

EVELLYN MAX GUEDES

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina isolados de colonização nasal de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro na pandemia de COVID-19: aspectos fenotípicos e genotípicos associados ao biofilme bacteriano



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/ 2024

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

M463s Max Guedes, Evellyn
Staphylococcus aureus resistentes à meticilina
isolados de colonização nasal de pacientes
internados em um hospital do Rio de Janeiro na
pandemia de COVID-19: aspectos fenotípicos e
genotípicos associados ao biofilme bacteriano /
Evellyn Max Guedes. -- Rio de Janeiro, 2024.
90 f.

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos.
Coorientadora: 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, 2024.

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

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

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): EVELLYN MAX GUEDES

DRE: 121059803

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Eliane de Oliveira Ferreira (Presidente)
Prof. Fernanda Sampaio Cavalcante
Prof. Thaís Campos Macharete
Prof. Marcia Giambiagi de Marval (Suplente)

Título da Monografia: “*Staphylococcus aureus* resistentes à metilina isolados de colonização nasal de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro na pandemia de COVID-19: aspectos fenotípicos e genotípicos associados ao biofilme bacteriano”

Local: Sala de Seminários do Departamento de Microbiologia Médica, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Data e hora de início: 11 de dezembro de 2024 às 09:30h

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, 11 de ~~DEZEMBRO~~ de 2024.

NOTA:

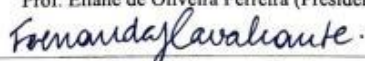
10,0

Banca Examinadora:



Prof. Eliane de Oliveira Ferreira (Presidente)

10,0



Prof. Fernanda Sampaio Cavalcante

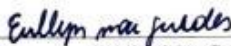
10,0



Prof. Thaís Campos Macharete

Prof. Marcia Giambiagi de Marval (Suplente)

Aluno(a):



Evellyn Max Guedes

**Orientador(a)
(e coorientador):**

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

**Coordenadora de
TCC:**



Prof. Marinella Silva Laport

DEDICATÓRIA

A minha família e meus amigos por todo apoio, carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força, paciência e por me guiar durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Sem esta orientação, nada disso seria possível.

Aos meus pais e toda minha família, pelo amor, apoio constante e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, mesmo nos momentos mais difíceis que nem eu mesma acreditei naquilo que sou capaz. A presença e incentivo daqueles que fazem parte da minha vida e da minha trajetória foram fundamentais para que eu chegasse até aqui e concluísse mais uma etapa.

Agradeço também aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH): Bruna, Gabriel, Nathália, Gabriela e Thaís. Muito obrigado por vocês sempre me ajudarem, pelas experiências e por todo apoio no decorrer da minha Iniciação Científica (IC).

Muito obrigado aos professores Dennis e Fernanda, que conheci no LIH, pelo conhecimento que vocês transmitiram para todo laboratório durante esses anos.

Agradeço de coração a minha coorientadora Tamara, por toda orientação, paciência e dedicação comigo, seus ensinamentos e sua presença foram essenciais na minha formação. Você é incrível e uma inspiração para todos aqueles ao seu redor, eu tenho muito orgulho de poder dizer que você estava e está até hoje do meu lado me guiando e incentivando. Muito obrigada por confiar e acreditar em mim, você está guardada no meu coração para sempre.

Muito obrigada à professora Kátia por ter me aceito e acolhido no laboratório como sua aluna. Suas sugestões e críticas construtivas foram fundamentais para o aprimoramento deste trabalho. Agradeço pela confiança e pela oportunidade de aprender tanto ao longo dessa jornada.

Agradeço a todos do Departamento de Microbiologia Médica, principalmente aos laboratórios parceiros, professores e técnicos: Márcia Giambiagi, Marinella Laport, Marlei Gomes e Rafael Duarte.

Agradeço às professoras Eliane de Oliveira Ferreira, Fernanda Sampaio Cavalcante, Márcia Giambiagi e a doutoranda Thaís Campos Macharete por terem aceitado participar da banca avaliadora deste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e a UFRJ, por viabilizarem a realização deste projeto.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa CAPES, CNPq, e FAPERJ por todo o suporte financeiro necessário para execução do estudo

RESUMO

EVELLYN MAX GUEDES

Staphylococcus aureus resistentes à metilicina isolados de colonização nasal de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro na pandemia de COVID-19: aspectos fenotípicos e genotípicos associados ao biofilme bacteriano

Orientadoras: Kátia 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 é um patógeno de grande relevância na clínica médica como agente de infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde. Apesar de membro da microbiota da pele e de mucosas, como as narinas, a colonização prévia por esse microrganismo configura-se como um fator de risco para a aquisição de infecção, especialmente, quando a amostra é classificada como MRSA (*methicillin-resistant S. aureus*). Entre muitos fatores de virulência, a capacidade de formar biofilme, cuja regulação envolve o sistema Agr, e a presença de determinantes de resistência a antimicrobianos o torna um patógeno oportunista relevante. Na pandemia de COVID-19 houve maior uso de antimicrobianos, sanitizantes e de dispositivos médicos invasivos, fatores que podem ter favorecido a emergência e a persistência de microrganismos multirresistentes produtores de biofilme. O objetivo deste estudo é avaliar amostras MRSA isoladas de pacientes colonizados e internados em um hospital público durante a pandemia de COVID-19 quanto à produção de biofilme e genes relacionados, e em relação ao perfil clonal das amostras. Entre Set/2020 e Set/2021 foram obtidas 93 amostras MRSA de swabs nasais de 93 pacientes de duas UTIs, COVID e não-COVID, as quais foram previamente caracterizadas quanto ao perfil de resistência antimicrobiana e ao tipo de SCCmec. A capacidade de formação de biofilme foi avaliada em placas de microtitulação de poliestireno e a detecção dos genes *icaA* e *sasG* foi avaliada por PCR *uniplex*. A tipagem do sistema Agr foi determinada por PCR *multiplex*, enquanto a funcionalidade deste sistema foi verificada através da detecção da produção de δ -hemolisina em ágar-sangue. A linhagem clonal das amostras fortes e moderadas produtoras de biofilme foi determinada por meio das técnicas moleculares de PFGE e MLST. Os resultados mostraram que 54,8% das amostras foram fortes (19,3%) ou moderadas (35,5%) produtoras de biofilme, com maior frequência de forte produção entre aquelas oriundas da UTI COVID-19 (33,3% [11/33]; $p = 0,0114$). O gene *icaA* foi detectado em todas as 93 amostras e o gene *sasG* em 88,2% delas. O sistema Agr tipo II foi o mais frequente (65,5%), seguido do tipo I (24,8%) e do tipo III (9,7%). Entre 51 (54,8%) amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme 49% eram do complexo clonal (CC) 5-SCCmec tipos IV ou II e 31,4% eram amostras comunitárias dos CC8 -IV e CC30-IV. Amostras do CC5 carregavam o Agr tipo II e 61% foram fortes produtoras de biofilme, enquanto amostras do CC8 carregavam o Agr tipo I, sendo 82,3% produtoras moderadas. O sistema Agr se mostrou ativo na maioria das amostras (72%), indicando possível cenário de dispersão do biofilme. O estudo mostrou alta capacidade de formação de biofilme entre as amostras MRSA e a emergência de linhagens comunitárias colonizando pacientes no hospital durante o período avaliado na pandemia, reforçando o uso de estratégias de vigilância e de prevenção de colonização por amostras de *S. aureus* multirresistentes.

Palavras-chave: *S. aureus*, COVID-19, colonização, biofilme, linhagens clonais

ABSTRACT

EVELLYN MAX GUEDES

Staphylococcus aureus resistentes à metilicina isolados de colonização nasal de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro na pandemia de COVID-19: aspectos fenotípicos e genotípicos associados ao biofilme bacteriano

Orientadoras: Kátia 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 a pathogen of significant relevance in medical practice as a causative agent of both community-acquired and healthcare-associated infections. Despite being part of the microbiota of the skin and mucous membranes, such as the nostrils, prior colonization by this microorganism constitutes a risk factor for acquiring infections, particularly when the isolate is MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*). Among its numerous virulence factors, the ability to form biofilms, that is regulated by the Agr system, and the presence of antimicrobial resistance determinants make it a notable opportunistic pathogen. During the COVID-19 pandemic, the increased use of antimicrobials, sanitizers, and invasive medical devices may have contributed to the emergence and persistence of biofilm-producing multidrug-resistant microorganisms. This study aims to evaluate MRSA isolates obtained from colonized patients hospitalized in a public hospital during the COVID-19 pandemic, focusing on biofilm production, associated genes, and the clonal profiles of isolates. Between Sep/2020 and Sep/2021, 93 MRSA isolates were obtained from nasal swabs of 93 patients from two ICUs (COVID and non-COVID). These isolates were previously characterized regarding their antimicrobial resistance profiles and SCCmec types. Biofilm formation capacity was assessed using polystyrene microtiter plates, and the presence of the *icaA* and *sasG* genes was detected by uniplex PCR. The Agr system typing was investigated by multiplex PCR, while its functionality was verified by detecting δ -hemolysin production on blood agar. The clonal lineages of strong and moderate biofilm-producing isolates were determined using PFGE and MLST molecular techniques. The results showed that 54.8% of the isolates were strong (19.3%) or moderate (35.5%) biofilm producers, with a higher frequency of strong producers among isolates from the COVID-19 ICU (33.3% [11/33]; $p = 0.0114$). The *icaA* gene was detected in all 93 isolates, and the *sasG* gene was present in 88.2%. Agr system type II was the most frequent (65.5%), followed by type I (24.8%) and type III (9.7%). Among the 51 (54.8%) strong/moderate biofilm-producing isolates, 49% belonged to the clonal complex (CC) 5-SCCmec types IV or II, and 31.4% were community isolates from CC8-IV and CC30-IV. CC5 isolates had Agr type II, with 61% being strong biofilm producers, while CC8 isolates carried Agr type I, with 82.3% being moderate producers. The Agr system was active in most isolates (72%), suggesting a potential scenario for biofilm dissemination. This study showed a high biofilm formation capacity in the MRSA isolates and the emergence of community lineages colonizing hospitalized patients during the period evaluated in the pandemic, refoincoring the use of strategies and prevention of colonization by multidrug-resistant *S. aureus* isolates.

