospitalar e os tipos IV, V e VII associados a comunidade, O tipo XI carrega o gene *mecC* (Christianson *et al.*, 2007; IGW-SCC, 2009; Uehara, 2022; Wang *et al.*, 2022). Com relação a região sudeste do Brasil, há uma prevalência dos tipos de SCC*mec* II, III e IV (Caboclo *et al.*, 2013; Augusto *et al.*, 2012; Pereira-Franchi *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022).

1.1.3. Suscetibilidade a macrolídeos, lincosamidas e aminoglicosídeos

Macrolídeos são uma classe de antimicrobianos de amplo espectro cujo primeiro representante foi a eritromicina. Seu mecanismo de ação se dá pela ligação à região 23S da subunidade 50S do ribossomo, inibindo a tradução de proteínas. Ao se ligar ao ribossomo, o macrolídeo impede a translocação do aminoacil-RNA transportador, interrompendo, assim, a etapa de prolongamento de uma cadeia polipeptídica, possuindo, assim, um caráter bacteriostático (Lenz *et al.*, 2021)

A resistência aos macrolídeos ocorre por meio de modificações na proteína alvo do fármaco ou expressão de bombas de efluxo na célula bacteriana. Essas modificações podem ser decorrentes de mutações pontuais ou podem ser mediadas por genes plasmidiais (eritromicina ribossomo metilase [*erm* – do inglês, *erythromycin ribosome methylase*] A, B e C), os quais promovem metilação do RNA ribossômico (Mlynarczyka *et al.*, 2010). Assim, alterações da subunidade 50S do ribossomo diminuem a afinidade dos macrolídeos a essas estruturas. Além disso, a metilação do RNA ribossômico pode provocar uma resistência cruzada com as lincosamidas e estreptograminas, resultando no fenótipo de resistência a Macrolídeo, Lincosamida e Estreptogramina B (MLS_B – do inglês, *macrolides, lincosamides and streptogramine B*) (Saderi; Emadi; Owlia, 2011).

A resistência pela expressão de bombas de efluxo se dá pela extrusão da molécula de antimicrobiano para o meio extracelular. Assim, as concentrações intracelulares do fármaco são insuficientes para que ele desempenhe sua função. As bombas de efluxo que possuem alta afinidade por macrolídeos e estreptograminas B são codificadas por uma família de genes denominada *msr*. Esses genes codificam um grupo de bombas do tipo cassete transportador de ligação de ATP (ABC, *ATP binding cassette*) (Ahirrao *et al.*, 2020). Dessa forma, quando ativos esses genes expressam uma proteína que utiliza energia por meio de ATP para translocar macrolídeos e estreptograminas B para o meio extracelular, impedindo sua ação na célula bacteriana.

As lincosamidas compõem uma classe de antimicrobianos cujo mecanismo de ação é muito similar ao dos macrolídeos. Também se ligam na região 23S da subunidade 50S do ribossomo, interrompendo o prolongamento da cadeia polipeptídica (Spížek & Řezanka, 2017). Uma vez que o mecanismo de ação das lincosamidas é muito similar à ação dos macrolídeos, o mecanismo de resistência por meio da metilação ribossomal, que é mediado por genes da família *erm*, também se relaciona às lincosamidas, como por exemplo a clindamicina. Além

disso, a resistência às lincosamidas pode se dar por meio de inativação enzimática da molécula antimicrobiana codificada pelo gene *linA* (Brisson-Noël *et al.*, 1988).

O fenótipo de resistência MLS_B pode se apresentar de forma constitutiva ($cMLS_B$) ou de forma induzida ($iMLS_B$). No fenótipo $cMLS_B$, a célula bacteriana produz um RNA mensageiro (mRNA), que é prontamente traduzido em proteínas e pode adicionar grupamentos metil no ribossomo, levando a resistência. Por outro lado, o microrganismo pode produzir um mRNA com repetições invertidas no fenótipo $iMLS_B$. Dessa forma, o mRNA adquire uma estrutura em grampo e o ribossomos não conseguem traduzir a molécula em proteínas (Yao *et al.*, 2019). Todavia, quando o grampo formado entra em contato com um indutor, como por exemplo um macrolídeo, ele perde sua estabilidade e, assim, pode ser traduzido. Portanto, no fenótipo $iMLS_B$ é necessária uma molécula indutora, que desestabilize o mRNA inativo para que ele possa ser traduzido (Kishk *et al.*, 2020).

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos cujo mecanismo de ação ocorre mediante a interação da droga com a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, com erros na leitura do mRNA e a tradução alterada de novas proteínas (Eyler & Shvets, 2019). Conseqüentemente, a síntese proteica pode ser interrompida ou pode haver a geração de proteínas disfuncionais.

A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer por meio da redução da absorção do fármaco, por meio da expressão de bombas de efluxo ou por meio da síntese de enzimas que inativam a molécula aminoglicosídica. Em *S. aureus* o mecanismo de ação mais descrito é a inativação do fármaco através de enzimas. Essas enzimas pertencem ao grupo de transferases, como acetiltransferase e fosfotransferase e são codificadas pelo gene *aacA-aphD* (Szymanek-Majchrzak *et al.*, 2018). Esse gene pode ser codificado em transposons junto com genes *erm*, que causam o fenótipo MLS_b . (Mlynarczyk- Bonikowska *et al.*, 2022)

Além da resistência aos macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos e beta-lactâmicos, *S. aureus* pode apresentar resistência a outros antimicrobianos, como as tetraciclínas e fluoroquinolonas (Buonsenso *et al.*, 2023; Okorie- Kanu *et al.*, 2020). Quando uma mesma amostra bacteriana apresenta um fenótipo de resistência a pelo menos três classe de antimicrobianos distintas, ela é classificada como multirresistente (MDR – do inglês, *multi-drug resistant*) (Sahli; Feidjel; Laalaoui, 2017). Esse fenótipo tem sido frequentemente descrito para amostras de *S. aureus* no Brasil e no mundo (Caboclo *et al.*, 2013, Davis *et al.*, 2013, Damasco *et al.*, 2019, Jara *et al.*, 2021).

1.1.4. Tolerância à saneantes

Em adição a resistência aos antimicrobianos em amostras de *S. aureus* há também relatos de tolerância e/ou resistência aos saneantes. Os saneantes são quaisquer substâncias utilizadas em tecidos vivos, superfícies e objetos inanimados de casas, escritórios, lojas e/ ou hospitais com o objetivo de desinfetar, sanitizar, desodorizar, além de desinfetar água para consumo humano, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2020). Dessa forma, os saneantes englobam tanto os desinfetantes, utilizados em objetos e/ ou superfícies, quanto os antissépticos utilizados em tecido vivo. Como exemplo de substâncias saneantes temos os compostos: biguanidas, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio que fazem parte da composição de produtos como detergentes líquidos ou em pó, desinfetantes comerciais, água sanitária e cera. Os exemplos de antissépticos utilizados na antisepsia são álcool etílico a 70°, soluções de clorexidina e iodóforos.

A tolerância aos saneantes é conferida por bombas de efluxo. Essas bombas podem transportar diversas moléculas, tais como saneantes, antimicrobianos e metais pesados (Blanco *et al.*, 2016; AlMatar *et al.*, 2021). Em espécies bacterianas os genes que codificam esses sistemas se encontram no DNA cromossômico ou em EGMs, como plasmídeos. Há cinco diferentes famílias de bombas de efluxo bacterianas, como: ABC (*ATP Binding Cassette*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), MATE (*Multi-Drug And Toxic Compound Extrusion*), SMR (*Small Multi- Drug Resistance*) e RND (*Resistance- Nodulation Division*). Todas essas famílias são observadas em bactérias Gram-positivas com exceção da família RND (Juárez-Verdayes *et al.*, 2012; Wassenaar, *et al.*, 2015).

As bombas de efluxo são fundamentais para a sobrevivência bacteriana em ambientes com elevada pressão seletiva causada pelo intenso uso de antimicrobianos, antissépticos e sanitizantes (Costa *et al.*, 2011; Hashem *et al.*, 2013). Em *S. aureus*, os genes de bombas relacionadas à tolerância aos saneantes com maior destaque são os genes *qacA/B* e *qacC* (também nomeado de *smr*), cujas famílias são MFS e SMR, respectivamente. Esses genes podem ser expressos individualmente ou em sinergismo. Quando expressos fazem, preferencialmente, a extrusão de compostos de quaternário de amônio, todavia podem transportar outras substâncias saneantes como as biguanidas e antimicrobianos (Hardy *et al.*, 2018). Noguchi e colaboradores (1999), evidenciaram que o efluxo de antimicrobianos, como as fluoroquinolonas, pode ser realizado por bombas de efluxo codificadas pelos genes *qacA/B* e *smr*. Dessa forma, a expressão de genes relacionados à tolerância aos saneantes, tal como *qacA/B* e *smr*, pode resultar não só na menor efetividade desses compostos, como também poderá culminar em uma menor susceptibilidade aos antimicrobianos.

1.1.5. Tipagem molecular

A epidemiologia molecular de *S. aureus* pode ser determinada por meio de diferentes técnicas, como a tipagem da proteína A estafilocócica, do sequenciamento em multi-locus, além da eletroforese em campo pulsado (PFGE – do inglês, *Pulsed field gel electrophoresis*). A eletroforese em campo pulsado é realizada através da digestão do DNA cromossômico bacteriano por enzimas de restrição, a qual apresenta alto poder discriminatório entre as diferentes linhagens de *S. aureus* (McDougal, et al, 2003). Assim, como descrito por Van Belkum e colaboradores, 2009, o critério de classificação como mesmo clone é definido como 80% ou mais de similaridade ou até quatro fragmentos gênicos de diferença entre si. Além disso, através de eletroforese em campo pulsado também podemos detectar possíveis surtos de infecções hospitalares.

De forma complementar, a metodologia descrita por Enright e colaboradores, 2000, através da caracterização por tipagem de sete genes constitutivos fundamentais na produção de importantes enzimas, por meio de sequenciamento (MLST - do inglês, *multilocus sequence typing*). Os genes envolvidos nesse processo são carbamato quinase (*arcC*), shikimato desidrogenase (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilato quinase (*gmk*), fosfato acetiltransferase (*pta*), triosefosfato isomerase (*tpi*) e acetil coenzima A (*yqiL*). Desse modo é possível determinar o perfil alélico para cada um desses genes, que combinados compõe uma sequência tipo (ST). Além disso, grupos de STs que possuem uma origem evolutiva em comum constituem um complexo clonal (CC). Assim, por meio das técnicas de PFGE e MLST, associado a determinação do tipo de *SCCmec*, as amostras são agrupadas em clones segundo suas características evolutivas.

No Brasil, devido a sua extensão territorial, há uma diversidade clonal com predomínio das linhagens CC5/ ST5, CC8/ ST8 e ST239 e CC45/ ST1120 e ST45 as quais já foram reportadas nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Goiás, Minas Gerais e Rio Grande do sul (Ribeiro *et al.*, 2007; Lamaro-Cardoso *et al.*, 2009; Pires *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2019). Todas as linhagens citadas, são relacionadas tanto à comunidade quanto ao ambiente hospitalar, com *SCCmec* dos tipos I, II, III, IV e V.

No Rio de Janeiro, em estudos realizados previamente por nosso grupo, Cavalcante e colaboradores, 2021, e Augusto e colaboradores, 2022, demonstraram a predominância de clones relacionados a infecções de origem comunitária como USA400 (CC1/ ST1), USA800 (CC5/ ST5) e USA1100 (CC30/ ST30), os quais possuem um *SCCmec* do tipo IV, enquanto Chamon e colaboradores, 2017, e Damasco e colaboradores, 2019, mostraram a presença dos

clones USA100 (CC5/ ST5) e CEB (CC8/ ST239), cujos SCCmec são do tipo II e III, respectivamente, relacionados ao ambiente hospitalar.

Todavia, a epidemiologia de perfis clonais pode ser mutável e novos clones podem ser inseridos e/ ou excluídos no contexto hospitalar ou comunitário. Em estudo prévio de nosso grupo, Augusto e colaboradores, em 2022, descreveram o isolamento do clone USA 300 (CC8/ ST8) em um hospital do Rio de Janeiro, o qual é endêmico nos EUA. (Moran *et al.*, 2006; See *et al.*, 2020). De mesmo modo, já houve relatos de colonização e infecção no Brasil por outros clones que não são comuns na epidemiologia brasileira, como por exemplo os pertencentes ao CC398 (André *et al.*, 2017; Da Silva *et al.*, 2020).

Cepas de *S. aureus* pertencentes ao CC398 foram previamente relatadas durante a primeira década do século XXI na Europa e, estavam colonizando e causando infecção em humanos (Voss *et al.*, 2005). É comum encontrar essa linhagem de *S. aureus* em animais, e, quando resistente à meticilina é denominada de *S. aureus* resistente à meticilina associada à pecuária (LA- MRSA). Os genes *erm(T)*, *scn* e *luk-PV* funcionam como marcadores dessa linhagem clonal em humanos (Zeggay *et al.*, 2023). Desse modo, os genes *erm(T)* e *scn* são positivos em cepas de *S. aureus* pertencentes ao clado CC398, enquanto o gene *luk-PV* é negativo. O gene *erm(T)*, assim como os outros genes *erm*, estão associados à resistência à eritromicina, podendo resultar no fenótipo de resistência induzida a clindamicina (Lozano *et al.*, 2011; Lacey *et al.*, 2022). Já o gene *scn* (*staphylococcal complement inhibitor*) está relacionado a virulência de *S. aureus* dado que codifica uma evasina que impede a fagocitose através da inibição de C3 convertase, além disso, está presente em 96% das amostras MSSA humanas (Rooijackers *et al.*, 2007; Chroboczek *et al.*, 2013). Por fim, o gene *luk-PVc* codifica para a leucocidina de Pantón- Valentine (PVL), previamente descrita no tópico 1,1. (Spaan *et al.*, 2017).

1.2. Pandemia de COVID-19 e Seu Impacto na Frequência de *S. aureus*

Em dezembro de 2019, foram relatados diversos casos de pneumonia de causa desconhecida em Wuhan, na China. Ainda no mesmo mês, foi descoberto que os casos da doença eram causados por um novo vírus denominado inicialmente de 2019-nCoV, que depois foi renomeado de SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), e a doença por ele causada foi chamada de COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) [Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), 2023].

No final do mês de janeiro 2020, tendo em vista os diversos casos de COVID-19, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou emergência de saúde pública de interesse internacional (PHEIC – do inglês, *public health emergency of international concern*), o mais alto nível de alerta da organização. Em março do mesmo ano, foi declarada pandemia de COVID-19. Três anos depois, considerando as taxas de imunização e a diminuição do número de casos, a OMS retirou o estado de emergência de saúde pública internacional com relação ao SARS-Cov-2 (OPAS, 2023).

Durante a pandemia de COVID-19 houve um intenso uso de antibióticos e saneantes, o que proporcionou um ambiente de grande pressão seletiva sobre os microrganismos, o que pode ter culminado com o aumento da aquisição de resistência e seleção de cepas MRSA-MDR, além de sua disseminação no ambiente hospitalar como já relatado (Rizvi & Ahammad, 2022).

Durante o período de pandemia, a OMS recomendou o uso de saneantes, como álcool 70°, na prevenção de COVID-19 (OMS, 2023). Além disso, houve um elevado número de pacientes que foram submetidos à antibioticoterapia no decorrer de sua internação (Echeverría-Esnal *et al.*, 2020; Mirzaei *et al.*, 2020; Ghosh; Bornman; Zafer, 2021). Cornejo-Juárez e colaboradores (2023) observaram, em estudo clínico envolvendo 639 pacientes com IRAS, no México, que a superlotação de Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) e o uso de protocolos inadequados de tratamento, como o elevado uso de antimicrobianos e esteroides, podem ter contribuído para coinfeções bacterianas durante a pandemia de COVID-19. Esse tipo de coinfeção resultou em uma maior taxa de mortalidade entre os pacientes (Wu *et al.*, 2022).

Staphylococcus aureus resistente à meticilina foi o microrganismo mais encontrado causando infecções hospitalares em pacientes com COVID-19, segundo alguns autores (Bhargava *et al.*, 2021; Möllers *et al.*, 2022; Polly *et al.*, 2022). Contudo, em relação a colonização pelo patógeno, raros estudos têm sido descritos. Engen e colaboradores, 2021, em estudo realizado em Chicago avaliaram o microbioma da nasofaringe em indivíduos com e sem COVID-19 e verificaram uma maior abundância relativa de *Staphylococcus spp* em indivíduos com a doença quando comparado com indivíduos sem COVID-19. O aumento do número de casos de pacientes colonizados por *S. aureus* em hospitais durante a pandemia poderia resultar na seleção de amostras MDR devido à exposição à pressão antibiótica. Além disso, em unidades de saúde onde o MRSA é endêmico, a admissão de pacientes colonizados poderia contribuir para a sua propagação. Dessa forma, detectar a colonização prévia por *S. aureus* na prevenção de IRAS, especialmente em um contexto de grande pressão seletiva, como foi o período de emergência de saúde pública de interesse internacional causado pela COVID-19, torna-se relevante e poderia contribuir para o controle e redução nas taxas de infecções.

2. JUSTIFICATIVA

A colonização prévia por *S. aureus* é um importante fator de risco para adquirir IRAS. Dessa forma, pacientes hospitalizados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) e colonizados por esse microrganismo são susceptíveis a desenvolver infecção, culminando com um maior tempo de internação, maiores custos do tratamento e pior prognóstico. Além disso, UTIs são ambientes de alta pressão seletiva onde microrganismos com susceptibilidade reduzida a antimicrobianos e saneantes podem ser selecionados.

No período em que ocorreu a coleta de amostras dessa coorte retrospectiva (Setembro/2020 - Setembro/2021) havia a pandemia de COVID-19, a qual levou muitas pessoas a ficarem internadas em UTIs. Quadros clínicos causados pelo SARS-CoV-2 foram associados a maior uso de antimicrobianos e de dispositivos médicos invasivos, especialmente em UTIs. Aliado a esse cenário, havia uma maior preocupação com a higienização de mãos, ambientes e alimentos, e, por consequência, um maior uso de saneantes/desinfetantes nas residências e nos hospitais. Esses fatos contribuíram para um aumento geral na pressão seletiva sobre os microrganismos, e, possivelmente, houve a transferência horizontal de genes de resistência, assim como a aquisição de resistência por mutações pontuais, principalmente em ambientes com grande pressão seletiva, como os hospitais, tornando preocupante a disseminação de cepas MRSA.

Dado o exposto, esse estudo poderá fornecer dados relacionados aos padrões de resistência das cepas de *S. aureus* relacionadas à colonização de pacientes presentes no hospital no período pandêmico. Ademais, a análise de cepas sequenciais oriundas de colonização nasal de um mesmo paciente poderá indicar a aquisição de resistência intra-hospitalar, bem como possíveis transmissões horizontais, e como isso influenciou o desfecho clínico.

3. OBJETIVO

Caracterizar amostras nasais de *Staphylococcus aureus* de vigilância epidemiológica coletadas semanalmente de pacientes internados em UTIs de um hospital público durante a pandemia de COVID-19, avaliando sua susceptibilidade a antimicrobianos, a presença de genes de tolerância a saneantes e sua diversidade clonal.

3.1. Estratégias

1. Confirmar a identificação bacteriana através da técnica de MALDI- TOF/MS;
2. Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos através da técnica de disco difusão em ágar;
3. Detectar o tipo de SCCmec por PCR;
4. Detectar os genes *qacA/B* e *smr*, associados a saneantes, por PCR;
5. Detectar os genes *erm(T)*, *luk- PV* e *scn*, marcadores do CC398, através de PCR;
6. Caracterizar as linhagens clonais das amostras sequenciais selecionadas através da análise dos perfis de fragmentação do DNA por PFGE;
7. Relacionar os dados clínicos dos pacientes com os resultados microbiológicos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho e fluxograma do estudo

O presente estudo é uma coorte prospectiva e faz parte de um projeto maior registrado e aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa inscrito sob o número CAAE: 39277320.5.0000.5284 (ANEXO 1). O Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ, um hospital público e terciário da cidade do Rio de Janeiro, se tornou referência no tratamento de COVID-19 durante o período pandêmico. Por não possuir emergência ativa, os pacientes com diagnóstico de COVID-19, internados na UTI COVID (UTIC), eram oriundos de outras unidades de saúde. Os pacientes internados nessa unidade tiveram o diagnóstico da doença confirmado através de RT-PCR. Já os pacientes internados na UTI Não-COVID-19 (UTINC), ou seja, sem a doença, eram pacientes em tratamento regular no hospital, que atende principalmente pacientes com doenças crônicas de base e muitos com altos scores de Charlson. O hospital possui cerca de 300 leitos ativos e durante a pandemia se tornou referência para o tratamento da doença. Os leitos de cuidados intensivos aumentaram de 17 para 51 leitos, sendo cerca de 37 reservados para pacientes da UTI COVID-19 e outros 14 leitos ficaram destinados a pacientes sem o diagnóstico de COVID-19. A limpeza dos leitos e do ambiente era realizada com álcool e produtos à base de cloro, respectivamente, em ambas as UTIs.

Durante o período de setembro/2020 e setembro/2021, foram coletados *swabs* nasais de vigilância epidemiológica de todos os pacientes internados em UTIs, com e sem diagnóstico de COVID-19. As coletadas foram realizadas até 72 horas a partir da admissão do paciente nas UTIs e, logo após, semanalmente até que houvesse a positividade do *swab* para *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) ou o paciente fosse removido da unidade, seja por alta médica ou óbito. Foram incluídos nesse estudo pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, que possuíssem prontuário e com duas ou mais amostras positivas para *S. aureus*.

Os *swabs* coletados foram semeados para triagem em ágar manitol-salgado (BD, Becton-Dickson and Company; Sparks, MD, USA) pelo Laboratório de Bacteriologia Clínica do Serviço de Patologia do hospital. Todas as amostras que cresceram nesse meio seletivo foram destinadas ao Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, onde foram acondicionadas em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*, BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA) com 20% (v/v) de glicerol (Proquimios Comércio e Indústria Ltda; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e estocadas a -20°C (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989).

As amostras controles para os experimentos realizados nesse trabalho encontram-se na tabela 1. O fluxograma deste estudo pode ser observado na figura 1.

Tabela 1 – Amostras controles que foram utilizadas no presente estudo

Espécie	Amostra	Característica	Referência
	ATCC 25923	Controle padrão para teste de disco-difusão	CLSI, 2020
	119a	SCCmec tipo I; linhagem Cordobés/ ST5	Teixeira <i>et al.</i> , 2012
	Mu50	SCCmec tipo II; linhagem USA100/ST5	Hiramatsu <i>et al.</i> , 1997
	63a	SCCmec tipo III; CEB/ST239	Augusto <i>et al.</i> , 2022
<i>Staphylococcus aureus</i>	522a	SCCmec tipo IV; USA 1100/ST30	Augusto <i>et al.</i> , 2022
	577a	SCCmec tipo V	Augusto <i>et al.</i> , 2022
	1759a	Amostra clínica parcialmente sequenciada. Controle positivo para <i>smr</i>	De Oliveira TRL, 2019
	1591a	Amostra clínica parcialmente sequenciada Controle positivo para <i>qac</i> (A/B)	De Oliveira TRL, 2019
	39c	Amostra clínica parcialmente sequenciada do ST398, Controle positivo para <i>erm</i> (T) e <i>scn</i>	Guimarães L.C. 2022
	526	Amostra clínica parcialmente sequenciada. Controle positivo para <i>luk- PV</i>	Augusto <i>et al.</i> , 2022
<i>Escherichia coli</i>	DH5a	Calibrador do MALDI-TOF	na

ATCC: *American Type Culture Collection*; a: amostra clínica; CEB: Clone endêmico brasileiro; CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; na: não se aplica.

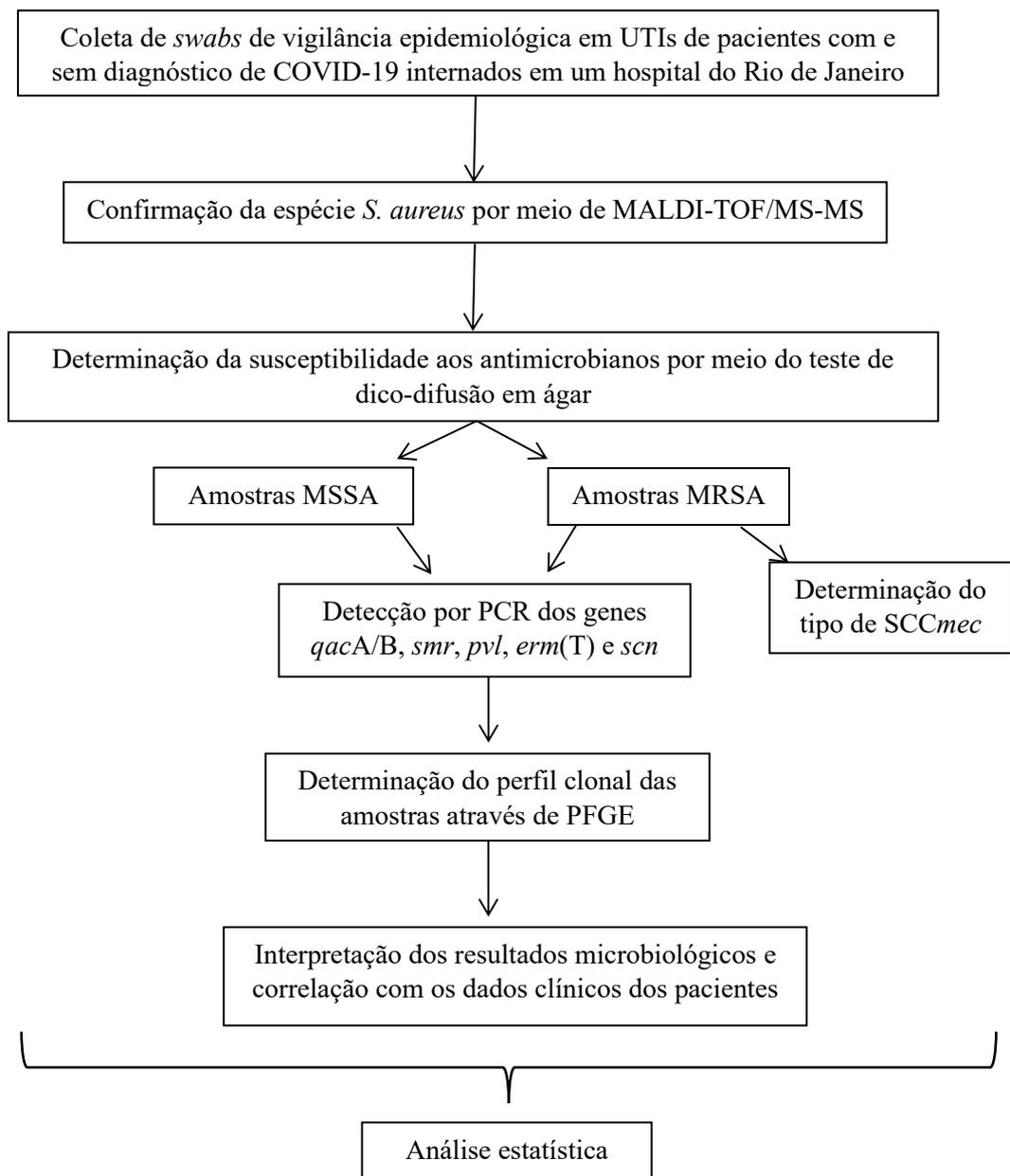


Figura 1: Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo.

UTI: unidade de terapia intensiva; MALDI-TOF-MS: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry* MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à metilina; SCCmec: *Staphylococcal Cassete Chromosome mec*; PFGE: *Pulse Field Gel Electrophoresis*;

4.2. Identificação das amostras

Todas as amostras foram confirmadas quanto à espécie por meio da metodologia de MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry*). Para essa confirmação as amostras foram cultivadas em TSA (*Trypticase Soy Agar*, Maryland, EUA) por 24 horas, a 35 °C. Após o crescimento, com o auxílio de um palito

de madeira, as colônias foram tocadas e colocadas na placa de metal oferecida pelo fabricante do equipamento MALDI-TOF Microflex LT (*Bruker Daltonics*). Esse experimento foi realizado em duplicata para cada amostra. Em seguida, foi colocado 1 µl de ácido fórmico (*Sigma Chemical Company*; Saint Louis, Missouri, EUA) sobre cada amostra e, após secagem a temperatura ambiente, foi adicionado 1µl de matriz, constituída por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, *Sigma Chemical Company*) preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5% (*Sigma*). Depois de seca, a placa foi colocada no aparelho em que a leitura foi realizada. A estirpe DH5 α de *Escherichia coli* foi utilizada como calibradora, e todos os índices foram processados conforme o padrão por meio do software de bioinformática MALDI *Biotyper* versão 3.1 (*Bruker Daltonics*). Esse software pesquisa em sua biblioteca de dados espectros de referência que sejam parecidos com os índices da amostra analisada. Identificações com score entre 2.000 e 3.000 foram determinadas como confiáveis nesse estudo, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Descrição do significado de cada faixa de *score* utilizada para interpretação dos resultados emitidos na técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo - espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS)

Intervalo	Descrição	Símbolo	Cor
2.000 – 3.000	Identificação de grande fiabilidade	(+++)	Verde
1.700 – 1.999	Identificação de baixa fiabilidade	(+)	Amarelo
0.000 – 1.699	Identificação de organismo impossível	(-)	Vermelho

Tabela adaptada de *BrukerDaltonik MALDI BiotyperClassificationResults*

4.3. Determinação do perfil de susceptibilidade

A determinação da susceptibilidade das amostras foi realizada por meio da técnica de disco-difusão. Foram utilizados discos de cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), linezolid (30µg), mupirocina (200 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30µg) e sulfametoxazol-trimetoprim (SXT, 25 µg) (Oxoid, Cambridge, Reino Unido), como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). Primeiramente, as amostras foram semeadas em TSA e incubadas por 24 h, a 35 °C. Após o crescimento, foi realizada uma suspensão bacteriana em solução salina a 0,85% ajustando a turbidez de acordo com a escala 0,5 de

McFarland, (Densidade Ótica_{600 nm} = 0,08 a 0,1 [*Cell Density Meter*, Biochrom LTDA, Cambridge, Inglaterra]; cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Esse inóculo foi semeado em ágar Müller-Hinton (BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA) de maneira confluyente com o auxílio de um *swab*. Posteriormente à semeadura, os discos de antimicrobianos foram depositados sobre o meio, e então a placa com a amostra foi incubada à 35 °C, por 16 a 18 h. Como controle de sensibilidade desse experimento foi utilizada a amostra de *S. aureus* ATCC 25923, como recomenda o CLSI (2020).

Os halos de inibição formados ao redor dos discos de antimicrobianos foram medidos e interpretados de acordo com os valores estabelecidos pelo CLSI (2023) e conforme o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast, 2023). Os valores utilizados para análise dos halos de todos os antimicrobianos, segundo o CLSI (2023) e BrCast (2023) estão descritos na tabela 3. O uso do BrCAST é preconizado para laboratórios clínicos do Brasil, assim, a interpretação dos resultados obtidos via esse manual está descrita nesse estudo. Contudo, todas as análises aqui realizadas foram baseadas nos critérios descritos pelo CLSI (2023) para uma melhor comparação com outros estudos, especialmente publicações internacionais. As amostras foram consideradas *multidrug resistant* (MDR) quando resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos, exceto a penicilina.

Tabela 3. Descrição das categorias de susceptibilidade e seus respectivos pontos de corte para interpretação dos valores de halo de inibição para amostras de *Staphylococcus aureus* de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023) e segundo o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast, 2023).

Antimicrobiano	Categorias de susceptibilidade de acordo com o halo de inibição em mm					
	Segundo o CLSI ^a			Segundo o BrCast ^b		
	Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Cefoxitina	≥ 22	-	≤ 21	≥ 22	-	< 22
Ciprofloxacina	≥ 21	16 - 20	≤ 15	≥ 50	21 - 49	< 21
Clindamicina	≥ 21	15 - 20	≤ 14	≥ 22	-	< 22
Eritromicina	≥ 23	14 - 22	≤ 13	≥ 21	-	< 21
Gentamicina	≥ 15	13 - 14	≤ 12	≥ 18	-	< 18
Linezolida	≥ 21	-	≤ 20	≥ 21	-	< 21
Mupirocina	Com halo	-	Sem halo	≥ 30	-	< 18
Penicilina	≥ 29	-	≤ 28	≥ 26	-	< 26
Rifampicina	≥ 20	17 - 19	≤ 16	≥ 26	-	< 26
Tetraciclina	≥ 19	15 - 18	≤ 14	≥ 22	-	22
SXT	≥ 16	11 - 15	≤ 10	≥ 17	14 - 16	< 14

^aCLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; ^bBrCast: *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim

Foi realizado também o teste de indução de resistência a clindamicina por eritromicina (teste D) associado ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos, de acordo com as orientações do CLSI (2020). Para esse teste, o disco de clindamicina (2 µg) foi aplicado em uma distância de 20 mm (borda a borda) do disco de eritromicina (15 µg). Após o posicionamento dos discos, o meio foi incubado a 35 °C por 16 a 18 h. Se porventura a amostra fosse resistente à eritromicina haveria um achatamento na zona de inibição da clindamicina, no formato da letra D, configurando um fenótipo de resistência induzida (iMLSb). A resistência concomitante à eritromicina e à clindamicina demonstraria um fenótipo de resistência constitutiva (cMLSb). Por fim, há a possibilidade de a amostra apresentar halo de inibição apenas à clindamicina, e neste caso o fenótipo é MSb.

4.4. Métodos moleculares

4.4.1. Obtenção do DNA

O DNA das amostras foi obtido por meio de lise com o isotiocianato de guanidina, segundo Pitcher, Saunders e Owen (1989), com adaptações. Inicialmente, as amostras foram semeadas em TSA e incubadas a 35 °C, por 24 h. Após incubação, cerca de 3 a 5 colônias do crescimento bacteriano foram transferidas para um microtubo (Eppendorf Mastercycler Gradient; Hamburgo, Alemanha), contendo 1 mL de tampão TE [Tris 10 mM (Invitrogen, EUA), EDTA 1 mM, pH 7,8 (Promega, EUA)] e em seguida, foi centrifugado em microcentrífuga (Eppendorf) por 5 minutos a 8000 g, com posterior descarte do sobrenadante. O sedimento foi acrescido de 100 µL da solução de lise [1 mL de tampão TE, 10 mg de lisozima (Sigma-Aldrich Chemical Company), 50 µL de polietilenoglicol [BRIJ a 0,5% (p/v)] (Sigma-Aldrich Chemical Company)], complementada com 5 µL de lisostafina (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich Chemical Company). A mistura foi incubada por 2 horas a 37 °C em banho maria. Após a incubação, foram adicionados 500 µL de solução de isotiocianato de guanidina (Life Technologies, Gathersburg, MD, EUA) na concentração de 5 M, com agitação manual e incubação por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os lisados foram incubados no gelo por 10 minutos e, então, foi adicionado 250 µL de acetato de amônio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) na concentração de 7,5 M. Uma nova agitação manual foi realizada e 500 µL de clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1 (v/v) foram adicionados e homogeneizados de forma manual. A solução foi centrifugada por 12 minutos a 13000 g e cerca de 800 µL da fase aquosa foram retiradas e transferidas para um novo microtubo. Posteriormente, ocorreu a adição de 0,54 volumes (aproximadamente 430 µL) de isopropanol gelado (Vetec). Os tubos foram, levemente, agitados por cerca de 1 minuto e centrifugados por 5 minutos a 13000 g e com o auxílio de uma micropipeta o sobrenadante foi descartado. O sedimento de DNA foi lavado com etanol (Vetec) gelado a 70%, centrifugado novamente a 13000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O DNA precipitado foi acrescido de 50 µL de tampão TE para ressuspensão e incubado por 1 h em banho maria a 55 °C. Após esse período, a concentração de DNA obtido foi quantificada em Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). O DNA foi estocado a -20 °C para posterior utilização nas técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

4.4.2. Determinação do tipo de SCCmec

As amostras de *S. aureus* classificadas como resistentes à cefoxitina (MRSA) no teste de difusão utilizando o disco de cefoxitina tiveram seu SCCmec tipificado, segundo o protocolo descrito por Milheiriço e colaboradores (2007).

O *mix* utilizado na reação da PCR para a determinação do SCC*mec* foi constituído por 3 µL de DNA, contendo aproximadamente 90 ng, 5 µL de tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Promega, Madison, WI, EUA); 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega); 0,2 µM dos oligonucleotídeos kdp F1, kdp R1, MRS1 e MRS2; 0,4 µM dos oligonucleotídeos CIF2 F2, CIF2 R2, RIF5 R10, RIF5 R13, SCC*mec*V J1F, SCC*mec*V J1R, SCC*mec*III J1F, SCC*mec*III J1R e 0,8 µM dos oligonucleotídeos ccrC F2, ccrC R2, des F2, des R2, ccrB2 F2, ccrB2 R2, mecI P2 e mecI P3. Para chegar ao volume final de 50 µL o *mix* foi avolumado com água de injeção. As sequências dos fragmentos dos ácidos nucleicos utilizados, o tamanho dos amplicons esperados e a especificidade de cada tipo de SCC*mec* estão discriminadas na tabela 4. O par de oligonucleotídeos MRS1 e MRS2 foi utilizado como controle interno da reação da PCR (Santos *et al.*, 1999).

Os fragmentos de ácidos nucleicos foram amplificados em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha) em que a desnaturação inicial ocorreu a 92°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação tendo a desnaturação a 94 °C por 30 segundos, a hibridização ocorreu a 53°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 1 minuto. A reação foi finalizada com uma extensão final por 4 minutos a 72°C.

A análise dos *amplicons* resultantes da PCR foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) (Invitrogen Carlsbad, EUA), em TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). O gel foi corado com Unisafe® (*Uniscience*, Flórida, EUA) com a concentração final de 0,5X e a imagem foi capturada em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Alemanha) sob luz ultravioleta. As estirpes 119a (SCC*mec*I), MU50 (SCC*mec*II), 63a (SCC*mec*III), 522a (SCC*mec*IV) e 577a (SCC*mec*V) foram utilizadas como controles. O marcador 100pb DNA Ladder (Promega, Wisconsin, EUA) foi utilizado para avaliar o tamanho dos fragmentos de DNA.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR multiplex para tipagem do *SCCmec* (Milheiriço *et al.*, 2007)

Oligonucleotídeos	Seqüência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Especificidade (tipo de <i>SCCmec</i>)
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	I
ccrC F2 ccrC R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	V
kdp F1 kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284	II
mecI P2 mecI P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209	II, III
dcs F2 dcs R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	I, II, IV
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	414	III
SCCmec V JIF SCCmec VJIR	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	377	V
SCCmec II JIF SCCmec III JIR	CATTTGTAGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243	III
ccrB2 F2 ccrB2 R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAGGGTTAGC	311	II, IV
MRS1 MRS2	TAGAAATGACTGAACGTCCG TTGCGATCAATGTTACCGTAG	154	Controle interno (<i>mecA</i>)

4.4.3. Detecção de genes relacionados a bombas de efluxo

Todas as amostras foram submetidas à detecção dos genes *qacA/B* e *smr* (também nomeado de *qacC*), relacionados a bombas de efluxo. A detecção desses genes foi realizada através de PCR *uniplex*, a qual foi realizada por meio de termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient). A reação continha tampão da enzima 1 X (10 mM de Tris-HCl, 25 mM de KCl), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 5 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de cada um dos dNTP (Promega) e 1 µL (30 ng) de DNA bacteriano, completando-se o volume com água de injeção para 25 µL de reação.