Key-words: *S. aureus*, COVID-19, colonization, biofilm, clonal lineages

RESUMO PARA LEIGOS

EVELLYN MAX GUEDES

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina isolados de colonização nasal de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro na pandemia de COVID-19: aspectos fenotípicos e genotípicos associados ao biofilme bacteriano

Orientadoras: Kátia 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 micróbio comum presente na pele e no nariz das pessoas. Mas, as pessoas que possuem esse micróbio no corpo têm maiores chances de desenvolver infecções, principalmente quando ela está internada em um hospital. No caso de infecções, é necessário usar antibióticos, medicamentos que combatem o microrganismo, mas se o micróbio é resistente a estes medicamentos, como *Staphylococcus* resistente à meticilina, o tratamento do paciente se torna mais difícil. Uma das características que torna esse patógeno tão perigoso é sua capacidade de formar uma camada protetora chamada de biofilme, que o ajuda a se proteger de medicamentos e do sistema de defesa do indivíduo. O biofilme é formado por um conjunto de microrganismos vivendo juntos, como uma comunidade, a qual está envolvida por uma substância, como se fosse uma cola, que protege estes micróbios. Essa cola também permite que eles grudem no nosso corpo e nos utensílios médicos do hospital. Durante a pandemia de COVID-19, houve maior uso de antibióticos e dos utensílios médicos, favorecendo assim o crescimento de microrganismos mais resistentes. *S. aureus* podem ser divididos no que chamamos de “linhagens clonais”, o que seria semelhante ao termo raça usado para diferenciar cães, e tais linhagens podem ser encontradas tanto no hospital como na comunidade. Esse estudo analisou amostras de *S. aureus* resistentes à antibióticos coletadas de pacientes internados em um hospital, em uma unidade de terapia intensiva (UTI) de pacientes com COVID-19 e em outra UTI de pacientes sem COVID-19. O objetivo foi entender o quanto essas bactérias formam biofilmes, se os genes envolvidos neste processo estavam presentes e se havia diferença entre micróbios de cada UTI. Os resultados mostraram que mais de 50% das amostras de *S. aureus* conseguiam formar muito biofilme, e uma quantidade maior destas amostras eram de pacientes que tinham COVID-19. Além disso, as amostras de *S. aureus* analisadas apresentavam genes que facilitam a formação do biofilme. Também verificamos que cerca de 80% das amostras que formaram muito biofilme eram de apenas duas linhagens, uma hospitalar e outra de origem comunitária. O estudo destaca a importância do uso de medidas para prevenir a colonização e disseminação hospitalar por micróbios resistentes, especialmente em ambientes de cuidados intensivos, como as UTIs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema da organização molecular, biossíntese e transdução da cascata de sinalização do sistema <i>quorum sensing</i> Agr	6
Figura 2.	Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo	18
Figura 3.	Esquema representando a semeadura para realização do teste de detecção fenotípica da produção de δ -hemolisina	25
Figura 4.	Distribuição das 93 amostras MRSA de acordo com o perfil de formação de biofilme	30
Figura 5.	Distribuição da capacidade de formação de biofilme em amostras MRSA oriundas de pacientes com e sem diagnóstico de COVID-19 em UTIs em um hospital do Rio de Janeiro durante a pandemia	31
Figura 6.	Correlação da capacidade de formação de biofilme e tipo de cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>) das 93 amostras MRSA	32
Figura 7.	Gel representativo de eletroforese para a detecção do gene <i>icaA</i> (750 pb)	33
Figura 8.	Gel representativo de eletroforese para a detecção do gene <i>sasG</i> (311 pb)	33
Figura 9.	Gel de eletroforese representativo dos tipos de Agr	34
Figura 10.	Placa de Ágar Sangue ilustrativa para avaliação da funcionalidade do operon <i>agr</i> nas amostras MRSA através do teste fenotípico de detecção de δ - hemolisina	36
Figura 11.	Distribuição das 93 amostras MRSA segundo a funcionalidade do sistema Agr	36
Figura 12.	Correlação da funcionalidade do sistema Agr e os tipos das 93 amostras MRSA testadas	37
Figura 13.	Distribuição dos fenótipos de formação de biofilme das 93 amostras MRSA de acordo com a funcionalidade do operon <i>agr</i>)	38
Figura 14.	Dendrograma do perfil genômico das 44 amostras tratadas com a enzima <i>SmaI</i>	40
Figura 15.	Dendrograma do perfil genômico das 3 amostras tratadas com a enzima <i>SmaI</i> e <i>ApaI</i>)	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características das principais linhagens clonais de <i>S. aureus</i> que já foram mais comumente detectadas no cenário mundial	12
Tabela 2.	Amostras controles que foram utilizadas no estudo	19
Tabela 3.	Características das 93 amostras MRSA isoladas de <i>swab</i> nasal de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro, entre setembro de 2020 e setembro de 2021, e utilizadas no presente estudo	20
Tabela 4.	Descrição das sequências dos oligonucleotídeos, ciclo das reações e tamanho dos amplicons (pb) utilizados na detecção dos genes <i>icaA</i> e <i>sasG</i> nas amostras de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Tabela 5.	Descrição das sequências dos oligonucleotídeos, ciclo das reações e tamanho dos amplicons (pb) utilizados para a tipagem do sistema Agr em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Tabela 6.	Descrição das características dos amplicons para detecção dos sete genes essenciais para a avaliação da sequência tipo de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Tabela 7.	Distribuição dos tipos de Agr nas 93 amostras MRSA oriundas de pacientes com e sem diagnóstico de COVID-19 internados em UTIs	34
Tabela 8.	Correlação dos tipos de Agr e tipo de cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>) das 93 amostras MRSA testadas	35
Tabela 9.	Correlação do tipo de sistema Agr e a capacidade de formação de biofilme	35
Tabela 10.	Caracterização da funcionalidade do sistema Agr nas 93 amostras MRSA oriundas de pacientes com e sem diagnóstico de COVID-19 internados em UTIs	37
Tabela 11.	Características genotípicas e fenotípicas das 19 amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme oriundas da UTI COVID-19	43
Tabela 12.	Características genotípicas e fenotípicas das 32 amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme oriundas da UTI Não COVID-19	44
Tabela 13.	Descrição das características gerais e resultados de todas as 93 amostras MRSA avaliadas no presente estudo	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Agr	<i>Accessory gene regulator</i>
AME	<i>Aminoglycoside modifying enzymes</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bap	<i>Biofilm associated protein</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAUTI	<i>Catheter-associated urinary tract infections</i>
CA-MRSA	<i>Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
CC	<i>Clonal complex</i>
ccr	<i>Cassete chromosome recombinases</i>
CEB	Clone Endêmico Brasileiro
CLABSI	<i>Central line associated bloodstream infection</i>
ClfA	<i>Clumping Factors A</i>
ClfB	<i>Clumping Factors B</i>
CNA	<i>Collagen Adhesin</i>
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Deoxinucleosídeos trifosfatados
DO	Densidade Óptica
DOc	Densidade Óptica de corte
DOf	Densidade Óptica final
DO492nm	Densidade Óptica a 492 nanômetro
eDNA	<i>Extracellular deoxyribonucleic acid</i>
EGM	Elemento Genético Móvel
erm	<i>Erythromycin Ribosome Methylase</i>
ETA	<i>Esfoliative Toxin A</i>
ETB	<i>Esfoliative Toxin B</i>
FnBPA	<i>Fibronectin Binding Protein A</i>
FnBPB	<i>Fibronectin Binding Protein B</i>
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IgG	Imunoglobulina G
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LA-MRSA	<i>Livestock-Associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
LIH	Laboratório de Infecção Hospitalar
MAC-MRSA	<i>Macrolide-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MDR	<i>Multidrug-Resistant</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MLS _B	Fenótipo de resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B
MLST	<i>Multilocus Sequence Type</i>
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	<i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
MSSA	<i>Methicillin susceptible Staphylococcus aureus</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

Pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBP	<i>Penicillin-Binding Proteins</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PIA	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i>
PSM	<i>Phenol-Soluble Modulins</i>
PVL	<i>Panton-Valentine Leukocidine</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SasG	<i>Staphylococcus aureus surface protein G</i>
SCC _{mec}	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus coagulase negativos</i>
SCP	<i>Staphylococcus coagulase positivos</i>
SE	<i>Staphylococcal enterotoxin</i>
SpA	<i>Staphylococcal protein A</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TSST-1	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin- 1</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTI _c	Unidade de Terapia Intensiva COVID-19
UTI _{nc}	Unidade de Terapia Intensiva não-COVID-19