Os amplicons foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% p/v em TBE 0,5X (Ácido bórico 50 mM [Promega, EUA]; Tris 50mM [Invitrogen, EUA]; EDTA 0,2 mM [Promega, EUA]). O gel foi corado com Unisafe®, sendo a concentração final de 0,5 X de Unisafe®. O marcador 100pb DNA ladder (Promega). foi usado como padrão de tamanho de DNA e a imagem foi capturada em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Alemanha) sob luz ultravioleta. As amostras 1591a e 1759a foram utilizadas como controles para as reações de amplificações dos genes *qacA/B* e *smr*, respectivamente. Os ciclos utilizados, a sequência dos oligonucleotídeos, o tamanho dos amplicons formados e as referências utilizadas estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos nas PCR utilizadas para a detecção dos genes relacionados a bombas de efluxo

Genes	Sequência (5'-3')	Fragmento amplificado	Ciclo de amplificação	Referência
<i>qacA/B</i>	F: GCAATTTTCATGGCACTCGGCA R: GCCCACTACAGATTCTTCAGCT	837 pb	95°C – 5 min 94°C – 1 min 56°C – 1 min 72°C – 1 min 72°C – 5 min	30x Alam <i>et al.</i> , 2003
<i>smr</i>	F: GCCATAAGTACTGAAGTTATTG GAAGTG R: CAAATTCCAAATGAAATTATTG GTTCCCTAAGG	101 pb	95°C – 5 min 95°C – 30s 52°C – 1 min 72°C – 30s 72°C – 5 min	30x De Oliveira, 2019

pb: pares de bases.

4.4.4. Detecção dos genes relacionados aos marcadores do ST398

Todas as amostras foram investigadas quanto a presença dos genes *luk- PV*, *scn* e *erm(T)*, os quais são relatados como marcadores moleculares do *sequence type* 398 (Zeggay *et al.*, 2023). A detecção desses genes foi realizada através de PCR *uniplex* em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient).

Para a detecção desses genes, foram preparadas reações distintas, as quais continham um volume total de 25 µL, que apresentavam: tampão de enzima 1 X (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 5 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Pomega), 200 µM de cada um dos

dNTP (Promega) e 3 μ L contendo aproximadamente 90 ng de DNA bacteriano, completando-se o volume com água de injeção. Para os genes *luk-PV* e *scn* foram utilizados 2,5 μ M de cada oligonucleotídeo, já para o gene *erm(T)* foram utilizados 2,0 μ M de cada iniciador.

Todos os amplicons gerados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% p/v em TBE 0,5X (Ácido bórico 50 mM [Promega, EUA]; Tris 50mM [Invitrogen, EUA]; EDTA 0,2 mM [Promega, EUA]). O gel foi corado com Unisafe®, sendo a concentração final de 0,5 X de Unisafe®. O marcador de 100pb ladder (Promega) foi utilizado como padrão de tamanho de DNA e a imagem foi capturada em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Alemanha) sob luz ultravioleta. A amostra 526a foi utilizada como controle para a reação de amplificação do gene *luk-PV* e a amostra 39c foi usada como controle da reação de amplificação dos genes *scn* e *erm(T)*. Os ciclos utilizados para cada uma das reações, a sequência dos oligonucleotídeos utilizados, o tamanho dos amplicons formados e as referências utilizadas estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos nas PCR utilizadas para a detecção dos genes associados ao CC398

Genes	Sequência (5'-3')	Fragmento amplificado	Ciclo de amplificação	Referência
<i>Luk-PV</i>	F: ATCATTAGGTAAAATGTCTG GACATGATCCA R: GCATCAASTGTATTGGATA GCAAAAAGC	433 pb	94°C – 2 min 94°C – 30s 55°C – 30s 72°C – 1 min 72°C – 5 min	30x Lina <i>et al.</i> , 1999
<i>scn</i>	F: AGCACAAGCTTGCCAACA TCG R: TTAATATTTACTTTTTAGTGC	257 pb	94°C – 10 min 94°C – 30s 50°C – 30s 72°C – 1 min 72°C – 10 min	30x Van Wamel <i>et al.</i> , 2006
<i>erm(T)</i>	F: CCGCCATTGAAATAGATCCT R: TTCTGTAGCTGTGCTTT CAAAAA	200 pb	94°C – 10 min 94°C – 30s 50°C – 30s 72°C – 1 min 72°C – 10 min	30x Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2010

pb: pares de bases.

4.4.5. Caracterização das linhagens clonais das amostras sequenciais por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) após tratamento do DNA com as enzimas de restrição *SmaI* e/ou *ApaI*

Todas as amostras foram analisadas após fragmentação do DNA cromossômico pela ação das enzimas de restrição *SmaI* e/ou *ApaI*, seguida de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), segundo descrito por Vivoni e colaboradores, 2006, e Guimarães e colaboradores, 2022, com modificações.

Inicialmente, as amostras foram cultivadas em ágar sangue e incubadas a 35°C pelo período de 48 horas. Em seguida, foram preparadas suspensões bacterianas em tubos de ensaio contendo 3 mL de TSB, utilizando-se a escala 0,5 de McFarland (Densidade Ótica_{600 nm} = 0,08 a 0,1 [*Cell Density Meter*, Biochrom LTDA, Cambridge, Inglaterra]; cerca de 1,5 x 10⁸ UFC/mL). As suspensões bacterianas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 250 rpm por aproximadamente 2 horas até que fosse alcançada a turbidez proporcional a 2,0 de McFarland (Densidade ótica_{600nm} = 0,4 ou 0,5 [*Cell Density Meter*, Biochrom LTDA, Cambridge, Inglaterra]; aproximadamente 6,0 x 10⁸ UFC/ mL). Depois de obtida a turbidez desejada foram transferidos para um microtubo (Eppendorf Mastercycler Gradient) 1,5 mL do crescimento bacteriano, e este foi submetido a centrifugação a 5.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e, então, foram adicionados: 125 µL de PIV (NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6) e 125 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point Agarose*, IBI Technical, New Heaven, EUA) na concentração de 1,8% (p/v), preparada previamente em PIV e aquecida a 58°C. A solução preparada foi colocada em moldes e acondicionada à temperatura de 4 °C pelo período de 10 min para que a agarose se tornasse sólida. Posteriormente, os moldes foram cortados em pequenos blocos de aproximadamente 35 µL cada. Esses por sua vez foram colocados em microtubos contendo 1 mL de solução de lise EC (Tris-HCl 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, 0,5% [p/v] de Brij 58 e 0,5% [p/v] lauril sarcosinato de sódio, pH 7,5) complementado com lisostafina e lizozima (Sigma-Aldrich Chemical Company) nas concentrações finais de 0,05 mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente, e então foram incubados a 37 °C sob leve agitação por 16 a 18 horas. Em seguida, as amostras foram resfriadas a 4 °C pelo tempo de 10 minutos. Após o resfriamento a solução de lise foi desprezada e, então, substituída por 1 mL da solução ES [EDTA 0,4 M, pH 9,5, 1% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio] suplementada com Proteinase K na concentração final de 0,1 mg/mL. As amostras foram mantidas por 18 horas em banho-maria, a 50 °C. Depois do período de incubação, os tubos foram resfriados novamente a 4 °C por 10 minutos e, a solução ES foi substituída por 1 mL de

tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). Os blocos de agarose foram armazenados a 4 °C.

Em uma segunda etapa, e utilizando-se apenas um bloco de agarose por amostra, foi realizada a digestão do DNA cromossômico. O bloco selecionado foi transferido para um novo tubo, e, em seguida, este passou por cinco lavagens com 1 mL TE em banho-maria a 37 °C, ocorrendo todas as lavagens pelo período de 1 hora com exceção da penúltima, a qual ocorreu pelo período de 18 horas. Decorridas as lavagens, o tampão TE foi substituído por 150 µL do tampão 4, específico para a enzima de restrição *SmaI* (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra), na concentração final de 1X, sendo mantido a 25 °C pelo período de quatro horas. Perpassado esse tempo, o tampão foi removido e substituído por mais 150 µL do tampão 4 a 1X, agora acrescido com 20 U da enzima de restrição *SmaI*, com posterior incubação por 18 horas a 25 °C. Para as amostras que apresentaram os marcadores genotípicos do ST398 uma segunda digestão foi realizada com 10 U da enzima *ApaI* (New England BioLabs), em 150 µL do tampão 4 a 1X e suplementada com 1,5 µL de albumina sérica bovina 10 mg/ml (Promega; Madison, WI, EUA), por 1 h a 25 °C, posteriormente à digestão pela enzima *SmaI*. Decorrido esse período, o bloco de agarose foi fundido a 70 °C para então ser aplicado no gel de agarose, preparado com TBE 0,5X (Ácido bórico 50 mM [Promega, EUA]; Tris 50mM [Invitrogen, EUA]; EDTA 0,2 mM [Promega, EUA]; pH 8,0) na concentração de 1% (p/v). O gel então passou por uma eletroforese em gel de campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad, Hercules, EUA), tendo o tempo de pulso crescente de 1 a 35 segundos a 14 °C durante o tempo de 21 horas, a voltagem de 6 V/cm e ângulo de 120 °C. Após a eletroforese, o gel foi corado por 40 minutos através de submersão em brometo de etídio (Sigma, Aldrich Chemical Company, EUA) na concentração de 0,5 mg/L. A imagem do gel corado foi revelada por meio de luz ultravioleta através de um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Alemanha). Como padrão de tamanho de peso molecular, foi utilizado o marcador 50 – 1.000 Kb *Lambda Ladder PFGE Marker* (New England BioLabs, Massachusetts, EUA).

Os padrões dos fragmentos do DNA cromossômico obtidos foram analisados por meio da versão 7.6.3 do *software* Bionumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Esse programa analisa os agrupamentos por meio do coeficiente de similaridade *Dice* e o método *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA). Para agrupamento das amostras em um mesmo perfil clonal, elas deveriam apresentar no máximo quatro bandas de diferença ou, no mínimo, 80% de similaridade (Van Belkum *et al.*, 2009).

4.5. Dados clínicos dos pacientes

Os dados clínicos dos pacientes que apresentaram espécimes nasais positivos para *S. aureus* foram obtidos e organizados por meio do sistema informatizado do HUCFF (Medtrack) de maneira sigilosa através do número do prontuário e do registro laboratorial de cada amostra.

As informações coletadas estão relacionadas ao tipo de UTI, de acordo com o diagnóstico positivo ou negativo de COVID-19, ao gênero, a idade, ao tempo de internação, e ao tempo decorrido e ao uso de antimicrobianos desde a admissão até o primeiro *swab* positivo. Por ser este estudo de caráter retrospectivo, os resultados obtidos não interferiram no diagnóstico ou no tratamento dos pacientes.

4.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, Califórnia USA). As variáveis foram analisadas utilizando os testes exato de Fisher, Qui-quadrado e Mann-Whitney U. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando valor de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Caracterização dos dados clínicos e demográficos dos pacientes

O presente estudo avaliou espécimes nasais de vigilância epidemiológica de 10.408 pacientes, entre setembro/2020 e setembro/2021, os quais 7.691 estavam internados na UTIc e 2.717 na UTInc (Figura 2). Um total de 256 pacientes estavam colonizados por *S. aureus*, gerando 306 amostras. As taxas de incidência encontradas para *S. aureus* nas unidades foram: 5,98/1.000 pacientes-dia na UTIc e 43,06/1.000 pacientes-dia na UTInc ($p < 0,01$).

Entre os 256 pacientes colonizados, 33 apresentaram duas ou mais amostras sequenciais positivas para *S. aureus*, gerando um total de 78 amostras desta espécie, as quais fizeram parte do presente estudo e estão destacadas na figura 2. Entre esses 33 pacientes, 26 (78,8%) apresentaram duas amostras, enquanto sete (21,2%) apresentaram três ou mais amostras sequenciais do microrganismo. Um total de 14 pacientes (42,4%) estavam internados na UTIc, resultando em 33 amostras isoladas neste setor e 19 (57,6%) estavam na UTInc, gerando um total de 45 amostras (Figura 2).

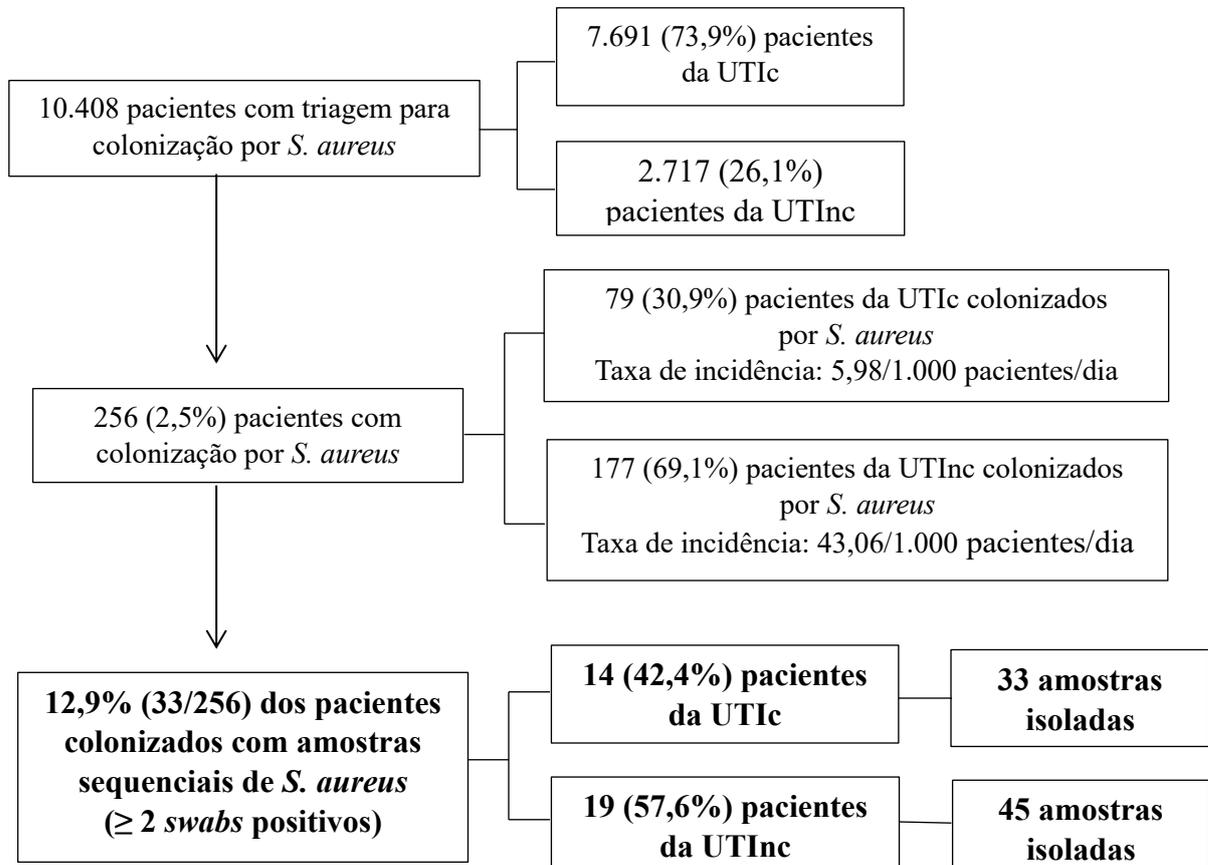


Figura 2. Fluxograma do estudo. UTIc: Unidade de Terapia Intensiva COVID-19; UTInc: Unidade de Terapia Intensiva não COVID-19

Os aspectos sociodemográficos e clínicos associados a pacientes com amostras sequenciais estão apresentados na Tabela 7. A média de idade dos pacientes foi de 59,42 anos e houve maior número de internações de mulheres. O percentual de pacientes que utilizaram antimicrobianos desde a admissão até o primeiro *swab* positivo foi maior entre aqueles que estavam internados na UTIc (64,3%) do que aqueles da UTInc (47,4%) ($p = 0,4824$). O tempo de internação observado para que um paciente fosse colonizado por *S. aureus* foi inferior entre aqueles diagnosticados com COVID-19 (média de 8,29 dias) do que entre pacientes sem a doença (média de 27,16 dias) ($p = 0,0354$). Assim como, o tempo decorrido desde a admissão até o primeiro *swab* MRSA também foi inferior no setor de COVID-19 ($p = 0,3271$)

Tabela 7 – Características associadas aos 33 pacientes internados em UTIs durante a pandemia de COVID-19 em um hospital do Rio de Janeiro e que apresentaram amostras sequenciais nasais de *Staphylococcus aureus*.

Características^a	Total (n=33)	UTI COVID-19 (n=14)	UTI não COVID-19 (n=19)
Idade [anos – média (SD)]	59,42 (19,85)	59,86 (18,08)	59,11 (21,54)
Gênero			
Masculino	16 (48,5%)	9 (64,3%)	7 (36,8%)
Feminino	17 (51,5%)	5 (35,7%)	12 (63,2%)
Tempo de internação (dias– média [SD])	56,91 (63,09)	57,57 (68,07)	56,42 (61,06)
Uso de ATB durante a hospitalização			
Sim	26 (78,8%)	14 (100%)	12 (63,2%)
Não	7 (21,2%)	0	7 (36,8%)
Desfecho			
Alta médica	16 (48,5%)	6 (42,9%)	10 (52,6%)
Óbito	17 (51,5%)	8 (57,1%)	9 (47,4%)
Tempo desde a admissão até o primeiro <i>swab</i> positivo [dias– média (SD)] ^b	19,15 (38,55)	8,29 (6,81)	27,16 (49,48)
Uso de ATB da admissão até o primeiro <i>swab</i> positivo			
Sim	18 (54,5%)	9 (64,3%)	9 (47,4%)
Não	15 (45,5%)	5 (35,7%)	10 (52,6%)
Tempo desde a admissão até o primeiro <i>swab</i> MRSA [dias– média (SD)]	25,50 (21,67)	13,50 (2,12)	29,50 (24,08)

^a recorte dos 33 pacientes analisados nesse estudo; ^b diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$

5.2 Identificação das amostras através da técnica de MALDI-TOF MS

Os *swabs* de vigilância epidemiológica foram coletados e semeados em ágar manitol salgado para uma triagem inicial realizada pelo serviço de bacteriologia clínica do hospital universitário. A triagem inicial resultou em 306 amostras confirmadas como *S. aureus* por meio da técnica de MALDI- TOF/MS. Destas, 78 eram amostras sequenciais oriundas de 33 pacientes, as quais foram avaliadas no presente estudo.

5.3. Determinação da susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade das 78 amostras foram determinados segundo os critérios do CLSI (2023) e do BrCAST (2023) como estão descritos nas tabelas 8 e 9. O BrCAST foi utilizado neste estudo pois é o preconizado para laboratórios clínicos brasileiros. Todavia, apenas os parâmetros relacionados ao CLSI (2023) foram utilizados para as análises estatísticas para melhor comparação com outros estudos, especialmente internacionais.

Segundo o preconizado pelo CLSI, entre as 78 amostras analisadas, 11 (14,1 %) foram resistentes à cefoxitina (amostras MRSA) (tabela 8). Para as demais classes de antimicrobianos, as taxas de resistência encontradas foram: 94,9% (74/78) para penicilina, 76,9% (60/78) para eritromicina, 66,7% (52/78) para clindamicina, 37,2% (29/78) para gentamicina e 3,8% (3/78) para ciprofloxacina. Todas as amostras foram sensíveis a linezolida, tetraciclina, rifampicina, SXT e mupirocina.

As taxas de resistência a penicilina, eritromicina, clindamicina e gentamicina entre as 11 amostras MRSA foram de 100% (11/11), 81,8% (9/11), 45,6% (5/11) e 18,2% (2/11), respectivamente, enquanto entre as 67 amostras MSSA as taxas foram de 94% (63/67), 76,1% (51/67), 70,1 (47/67) e 40,3 (27/67), respectivamente (tabela 8).

Tabela 8. Taxas de não- susceptibilidade das 78 amostras de *Staphylococcus aureus* aos 11 antimicrobianos testados segundo a resistência à meticilina e os critérios apresentados pelo CLSI (2023)

Antimicrobiano	Nº (%) de amostras não- susceptíveis		
	Total (78)	MRSA (11)	MSSA (67)
Cefoxitina	11 (14,1)	11 (100)	0
Ciprofloxacina	3 (3,8)	3 (100)	0
Clindamicina	52 (66,7)	5 (45,5)	47 (70,1)
➤ Fenótipo <i>i</i> MLS _B	50 (64,1)	4 (36,4)	46 (68,7)
Eritromicina	60 (76,9)	9 (81,8)	51 (76,1)
Gentamicina	14 (17,9)	2 (18,2)	27 (40,3)
Linezolida	0	0	0
Mupirocina	0	0	0
Penicilina	74 (94,9)	11 (100)	63 (94)
Rifampicina	0	0	0
Tetraciclina	0	0	0
SXT	0	0	0

*i*MLS_B: Fenótipo de resistência induzida; SXT: Sulfametoxazol- Trimetoprim

Não foi observada diferença estatística entre os perfis de susceptibilidade das amostras das UTIs avaliadas. Verificou-se que o percentual de amostras não-sensíveis ficou acima dos 60% para os antimicrobianos clindamicina, eritromicina e penicilina, segundo critérios do CLSI e do BrCast (tabela 9).

A análise realizada segundo os critérios preconizados pelo BrCAST quando comparados àqueles determinados pelo CLSI mostrou diferença nas taxas para os antimicrobianos ciprofloxacina, mupirocina, rifampicina e tetraciclina, com valores de 100%, 10,3 %, 7,7% e 2,6% de não-susceptibilidade, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação dos perfis de susceptibilidade das amostras de *Staphylococcus aureus* aos 11 antimicrobianos testados segundo os critérios apresentados pelo CLSI (2023) e BrCAST (2023) em ambas as UTIs avaliadas.

Antimicrobiano	Nº (%) de amostras não-sensíveis						
	CLSI (2023) ^a				BrCast (2023) ^b		
	Total (n = 78)	UTIc (n = 33)	UTInc (n = 45)	Valor de p	Total (n = 78)	UTIc (n = 33)	UTInc (n = 45)
Cefoxitina	11 (14,1)	3 (9, 1)	8 (17 8)	0,3388	11 (14,1)	3 (9,1)	8 (17,8)
Ciprofloxacina	3 (3,8)	0 (0)	3 (6,7)	0,2582	78 (100)	33 (100)	45 (100)
Clindamicina	52 (66,7)	24 (72, 7)	28 (62,2)	0,3309	52 (66,7)	24 (72,7)	28 (62,2)
Eritromicina	60 (76,9)	26 (78,8)	34 (75,6)	0,7378	60 (76,9)	26 (78,8)	34 (75,6)
Gentamicina	29 (37,2)	14 (42,4)	15 (33,3)	0,4118	29 (37,2)	14 (42,4)	15 (33,3)
Linezolida	0	0	0	1	0	0	0
Mupirocina	0	0	0	1	8 (10,3)	2 (6,1)	6 (13,3)
Penicilina	74 (94,9)	32 (97,0)	42 (93,3)	0,6335	74 (94,9)	32 (97)	42 (93,3)
Rifampicina	0	0	0	1	6 (7,7)	2 (6,1)	4 (8,9)
Tetraciclina	0	0	0	1	2 (2,6)	1 (3)	1 (2,2)
SXT	0	0	0	1	0	0	0

UTIc: Unidade de Tratamento Intensivo COVID- 19; UTInc: Unidade de Tratamento Intensivo Não COVID- 19; SXT: Sulfametoxazol- Trimetoprim; ^a amostras com resistência intermediária e plena; ^b apenas amostras com resistência plena, segundo critérios do BrCast a categoria Intermediária = sensível com aumento de exposição.

O teste de disco-aproximação, também chamado de teste D, para a análise dos fenótipos $iMLS_B$, $cMLS_B$ e MS_B foi realizado para as 60 amostras de *S. aureus* não sensíveis à eritromicina, segundo o CLSI (2023). Os fenótipos $iMLS_B$, $cMLS_B$ e MS_B foram detectados em 83,3% (50/60), 1,7% (1/60) e 13,3% (8/60) das amostras, respectivamente. Entre amostras MRSA o fenótipo $iMLS_B$ foi detectado em 44,4% (4/9) das amostras, enquanto entre amostras MSSA este fenótipo foi verificado em 90,2% (46/51) delas com um valor de p igual a 0,0007. Com relação ao fenótipo MS_B , foi observada uma taxa de 44,4% (4/9) das amostras MRSA, já dentre as amostras MSSA esse percentual foi de 7,8% (4/51) com um p valor de 0,0134. Não foi possível classificar uma amostra MSSA da UTInc em nenhuma das categorias previamente descritas, visto que a amostra apresentou resistência plena a eritromicina e resistência intermediária a clindamicina. A distribuição dos fenótipos de acordo com a UTI e a susceptibilidade a meticilina pode ser observada na tabela 10.

Tabela 10. Distribuição dos fenótipos MLS_B encontrados em 60 amostras de *Staphylococcus aureus* não sensíveis à eritromicina de acordo com o tipo de Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) e susceptibilidade a meticilina.

Perfil de susceptibilidade	Fenótipo associado (n/%)	n (%) de amostras					
		Tipo de UTI		Valor de <i>p</i>	Susceptibilidade a meticilina		Valor de <i>p</i>
		UTIC (n = 26)	UTInc (n = 34)		MRSA (n = 9)	MSSA (n = 51)	
ERI (R) + CLI (halo D)	_i MLS _B (50/83,3)	24 (92,3)	26 (76,5)	0,1634	4 (44,4)	46 (90,2)	0,0007
ERI (R) + CLI (R)	_c MLS _B (1/1,7)	0	1 (2,9)	1	1 (11,1)	0	0,1500
ERI (R ou I) + CLI (S)	MS _B (8/13,3)	2 (7,7)	6 (17,6)	0,4463	4 (44,4)	4 (7,8)	0,0134
ERI (R) + CLI (I)	Não aplicável (1/ 1,7)	0	1 (2,9)	1	0	1 (2)	1

CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; I: Intermediário; R: Resistente; S: Sensível; UTIC: Unidade de Tratamento Intensivo COVID- 19; UTInc: Unidade de Tratamento Intensivo Não COVID- 19; *p*- valor < 0,05 destacados em negrito

O perfil de susceptibilidade das amostras sequenciais também foi avaliado pareando-se as amostras de um mesmo paciente. Os resultados mostraram que amostras de quatro pacientes internados na UTIc apresentaram alterações quanto a sensibilidade a pelo menos um dos seguintes antimicrobianos: cefoxitina, clindamicina, eritromicina e/ou gentamicina (tabela 11). Alterações de susceptibilidade também foram observadas para amostras de 10 pacientes oriundos da UTInc (tabela 12).

Tabela 11. Perfil de susceptibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* sequenciais de um mesmo paciente com aquisição/perda de resistência antimicrobiana em pacientes com diagnóstico de COVID- 19.

Nº do paciente	Nº da Amostra	Data da coleta	Antimicrobiano			
			FOX	CLI	ERI	GEN
2	2193	22/02/2021	S	S	S	S
	2203	02/03/2021	R	halo D	R	S
22	2328	20/07/2021	S	S	S	S
	2336	27/07/2021	S	S	S	I
	2350	03/08/2021	S	S	S	I
24	2333	23/07/2021	S	S	S	S
	2342	28/07/2021	R	halo D	R	I
27	2343	28/07/2021	R	halo D	R	I
	2458	10/08/2021	S	halo D	R	S

CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; FOX: cefoxitina; R: resistente; I: intermediário; S: sensível; mudanças no perfil destacadas em negrito.

Tabela 12. Perfil de susceptibilidade das amostras de *Staphylococcus aureus* sequenciais de um mesmo paciente com aquisição/perda de resistência antimicrobiana em pacientes sem diagnóstico de COVID- 19.

Nº do paciente	Nº da Amostra	Data da coleta	Antimicrobiano			
			FOX	CLI	ERI	GEN
4	2060	17/09/2020	S	halo D	R	R
	2081	24/09/2020	S	halo D	R	S
5	2065	17/09/2020	S	S	S	S
	2076	23/09/2020	S	S	I	S
9	2123	03/11/2020	S	halo D	R	S
	2136	09/11/2020	R	halo D	R	S
11	2231	08/04/2021	S	S	S	S
	2271	21/05/2021	R	S	R	S
12	2241	22/04/2021	S	S	R	S
	2257	06/05/2021	R	S	R	S
13	2263	13/05/2021	S	S	S	S
	2285	07/06/2021	S	halo D	R	R
17	2289	08/06/2021	S	halo D	R	R
	2300	28/06/2021	R	R	R	S
20	2310	02/07/2021	S	halo D	R	I
	2318	08/07/2021	S	halo D	R	R
	2324	15/07/2021	S	S	S	S
25	2335	23/07/2021	S	halo D	R	R
	2347	30/07/2021	S	halo D	R	R
	2355	06/08/2021	S	halo D	R	R
	2466	23/08/2021	S	halo D	R	R
	2484	30/08/2021	S	halo D	R	R
	2505	16/09/2021	S	S	S	S
30	2482	27/08/2021	S	halo D	R	S
	2491	06/09/2021	S	I	R	I

CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; FOX: cefoxitina; R: resistente; I: intermediário; S: sensível; mudanças no perfil destacadas em negrito.

A análise da multirresistência (MDR) mostrou que 29 (37,2%) amostras foram MDR. Dessas, 16 amostras (35,5%; 16/45) pertenciam a pacientes sem o diagnóstico de COVID, enquanto 13 (39,4%; 13/33) eram de pacientes com o diagnóstico da doença (figura 3), não sendo observada diferença estatística significativa entre as UTIs ($p = 0.7289$). Entre as amostras MRSA e MSSA 45,6% (5/11) e 35,8% (24/67) eram MDR, respectivamente.

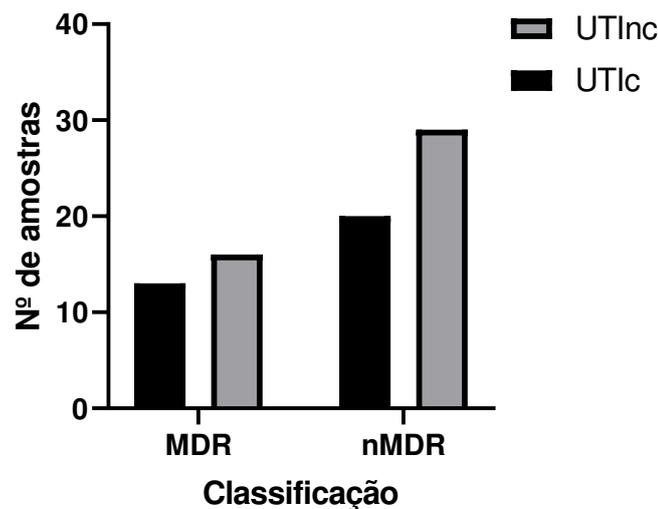


Figura 3. Distribuição das amostras MDR de acordo com a UTI. MDR: “Multidrug-resistant”; nMDR: não-“Multidrug-resistant”; UTIc: Unidade de Tratamento Intensivo COVID- 19; UTInc: Unidade de Tratamento Intensivo Não- COVID-19.

5.4. Detecção do tipo de SCCmec

A tipificação do SCCmec foi realizada para as 11 amostras MRSA, as quais foram previamente detectadas como resistentes à cefoxitina através da técnica de disco difusão. Dessa forma, foi observado que 81,8 % (9/11) possuíam o SCCmec tipo IV e 18,2 % (2/11) carregavam o SCCmec tipo II.

A análise da distribuição dos tipos de SCCmec, segundo o tipo de UTI pode ser observada na figura 4, a qual demonstra que todas as amostras da UTIc possuíam SCCmec do tipo IV. Já na UTInc, 75 % (6/8) das amostras MRSA possuíam SCCmecIV, e 25 % (2/8) o SCCmec II. Na figura 5 podem ser observados os padrões de bandeamento dos tipos de SCCmec em um gel de eletroforese representativo dos tipos de SCCmec.

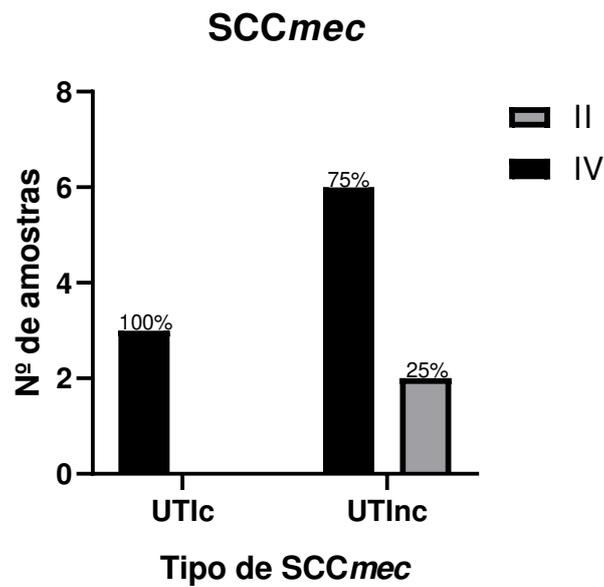


Figura 4. Distribuição dos tipos de *SCCmec* de acordo com o tipo de UTI. UTIc: Unidade de Tratamento Intensivo COVID- 19; UTInc: Unidade de Tratamento Intensivo Não- COVID-19.

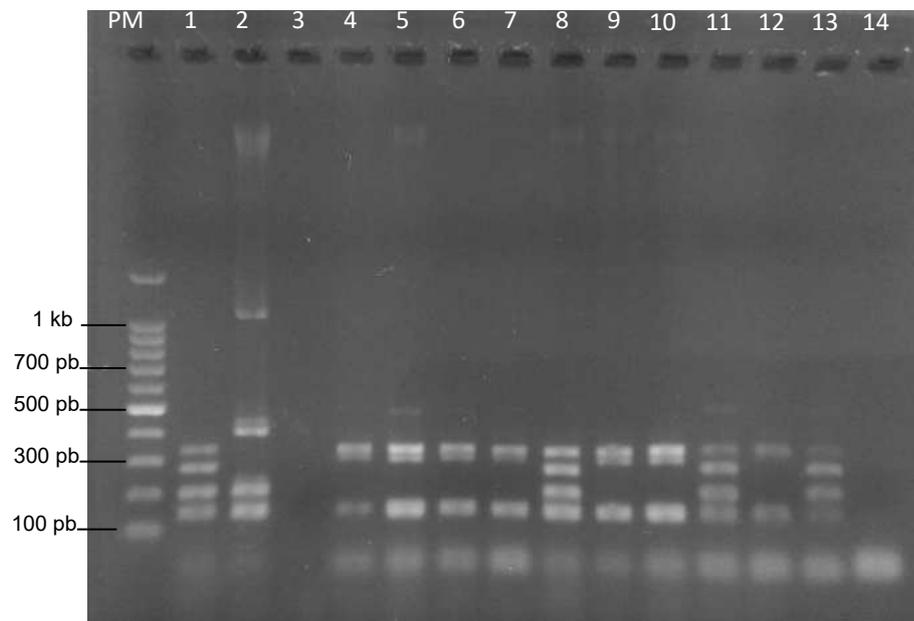


Figura 5. Gel de eletroforese representativo dos tipos de *SCCmec*. PM: Padrão de tamanho de DNA (100- pb DNA Ladder, Promega, Wisconsin, EUA); Coluna 1: controle positivo, *SCCmec* II (amostra: Mu50); coluna 2: Controle positivo, *SCCmec* III (amostra: 63a); coluna 4: Controle positivo, *SCCmec* IV (amostra: 522a); colunas 5, 6, 7, 9, 10 e 12: amostras representativas do *SCCmec* IV; colunas 8, 11 e 13: amostras representativas do *SCCmec* II; Coluna 14: Controle negativo da reação; pb: Pares de base; kb: kilo bases.

5.5. Detecção dos genes relacionados às bombas de efluxo

Todas as 78 amostras presentes no estudo foram avaliadas para a presença dos genes *qacA/B* e *smr*, relacionados a bombas de efluxo. Todas as amostras foram negativas para os genes *qacA/B*. Em contrapartida, 52,6 % (41/78) das amostras possuíam o gene *smr* (figura 6), sendo 18 (43,9%) amostras de pacientes da UTIc e 23 (56,1%) de pacientes da UTInc ($p = 0.7641$). A figura 7 mostra o gel de eletroforese representativo da presença dos genes *qacA/B* e *smr*.

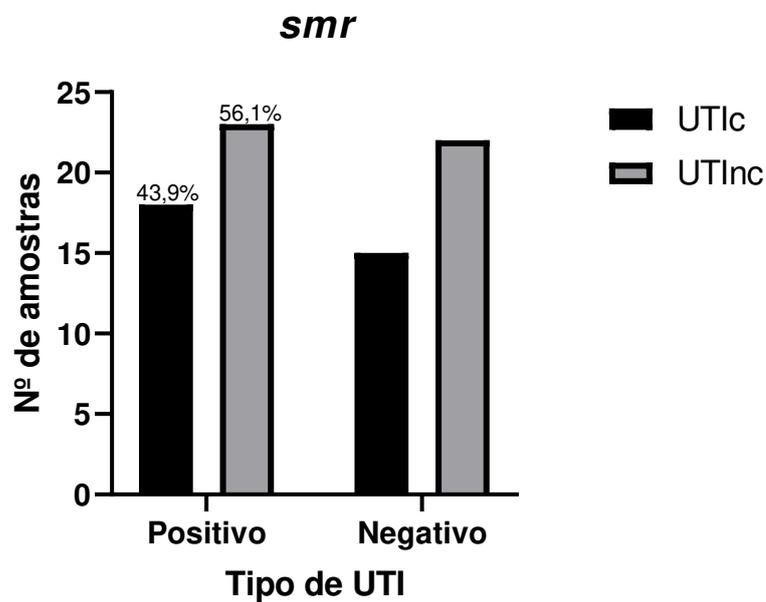


Figura 6. Distribuição do gene *smr* de acordo com o tipo de UTI. UTIc: Unidade de Tratamento Intensivo COVID- 19; UTInc: Unidade de Tratamento Intensivo Não- COVID-19.