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.2.	Virulência	2
1.1.2.1.	Biofilme	3
1.1.3.	Resistência aos antimicrobianos	7
1.1.4.	<i>Staphylococcus aureus</i> e Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)	8
1.1.5.	Epidemiologia das infecções causadas por <i>S. aureus</i>	10
1.2.	Pandemia de COVID-19	13
2.	JUSTIFICATIVA	15
3.	OBJETIVO	16
3.1	Estratégias	16
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1.	Desenho e fluxograma do estudo	17
4.2.	Avaliação da capacidade de formação de biofilme	20
4.3.	Extração do DNA bacteriano	21
4.4.	Deteção dos genes <i>icaA</i> e <i>sasG</i>	22
4.5.	Tipagem do sistema de <i>quorum-sensing</i> Agr e avaliação fenotípica de sua atividade	23
4.5.1.	Tipagem do Sistema Agr	23
4.5.2.	Determinação da atividade do sistema <i>agr</i> pela detecção da produção de δ -hemolisina	25
4.6.	Caracterização das linhagens clonais das amostras MRSA por meio de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE, <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>) após o tratamento do DNA com as enzimas de restrição <i>SmaI</i> e/ou <i>ApaI</i>	25
4.7.	Determinação do perfil alélico por meio de MLST (<i>multilocus sequence typing</i>) das amostras MRSA	27
4.8.	Análise estatística	29
5.	RESULTADOS	30
5.1.	Deteção da capacidade de formação de biofilme	30

5.2.	Detecção dos genes associados à formação de biofilme	32
5.3.	Tipagem do sistema Agr	33
5.4.	Análise fenotípica da funcionalidade do sistema Agr	36
5.5.	Análise genômica por eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE, <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>) e MLST (<i>Multilocus sequence typing</i>)	38
5.6.	Análise e correlação microbiológica das 51 amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme	41
6.	DISCUSSÃO	45
7.	CONCLUSÕES	53
	Referências	54
	ANEXO 1	70
	ANEXO 2	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus spp.* pertence à família *Staphylococcaceae* e engloba mais de 60 espécies (LPSN, 2024). Esse grupo de microrganismos apresenta células dispostas como cachos de uva e de coloração roxa após serem coradas pela técnica de Gram, sendo classificadas como cocos Gram positivos. Essa característica é responsável por nomear esse gênero bacteriano: do latim *staphylos*, “cacho” e *kokkos*, “semente” (Madhaiyan, Wirth e Saravanan, 2020). Bactérias integrantes desse gênero são imóveis, não formadoras de esporos e suas colônias podem apresentar coloração que varia do branco ao amarelo. Além disso, possuem uma espessa camada de parede celular, composta, principalmente, por peptidoglicano, ácido teicóico e proteínas (Bannerman e Peacock, 2007; Rohde, 2019).

A versatilidade quanto à sua forma de crescimento é outra característica muito importante nesses organismos, visto que apresentam capacidade de crescer em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, em faixas de temperaturas de 18 °C a 40 °C e em ambientes aeróbicos e anaeróbicos (Madhaiyan, Wirth e Saravanan, 2020). A produção da enzima catalase, associada aos aspectos morfotintoriais auxiliam na diferenciação de outros cocos Gram-positivos, como dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*, os quais não apresentam a capacidade de produção desta enzima, que promove a catálise da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigênio gasoso (O₂). Pode-se ressaltar também que o gênero *Staphylococcus* possui resistência a 0,04 U de bacitracina. (Bannerman e Peacock, 2007; Teixeira *et al.*, 2008; Buvelot *et al.*, 2017).

O gênero *Staphylococcus* é subdividido em dois grupos principais: *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) e *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP). Tal classificação é devido a capacidade ou não de produção da proteína coagulase, a qual reage com a protrombina plasmática, promovendo a conversão de fibrinogênio em fibrina e gerando coágulos (Crosby, Kwiecinski, e Horswill, 2016). A espécie *Staphylococcus aureus* é a de maior relevância no grupo dos SCP em humanos, enquanto no grupo dos SCN as espécies mais relevantes na literatura são *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* (Becker, Heilmann e Peters, 2014; Becker e Von Eiff, 2015; Smith e Andam, 2021).

S. aureus é frequentemente encontrado na microbiota da pele e no epitélio nasal de 20 a 40% de indivíduos saudáveis da comunidade, apesar de também ser um relevante patógeno de importância médica (Lee *et al.*, 2018; Krismer *et al.*, 2017). As narinas anteriores são o

principal reservatório deste microrganismo, contudo outros locais do corpo humano, como axilas, trato gastrointestinal, períneo e pele podem ter *S. aureus* como membro da microbiota (Sakr *et al.*, 2018). As cavidades nasais são sítios de transição entre a pele seca e as mucosas das vias aéreas, apresentando gêneros bacterianos distintos, como *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Moraxella* como colonizadores (Krismer *et al.*, 2017; Laux, Peschel e Krismer, 2019). A pouca quantidade de microrganismos na cavidade nasal está relacionada com o fato desta região possuir uma baixa presença de nutrientes importantes para o crescimento bacteriano. Nesse sentido, os microrganismos capazes de permanecer nesse ambiente promovem a secreção de proteases que degradam proteínas do hospedeiro, como albumina, lactoferrina, hemoglobina e mucina, propiciando a obtenção de nutrientes essenciais para o funcionamento do metabolismo celular destas bactérias (Krismer *et al.*, 2014; Laux, Peschel e Krismer, 2019). Além disso, *S. aureus* apresentam um arsenal de adesinas que tornam esse microrganismo mais apto para o estabelecimento da adesão, colonização nasal e processo de patogênese, como o grupo das MSCRAMMs, adesinas que serão abordadas no próximo tópico (Ghasemian *et al.*, 2015)

A grande diversidade de fatores de virulência em *S. aureus* que permitem sua evasão do sistema imune do hospedeiro, sendo um agente causal de diversos tipos de infecção, tanto em ambientes hospitalares quanto comunitários, o que torna este microrganismo um importante patógeno oportunista (Zecconi e Scali, 2013; Nowicka e Grywalska, 2019). A colonização por *S. aureus* encontra-se intimamente relacionada ao desenvolvimento posterior de infecções, principalmente em cenários onde ocorre menor resposta do sistema imunológico do hospedeiro ou quando há algum comprometimento e/ou ruptura da barreira cutânea-mucosa, possibilitando o acesso de *S. aureus* a tecidos estéreis do indivíduo e a corrente sanguínea (O’Gara, 2017).

1.1.2 Virulência

S. aureus é um patógeno com um amplo espectro de fatores de virulência que contribuem para o sucesso de colonização do hospedeiro, adesão, invasão em diferentes tecidos e ainda a capacidade de evasão do sistema imune (O’Gara, 2017; Jenul e Horswill, 2019).

O estabelecimento do processo de adesão é possibilitado por um série de proteínas superficiais, das quais se destacam as denominadas “componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva” (MSCRAMMs – *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), que são proteínas bacterianas com capacidade de reconhecimento específico à componentes da matriz extracelular do hospedeiro, como colágenos, lamininas, fibronectinas e elastinas (Foster, 2019). Nesse sentido, pode-se destacar

nesse grupo a prevalência dos genes *clfA* e *clfB*, os quais codificam proteínas de ligação ao fibrinogênio, do gene *ebp*, importante na geração de uma proteína que permite a ligação à elastina, e do gene *cna* capaz de codificar uma proteína de adesão ao colágeno (Liu *et al.*, 2010; Nowicka e Grywalska, 2019; Foster, 2019). Além disso, é importante ressaltar também a presença das proteínas A e B que se ligam à fibronectina (FnBPA e FnBPB – *fibronectin binding protein A* e *fibronectin binding protein B*) (Cheung, Bae e Otto, 2021).

Esse microrganismo também possui capacidade de produção de enzimas relevantes no cenário de obtenção de energia e disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro, como nucleases, proteases, lipases, collagenases e hialuronidasas (Tam e Torres, 2019).

Em relação à evasão do sistema imunológico do hospedeiro, a presença da cápsula polissacarídica possui um papel antifagocitário e a proteína A estafilocócica (SpA – *Staphylococcal protein A*) apresenta a capacidade de ligação à porção Fc das imunoglobulinas G (IgG), dificultando a atuação dos anticorpos e o processo de fagocitose da célula bacteriana (Foster *et al.*, 2014; Visansirikul, Kolodziej e Demchenko, 2020).

Outra relevante característica e estratégia em *S. aureus* é a secreção de toxinas que possuem ação local ou até mesmo sistêmica, como a leucocidina Pantón-Valentine (PVL), capaz de formar poros na membrana e lisar a célula, as hemolisinas (α , β , δ e γ) relacionadas a alterações da permeabilidade celular frente a interação das mesmas com a membrana alvo, danificando a célula hospedeira, as enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEM, SEN, SEO e SEU), as toxinas esfoliativas (ETA e ETB) e a toxina da síndrome do choque-tóxico (TSST-1) (Spaan, Van Strijp e Torres, 2017; Oliveira, Borges e Simões, 2018; Tam e Torres, 2019).

1.1.2.1 Biofilme

A formação do biofilme é um fator de virulência em destaque na espécie *S. aureus*. O biofilme é definido como um agregado de células microbianas que se encontram imersas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, podendo se aderir a superfícies bióticas e/ou abióticas através de proteínas de superfície celular bacteriana (Jamal *et al.*, 2018; Foster *et al.*, 2020). Muitas infecções crônicas de difícil tratamento e elevado custo estão associadas à formação de biofilme em dispositivos médicos e tecidos do hospedeiro, uma vez que as células agregadas nesta matriz se encontram menos susceptíveis à ação de antimicrobianos, devido à dificuldade de penetração destes compostos e também do sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo a persistência bacteriana no organismo (Lister e Horswill, 2014; Moormeier e Bayles, 2017). O biofilme pode também estar relacionado a um foco de disseminação em outros

sítios devido ao rompimento da matriz, liberação e dispersão dos microrganismos (Moormeier e Bayles, 2017; Le, Park e Otto, 2018).