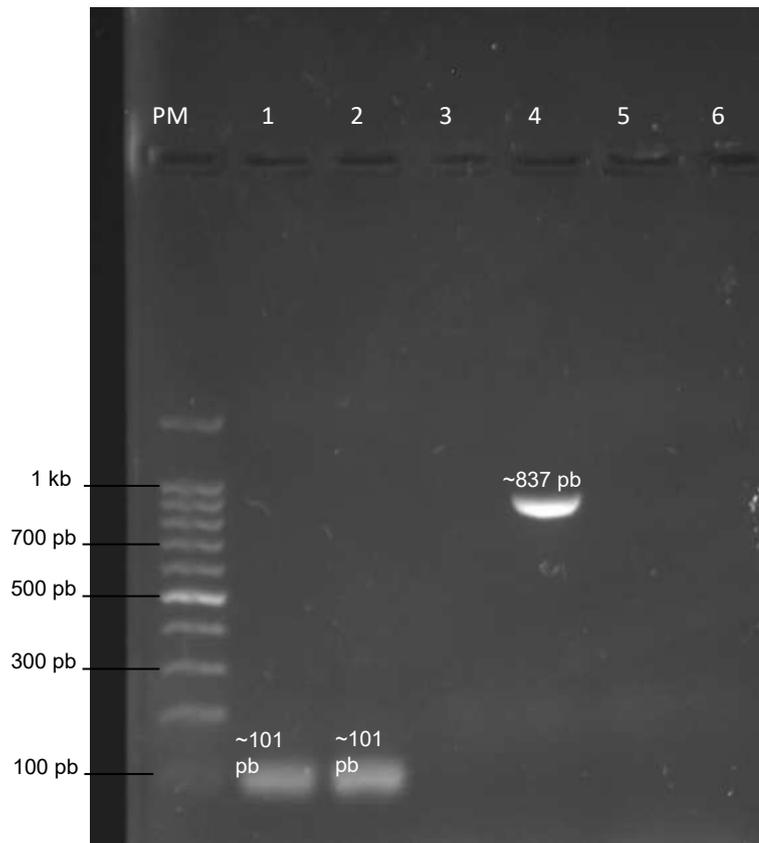


Figura 7. Gel de eletroforese representativo da presença dos genes *smr* e *qacA/B*. PM: Padrão de tamanho de DNA (100- pb DNA Ladder, Promega, Wisconsin, EUA); coluna 1: controle positivo do gene *smr* (amostra 1759a, 101 pb); coluna 2: amostra positiva para o gene *smr*; coluna 3: controle negativo da reação para o gene *smr*; coluna 4: controle positivo do gene *qacA/B* (amostra: 1591a, 837 pb); coluna 5: amostra negativa para o gene *qacA/B*; coluna 6: controle negativo da reação para os genes *qacA/B*; pb: pares de base; kb: kilo bases.

5.6. Detecção de genes marcadores do CC398

Todas as 78 amostras foram submetidas a detecção dos genes *erm(T)*, *scn* e *luk- PV*, marcadores gênicos relacionados ao complexo clonal 398. O perfil *erm(T)* e *scn* positivos e gene *luk- PV* negativo, relacionado ao CC398, foi encontrado em 52,6% (41/78) das amostras.

A análise da distribuição desse perfil gênico em cada UTI mostrou que: 57,6 % (19/33) das amostras da UTIc e 48,9 % (22/45) das amostras da UTInc ($p = 0,4478$) apresentaram o genótipo relativo ao complexo clonal 398. O perfil gênico relacionado ao CC98 foi prevalente dentre as amostras MSSA ($p = 0,0208$), enquanto o perfil gênico *scn* positivo, *luk- PV* positivo e *erm(T)* negativo foi prevalente dentre as amostras MRSA ($p = 0,0011$). Na tabela 13 pode ser observada a distribuição dos genes relacionados ao complexo clonal 398 de acordo com o tipo

de UTI e susceptibilidade a meticilina. A figura 8 apresenta um gel de eletroforese representativo dos controles dos genes *erm(T)*, *scn* e *luk-PV*.

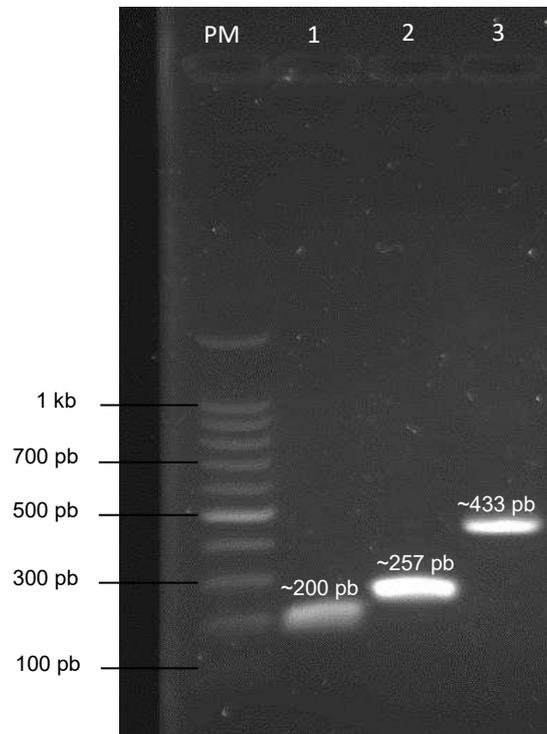


Figura 8. Gel de eletroforese representativo dos controles dos genes *erm(T)*, *scn* e *luk-PV*. PM: Padrão de tamanho de DNA (100- pb DNA Ladder, Promega, Wisconsin, EUA); coluna 1: controle positivo do gene *erm(T)* (amostra 39c, 200 pb); coluna 2: controle positivo do gene *scn* (amostra 39c, 257 pb); coluna 3: controle positivo do gene *luk-PV* (amostra 526, 433pb); pb: pares de base; kb: kilo bases.

Tabela 13. Distribuição dos genes associados ao CC398 encontrados nas 78 amostras de *Staphylococcus aureus* de acordo com o tipo de Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) e susceptibilidade a meticilina.

Perfil gênico	n (%) de amostras						
	Total (n = 78)	Tipo de UTI		Valor de <i>p</i>	Susceptibilidade a meticilina		Valor de <i>p</i>
		UTIC (n = 33)	UTInc (n = 45)		MRSA (n = 11)	MSSA (n = 67)	
<i>erm</i> (T)	0	0	0	1	0	0	1
<i>Scn</i>	20 (25,6)	10 (30,3)	10 (22,2)	0,4194	4 (36,4)	16 (23,9)	0,4590
<i>luk- PV</i>	4 (5,1)	0	4 (8,9)	0,1331	1 (9,1)	3 (4,5)	0,4627
<i>erm</i> (T) + <i>scn</i>	41 (52,6)	19 (57,6)	22 (48,9)	0,4478	2 (18,2)	39 (58,2)	0,0208
<i>erm</i> (T) + <i>luk- PV</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>scn</i> + <i>luk- PV</i>	5 (6,4)	1 (3)	4 (8,9)	0,3892	4 (36,4)	1 (1,5)	0,0011
<i>erm</i> (T) + <i>scn</i> + <i>luk- PV</i>	0	0	0	1	0	0	1
Ausência dos genes testados	8 (10,3)	3 (9,1)	5 (11,1)	1	0	8 (11,9)	0,5920

UTIC: Unidade de Tratamento Intensivo COVID- 19; UTInc: Unidade de Tratamento Intensivo Não COVID- 19; *p*- valor < 0,05 destacados em negrito

5.7. Perfis de fragmentação do DNA genômico das amostras por meio de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado depois do tratamento com as enzimas de restrição *SmaI* e/ou *ApaI*

A determinação do perfil de fragmentação do DNA genômico foi realizada em 36 amostras de *S. aureus* isoladas do *swab* nasal de 18 pacientes, dos quais sete pacientes eram da UTIc e 11 da UTInc. Dentre os 18 pacientes, 11 apresentavam duas amostras coletadas e outros três pacientes apresentavam três ou mais amostras. Para outros quatro pacientes, essa técnica foi aplicada apenas em uma das amostras. Tais amostras foram selecionadas de modo aleatório para serem processadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.4.5.

Entre as 36 amostras analisadas, 11 foram tratadas com a enzima de restrição *SmaI*, considerada a técnica padrão de fragmentação do DNA genômico em amostras de *S. aureus* (figura 9). Já outras 25 amostras, as quais possuíam os marcadores genéticos para o CC398, foram tratadas com *SmaI* e *ApaI*, segundo descrito previamente na literatura (figura 10). Como parâmetro de análise, as amostras com até quatro bandas de diferença, ou com mais de 80% de similaridade foram consideradas como pertencentes ao mesmo pulstotipo. A análise do perfil de fragmentação do DNA genômico revelou 10 *clusters* distintos e os pulstotipos foram nomeados de A até J. O pulstotipo A foi o mais prevalente englobando 23 amostras que possuíam os marcadores gênicos do CC398. O segundo pulstotipo mais prevalente foi o B com três amostras (Figuras 9 e 10).

Ao analisarmos as amostras do paciente 12, oriundo da UTInc (Figura 9), observamos que ambas as amostras pertencem ao mesmo *cluster* e a colonização inicial é por amostra MSSA, no entanto, após duas semanas, há o isolamento de uma amostra MRSA com SCC*mec* do tipo IV. Este cenário de aquisição de resistência também é visto para o paciente 9 (Figura 10), o qual estava internado na UTInc e inicialmente era colonizado por amostra MSSA e, após uma semana, foi observado que este paciente estava colonizado por amostra MRSA com SCC*mec* do tipo II.

Possível transmissão horizontal de amostras de *S. aureus* entre pacientes também podem ser observadas nesse estudo. Os pacientes 11 e 12 estiveram internados no mesmo período, na mesma unidade (UTInc) e as amostras da segunda coleta de cada indivíduo possuíam 100% de similaridade (Figura 9). Esse cenário também pode ser observado entre os pacientes 16 e 23 que estavam internados na UTIc no mesmo período (Figura 10).

A análise das amostras dos pacientes 2, 11, 17, 20 e 24 mostrou que a primeira amostra obtida desses pacientes se distingue da segunda amostra obtida com relação ao pulsotipo encontrado, a presença do gene *smr* e ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (Figuras 9 e 10), sugerindo que esses pacientes foram colonizados por mais de uma cepa de *S. aureus* durante a internação.

Em relação ao paciente 4 o mesmo pulsotipo foi encontrado para as duas amostras, contudo sua primeira amostra possuía o gene *smr* e resistência a clindamicina, eritromicina, gentamicina e penicilina. Já a segunda amostra desse paciente foi negativa para o gene *smr* e apresentou resistência apenas a clindamicina e penicilina, sugerindo perda de resistência pelo microrganismo ou a co-colonização por subtipos clonais (Figura 10).

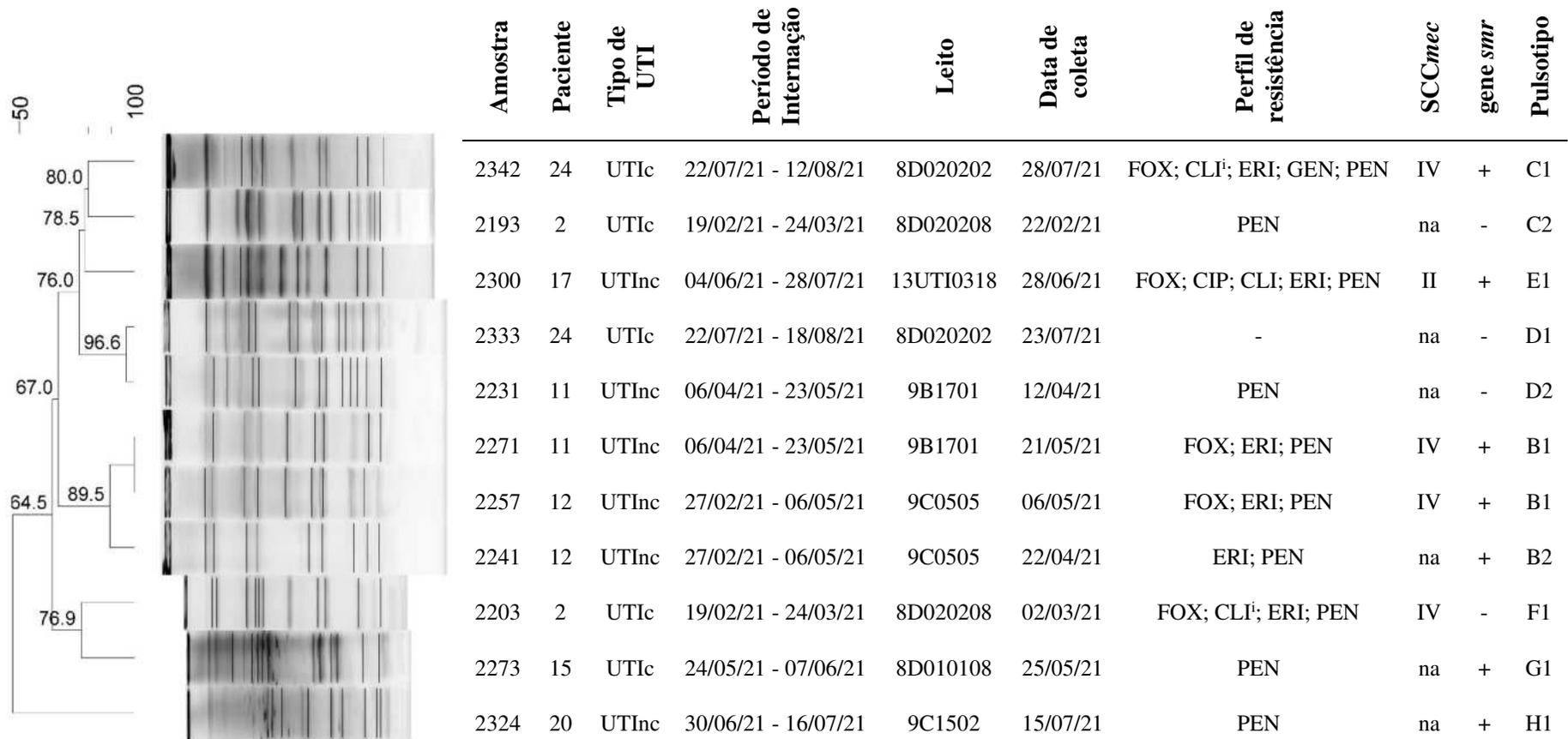


Figura 9. Dendrograma do perfil genômico das 11 amostras tratadas com a enzima *SmaI* e características demográficas e microbiológicas relacionadas a cada amostra. CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; na: não- aplicável; [†]: Fenótipo β MLS_B; PEN: penicilina; UTIc: Unidade de Tratamento Intensivo COVID- 19; UTInc: Unidade de Tratamento Intensivo Não- COVID-19.

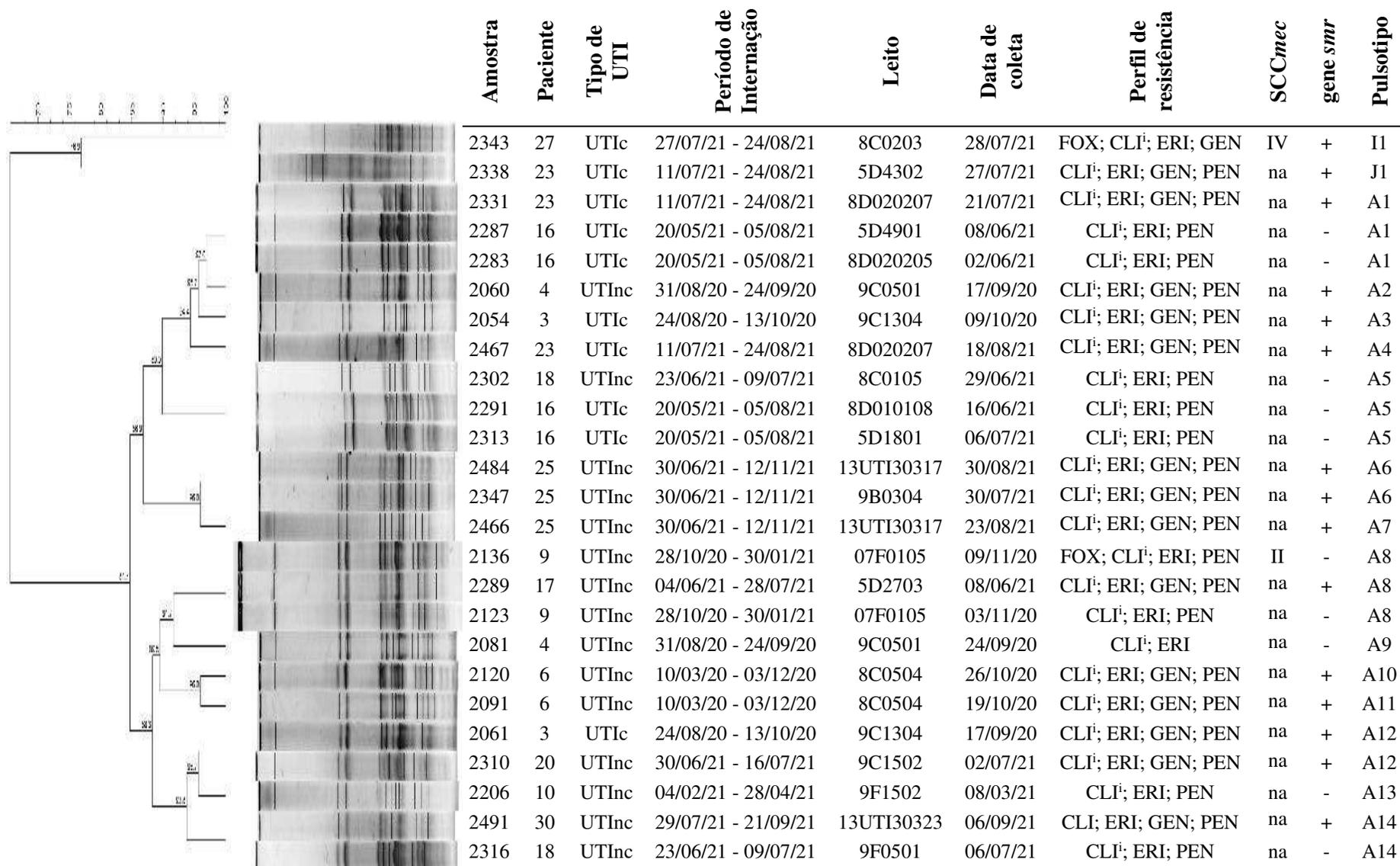


Figura 10. Dendrograma do perfil genômico das 25 amostras tratadas com as enzimas *Sma*I e *Apa*I e características demográficas e microbiológicas relacionadas a cada amostra. CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; na: não- aplicável; ⁱ: Fenótipo β -MLS₂; PEN: penicilina; UTIc: Unidade de Tratamento Intensivo COVID- 19; UTInc: Unidade de Tratamento Intensivo Não- COVID-19.

6. Discussão

Staphylococcus aureus é um dos principais microrganismos associados a infecções relacionadas ao ambiente hospitalar, em especial entre pacientes internados que utilizam dispositivos médicos invasivos (Paling *et al.*, 2017). A pandemia de COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2 ocasionou a hospitalização de diversos indivíduos que necessitavam do uso desses dispositivos, especialmente, aqueles relacionados a ventilação mecânica (Olivas-Martinez *et al.*, 2021; El Zahran *et al.*, 2023). *S. aureus* tem sido descrito como um dos microrganismos mais encontrados como agente colonizador e de infecção em indivíduos diagnosticados com COVID-19 (Garcia-Vidal *et al.*, 2021; Ciptaningtyas *et al.*, 2022; Langford *et al.*, 2022), e a colonização prévia pelo patógeno é relatada como importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções causadas por este microrganismo (Sakr *et al.*, 2018; Taki *et al.*, 2023). Troeman e colaboradores, 2023, em um estudo de coorte multicêntrico envolvendo 10 países da Europa, desenvolvido entre 2016 e 2019 e envolvendo 5.004 pacientes observaram que a taxa de incidência de infecção de corrente sanguínea (ICS) e infecção de sítio cirúrgico (ISC) foi de 2,55/100 pacientes para indivíduos colonizados por *S. aureus*, e de apenas 0,85/100 pacientes para indivíduos que não estavam colonizados, destacando que indivíduos carreadores de *S. aureus* podem mais facilmente desenvolver infecções. Assim, é relevante o monitoramento da colonização por cepas de *S. aureus* em um ambiente de alta pressão seletiva, principalmente entre indivíduos internados em unidades de tratamento intensivo.

O presente trabalho é parte de um estudo maior que teve como objetivo caracterizar amostras de *S. aureus* a partir de *swabs* nasais oriundos de pacientes com e sem diagnóstico de COVID-19, internados em Unidades de Tratamento Intensivo em um hospital universitário do Rio de Janeiro. Altas taxas de incidência de colonização por *S. aureus* foram encontradas em ambas as unidades estudadas com 5,98/1000 pacientes-dia na UTIc e 43,06/1000 pacientes-dia na UTInc ($p < 0,01$), visto que é considerada pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do hospital universitário uma elevada taxa de incidência de colonização quando essa for $> 4/1000$ pacientes- dia. Os altos valores encontrados podem ter relação com as estratégias de prevenção e controle de infecções utilizadas nas UTIs, além do impacto no aumento da carga de trabalho dos profissionais de saúde no período pandêmico (Porto *et al.*, 2019; Stevens *et al.*, 2020). Vale lembrar que o maior uso de antimicrobianos nesse período também pode ter favorecido a transmissão horizontal de amostras bacterianas (Durán-Manuel *et al.*, 2021). A maior taxa de colonização por *S. aureus* encontrada na UTInc, no presente estudo, pode ser

justificada por esta unidade admitir principalmente pacientes crônicos, e que apresentam doenças de base debilitantes e altas taxas de *score* de Charlson.

A partir de um total de 256 amostras de *S. aureus* isoladas de colonização nasal, o presente estudo avaliou 78 amostras oriundas de 33 pacientes que apresentaram pelo menos duas coletas positivas para *S. aureus*, dos quais 14 deles estavam internados na UTIc e 19 na UTInc. A análise da variável “tempo médio desde a admissão até o primeiro *swab* positivo para *S. aureus*” mostrou que pacientes com COVID-19 foram, em média, mais rapidamente colonizados por *S. aureus* (8,29 dias) quando comparado aos pacientes internados na UTI Não-COVID-19 (27,16 dias) ($p = 0,0354$). Garcia-Vidal e colaboradores, 2021, relataram um tempo médio de aquisição de infecção por *S. aureus* em indivíduos com COVID-19 semelhante ao tempo médio encontrado nesse estudo para colonização pelo patógeno. Esse curto intervalo de para que um indivíduo desenvolvesse infecção por *S. aureus* pode estar relacionada ao uso intensivo de ventilação mecânica por pacientes com COVID-19, bem como o uso de imunomoduladores (Falcone *et al.*, 2021).

Em nosso estudo, um menor tempo médio para que um indivíduo fosse colonizado por uma cepa MRSA também foi descrito na UTIc (13,5 dias) ao compararmos com a UTInc (29,5 dias), ainda que não tenha sido observada diferença estatística. Também um maior uso de antimicrobianos desde a admissão do paciente até o primeiro *swab* positivo foi reportado na UTIc, com 64,3% dos pacientes desta unidade em uso desses agentes em contraste com 47,4% dos pacientes da UTInc ($p = 0,4824$). Segundo Rolo e colaboradores, 2017, a elevada pressão seletiva no ambiente é a responsável por selecionar cepas com menor sensibilidade aos antimicrobianos. Miragaia, 2018, também descreve esse cenário ao observar que o desenvolvimento de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* está relacionado ao uso extensivo desta classe de antimicrobianos.

Taxas de resistência à penicilina, eritromicina e clindamicina acima dos 60% foram reportadas neste trabalho, além de 83,3% das amostras apresentarem o fenótipo de resistência induzida à clindamicina. Entre amostras MRSA as taxas de resistência encontradas para eritromicina e clindamicina foram de 81,8% e 45,6%, enquanto para amostras MSSA foram de 76,1% e 70,1%, respectivamente. Taxas similares de resistência a esses antimicrobianos foram apresentadas em outros estudos realizados antes da pandemia de COVID-19, principalmente entre amostras MRSA (Goudarzi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Aggarwal *et al.*, 2019). Todavia, entre amostras MSSA do presente estudo, a resistência a eritromicina também foi expressiva, mas principalmente para clindamicina, tendo 68,7% destas amostras apresentado o fenótipo β -MLS_b, enquanto 45,6% das amostras MRSA mostraram este perfil. A presença desse fenótipo

não era observada em valores tão elevados nos estudos anteriores a pandemia, e as taxas variavam entre 11,48% e 46,7% (Adhikari *et al.*, 2017; Aggarwal *et al.*, 2019; Che Hamzah *et al.*, 2019). Esse cenário pode ser associado ao elevado uso de macrolídeos, como a azitromicina, que ocorreu durante a pandemia de COVID-19 em alguns países, inclusive no Brasil (Del Fiol *et al.*, 2022; Solanky *et al.*, 2023). O uso excessivo desse antimicrobiano pode favorecer a seleção de cepas com resistência a classe dos macrolídeos, e somado a este fato, pode resultar em uma resistência cruzada a outros antimicrobianos, como a clindamicina (Yao *et al.*, 2019; Kishk *et al.*, 2020).

No presente estudo, amostras MRSA foram isoladas de nove (27,3%) pacientes, em um total de 11 (14,1%) amostras. McNeil e colaboradores, 2022, realizaram um estudo clínico de coorte prospectiva longitudinal em um hospital infantil do Texas, envolvendo 201 amostras de *S. aureus* de colonização obtidas em dois períodos, antes e durante a pandemia. Os autores observaram que 5,4% dos indivíduos estavam colonizados por MRSA antes da pandemia enquanto no período pandêmico houve uma redução no número de indivíduos carregando o patógeno, provavelmente devido as medidas de prevenção contra a infecção do vírus SARS-CoV-2, como o uso de máscaras e medidas de distanciamento social (McNeil *et al.*, 2022). Cepas MRSA apresentam resistência a todos o beta-lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de quinta geração, e estão associadas a difícil tratamento (Turner *et al.*, 2019). Além disso, tais cepas estão relacionadas a maiores taxas de mortalidade hospitalar (Ioannou *et al.*, 2023). Portanto, a colonização prévia por cepas MRSA é relevante e precisa ser monitorada, principalmente em pacientes graves e que necessitam de procedimentos médicos de alta complexidade (Alexiou *et al.*, 2017). Ioannou e colaboradores (2023) em um estudo de coorte retrospectivo unicêntrico realizado na Grécia, entre os anos de 2005 e 2021, envolvendo 256 pacientes, observaram que a bacteremia por MRSA foi um fator associado à mortalidade hospitalar. Além disso, já foi observado que infecções por MRSA estão associadas a maiores custos, embora também exista um crescente aumento nos custos de infecções por amostras MSSA (Filice *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2019).

Em nosso estudo foi observado que 81,8% das amostras MRSA carregavam o SCC*mec* do tipo IV, o qual é frequentemente associado a amostras oriundas da comunidade e denominadas de CA- MRSA (David *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2023). Por outro lado, 18,2% das amostras apresentaram o SCC*mec* do tipo II, o qual está associado a amostras de origem hospitalar e são denominadas de HA- MRSA (David *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2023). Em estudos realizados por nosso grupo na cidade do Rio de Janeiro, antes da pandemia de COVID-19, envolvendo amostras oriundas de colonização nasal e hemocultura, os tipos de SCC*mec*

encontrados também foram aqueles dos tipos II e IV (Cavalcante *et al.*, 2017; Chamon *et al.*, 2017; Augusto *et al.*, 2022). Augusto e colaboradores, 2022, em um estudo de coorte prospectivo realizado no Rio de Janeiro, entre os anos de 2016 e 2018, envolvendo 123 amostras de hemoculturas, mostraram que 51,4% e 40,5% das amostras MRSA carregavam os SCCmec dos tipos II e IV, respectivamente. Vale destacar que todas as amostras da UTIc possuíam o SCCmec do tipo IV. Já na UTInc 75 % (6/8) e 25 % (2/8) das amostras carregavam os SCCmec IV e II, respectivamente. A maior incidência de cepas MRSA com SCCmecIV em nosso trabalho pode estar relacionada ao fato de que o hospital onde o estudo foi realizado, um centro de referência para tratamento de pacientes com COVID-19, recebeu indivíduos de diversas localidades e comunidades, sendo em sua maioria pacientes sem comorbidades prévias e acometidos de forma aguda pelo quadro de COVID-19. Já a maior parte dos indivíduos internados na UTInc são pacientes clínicos e portadores de doenças crônicas, que podem fazer uso recorrentemente de antimicrobianos e, geralmente, possuem histórico de internações prévias, favorecendo assim a colonização por amostras HA- MRSA.

Um cenário descrito nas UTIs avaliadas foi o isolamento de amostras MDR, tanto na UTIc (42,2% das amostras), quanto na UTInc (39,4%), indicando que a pressão seletiva houve em ambas as unidades. Estudos realizados em diversos países antes da pandemia de COVID-19 já mostravam diferentes taxas de amostras de *S. aureus* MDR, com 24,1% a 50,5% delas apresentando este fenótipo (Dilnessa *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Gebremariam *et al.*, 2022). Contudo, no período pandêmico alguns autores relataram redução ou ausência de alteração nas taxas de amostras MDR. Jeon e colaboradores, 2022, observaram uma redução de 38,9% das taxas de MRSA nas UTIs, que no estudo é considerado como patógeno MDR, quando analisaram o uso de antimicrobianos e dados clínicos e microbiológicos de pacientes oriundos de quatro hospitais da Coreia do Sul, entre 2018 e 2021. Por outro lado, Pinheiro e colaboradores, 2023, em um estudo observacional retrospectivo unicêntrico realizado com amostras de indivíduos internados em diferentes clínicas do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), em Niterói, RJ, entre os anos de 2019 e 2021, verificaram que não houve diferença significativa entre as taxas de amostras MDR isoladas antes e durante o período da pandemia, com taxas que variaram entre 13,3% no ano de 2019 e 9,7% no ano de 2021. A variação encontrada pelos autores quando comparada aos resultados do presente trabalho possivelmente está associada ao fato do presente estudo ter sido realizado em um hospital referência em COVID-19, aceitando pacientes graves, e em UTIs, local onde há pacientes com maiores comorbidades, necessitando de assistência constante e uso de medicamentos, aspectos que podem impactar na resistência e transmissão de patógenos.

Uma maior pressão seletiva sobre as amostras também pode ser associada ao elevado uso de saneantes na pandemia, dado que a prevenção da infecção pelo vírus SARS-CoV-2 foi realizada através do uso de máscaras e saneantes (OMS, 2023). A tolerância a saneantes é associada a bombas de efluxo, as quais podem transportar diversas substâncias, como saneantes, metais pesados e antimicrobianos (Blanco *et al.*, 2016; Almatar *et al.*, 2020). No presente estudo foram investigados os genes *qacA/B* e *smr* que codificam uma proteína transmembrana responsável pelo efluxo desses produtos. Contudo, não foram encontradas amostras com os genes *qacA/B*, enquanto o gene *smr* foi detectado em 52,6% das amostras e em ambas as UTIs investigadas. Sommer e colaboradores, 2019, em um estudo realizado entre 2016 e 2017 no Texas, viram que de 119 amostras de *S. aureus* isoladas de hemocultura 13,4% carregavam os genes *qacA/B*. Taxa de 2% de positividade para esses genes foi observada por Longtin e colaboradores, 2011, no Canadá e de 3,3% por Hassanzadeh e colaboradores, 2017, no Iran. Em contraste, Conceição *et al.*, 2016, observou taxa de 40,5% para tais genes em amostras de *S. aureus* isoladas de colonização nasal em um estudo que envolveu três países da África. Esses fatos demonstram que a prevalência desses genes pode estar associada com a localização geográfica e as linhagens associadas ou provavelmente com o período avaliado, já que o presente estudo foi realizado durante o período pandêmico, o que pode ter levado a uma seleção de amostras expressando o gene *smr*.

O percentual elevado de amostras carregando o gene *smr* é superior aos dados relatados na literatura, tanto antes da pandemia de COVID-19, com variação de 7% a 30%, (Longtin *et al.*, 2011; Hassanzadeh *et al.*, 2017; Sommer *et al.*, 2019) quanto durante a pandemia (30%) (Ghasemzadeh-Moghaddam *et al.*, 2022), e provavelmente é consequência do intenso uso de saneantes e antimicrobianos neste período (OMS, 2023). Além disso, a presença desse gene pode interferir na eficiência da antisepsia de pacientes, já que ele tem sido associado a maiores valores de expressão pelo método de *Cartwheel* quando agentes saneantes são testados frente a amostras de *S. aureus* (De Oliveira, 2019). Vale destacar que os genes abordados neste estudo, *qacA/B* e *smr*, são carregados por plasmídeos e podem ser transferidos entre as cepas bacterianas. Portanto, em cenários de elevada pressão seletiva associados ao maior número de hospitalizações, a transmissão desses genes pode ser facilitada, justificando nossas taxas mais elevadas para o gene *smr* em ambas as UTIs.

Com o objetivo de estudar a dinâmica clonal e compreender o processo de aquisição de colonização por *S. aureus*, parte das amostras foram avaliadas pela técnica de PFGE. Entre as 36 amostras utilizadas nesta análise, 26 não puderam ter seu DNA genômico fragmentado apenas pela enzima *SmaI*, havendo também a necessidade do uso da enzima *ApaI*, fato também

relatado por Voss e colaboradores, 2005, e Guimarães e colaboradores, 2022, sendo, portanto, associadas ao complexo clonal 398. A análise clonal revelou 10 *clusters* distintos e os pulsotipos foram nomeados de A até J. O pulsotipo A foi o mais prevalente englobando 23 amostras e foi associado ao CC398. O segundo pulsotipo mais prevalente foi o B englobando três amostras de *S. aureus*.

O complexo clonal 398 (CC398) foi descrito como agente colonizador e causador de infecção em humanos primeiramente por Voss e colaboradores, 2005, em um estudo realizado nos Países Baixos, entre 2004 e 2005. Cepas MRSA desse complexo clonal geralmente são associadas à pecuária, assim são denominadas de LA-MRSA. Contudo, esse complexo alberga principalmente amostras MSSA, as quais têm sido cada vez mais isoladas como agente infeccioso e de colonização em humanos. (Lozano *et al.*, 2011; Carrel *et al.*, 2017; Di Gregorio *et al.*, 2022; Guimarães *et al.*, 2022). Os genes *erm*(T) e *scn* são relatados como marcadores das cepas pertencentes ao CC398, enquanto o gene *luk-PV* não é observado nessas cepas (Di Gregorio *et al.*, 2022; Lacey *et al.*, 2022; Zeggay *et al.*, 2023). Em nosso estudo detectamos esse perfil gênico em um total de 52,6% (41/78) das amostras e quase todas estas amostras (97,6%, 40/41) apresentavam o fenótipo β MLS_b. Esse fato também foi verificado por Lacey e colaboradores, 2022, em um hospital no oeste da Argélia. Os autores avaliaram 92 amostras de *S. aureus* isoladas de colonização nasal de pacientes, da equipe médica e do ambiente hospitalar e detectaram oito amostras MSSA do CC398 com o gene *erm*(T) e o fenótipo β MLS_b. Portanto, a elevada taxa de amostras MSSA associadas ao complexo clonal 398, detectadas em nosso estudo parece estar relacionada com o também alto percentual de amostras com o fenótipo β MLS_b.

Alguns estudos na literatura têm discutido a presença do CC398 em amostras de colonização nasal e infecção (Lozano *et al.*, 2011; Carrel *et al.*, 2017; Di Gregorio *et al.*, 2023). Lozano e colaboradores, 2011, detectaram duas amostras do CC398 em seu trabalho realizado na Espanha, em 2009, envolvendo 53 amostras de colonização nasal de 278 pacientes saudáveis e sem aparentes fatores de risco. Carrel e colaboradores, 2017, em um estudo de coorte retrospectiva, realizado com 34.025 amostras de infecção isoladas de 47.513 pacientes de 136 centros médicos de veteranos, entre 2003 e 2014, nos EUA, observaram que 13,5% eram do CC398. Os autores sugeriram a presença desse CC a partir do resultado do antibiograma. Contudo, a confirmação necessitaria do emprego de técnicas moleculares, como PFGE, MLST ou sequenciamento de genoma completo (Carrel *et al.*, 2017). Além disso, eles também observaram um aumento das taxas das possíveis amostras pertencentes ao CC398 ao longo dos anos, indo de 5,7% em 2003 a 14,9% em 2014 (Carrel *et al.*, 2017). Di Gregorio e

colaboradores, 2023, em um trabalho prospectivo observacional em infecção de corrente sanguínea por *S. aureus*, realizado no ano de 2019 envolvendo cinco países da América do Sul relataram que 18,8% das 239 amostras MSSA eram do CC398. O presente estudo mostra uma taxa maior em relação às relatadas na literatura, com 52,6% das amostras com marcadores para o CC398. A elevada taxa encontrada neste trabalho pode estar associada ao maior uso de macrolídeos no Brasil durante a pandemia, o que pode ter favorecido a emergência de clones que apresentam resistência a esta classe de antimicrobianos, como o CC398. Cabe lembrar o fato de que linhagens MSSA não são frequentes alvos de estudos em ambientes hospitalares, dificultando análises comparativas e epidemiológicas.

Os mecanismos genéticos envolvidos na perda e aquisição de genes têm contribuído para a evolução de patógenos bacterianos e alterado a dinâmica clonal em ambientes hospitalares. Em nosso estudo duas amostras da mesma linhagem e isoladas de dois diferentes pacientes adquiriram o elemento genético móvel SCC_{mec} IV. Liu e colaboradores, 2022, observaram que ambientes de elevada pressão seletiva, bem como o uso de concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos favorecem a transferência horizontal de elementos genéticos móveis. Em um estudo que utilizou 25 amostras de *E. coli* isoladas de porcos, bezerras e carne de frango em 2015 na Dinamarca, Liu e colaboradores, 2019, observaram que a exposição a diferentes antimicrobianos pode levar ao aumento da transferência de elementos genéticos móveis, que ocorre de modo natural. Assim, nossos resultados podem estar relacionados a processos naturais, como conjugação e transdução gênicas, e que auxiliam na sobrevivência e evolução das bactérias, mas que podem ter sido favorecidos devido ao ambiente de elevada pressão seletiva como as UTIs, durante a pandemia de COVID-19.

Além disso, também foram observadas possíveis transmissões horizontais de cepas de *S. aureus* no ambiente hospitalar avaliado. A transmissão de amostras ocorreu entre indivíduos internados na UTIc e entre aqueles da UTInc, envolvendo diferentes linhagens, e pode ter sido mediada pela equipe de trabalho da UTI e/ou pelos instrumentos usados por ela. É importante também lembrar que se trata de um período pandêmico em que a pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos e saneantes e a carga de trabalho intensa exercida sobre os profissionais de saúde podem ter contribuído para estes eventos. Loftus e colaboradores, 2018, através de seu estudo realizado nos Estados Unidos, envolvendo 178 amostras de *S. aureus* observaram sete casos de transmissão de *S. aureus* e, as fontes de transmissão foram supostamente os pacientes, as mãos de profissionais de saúde e/ou equipamentos médicos. Além disso, foi relatado que salas de cirurgia, são potenciais locais de transmissão de cepas de *S. aureus* (Loftus *et al.*, 2018).