Em geral, o processo de formação de biofilme bacteriano pode ser dividido em três etapas principais, sendo estas a adesão, maturação e dispersão (Otto, 2013). Inicialmente, a adesão bacteriana em superfície abiótica inerte envolve, principalmente, a ocorrência de ligações inespecíficas dependente da carga superficial da célula bacteriana e hidrofobicidade (Lister e Horswill, 2014). No entanto, em relação à superfície de implantes ou dispositivos médicos, a adesão ocorre, majoritariamente, pelas adesinas da parede celular bacteriana, como por exemplo as MSCRAMMs. Isto acontece pelo fato do dispositivo médico após inserido no hospedeiro ser imediatamente recoberto por proteínas plasmáticas e/ou de matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e fibrinogênio, o que potencializa a fixação do microrganismo no dispositivo (Otto, 2008; Franz *et al.*, 2011; Arciola, Campoccia e Montanaro, 2018).

Após o processo de adesão, inicia-se a fase de multiplicação das células bacterianas e formação de microcolônias, dando sequência então ao estágio de maturação do biofilme, o qual é possibilitado pela agregação bacteriana e produção da matriz extracelular polimérica (Moormeier *et al.*, 2014). O biofilme de *Staphylococcus spp.* pode apresentar diferentes biomoléculas, como polissacarídeos, proteínas e/ou DNA extracelular (Otto, 2013; Foster *et al.*, 2014). A PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) é uma glicosaminoglicana, frequentemente, presente e tem como principal função ligar as células bacterianas e garantir a integridade do biofilme. Sua expressão é controlada pelo operon *ica*, o qual é formado pelos genes *icaA*, *D*, *B* e *C* e pelo gene *icaR* que atua na regulação, sendo um repressor. O gene *icaA* é um dos principais associados a síntese polissacarídica na composição do biofilme, codificando uma enzima chamada N-acetilglucosamina transferase, responsável pela adição do açúcar N-acetilglucosamina à cadeia polissacarídica que compõem a PIA (Otto, 2013; Otto, 2018; Alabdullatif e Alzahrani, 2022).

A literatura também relata cepas MRSA (*methicillin-resistente S. aureus*) produtoras de biofilme PIA-independente, com composição bioquímica, majoritariamente, proteica. Neste caso, os biofilmes formados podem apresentar biomoléculas, como a proteína A, as proteínas de ligação à fibronectina A e B (FnBPA e FnBPB) e a proteína SasG (*S. aureus surface protein G*), as quais exercem funções essenciais para manutenção desta estrutura e acúmulo celular (Houston *et al.*, 2011). Pode-se destacar também o gene *bap*, o qual é responsável pela codificação de uma proteína de ancoragem associada à instalação do biofilme independente de PIA (Torres *et al.*, 2019). Nesse sentido, o produto gerado pela expressão do gene *bap* pode auxiliar a fixação primária do biofilme, como em substâncias inertes (Salina *et al.*, 2020). Além

disso, alguns estudos sugerem que a alta expressão de PBP2a pode inibir, por mecanismos ainda não esclarecidos, a expressão dos operons *ica* e *agr* em amostras biofilme-positivas, o que poderia estar relacionado ao fato de grande parte das amostras MRSA apresentarem biofilme proteico e aquelas MSSA (*methicillin-susceptible S. aureus*) possuírem uma composição polissacarídica. Contudo, cepas produtoras de biofilmes proteicos podem apresentar mais vantagens de adaptação ao ambiente, como a possibilidade de ter maior resistência à antimicrobianos em decorrência do fato das moléculas na matriz protéica poderem formar uma barreira mais densa e complexa que impede a penetração de compostos em comparação com a matriz polissacarídica. (Fitzpatrick, Humphreys e O'Gara, 2005; O'Neill *et al.*, 2007; Pozzi *et al.*, 2012; McCarthy *et al.*, 2015; Hosseini *et al.*, 2020).

O biofilme de *S. aureus* também pode ser composto por DNA extracelular, em virtude da lise celular realizada pelas autolisinas presentes na superfície da célula bacteriana. Esse material liberado pode se ligar a superfícies não revestidas por proteínas, auxiliando no processo de adesão (Foster *et al.*, 2014). Além disso, o crescimento do biofilme durante a etapa de proliferação e maturação é acompanhado pela produção de componentes da matriz, como eDNA (Otto, 2018)

Ao final do processo de formação de biofilme, ocorre o estágio de dispersão com o rompimento da matriz extracelular e liberação das células bacterianas, gerando um foco de disseminação para outros sítios no hospedeiro ou ambiente (Arciola, Campoccia e Montanaro, 2018). Dentre os principais mecanismos relacionados à etapa de dispersão, destaca-se o sistema de *quorum-sensing* Agr (*accessory gene regulator*), o qual pode controlar a expressão de determinados genes relacionados à virulência (proteases, hemolisinas e toxinas) de acordo com a detecção da densidade celular. Dessa forma, o operon *agr* é formado por quatro genes, denominados *agrA*, *agrC*, *agrD* e *agrB* e associados aos processos de sinalização e ativação do sistema *quorum-sensing* (Boles e Horswill, 2008; Le e Otto, 2015; Arciola, Campoccia e Montanaro, 2018; Raghuram *et al.*, 2022). Polimorfismos em AgrD, o peptídeo autoindutor, resultam em quatro diferentes grupos principais de sistema Agr, denominados de tipos I, II, III e IV (Javdan, 2019; Derakhshan, Navidinia e Haghi, 2021; Raghuram *et al.*, 2022).

O operon *agr* é composto pelo locus do RNAII, o qual apresenta o promotor P2, e pelo RNAPIII que apresenta o promotor P3 (Figura 1). A molécula efetora e intracelular de RNAPIII tem como uma das principais funções a repressão da expressão de diversas proteínas presentes na superfície da célula bacteriana e, conseqüentemente, o favorecimento da expressão de toxinas e enzimas. Essa molécula pode também ter uma atuação como RNA mensageiro do gene *hld*, responsável pela codificação da δ -hemolisina, cuja produção pode ser detectada por

teste fenotípico em ágar sangue, utilizando uma amostra controle produtora de β -hemolisina. Essa hemolisina em contato com a δ -hemolisina produzida pela amostra clínica leva a uma ação sinérgica no sangue, produzindo uma hemólise em forma de seta na interseção da ação de ambas as hemolisinas, indicando a ativação do sistema Agr (Novick e Geisinger, 2008; Thoendel *et al.*, 2011; Otto, 2013; Le e Otto, 2015). Nesse sentido, quando o sistema Agr está inativo ocorre um estímulo para que a célula bacteriana comece a expressar mais adesinas, favorecendo a adesão às superfícies e produção de biofilme. No sistema Agr ativo há a repressão de adesinas bacterianas e geração de nucleases, proteases e modulinas solúveis em fenol, chamadas de PSMs (*phenol soluble modulins*), que promovem o rompimento da matriz extracelular do biofilme, propiciando uma maior dispersão bacteriana, podendo assim atingir novos sítios com o desenvolvimento de novas infecções (Otto, 2013; Lister e Horswill, 2014; Le e Otto, 2015; Bronesky *et al.*, 2016). Todos estes processos descritos podem ser observados na Figura 1.

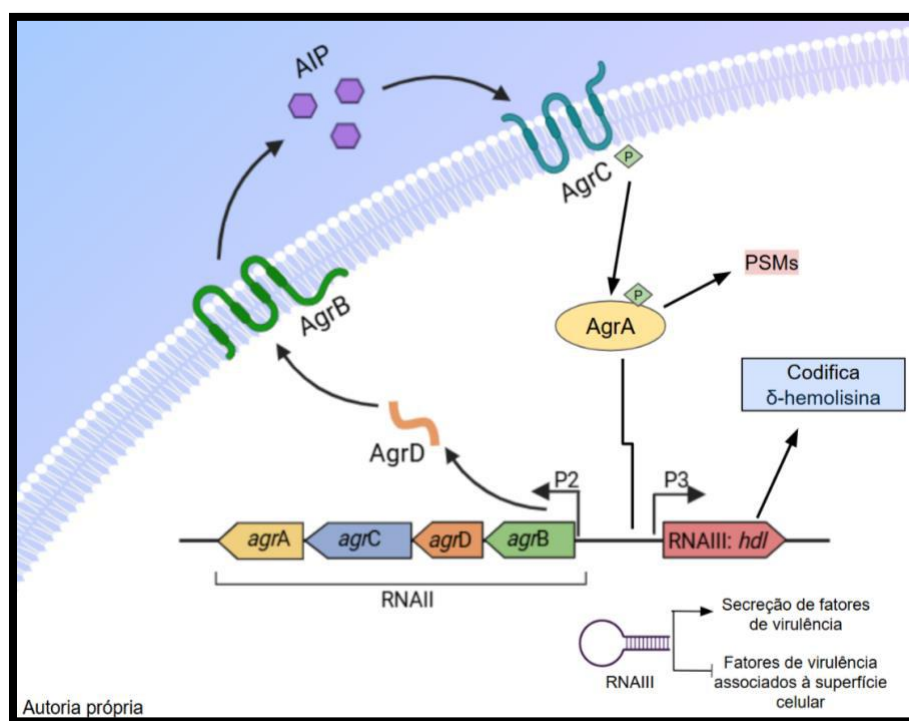


Figura 1: Esquema da organização molecular, biossíntese e transdução da cascata de sinalização do sistema *quorum sensing* Agr. O operon *agr* apresenta duas unidades transcricionais divergentes, RNAII e RNAIII. O locus RNA II é composto pelo operon *agrACDB*. AgrD é transcrito como peptídeo precursor e exportado para o meio extracelular através de AgrB que, além de exportá-lo permite sua maturação adicionando tiolactona a sua estrutura e tornando-o um peptídeo auto-indutor ou AIP. O AIP quando em alta concentração no ambiente extracelular interage com o receptor transmembrana AgrC (histidina quinase) que sofre autofosforilação e transfere um fosfato para AgrA, ativando-o. AgrA se liga tanto ao promotor P2, regulando positivamente a expressão de RNA II que promove aumento na produção de AIP, quanto ao promotor P3, levando a transcrição de RNA III, molécula efetora do sistema Agr que controla a expressão de diversos genes. AgrA também pode se ligar ao promotor dos genes que codificam as modulinas solúveis em fenol (PSMs).

1.1.3 Resistência aos antimicrobianos

No final da década de 1950, a meticilina, uma penicilina semissintética resistente à atuação das beta-lactamases, foi introduzida no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes à penicilina (Enright *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2019). No entanto, no início de 1960, já havia os primeiros relatos de cepas de MRSA na Inglaterra (Deurenberg e Stobberingh, 2008; Harkins *et al.*, 2017). Amostras MRSA possuem capacidade de produzir uma proteína alterada e adicional de ligação à penicilina, conhecida como PBP2a, que apresenta menor afinidade aos beta-lactâmicos. Dessa forma, essas cepas adquirem resistência a todas as subclasses de beta-lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas, exceto o grupo de quinta geração das cefalosporinas, como ceftarolina e ceftobiprole denominadas anti-MRSA (Chambers e DeLeo, 2009; Turner *et al.*, 2019).

A resistência à meticilina em *S. aureus* é conferida pelo gene *mecA* que codifica a proteína PBP2a e encontra-se inserido em um elemento genético móvel (EGM) denominado de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec* – *staphylococcal cassette chromosome mec*). Este é formado pelos complexos *mec*, *ccr* e a região J, sendo considerado altamente conservado entre as linhagens de *S. aureus* (Katayama, Ito e Hiramatsu, 2000; Lakhundi e Zhang, 2018). Nesse sentido, sabe-se que o complexo *mec* contém o gene *mecA*, e também apresenta genes reguladores, como *mecI* (repressor) e *mecR1* (indutor). O gene *mecA* foi o primeiro a ser descrito em amostras de *S. aureus*, e posteriormente foram relatados os homólogos *mecC* e *mecB* (Małyszko, Schwarz e Hauschild, 2014; Becker *et al.*, 2018; Partridge *et al.*, 2018). O gene *mecC* pode ser detectado no SCC*mec* do tipo XI, carregado por algumas cepas MRSA, principalmente de bovinos (García-Álvarez *et al.*, 2011). Já o gene *mecB*, inicialmente encontrado em *Macrococcus caseolyticus* e, recentemente em *S. aureus*, tem sido descrito associado a um plasmídeo (Tsubakishita *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2018). Além disso, pode-se destacar o complexo *ccr*, o qual tem capacidade de codificar recombinases importantes para inserção e deleção do SCC*mec* no DNA bacteriano, e a região J, que pode carrear genes adicionais de resistência à outros antimicrobianos e metais pesados (Wang e Archer, 2010; Liu *et al.*, 2016; Singh-Moodley *et al.*, 2020).

A existência de diferenças e complexidades na composição dos diferentes tipos de SCC*mec* baseia-se nas diversas combinações possíveis dos tipos de complexo *mec*, tipos de genes recombinases *ccr* e constituição da região J, o que tem promovido o agrupamentos de SCC*mec* em tipos, sendo já descritos 15 tipos de SCC*mec* (I ao XV) até o momento vigente, sendo os tipos I, II, III, VI e VIII normalmente relacionadas a IRAS ou a amostras de origem hospitalar (HA-MRSA, *hospital acquired S. aureus*), enquanto amostras carreadoras dos tipos

IV, V ou VII associam-se mais à amostras comunitárias, conhecidas como CA-MRSA (*community acquired S. aureus*) (Christianson *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022). No Brasil, mais especificamente na região sudeste, os tipos II, III e IV são os mais descritos (Schuenck *et al.*, 2009; Caboclo *et al.*, 2013; Damasco *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022; Augusto *et al.*, 2022).

S. aureus também pode apresentar resistência a outras classes de antimicrobianos, como aos macrolídeos (Ahirrao *et al.*, 2020). Esse cenário foi associado, recentemente, ao elevado uso de macrolídeos, como a azitromicina, durante a pandemia de COVID- 19 em alguns países, inclusive no Brasil (Del Fiol *et al.*, 2022; Solanky *et al.*, 2023). Atualmente, *S. aureus* resistente à meticilina e resistente a macrolídeos (MAC-MRSA) é um dos microrganismos clinicamente mais relevantes, visto que apresentam rápida capacidade de adquirir resistência e limitações quanto às opções terapêuticas a serem empregadas (Miklasińska-Majdanik, 2021). Há a possibilidade de ocorrer resistência cruzada com as lincosamidas e estreptograminas, gerando o fenótipo de resistência a Macrolídeo, Lincosamida e Estreptogramina B (MLS_B – *macrolides, lincosamides and streptogramine B*) (Saderi, Emadi e Owlia, 2011; Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022). Além da resistência aos macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas e beta-lactâmicos, *S. aureus* pode também apresentar resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, tetraciclinas e fluoroquinolonas (Szymanek-Majchrzak *et al.*, 2018; Okorie- Kanu *et al.*, 2020; Buonsenso *et al.*, 2023)

Cepas bacterianas que possuem resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos distintas são denominadas de multirresistentes (MDR – *multi-drug resistant*) e representam um desafio de saúde pública devido à necessidade de uso de novos antimicrobianos para terapia médica (Sahli, Feidjel e Laalaoui, 2017; Aurilio *et al.*, 2021). O fenótipo MDR já foi associado a amostras de *S. aureus* no Brasil e no mundo (Caboclo *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2013; Damasco *et al.*, 2019; Fernández *et al.*, 2021). Amostras MRSA podem apresentar esse fenótipo de multirresistência, expressando resistência às penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol, lincomicina, aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos, fluoroquinolonas, sulfonamidas e/ou rifampicina, configurando assim uma maior dificuldade no tratamento de infecções por este patógeno (Guo *et al.*, 2020).

1.1.4 *Staphylococcus aureus* e infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são infecções adquiridas no hospital ou em locais de saúde com cuidados médicos aos pacientes, que podem promover manifestações durante a internação ou até mesmo no período pós alta, sendo um grande

problema de saúde pública e de vigilância epidemiológica (Costa, Silva e Noriega, 2007; WHO, 2014). Os ambientes de saúde são considerados locais com elevado risco de disseminação de agentes infecciosos, uma vez que pacientes infectados estão no mesmo ambiente que indivíduos com a saúde debilitada. Alguns fatores de risco têm sido associados a aquisição de IRAS, como o uso contínuo de antimicrobianos levando a seleção de microrganismos resistentes, procedimentos invasivos que utilizam dispositivos médicos, como cateter venoso central, tempo prolongado de permanência no ambiente hospitalar e internação em UTIs - Unidades de Terapia Intensiva (Madigan *et al.*, 2016). Além disso, vale ressaltar a possibilidade de transmissão de patógenos pelos profissionais de saúde, visto que estes encontram-se constantemente em mobilidade e atuação no ambiente hospitalar, podendo ser expostos aos patógenos e facilitar a transferência de microrganismos entre os indivíduos internados (Da Silva *et al.*, 2020).

S. aureus é um patógeno que pode causar diferentes níveis de quadros infecciosos, desde manifestações mais brandas até processos mais graves. Dessa forma, pode estar associado às infecções superficiais de pele, como furunculoses, celulite, abscessos, e também infecções invasivas, como endocardite, osteomielite, pneumonias e bacteremia/septicemia (Otto, 2012; Tong *et al.*, 2015; Plumet *et al.*, 2022). Além disso, é importante ressaltar os processos patológicos associados à produção de toxinas bacterianas, como a síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e intoxicação alimentar (Carroll, 2014).

A colonização prévia por *S. aureus* é considerado o fator de risco mais relevante para o estabelecimento de infecções, principalmente as IRAS (Sakr *et al.*, 2018; Nurjadi *et al.*, 2020). Estudos, como de Troeman e colaboradores, 2023, envolvendo 10 países da Europa, 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 somente 0,85/100 pacientes para indivíduos que não estavam colonizados, o que destaca que indivíduos carreadores de *S. aureus*, especialmente cepas MRSA, podem mais facilmente desenvolver infecções (Cadena *et al.*, 2016; Callejo-Torre *et al.*, 2016). Nesse sentido, torna-se relevante o monitoramento contínuo da colonização por cepas de *S. aureus*, incluindo as MRSA, principalmente dentro de um ambiente hospitalar de alta pressão seletiva, como as unidades de tratamento intensivo (Zhou *et al.*, 2020)

A literatura tem mostrado também um aumento na ocorrência de IRAS por amostras MRSA (*methicillin resistant S. aureus*) provenientes da comunidade em indivíduos internados (Park *et al.*, 2013; Caboclo *et al.*, 2013; Sharara; Maragakis e Cosgrove, 2021; Augusto *et al.*, 2022). As infecções por MRSA estão relacionadas a quadros de maior morbidade e mortalidade,

e aumento dos custos hospitalares, principalmente em casos de infecções de corrente sanguínea (Gudiol *et al.*, 2017; Sakr *et al.*, 2019).