Em nosso estudo, demonstramos altas taxas de resistência à penicilina, eritromicina e clindamicina em amostras de *S. aureus* isoladas de colonização nasal, com um considerável número de amostras apresentando os fenótipos MDR e iMLSb. O gene *smr* foi identificado em aproximadamente metade das amostras indicando pressão seletiva sobre as amostras no período. A presença dos marcadores genéticos para o complexo clonal 398 foi reportada em 52,6% das amostras, fato que pode influenciar na dinâmica de clones prevalentes no ambiente hospitalar. Os processos de aquisição de resistência e de disseminação e transferência de cepas entre indivíduos foi verificada, destacando e reforçando a necessidade de estudos envolvendo colonização nasal por *S. aureus* no ambiente hospitalar.

7. Conclusões

- Dentre os 33 pacientes avaliados no estudo, aqueles internados na UTI COVID-19 foram, em média, mais rapidamente colonizados por *S. aureus* quando comparado aos pacientes internados na UTI Não-COVID-19 ($p = 0,0354$).
- Taxas de resistência acima de 60% foram observadas para clindamicina, eritromicina e penicilina entre amostras de *S. aureus* em ambas as UTIs avaliadas. Além disso, 41% das amostras apresentam o fenótipo MDR e 83,3% das amostras com não sensibilidade a eritromicina foram associadas ao fenótipo μ MLS_b, havendo prevalência de amostras MSSA com esse fenótipo ($p = 0,0007$).
- Amostras MRSA foram detectadas em nove (11,5%) pacientes, sendo 9,1% das amostras identificadas na UTIc e 17,8% na UTInc. O SCC_{mec} do tipo IV foi prevalente (81,8%) e identificado em todas as amostras da UTIc e em 71,4% da UTInc.
- Possível mudança no perfil de susceptibilidade foi observada em amostras de 14 (17,9%) pacientes, ao longo da internação, e 42,9% destes apresentaram amostras iniciais MSSA seguido do isolamento de amostras MRSA.
- O gene *smr* foi detectado em 52,6% das amostras, enquanto todas as amostras foram negativas para os genes *qacA/B*.
- O perfil gênico marcador para o complexo clonal 398 foi associado a 52,6% das amostras, sem diferença estatística entre as UTIs, mas prevalente dentre amostras MSSA ($p = 0,0208$). Duas amostras MRSA foram associadas a este CC.
- Transmissão horizontal de amostras de *S. aureus* ocorreu entre indivíduos internados na UTIc e entre aqueles da UTInc.

8. REFERÊNCIAS

- Adhikari, R. P., Shrestha, S., Barakoti, A., & Amatya, R. (2017). Inducible clindamycin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *BMC Infectious Diseases*, 17, 1-5.
- Ahirrao, P., Tambat, R., Chandal, N., Mahey, N., Kamboj, A., Jain, U. K., & Nandanwar, H. S. (2020). *msrA* efflux pump inhibitory activity of Piper cubeba lf and its phytoconstituents against *Staphylococcus aureus* RN4220. *Chemistry & Biodiversity*, 17, e2000144.
- Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J. P., & Molle, V. (2021). *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins*, 13, 677.
- Alam, M. M., Kobayashi, N., Uehara, N., & Watanabe, N. (2003). Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes *qacA* and *qacB* in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*, 9, 109-121
- Alexiou, K., Drikos, I., Terzopoulou, M., Sikalias, N., Ioannidis, A., & Economou, N. (2017). A prospective randomised trial of isolated pathogens of surgical site infections (SSI). *Annals of Medicine and Surgery*, 21, 25-29.
- AlMatar, M., Albarri, O., Makky, E. A., & Köksal, F. (2021). Efflux pump inhibitors: new updates. *Pharmacological Reports*, 73, 1-16.
- Almeida, S. T., Paulo, A. C., Babo, J., Borralho, J., Figueiredo, C., Gonçalves, B., ... & Sá-Leão, R. (2021). Absence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among immunocompetent healthy adults: Insights from a longitudinal study. *Plos One*, 16, e0253739.
- André, E. D., Pereira, R. F. A., Snyder, R. E., Machado, T. S., André, L. S. P., Cardoso, C. A. A., & Aguiar-Alves, F. (2017). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clonal complex 398 with no livestock association in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 647-649.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Classificação de saneantes. (2020). Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/saneantes/classificacao-de-saneantes>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- Aggarwal, S., Jena, S., Panda, S., Sharma, S., Dhawan, B., Nath, G., ... & Singh, D. V. (2019). Antibiotic susceptibility, virulence pattern, and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from variety of infections in India. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2763.
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 1751-1773.
- Augusto, M. F., da Silva Fernandes, D. C., de Oliveira, T. L. R., Cavalcante, F. S., Chamon, R. C., Ferreira, A. L. P., ... & dos Santos, K. R. N. (2022). Pandemic clone USA300 in a Brazilian hospital: detection of an emergent lineage among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bloodstream infections. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 11, 1-10.

- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 870-926.
- Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E. A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., ... & Peters, G. (2018). Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 24, 242
- Bhargava, A., Riederer, K., Sharma, M., Fukushima, E. A., Johnson, L., & Saravolatz, L. (2021). High rate of multidrug-resistant organisms (MDROs) among COVID-19 patients presenting with bacteremia upon hospital admission. *American Journal of Infection Control*, 49, 1441-1442.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., ... & Martinez, J. L. (2016). Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*, 4, 14.
- Buonsenso, D., Giaimo, M., Pata, D., Rizzi, A., Fiori, B., Spanu, T., ... & Valentini, P. (2023). Retrospective Study on *Staphylococcus aureus* Resistance Profile and Antibiotic Use in a Pediatric Population. *Antibiotics*, 12, 1378.
- BrCAST (2023). Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos]. <http://brcast.org.br/documentos/>.
- Brisson-Noël, A., Delrieu, P., Samain, D., & Courvalin, P. (1988). Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 15880-15887.
- Butterly, A., Schmidt, U., Wiener-Kronish, J., & Riou, B. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization, its relationship to nosocomial infection, and efficacy of control methods. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 113, 1453-1459.
- Buvelot, H., Posfay-Barbe, K. M., Linder, P., Schrenzel, J., & Krause, K. H. (2017). *Staphylococcus aureus*, phagocyte NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, 139-157.
- Caboclo, R. M. F., Cavalcante, F. S., Iorio, N. L. P., Schuenck, R. P., Olendzki, A. N., Felix, M. J., ... & dos Santos, K. R. N. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. *American Journal of Infection Control*, 41, e21-e26.
- Carrel, M., Goto, M., Schweizer, M. L., David, M. Z., Livorsi, D., & Perencevich, E. N. (2017). Diffusion of clindamycin-resistant and erythromycin-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), potential ST398, in United States Veterans Health Administration Hospitals, 2003-2014. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6, 1-8.
- Carvalho, S. P. D., Almeida, J. B. D., Andrade, Y. M., da Silva, L. S., Chamon, R. C., Santos, K., & Marques, L. M. (2019). Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and community environments in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23, 134-138.
- Cavalcante, F. S., Pinheiro, M. V., de Carvalho Ferreira, D., Alvarenga, C. V. D. C. G., Guimarães, A. C. F., Nouér, S. A., & Dos Santos, K. R. N. (2017). Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients on admission to a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal of Infection Control*, 45, 1190-1193.
- Cavalcante, F. S., Saintive, S., Carvalho Ferreira, D., Rocha Silva, A. B., Guimarães, L. C., Braga, B. S., ... & Netto dos Santos, K. R. (2021). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from infected skin lesions present

several virulence genes and are associated with the CC30 in Brazilian children with atopic dermatitis. *Virulence*, 12, 260-269.

Chamon, R. C., da Silva Ribeiro, S., da Costa, T. M., Nouér, S. A., & Dos Santos, K. R. N. (2017). Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21, 185-189.

Cheung, G. Y., Bac, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12, 547-569.

Che Hamzah, A. M., Yeo, C. C., Puah, S. M., Chua, K. H., A. Rahman, N. I., Abdullah, F. H., ... & Chew, C. H. (2019). Tigecycline and inducible clindamycin resistance in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Terengganu, Malaysia. *Journal of medical microbiology*, 68, 1299-1305.

Christianson, S., Golding, G. R., Campbell, J., & Mulvey, M. R. (2007). Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 1904-1911.

Chroboczek, T., Boisset, S., Rasigade, J. P., Tristan, A., Bes, M., Meugnier, H., ... & Laurent, F. (2013). Clonal complex 398 methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*: a frequent unspecialized human pathogen with specific phenotypic and genotypic characteristics. *PLoS One*, 8, e68462.

Ciptaningtyas, V. R., Hapsari, R., Lestari, E. S., Farida, H., de Mast, Q., & de Jonge, M. I. (2022). Bacterial colonization of the upper airways of children positive and negative for SARS-CoV-2 during the COVID-19 pandemic. *BMC Infectious Diseases*, 22, 860.

CLSI (2020). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100. Wayne, Pennsylvania, USA.

CLSI (2023). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100. Wayne, Pennsylvania, USA.

Conceição, T., Coelho, C., de Lencastre, H., & Aires-de-Sousa, M. (2016). High prevalence of biocide resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolates from three African countries. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60, 678-681.

Cornejo-Juárez, P., Volkow-Fernández, P., Vázquez-Marín, C. L., Álvarez-Romero, N., García-Pineda, B., Chavez-Chavez, T., & Vilar-Compte, D. (2023). Impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic in hospital-acquired infections and bacterial resistance at an oncology hospital. *Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology*, 3, e70.

Costa, S. S., Falcão, C., Viveiros, M., Machado, D., Martins, M., Melo-Cristino, J., ... & Couto, I. (2011). Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC microbiology*, 11, 1-12.

Craven, R. R., Gao, X., Allen, I. C., Gris, D., Wardenburg, J. B., McElvania-TeKippe, E., ... & Duncan, J. A. (2009). *Staphylococcus aureus* α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS one*, 4, e7446.

Cristina, M. L., Spagnolo, A. M., Giribone, L., Demartini, A., & Sartini, M. (2021). Epidemiology and prevention of healthcare-associated infections in geriatric patients: a narrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 5333.

Da Silva, L. S., Andrade, Y. M., Oliveira, A. C., Cunha, B. C., Oliveira, E. G., Cunha, T. S., ... & Marques, L. M. (2020). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare workers at a tertiary care hospital in northeastern Brazil. *Infection Prevention in Practice*, 2, 100084.

- Damasco, A. P., Costa, T. M. D., Morgado, P. G. M., Guimarães, L. C., Cavalcante, F. S., Nouér, S. A., & Santos, K. R. N. D. (2019). Daptomycin and vancomycin non-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages from bloodstream infection in a Brazilian teaching hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23, 139-142.
- David, M. Z., Cadilla, A., Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2014). Replacement of HA-MRSA by CA-MRSA infections at an academic medical center in the midwestern United States, 2004-5 to 2008. *PLoS One*, 9, e92760.
- Davis, M. F., Peterson, A. E., Julian, K. G., Greene, W. H., Price, L. B., Nelson, K., ... & Silbergeld, E. K. (2013). Household risk factors for colonization with multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *PloS one*, 8, e54733.
- Del Fiol, F. D. S., Bergamaschi, C. D. C., De Andrade Jr, I. P., Lopes, L. C., Silva, M. T., & Barberato-Filho, S. (2022). Consumption trends of antibiotics in Brazil during the COVID-19 pandemic. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 844818.
- De Mello Freitas, F. T., Viegas, A. P. B., & Romero, G. A. S. (2021). Neonatal healthcare-associated infections in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Archives of public health*, 79, 89.
- De Oliveira, T.L.R. (2019). Caracterização fenotípica e molecular da resistência às fluoroquinolonas e saneantes em amostras de *Staphylococcus aureus* de diferentes linhagens isoladas em hospitais do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 106 f.
- De Oliveira, T. L. R., Cavalcante, F. S., Chamon, R. C., Ferreira, R. B. R., & Dos Santos, K. R. N. (2019). Genetic mutations in the quinolone resistance-determining region are related to changes in the epidemiological profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 236-240.
- Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 747-763.
- Di Gregorio, S., Vielma, J., Haim, M. S., Rago, L., Campos, J., Kekre, M., ... & StaphNET-SA consortium. (2022). Genomic epidemiology of *S. aureus* isolated from bloodstream infections in South America during 2019 supports regional surveillance. medRxiv, 2022-12.
- Dilnessa, T., & Bitew, A. (2016). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples at Yekatit 12 Hospital Medical College, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, 16, 1-9.
- Durán-Manuel, E. M., Cruz-Cruz, C., Ibáñez-Cervantes, G., Bravata-Alcantará, J. C., Sosa-Hernandez, O., Delgado-Balbuena, L., ... & Bello-López, J. M. (2021). Clonal dispersion of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit designed to patients COVID-19. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 15, 58-68.
- Echeverría-Esnal, D., Martín-Ontiyuelo, C., Navarrete-Rouco, M. E., De-Antonio Cuscó, M., Ferrández, O., Horcajada, J. P., & Grau, S. (2021). Azithromycin in the treatment of COVID-19: a review. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 19, 147-163.
- Edwin Erayil, S., Palzer, E., & Kline, S. (2022). An evaluation of risk factors for *Staphylococcus aureus* colonization in a pre-surgical population. *Access Microbiology*, 4, 000316.
- El Zahran, T., Kalot, N., Cheaito, R., Khalifeh, M., Estelly, N., & El Majzoub, I. (2023). Predictors of intensive care unit admission in adult cancer patients presenting to the emergency department with COVID-19 infection: A retrospective study. *PloS one*, 18, e0287649.

- Engen, P. A., Naqib, A., Jennings, C., Green, S. J., Landay, A., Keshavarzian, A., & Voigt, R. M. (2021). Nasopharyngeal microbiota in SARS-CoV-2 positive and negative patients. *Biological procedures online*, 23, 1-6.
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal Clinical of Microbiology*, 38, 1008-1015.
- Eyler, R. F., & Shvets, K. (2019). Clinical pharmacology of antibiotics. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 14, 1080.
- Falcone, M., Tiseo, G., Giordano, C., Leonildi, A., Menichini, M., Vecchione, A., ... & Menichetti, F. (2021). Predictors of hospital-acquired bacterial and fungal superinfections in COVID-19: a prospective observational study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(4), 1078-1084.
- Filice, G. A., Nyman, J. A., Lexau, C., Lees, C. H., Bockstedt, L. A., Como-Sabetti, K., ... & Lynfield, R. (2010). Excess costs and utilization associated with methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* infection. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(4), 365-373.
- Foster, C. E., Kok, M., Flores, A. R., Minard, C. G., Luna, R. A., Lamberth, L. B., ... & Hulten, K. G. (2020). Adhesin genes and biofilm formation among pediatric *Staphylococcus aureus* isolates from implant-associated infections. *Plos One*, 15, e0235115.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 49-62.
- García-Vidal, C., Sanjuan, G., Moreno-García, E., Puerta-Alcalde, P., García-Pouton, N., Chumbita, M., ... & Torres, A. (2021). Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*, 27, 83-88.
- Gebremariam, N. M., Bitew, A., Tsige, E., Woldesenbet, D., & Tola, M. A. (2022). A High Level of Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Cocci Isolates from Different Clinical Samples Among Patients Referred to Arsho Advanced Medical Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*, 4203-4212
- Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Azimian, A., Bayani, G., Dashti, V., Nojoomi, S., Shirazi, N., ... & Van Belkum, A. (2022). High prevalence and expression of antiseptic resistance genes among infectious t037/ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in North Khorasan Province, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25, 775.
- Ghosh, S., Bornman, C., & Zafer, M. M. (2021). Antimicrobial Resistance Threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand?. *Journal of Infection and Public Health*, 14, 555-560.
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Fernandez-Perez, R., Aspiroz, C., Ruiz-Larrea, F., & Zarazaga, M. (2010). Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1269-1277.
- Goudarzi, M., Goudarzi, H., Sá Figueiredo, A. M., Udo, E. E., Fazeli, M., Asadzadeh, M., & Seyedjavadi, S. S. (2016). Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from intensive care units in Iran: ST22-SCC mec IV/t790 emerges as the major clone. *PloS one*, 11, e0155529.
- Grumann, D., Nübel, U., & Bröker, B. M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins—their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 583-592.

- Guimarães, L. C., Assunção, M. I. D. M. M., de Oliveira, T. L. R., Cavalcante, F. S., Saintive, S., Abad, E. D. D., ... & Dos Santos, K. R. N. (2022). Methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates from skin and nares of Brazilian children with atopic dermatitis demonstrate high level of clonal diversity. *Plos one*, 17, e0276960.
- Hardy, K., Sunnucks, K., Gil, H., Shabir, S., Trampari, E., Hawkey, P., & Webber, M. (2018). Increased usage of antiseptics is associated with reduced susceptibility in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 9, e00894-18.
- Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., ... & Holden, M. T. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biology*, 18, 1-11.
- Hashem, R. A., Yassin, A. S., Zedan, H. H., & Amin, M. A. (2013). Fluoroquinolone resistant mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Cairo, Egypt. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7, 796-803.
- Hassanzadeh, S., Mashhadi, R., Yousefi, M., Askari, E., Saniei, M., & Pourmand, M. R. (2017). Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 111, 71-74.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., & Tenover, F. C. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40, 135-136.
- Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M., & O'Gara, J. P. (2011). Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun*, 79, 1153-1165.
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G. A., Powers, M. E., Frank, K. M., Wang, Y., & Wardenburg, J. B. (2011). A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nature Medicine*, 17, 1310-1314.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 4961.
- Ioannou, P., Zacharioudaki, M., Spentzouri, D., Koutoulakou, A., Kitsos-Kalyvianakis, K., Chontos, C., ... & Kofteridis, D. P. (2023). A Retrospective Study of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in a Tertiary Hospital and Factors Associated with Mortality. *Diagnostics*, 13, 1975.
- Jeon, K., Jeong, S., Lee, N., Park, M. J., Song, W., Kim, H. S., ... & Kim, J. S. (2022). Impact of COVID-19 on antimicrobial consumption and spread of multidrug-resistance in bacterial infections. *Antibiotics*, 11, 535.
- Juárez-Verdayes, M. A., Parra-Ortega, B., Hernández-Rodríguez, C., Betanzos-Cabrera, G., Rodríguez-Martínez, S., Cancino-Díaz, M. E., & Cancino-Díaz, J. C. (2012). Identification and expression of nor efflux family genes in *Staphylococcus epidermidis* that act against gatifloxacin. *Microbial Pathogenesis*, 52, 318-325.
- Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 1549-1555.
- Khalili, H., Najari-Peerayeh, S., Mahrooghi, M., Mansouri, P., & Bakhshi, B. (2021). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of infectious and non-infectious skin and soft tissue lesions in patients in Tehran. *BMC Microbiology*, 21, 1-8.