Um importante aspecto associado ao *S. aureus* como patógeno causador de IRAS é sua capacidade de formar biofilme (Otto, 2018; Sohail *et al.*, 2023). Além de causar doença aguda, *S. aureus* pode promover infecções crônicas de difícil tratamento, muitas das quais estão frequentemente associadas à capacidade deste patógeno de se aderir a dispositivos médicos e formar biofilme (O'Neill *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2020). Como exposto anteriormente, essa complexa estrutura do biofilme atua como uma barreira frente às moléculas de reconhecimento do sistema imunológico do hospedeiro e à terapia antimicrobiana, possibilitando a sobrevivência da bactéria e agravando o quadro de infecção (Reynolds e Kollef, 2021). A porcentagem de infecções bacterianas que envolvem biofilmes pode variar, estimando-se cerca de 65% de todas as infecções de acordo com o Centro de Controle de Doenças (CDC) a 80% segundo os Institutos Nacionais de Saúde (NIH), ambos órgãos dos EUA (Joo e Otto, 2012).

1.1.5. Epidemiologia das infecções causadas por amostras MRSA

O estabelecimento de infecções por amostras MRSA relacionam-se a taxas de mortalidade mais elevadas do que infecções causadas por amostras MSSA, podendo levar a um período de internação e despesas hospitalares superiores (Wolk *et al.*, 2009; Thampi *et al.*, 2015). Sabe-se que essas infecções estão associadas aos ambientes hospitalares e ocorrem mais comumente em indivíduos hospitalizados, com sistema imunológico comprometido, e em extremos etários, sendo causadas por amostras MRSA resistentes também à outras classes de antimicrobianos, como fluoroquinolonas, macrolídeos e aminoglicosídeos (David *et al.*, 2014).

A análise da epidemiologia molecular das infecções causadas por amostras MRSA pode ser estabelecida mediante a eletroforese em campo pulsado (PFGE – *Pulsed field gel electrophoresis*), técnica esta que consiste na realização da fragmentação do DNA cromossômico da bactéria pelo tratamento com enzimas de restrição e separação, a qual apresenta um elevado poder discriminatório entre linhagens de *S. aureus* (Naimi *et al.*, 2001; McDougal *et al.*, 2003). Em 2009, foi proposto por Van Belkum e colaboradores critérios de classificação dos resultados obtidos pelo PFGE, definindo que para serem consideradas do mesmo clone, as amostras devem possuir 80% ou mais de similaridade entre si e/ou até quatro fragmentos gênicos de diferença.

Outra metodologia molecular frequentemente aplicada é a descrita por Enright e colaboradores em 2000, que aborda a tipagem por sequenciamento de multilocus enzimáticos (MLST - *multilocus sequence typing*) através da caracterização de sete genes constitutivos (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yquiL*) essenciais na produção de determinadas enzimas importantes para o funcionamento do metabolismo celular bacteriano. Dessa maneira, é realizada a determinação do perfil alélico observado em cada um desses genes para uma cepa e quando esses alelos são combinados podem compor uma sequência tipo (*sequence type*, ST). Pode-se ressaltar também que amostras em grupos de STs que apresentam até 2 alelos de diferença apresentam uma relação evolutiva próxima e são agrupadas dentro de um mesmo complexo clonal (CC) (Enright *et al.*, 2000). A determinação do tipo de SCCmec e as técnicas de PFGE e MLST quando associadas propiciam um melhor entendimento e caracterização das linhagens clonais de *S. aureus* (McDougal *et al.*, 2003). Assim, os clones de *S. aureus* podem ser diferenciados por PFGE e podem ser agrupados em STs, mediante a observação da proximidade evolutiva das amostras testadas. Outra metodologia de estudo epidemiológico em *S. aureus* é a tipagem do gene *spa*, responsável pela codificação da proteína A, que permite a avaliação de polimorfismos em uma região variável do gene em questão para o estabelecimento de linhagens (Li *et al.*, 2019).

Em 2003, McDougal e colaboradores padronizaram as nomenclaturas das linhagens/clones MRSA frequentemente observadas nos Estados Unidos. Logo, oito linhagens, denominadas de USA100 a USA800, foram descritas tendo como suporte a correlação dos dados obtidos pelo PFGE, MLST e tipagem do gene *spa*. Posteriormente, outras linhagens como USA900, USA100 e USA1100 foram descritas e seus perfis clonais atribuídos (Tenover *et al.*, 2008; Monecke *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2018). Dessa forma, diferentes linhagens clonais MRSA já foram observadas pelo mundo (Lee *et al.*, 2018; Lakhundi e Zhang, 2018) (Tabela 1).

Tabela 1. Características das principais linhagens clonais de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina mais comumente detectadas no cenário mundial

Linhagens clonais	SCCmec	Tipo de Agr	CC/ST	PVL
Associadas a comunidade				
USA300	IV	1	8/8	+
EMRSA-15 (Reino Unido)	IV	1/2	22/22	-/+
USA1000 (Taiwan)	IV	1	59/59	-/+
USA1100 (Oceania)	IV	3	30/30	+
Associadas ao hospital				
Clone arcaico (Europa)	I	1/4	5/250	-
USA100 (NY/Japão)	II	2	5/5 ou 105	-
USA200	II	3	30/36	-
USA500	IV	1	8/8	-
USA400	IV	3	1/1	+
USA800 (Pediátrico)	IV	2	5/5	-
USA600 (Canadense; Berlim)	II	1/4	45/45	-
CEB, Húngaro	III	1	8/239	-

CEB: Clone endêmico brasileiro; CC: Complexo clonal; EMRSA: *S. aureus* resistente à meticilina epidêmico; SCCmec: Cassete cromossômico estafilocócico mec; ST: Sequência tipo; PVL: Leucocidina Pantón-Valentine; Agr: Regulador de genes acessórios.

O clone brasileiro carreador do SCCmec III e pertencente ao ST239/CC8 (CEB, clone endêmico brasileiro), descrito por Teixeira e colaboradores (1995), inicialmente foi muito associado a grande parte das infecções hospitalares por cepas MRSA no começo dos anos 2000 (Vivoni *et al.*, 2006; Caboclo *et al.*, 2013). Entretanto, nos últimos anos diversos estudos demonstraram no Brasil a emergência de outras linhagens, como CC5/ST5, CC8/ST8 e CC45/ST45 (Ribeiro *et al.*, 2007; Pires *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2019, Damasco *et al.*, 2019). Além desses estudos, em 2017, Chamon e colaboradores em um estudo realizado com amostras de dois hospitais no Rio de Janeiro, observaram a predominância do clone USA100 (CC5/ST5) sob o clone CEB (CC8/ST239), carreadores dos SCCmec tipos II e III, respectivamente. Cepas do tipo IV detectadas em pacientes de hospitais do Rio de Janeiro normalmente estão associadas aos genótipos USA800/ST5 e USA1100/ST30, e amostras carreadoras do SCCmec II relacionam-se a linhagem USA100/ST5 e ST105 (da Costa *et al.*, 2016; Chamon *et al.*, 2017; Damasco *et al.*, 2019, Augusto *et al.*, 2022). Recentemente, amostras associadas a infecções de origem comunitária, que geralmente apresentam

características de maior virulência e menor resistência, têm emergido em hospitais nacionais, como cepas USA300 com SCCmec IV e ST8/CC8, USA1100 com SCCmec IV e ST30/CC30 e USA400 com SCCmec tipo IV e ST1/CC1 (Bride *et al.*, 2019; Veloso *et al.*, 2019; Cavalcante *et al.*, 2021; Augusto *et al.*, 2022, Whitaker, C O, 2022).

O aumento de cepas MRSA pertencente a linhagem USA100 em hospitais brasileiros é um cenário crítico, pois tal linhagem pode apresentar resistência à mupirocina, muito utilizada na descolonização nasal dos pacientes, e resistência à vancomicina e à daptomicina, usadas como principais opções terapêuticas em infecções (da Costa *et al.*, 2016; Chamon *et al.*, 2017). Alguns estudos já demonstraram também que amostras dessa linhagem estão associadas com a capacidade de formação de biofilme (Vanhommerig *et al.*, 2014; King *et al.*, 2016).

No Brasil também há relatos quanto à infecção e colonização por clones MRSA não comuns no perfil epidemiológico nacional, como a detecção de clones do CC398 (André *et al.*, 2017; Da Silva *et al.*, 2020). Tal linhagem possui um caráter zoonótico, colonizando diferentes espécies animais, dos quais os porcos são um dos principais hospedeiros. As amostras pertencentes a este complexo clonal estão associadas a pecuária e, em cenários cujas cepas apresentam resistência à metilina estas são denominadas LA-MRSA (*live-stock associated MRSA*) (Tuominen *et al.*, 2023). Entretanto, a disseminação de LA-MRSA pode não ocorrer apenas pelo contato direto entre humanos e pecuária, visto que já foi relatada a propagação para indivíduos que não apresentavam qualquer contato com animais (Deiters *et al.*, 2015; Larsen *et al.*, 2015)

1.2 Pandemia de COVID-19

No final de 2019, o vírus SARS-CoV-2 foi relatado em Wuhan, na China, propagando-se rapidamente por diferentes países e conduzindo a uma pandemia mundial, tendo taxas de infecções superiores a 690 milhões e índices de letalidade superiores a 6,9 milhões (Marschalek, 2023). Esse vírus acomete o sistema respiratório, podendo estabelecer infecção, principalmente, no trato respiratório inferior e o contato por gotículas é uma das principais formas de transmissão desse patógeno (Han *et al.*, 2020; Yuki, Fujiogi e Koutsogiannaki, 2020). Em 11 de março de 2020, a OMS - Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*) declarou oficialmente estado de pandemia de COVID-19, *Coronavírus Disease 2019* (WHO, 2020). Poucos anos depois, com os programas de vacinação e aumento das taxas de imunização com a consequente redução dos casos da doença, o estado de emergência de saúde pública da pandemia de COVID-19 foi removido pela OMS (OPAS, 2023).

Pacientes com COVID-19 grave podem apresentar coinfeções bacterianas e fúngicas, acarretando em aumento da gravidade da doença e redução de sua sobrevivência, sendo *S. aureus* um dos mais relevantes microrganismos associados a infecções bacterianas e capaz de elevar o índice de mortalidade dos indivíduos acometidos (Cusumano *et al.*, 2020; Romanelli *et al.*, 2023)

Durante a pandemia de COVID-19 houve maior uso de antimicrobianos e sanitizantes, resultando numa maior pressão seletiva, o que possivelmente acarretou a emergência de microrganismos resistentes, como amostras MRSA (Zhou *et al.*, 2020; Rizvi e Ahammad, 2022). Os antimicrobianos foram utilizados no suporte de coinfeções bacterianas e/ou fúngicas, em casos suspeitos e confirmados de COVID-19, em tratamentos empíricos e em indivíduos que adquiriram IRAS (Rawson *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2021). Baker e colaboradores (2022), em um estudo de coorte prospectivo realizado em 148 hospitais de Boston, EUA, observaram que infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres centrais, infecções do trato urinário associadas a cateteres e bacteremia por MRSA aumentaram à medida que a carga de COVID-19 se elevou, enfatizando a necessidade de cuidados na pandemia de COVID-19 concomitante com a rotina constante de controle e prevenção de infecções no ambiente hospitalar. Em estudo de Grasselli e colaboradores (2021) foi realizada uma análise retrospectiva de dados coletados de todos os pacientes com COVID-19 internados nas UTIs de oito hospitais centrais italianos, e observou-se que pacientes gravemente afetados pela doença apresentavam um alto risco de aquisição de IRAS por bactérias multirresistentes (MDR), especialmente pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções de corrente sanguínea.

De acordo com a literatura, um dos microrganismos de maior destaque associado às infecções hospitalares em indivíduos com COVID-19 foi o MRSA (Bhargava *et al.*, 2021; Möllers *et al.*, 2022; Polly *et al.*, 2022). Ainda é importante destacar que a colonização prévia por MRSA configura-se como um fator de risco para posterior aquisição de infecções invasivas (Hardy *et al.*, 2004). Contudo, estudos envolvendo amostras provenientes de colonização ainda são pouco abordados na literatura. Um estudo realizado por Engen e col. (2021), em Chicago, que avaliou o microbioma da região nasofaríngea de indivíduos positivos e negativos para COVID-19, mostrou que amostras de *Staphylococcus* eram mais frequentes em pacientes com COVID-19. Deve-se destacar que, durante a pandemia, ocorreu maior uso de agentes antimicrobianos, aumentando o risco de taxas mais elevadas de resistência mediante a seleção de amostras resistentes (Ghosh, Bornman e Zafer, 2021). Portanto, avaliar a colonização por *S. aureus* no período pandêmico causado pela COVID-19 é importante, principalmente, para controle epidemiológico e estabelecimento de medidas de prevenção e controle

2. JUSTIFICATIVA

Infecções por *S. aureus* são favorecidas pelo amplo espectro de fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos e antissépticos apresentados por este patógeno oportunista, implicando em manifestações clínicas e quadros com tratamento mais complexos, além do aumento no período de internação e nas taxas de morbidade e mortalidade. A capacidade de formação de biofilme por amostras de *S. aureus* é considerado um relevante fator de virulência nesse contexto, já que microrganismos presentes no microambiente do biofilme possuem perfis de crescimento reduzido, favorecendo sua persistência no local. Destaca-se o fato dessas células sésseis serem capazes de se aderir a uma matriz, resultando em uma bem estruturada comunidade bacteriana, facilitando a transferência horizontal de genes de resistência por essas bactérias, e a seleção de amostras multirresistentes. No contexto da pandemia de COVID-19 houve uma maior utilização de antimicrobianos e saneantes, possivelmente propiciando aumento da pressão seletiva sobre microrganismos no ambiente hospitalar, assim como no ambiente comunitário, culminando na seleção e disseminação de amostras MRSA.

Paralelamente, sabe-se que a colonização prévia por *S. aureus*, em particular por amostras MRSA, é uma condição de risco para o desenvolvimento de IRAS. Dessa forma, esse estudo poderá contribuir com dados de importância epidemiológica e acerca da virulência de amostras MRSA, incluindo aquelas multirresistentes, isoladas de colonização nasal de pacientes internados durante a pandemia de COVID-19, auxiliando no monitoramento dessas cepas no Brasil, aspecto importante para o estabelecimento de medidas de prevenção e controle de infecções hospitalares e colonização, promovendo o emprego de políticas de higiene mais rígidas a fim de viabilizar uma maior segurança aos pacientes.

3. OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo avaliar amostras MRSA isoladas de colonização nasal de pacientes internados em UTIs de um hospital do Rio de Janeiro, em um período da pandemia de COVID-19, quanto aos aspectos fenotípicos e moleculares associados à produção de biofilme, e determinar o perfil clonal de amostras fortes e moderadas produtoras de biofilme.

3.1. Estratégias

1. Determinar a capacidade de formação de biofilme em placa de poliestireno;
2. Detectar a presença dos genes *icaA* e *sasG*, e o tipo de Agr através de PCR;
3. Determinar a funcionalidade do sistema Agr através da detecção fenotípica da produção de δ -hemolisina em ágar-sangue;
4. Determinar a linhagem clonal das amostras fortes e moderadas produtoras de biofilme através de PFGE e MLST;
5. Relacionar os aspectos microbiológicos associados aos pacientes nas duas UTIs avaliadas, COVID e não COVID

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho e fluxograma do estudo

Esse estudo é parte de uma coorte prospectiva, de caráter transversal e laboratorial, registrado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa sob o número CAAE: 39277320.5.0000.5284 (ANEXO 1). Amostras de *S. aureus* oriundos de *swabs* nasais de vigilância epidemiológica foram coletadas de pacientes com e sem diagnóstico de COVID-19 internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ, na cidade do Rio de Janeiro, entre setembro de 2020 e setembro de 2021.

Durante o período da pandemia de COVID-19, este hospital tornou-se um local de referência para tratamento de pacientes diagnosticados com a doença. O hospital apresenta cerca de 300 leitos ativos, sendo 51 designados para cuidados intensivos, dos quais em média 37 leitos foram voltados para atender pacientes com COVID-19 e 14 reservados para aqueles não diagnosticados com a doença. O fato de o hospital não possuir atendimento de emergência ativo permitiu que pacientes positivos para COVID-19 fossem transferidos de outras unidades de saúde e internados na UTI COVID-19 (UTIc) neste hospital. Por outro lado, os pacientes internados na UTI não-COVID-19 (UTInc) faziam tratamento regular no hospital, que atende na maioria pacientes com doenças crônicas, mas também pode receber pacientes encaminhados de outros locais de saúde. O diagnóstico da doença foi confirmado mediante a técnica de RT-qPCR para todos os pacientes com diagnóstico de COVID-19. O ambiente hospitalar e os leitos utilizados eram higienizados com produtos à base de cloro e álcool, respectivamente, em ambas UTIs.

Foram internados nas UTIs deste hospital durante um ano, um total de 10.408 pacientes/dia, com e sem diagnóstico de COVID-19, e dentre estes 7.691 pacientes/dia foram hospitalizados na UTIc e 2.717 pacientes/dia na UTInc. O conceito de paciente/dia neste estudo foi baseado na ocupação diária de leitos hospitalares, ou seja, corresponde a quantidade de pacientes ocupando os leitos em um período de 24 horas.

Todos estes pacientes foram submetidos à coleta de *swabs* de vigilância epidemiológica, tendo em vista que as coletas foram realizadas em até 72 horas depois da entrada do paciente nas UTIs. Para esse estudo foi considerado apenas o primeiro *swab* nasal positivo para *S. aureus* de cada paciente, totalizando 255 amostras, sendo 93 identificadas como MRSA, as quais foram previamente caracterizadas quanto à espécie, perfil de resistência antimicrobiana e tipo de SCCmec. Estas amostras fazem parte da coleção de isolados do Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH) do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, onde estão armazenadas em

caldo TSB (Tryptic Soy Broth, BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD, EUA) contendo 20% (v/v) de glicerol (Proquimios Comércio e Indústria Ltda; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e estocadas em uma temperatura de -20 °C (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989).

O fluxograma do presente estudo pode ser observado na figura 1. As amostras controles utilizadas nos experimentos estão relacionadas na tabela 2 enquanto as amostras clínicas previamente caracterizadas e foco deste estudo estão descritas na tabela 3.