- Kim, S. J., Chang, J., & Singh, M. (2015). Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848, 350-362.
- Kinnevey, P. M., Kearney, A., Shore, A. C., Earls, M. R., Brennan, G., Poovelikunnel, T. T., ... & Coleman, D. C. (2021). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission among healthcare workers, patients and the environment in a large acute hospital under non-outbreak conditions investigated using whole-genome sequencing. *Journal of Hospital Infection*, 118, 99-107.
- Kishk, R. M., Anani, M. M., Nemr, N. A., Soliman, N. M., & Fouad, M. M. (2020). Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Suez Canal University Hospital, Ismailia, Egypt. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 14, 1281-1287.
- Klein, E. Y., Jiang, W., Mojica, N., Tseng, K. K., McNeill, R., Cosgrove, S. E., & Perl, T. M. (2019). National costs associated with methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations in the United States, 2010–2014. *Clinical Infectious Diseases*, 68, 22-28.
- Laceb, Z. M., Diene, S. M., Lalaoui, R., Kihal, M., Chergui, F. H., Rolain, J. M., & Hadjadj, L. (2022). Genetic Diversity and Virulence Profile of Methicillin and Inducible Clindamycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Western Algeria. *Antibiotics*, 11, 971.
- Lamaro-Cardoso, J., de Lencastre, H., Kipnis, A., Pimenta, F. C., Oliveira, L. S., Oliveira, R. M., ... & Andrade, A. L. S. (2009). Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care centers in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 3991-3997.
- Langford, B. J., Soucy, J. P., Leung, V., So, M., Kwan, A. T., Portnoff, J. S., ... & Daneman, N. (2022). Antibiotic resistance associated with the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29, 302–309
- Lee, A. S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*, 4, 1-23.
- Lee, G. C., Dallas, S. D., Wang, Y., Olsen, R. J., Lawson, K. A., Wilson, J., & Frei, C. R. (2017). Emerging multidrug resistance in community-associated *Staphylococcus aureus* involved in skin and soft tissue infections and nasal colonization. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 2461-2468.
- Lenz, K. D., Klosterman, K. E., Mukundan, H., & Kubicek-Sutherland, J. Z. (2021). Macrolides: From toxins to therapeutics. *Toxins*, 13, 347.
- Li, X., Wang, X., Thompson, C. D., Park, S., Park, W. B., & Lee, J. C. (2016). Preclinical efficacy of clumping factor A in prevention of *Staphylococcus aureus* infection. *mBio*, 7, 10-1128.
- Lima, L. M., da Silva, B. N. M., Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112829.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M. O., Gauduchon, V., ... & Etienne, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine leukocidin—producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical infectious diseases*, 29, 1128-1132.
- LPSN (2023) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso em 20/06/2023.
- Liu, G., Bogaj, K., Bortolaia, V., Olsen, J. E., & Thomsen, L. E. (2019). Antibiotic-induced, increased conjugative transfer is common to diverse naturally occurring ESBL plasmids in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 10, 2119.

- Liu, G., Thomsen, L. E., & Olsen, J. E. (2022). Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: a mini-review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *77*, 556-567.
- Liu, J., Chen, D., Peters, B. M., Li, L., Li, B., Xu, Z., & Shirliff, M. E. (2016). *Staphylococcal* chromosomal cassettes *mec* (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, *101*, 56-67.
- Liu, Y., Du, F. L., Liu, P. P., Mei, Y. F., Wan, L. G., Wei, D. D., ... & Zhang, W. (2018). Molecular epidemiology and virulence features of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates in a regional burn center in China, 2012–2016. *Microbial Drug Resistance*, *24*, 1354-1360.
- Loftus, R. W., Dexter, F., & Robinson, A. D. (2018). High-risk *Staphylococcus aureus* transmission in the operating room: a call for widespread improvements in perioperative hand hygiene and patient decolonization practices. *American Journal of Infection Control*, *46*, 1134-1141.
- Longtin, J., Seah, C., Siebert, K., McGeer, A., Simor, A., Longtin, Y., ... & Melano, R. G. (2011). Distribution of antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*, 2999-3001.
- Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Benito, D., Aspiroz, C., Zarazaga, M., & Torres, C. (2011). *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*, 500-505.
- Luyt, C. E., Hékimian, G., Koulenti, D., & Chastre, J. (2018). Microbial cause of ICU-acquired pneumonia: hospital-acquired pneumonia versus ventilator-associated pneumonia. *Current Opinion in Critical Care*, *24*, 332-338.
- Lv, Y., Chen, L., Xiang, Q., Tang, Q. S., Wang, F. D., Cai, H. M., ... & Wang, H. (2019). Hospitalization costs due to healthcare-associated infections: an analysis of propensity score matching. *Journal of Infection and Public Health*, *12*, 568-575.
- Madani, A., Garakani, K., & Mofrad, M. R. (2017). Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesin, CNA, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. *PloS One*, *12*, e0179601.
- Madhaiyan, M., Wirth, J. S., & Saravanan, V. S. (2020). Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*, 5926-5936.
- Małyszko, I., Schwarz, S., & Hauschild, T. (2014). Detection of a new *mecC* allotype, *mecC2*, in methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*, 2003-2005.
- McDougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., McAllister, S. K., & Tenover, F. C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*, 5113-5120.
- McNeil, J. C., Joseph, M., Sommer, L. M., & Flores, A. R. (2022). *Staphylococcus aureus* Colonization in Healthy Children during the First Year of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pandemic. *The Journal of Pediatrics*, *249*, 101-105.
- Milheiriço, C., Oliveira, D. C., & de Lencastre, H. (2007). Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*, 3374-3377.

- Miragaia, M. (2018). Factors contributing to the evolution of *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci: update and new insights from whole genome sequencing (WGS). *Frontiers in Microbiology*, 9, 2723.
- Mirzaei, R., Goodarzi, P., Asadi, M., Soltani, A., Aljanabi, H. A. A., Jeda, A. S., ... & Karampoor, S. (2020). Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB life*, 72, 2097-2111.
- Moran, G. J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., Fosheim, G. E., McDougal, L. K., Carey, R. B., & Talan, D. A. (2006). Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine*, 355, 666-674.
- Mlynarczyk, B., Mlynarczyk, A., Kmera-Muszynska, M., Majewski, S., & Mlynarczyk, G. (2010). Mechanisms of resistance to antimicrobial drugs in pathogenic Gram-positive cocci. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10, 928-937.
- Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 8088.
- Möllers, M., Von Wahlde, M. K., Schuler, F., Mellmann, A., Böing, C., Schwierzeck, V., ... & Kampmeier, S. (2022). Outbreak of MRSA in a gynecology/obstetrics department during the COVID-19 pandemic: a cautionary tale. *Microorganisms*, 10, 689.
- Nascimento, T. C., Diniz, C. G., Silva, V. L., Ferreira-Machado, A. B., Fajardo, M. O., de Oliveira, T. L. R., ... & Santos, K. R. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22, 55-59.
- Noguchi, N., Hase, M., Kitta, M., Sasatsu, M., Deguchi, K., & Kono, M. (1999). Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 172, 247-253.
- Nurjadi, D., Last, K., Klein, S., Boutin, S., Schmack, B., Mueller, F., ... & Zanger, P. (2020). Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* is a risk factor for ventricular assist device infection in the first year after implantation: a prospective, single-centre, cohort study. *Journal of Infection*, 80, 511-518.
- Okorie-Kanu, O. J., Anyanwu, M. U., Ezenduka, E. V., Mgbeahuruike, A. C., Thapaliya, D., Gerbig, G., ... & Smith, T. C. (2020). Molecular epidemiology, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken and pig carcasses, and carcass handlers. *PLoS One*, 15, e0232913
- Olivas-Martinez, A., Cárdenas-Fragoso, J. L., Jiménez, J. V., Lozano-Cruz, O. A., Ortiz-Brizuela, E., Tovar-Méndez, V. H., ... & Sifuentes-Osornio, J. (2021). In-hospital mortality from severe COVID-19 in a tertiary care center in Mexico City; causes of death, risk factors and the impact of hospital saturation. *PloS one*, 16, e0245772.
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10, 252.
- OMS (2011). Organização Mundial de Saúde. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80135>. Acesso em: 07 out. 2023.
- OMS (2023). Organização Mundial de Saúde. Conselhos sobre doença coronavírus (COVID-19) para o público. Disponível em: https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAiAjrArBhAWEiwA2qWdCDmLIT4_aG08fbvDpMpyzqvBAViHrjuea-P-8A_5Pne9m1GuodryxoCSgUQAvD_BwE. Acesso em: 30 jun. 2023.
- OPAS (2023). Organização Pan- Americana de Saúde. Histórico da Pandemia de COVID-19. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>. Acesso em: 30 jun. 2023.

- OPAS (2023). Organização Pan- Americana de Saúde. OMS declara fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19. 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2023-oms-declara-fim-da-emergencia-saude-publicaimportancia-internacional-referente>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- O'Toole, R. F. (2021). The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 27, 1772-1776.
- Paling, F. P., Wolkewitz, M., Bode, L. G., Klouwenberg, P. K., Ong, D. S., Depuydt, P., ... & Kluytmans, J. A. J. W. (2017). *Staphylococcus aureus* colonization at ICU admission as a risk factor for developing *S. aureus* ICU pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection*, 23, 49-e9.
- Patsilinakos, A., Artini, M., Papa, R., Sabatino, M., Božović, M., Garzoli, S., ... & Ragno, R. (2019). Machine learning analyses on data including essential oil chemical composition and in vitro experimental antibiofilm activities against *Staphylococcus* species. *Molecules*, 24, 890.
- Peacock, S. J., & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 577-601.
- Pereira-Franchi, E. P. L., Barreira, M. R. N., da Costa, N. D. S. L. M., Riboli, D. F. M., Abraão, L. M., Martins, K. B., ... & Cunha, M. D. L. R. D. S. D. (2019). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Brazilian primary health care system. *Tropical Medicine & International Health*, 24, 339-347.
- Pinheiro, F. R., Rozza-de-Menezes, R. E., Blum, M. C., Pereira, R. F. A., Rocha, J. A., Guedes Pinto, M. C. F., ... & Aguiar-Alves, F. (2023). Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility in bacteria infecting children and their mothers in pediatric, neonatal-intensive care unit, and gynecology/obstetrics wards of a quaternary referral hospital during the COVID-19 pandemic. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1096223.
- Pires, F. V., da Cunha, M. D. L. R. D. S., Abraao, L. M., Martins, P. Y., Camargo, C. H., & Fortaleza, C. M. C. B. (2014). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. *PLoS One*, 9, e92537.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8, 151-156.
- Plumet, L., Ahmad-Mansour, N., Dunyach-Remy, C., Kissa, K., Sotto, A., Lavigne, J. P., ... & Molle, V. (2022). Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* Infections: A review of animal models, treatments, and clinical trials. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 808.
- Polly, M., de Almeida, B. L., Lennon, R. P., Cortês, M. F., Costa, S. F., & Guimarães, T. (2022). Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. *American Journal of Infection Control*, 50, 32-38.
- Porto, A. P. M., Borges, I. C., Buss, L., Machado, A., Bassetti, B. R., Cocentino, B., ... & Costa, S. F. (2022). Healthcare-associated infections on the ICU in 21 Brazilian hospitals during the early months of the COVID-19 pandemic: an ecological study. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1-37.
- Ribeiro, A., Coronado, A. Z., Silva-Carvalho, M. C., Ferreira-Carvalho, B. T., Dias, C., Rozenbaum, R., ... & Figueiredo, A. M. S. (2007). Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community-and hospital-associated diseases. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59, 339-345.
- Rizvi, S. G., & Ahammad, S. Z. (2022). COVID-19 and antimicrobial resistance: A cross-study. *Science of the Total Environment*, 807, 150873.

- Rohde, M. (2019). The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiology Spectrum*, 7, 10-1128.
- Rolo, J., Worning, P., Boye Nielsen, J., Sobral, R., Bowden, R., Bouchami, O., ... & Miragaia, M. (2017). Evidence for the evolutionary steps leading to *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci. *PLoS genetics*, 13, e1006674.
- Rooijackers, S. H., Milder, F. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., van Strijp, J. A., & Gros, P. (2007). *Staphylococcal* complement inhibitor: structure and active sites. *The Journal of Immunology*, 179, 2989-2998.
- Saderi, H., Emadi, B., & Owlia, P. (2011). 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*, 17, BR48.
- Sahli, F., Feidjel, R., & Laalaoui, R. (2017). Hemodialysis catheter-related infection: rates, risk factors and pathogens. *Journal of Infection and Public Health*, 10, 403-408.
- Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J. L., Rolain, J. M., & Blin, O. (2018). *Staphylococcus aureus* nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2419.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Extraction and purification of plasmid DNA. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1, 21-152.
- Santos, K. R., Teixeira, L. M., Leal, G. S., Fonseca, L. S., & Gontijo Filho, P. P. (1999). DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. *Journal of Medical Microbiology*, 48, 17-23.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 234-258.
- Schlievert, P. M., & Davis, C. C. (2020). Device-associated menstrual toxic shock syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*, 33, 10-1128.
- See, I., Mu, Y., Albrecht, V., Karlsson, M., Dumyati, G., Hardy, D. J., ... & Kallen, A. J. (2020). Trends in incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections differ by strain type and healthcare exposure, United States, 2005–2013. *Clinical Infectious Diseases*, 70, 19-25.
- See, P., Bonacorsi, S., Toumazi, A., Doit, C., Naudin, J., Chomton, M., ... & Levy, M. (2023). Factors linked to *Staphylococcus aureus* healthcare-associated infections among pediatric intensive care unit colonized patients. *Archives de Pédiatrie*, 30, 153-157.
- Sharara, S. L., Maragakis, L. L., & Cosgrove, S. E. (2021). Decolonization of *Staphylococcus aureus*. *Infectious Disease Clinics*, 35, 107-133.
- Silva, L. P., Fortaleza, C. M. C. B., Teixeira, N. B., Silva, L. T. P., de Angelis, C. D., & Ribeiro de Souza da Cunha, M. D. L. (2022). Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and MRSA in Bedridden Patients and Residents of Long-Term Care Facilities. *Antibiotics*, 11, 1526.
- Solanky, D., McGovern, O. L., Edwards, J. R., Mahon, G., Patel, T. S., Lessa, F. C., ... & Patel, P. K. (2023). Prescribing of outpatient antibiotics commonly used for respiratory infections among adults before and during the coronavirus disease 2019 pandemic in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 77, S12-S19.
- Sommer, L. M., Krauss, J. L., Hultén, K. G., Dunn, J. J., Kaplan, S. L., & McNeil, J. C. (2019). The prevalence of antiseptic tolerance genes among staphylococci and enterococci in a pediatric population. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 40, 333-340.

- Spaan, A. N., van Strijp, J. A., & Torres, V. J. (2017). Leukocidins: *Staphylococcal* bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 435-447.
- Spížek, J., & Řezanka, T. (2017). Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology*, 133, 20-28.
- Stevens, M. P., Doll, M., Pryor, R., Godbout, E., Cooper, K., & Bearman, G. (2020). Impact of COVID-19 on traditional healthcare-associated infection prevention efforts. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 41, 946-947.
- Szymanek-Majchrzak, K., Mlynarczyk, A., Kawecki, D., Pacholczyk, M., Durlík, M., Deborska-Materkowska, D., ... & Mlynarczyk, G. (2018, September). Resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, originating in the surgical and transplantation wards of the Warsaw clinical center—A retrospective analysis. In *Transplantation proceedings*. Elsevier, 50, 2170-2175.
- Taki, E., Jabalameli, F., Tehrani, M. R. M., Feizabadi, M. M., Halimi, S., Sanjari, M., ... & Emaneini, M. (2023). Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nasal Cavity and Wound Infections Among Diabetic Patients. *Current Microbiology*, 80, 147.
- Teixeira, M. M., Araújo, M. C., Silva-Carvalho, M. C., Beltrame, C. O., Oliveira, C. C. H. B., Figueiredo, A. M. S., & Oliveira, A. G. (2012). Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45, 637-643.
- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler Jr, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28, 603-661.
- Troeman, D. P., Hazard, D., Timbermont, L., Malhotra-Kumar, S., van Werkhoven, C. H., Wolkewitz, M., ... & ASPIRE-SSI Study Team. (2023). Postoperative *Staphylococcus aureus* Infections in Patients With and Without Preoperative Colonization. *JAMA Network Open*, 6, e2339793-e2339793.
- Tu Quoc, P. H., Genevaux, P., Pajunen, M., Savilahti, H., Georgopoulos, C., Schrenzel, J., & Kelley, W. L. (2007). Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 75, 1079-1088.
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., ... & Fowler Jr, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 203-218.
- Uehara, Y. (2022). Current status of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). *Antibiotics*, 11, 86.
- Van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., ... & European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). (2009). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 1-46.
- Van Wamel, W. J., Rooijackers, S. H., Ruyken, M., van Kessel, K. P., & van Strijp, J. A. (2006). The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 188, 1310-1315.
- Visansirikul, S., Kolodziej, S. A., & Demchenko, A. V. (2020). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18, 783-798.

- Vivoni, A. M., Diep, B. A., de Gouveia Magalhaes, A. C., Santos, K. R. N., Riley, L. W., Sensabaugh, G. F., & Moreira, B. M. (2006). Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1686-1691.
- Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., & Wulf, M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1965.
- Votintseva, A. A., Fung, R., Miller, R. R., Knox, K., Godwin, H., Wyllie, D. H., ... & Walker, A. S. (2014). Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiology*, 14, 1-11.
- Wang, L., & Archer, G. L. (2010). Roles of CcrA and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome *mec*, a *Staphylococcus aureus* genomic island. *Journal of Bacteriology*, 192, 3204-3212.
- Wang, W., Hu, Y., Baker, M., Dottorini, T., Li, H., Dong, Y., ... & Li, F. (2022). Novel SCC *mec* type XV (7A) and two pseudo-SCC*mec* variants in foodborne MRSA in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77, 903-909.
- Wassenaar, T., Ussery, D., Nielsen, L., & Ingmer, H. (2015). Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 5, 44-61.
- Wu, H. Y., Chang, P. H., Chen, K. Y., Lin, I. F., Hsieh, W. H., Tsai, W. L., ... & GREAT working group. (2022). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) associated bacterial coinfection: Incidence, diagnosis and treatment. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 55, 985-992.
- Yao, W., Xu, G., Li, D., Bai, B., Wang, H., Cheng, H., ... & Yu, Z. (2019). *Staphylococcus aureus* with an erm-mediated constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotype has reduced susceptibility to the new ketolide, solithromycin. *BMC Infectious Diseases*, 19, 1-8.
- Zeggay, A., Atchou, A., Valot, B., Hocquet, D., Bertrand, X., & Bouiller, K. (2023). Genome Analysis of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 Strains Isolated from Patients with Invasive Infection. *Microorganisms*, 11, 1446.
- Zhong, J., Wei, M., Yang, C., Yin, Y., Bai, Y., Li, R., & Gu, L. (2023). Molecular Epidemiology of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Clinical Characteristics of Different Sites of Infection. *Infection and Drug Resistance*, 1485-1497.

ANEXO 1

Aprovação pelo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE
SÁ/ UNESA/RJ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES RELACIONADAS A ASSISTÊNCIA À SAÚDE POR MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES E USO DE ANTIMICROBIANOS EM PACIENTES COM COVID-19 ADMITIDOS EM UNIDADES DE TRATAMENTO INTENSIVO DO RIO DE JANEIRO

Pesquisador: Káris Maria de Pinho Rodrigues

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39277320.5.0000.5284

Instituição Proponente: SOCIEDADE DE ENSINO SUPERIOR ESTACIO DE SA LTDA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.398.497

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES RELACIONADAS A ASSISTÊNCIA À SAÚDE POR MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES E USO DE ANTIMICROBIANOS EM PACIENTES COM COVID-19 ADMITIDOS EM UNIDADES DE TRATAMENTO INTENSIVO DO RIO DE JANEIRO", submetido ao CEP CEP UNESA em 16/10/2020, é de autoria da pesquisadora Káris Maria de Pinho Rodrigues. Trata-se de um estudo em parceria com as comissões de controle de infecção hospitalar (CCIH) de três hospitais.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com a pesquisadora responsável:

Objetivo Primário:

Investigar e analisar a ocorrência de IRAS e colonização causadas por bactérias MDR em pacientes com COVID-19, evidenciando e avaliando o impacto da coexistência destas duas pandemias; e propor estratégias que possam reduzir o risco associado a estes agravos combinados.

Objetivo Secundário:

Investigar o impacto da pandemia de COVID-19 na ocorrência de IRAS e de resistência a

Endereço: Avenida Presidente Vargas, 642, 22o andar

Bairro: Centro

CEP: 20.071-001

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2206-9726

E-mail: cep.unesa@estacio.br