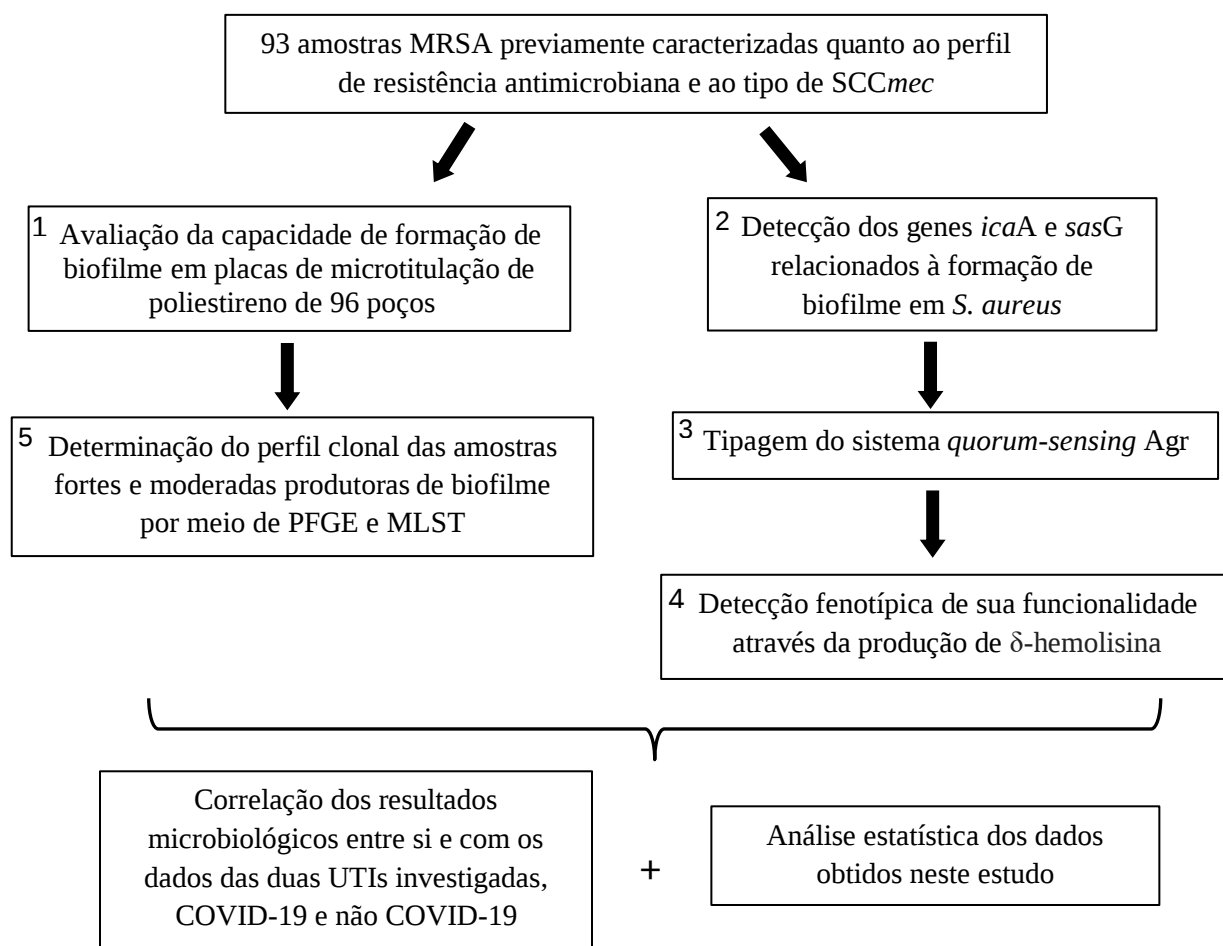


Figura 2: Fluxograma da metodologia empregada no presente estudo. MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. UTIs: Unidades de Terapia Intensiva; PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; MLST: *Multi Locus Sequence Typing*.

Tabela 2. Amostras controles de *Staphylococcus aureus* que foram utilizadas neste estudo

Amostra	Característica	Referência
ATCC6538 (INCQS 00039)	Amostra forte produtora de biofilme; Amostra padrão na análise de susceptibilidade aos saneantes	Fiocruz, 1987 (cedida pelo INCQS)
ATCC33591	Amostra positiva para o gene <i>icaA</i>	na
1125a*	Amostra positiva para o gene <i>sasG</i> ; gene sequenciado	Matos, 2013
Mu50	SCCmec tipo II; linhagem USA 100/ST5; Amostra controle <i>agr</i> tipo II; Amostra padrão negativa para δ -hemolisina	Hiramatsu <i>et al.</i> , 1997
63a*	SCCmec tipo III; CEB/ST239; Amostra controle <i>agr</i> tipo I	Augusto <i>et al.</i> , 2022
1342a*	Amostra com sistema Agr tipo III	Chamon <i>et al.</i> , 2017
1453a*	Amostra com sistema Agr tipo IV	Chamon <i>et al.</i> , 2017
RN4220	Amostra produtora de β -hemolisina	Novick, 1967
523a*	MSSA; linhagem USA 400/ST1; Amostra clínica positiva para δ -hemolisina	Guimarães, 2018

ATCC: *American Type Culture Collection*; *Amostra clínica; CEB: Clone endêmico brasileiro; CMI: concentração mínima inibitória; na: não se aplica.

Tabela 3. Características das 93 amostras MRSA isoladas de *swab* nasal de pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro durante a pandemia de COVID-19, entre setembro de 2020 e setembro de 2021, e utilizadas no presente estudo

Características	N (%) de amostras		
	Total (93)	UTI COVID (33)	UTI Não-COVID (60)
MDR	52 (55,9)	22 (66,7)	30 (50)
SCC_{mec}			
Tipo II	21 (22,6)	11 (33,4)	10 (16,7)
Tipo III	1 (1,1)	1 (3)	-
Tipo IV	65 (69,8)	19 (57,6)	46 (76,7)
Tipo V	2 (2,2)	1 (3)	1 (1,6)
NT	4 (4,3)	1 (3)	3 (5)

MDR: Multidroga resistente (resistentes a pelo menos 3 classes de antimicrobianos); NT: Não tipável; UTI: unidade de terapia intensiva; UTI COVID: Pacientes positivos para COVID-19; UTI Não-COVID: Pacientes negativos para COVID-19

4.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Para as 93 amostras de *S. aureus* foi realizada a técnica de quantificação da produção de biofilme, segundo descrito por Stepanović e colaboradores, 2007. Inicialmente, foi feito o cultivo das amostras em ágar TSA (BD) para observação da pureza e posteriormente, as placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. Após o período de crescimento em meio sólido, essas amostras foram inoculadas em TSB (BD) para crescimento em meio líquido por 24 horas por 37 °C. Em paralelo, foram distribuídos 180 µL de TSB (BD) acrescido de 1 % glicose (p/v) para mimetização de um ambiente de estresse do hospedeiro (Isofar; Duque de Caxias, RJ, Brasil) em uma placa de 96 poços de fundo chato (Costar; Corning, NY, EUA).

As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de alíquotas de TSB com crescimento bacteriano em tubos contendo 3 mL de água destilada estéril a fim de atingir uma turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL; absorbância entre 0,08 e 0,1 a 600 nm). Em seguida, 20 µL de cada suspensão bacteriana foram inoculadas nos poços contendo TSB e glicose, em triplicata experimental. É importante destacar que para o branco (controle negativo) foram separados oito poços (última fileira vertical na placa) que continham apenas 180 µL de TSB + 1 % de glicose. Como amostra controle foi utilizada a amostra ATCC 6538, classificada como forte produtora de biofilme.

A placa foi então incubada por período de 24 horas. Após esse período de incubação, o meio de cultura com crescimento e células não aderidas foram descartados por inversão da placa e foi realizada uma lavagem com 200 μ L de tampão PBS 1 X (phosphate buffered saline, Laborclin; Pinhais, PN, Brasil) estéril. Em seguida, o PBS foi descartado por inversão e a placa foi incubada a 37 °C por 10 minutos, com a tampa aberta. Uma nova incubação a 60 °C por 1h foi realizada para fixação do biofilme formado. Logo após, 150 μ L de safranina 0,1 % (Fisher Scientific Company; Fair Lawn, NJ, EUA) foram adicionados e a placa foi mantida à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Após esse período, a safranina foi removida e foi realizada uma lavagem com 200 μ L de PBS 1X estéril. A placa foi invertida e mantida em temperatura ambiente por 10 minutos. Para a eluição do corante aderido ao biofilme, foi feita a adição de 150 μ L de etanol a 92% em cada poço e incubado em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após agitação leve da placa para homogeneização do conteúdo dos poços foi realizada a leitura a 492 nm em espectrofotômetro (Thermo Plate TP Reader NM, EUA).

Os valores de densidade óptica (DO) gerados pelo aparelho foram analisados. De início, foi feito o cálculo da média do branco com os oito valores de DO obtidos. O mesmo raciocínio é seguido para as amostras, a média das mesmas foi calculada com os valores de DO dos três poços utilizados para cada uma. Em seguida foi determinada a densidade óptica final (DO_f), a qual corresponde à média de cada amostra subtraída da média do branco. Assim, a determinação da classificação das amostras quanto ao grau de formação de biofilme foi baseada nos seguintes parâmetros: DO_f da amostra < 25% da DO_f do controle é considerado não produtor, 25% - 50% da DO_f do controle é considerado fraco produtor, 50% - 75% da DO_f do controle é considerado produtor moderado e > 75% da DO_f do controle é considerado forte produtor, conforme estabelecido por Smith e colaboradores, 2008.

4.3 Extração do DNA bacteriano

A obtenção do DNA bacteriano foi realizada mediante a lise com isotiocianato de guanidina, conforme descrito por Pitcher, Saunders e Owen (1989), com adaptações. Inicialmente, foi feita a semeadura das amostras em TSA (BD) e incubadas a 35°C, por 24 horas. Com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, cerca de 3 a 5 colônias do crescimento foram inoculadas em um microtubos contendo 1 mL de tampão TE 1X [Tris 10 mM (Invitrogen, Massachusetts, EUA), EDTA 1 mM, pH 7,8 (Promega, Wisconsin, EUA)]. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em microcentrifuga (Eppendorf Mastercycler Gradient; Hamburgo, Alemanha) durante 5 minutos a 8000 xg. Em seguida, o sobrenadante foi descartado

e adicionado ao sedimento 100 μL da solução de lise [1 mL de tampão TE, 10 mg de lisozima (Sigma-Aldrich Chemical Company, Missouri, EUA) 50 μL de polietilenoglicol (BRIJ a 0,5% (p/v)) (Sigma-Aldrich Chemical Company)] e 5 μL de lisostafina (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich Chemical Company). Na sequência, foi realizada a incubação em banho-maria a 37°C durante 2 h e, após este período, foram adicionados 500 μL de solução de isotiocianato de guanidina (Life Technologies, Gathersburg, MD, EUA) em concentração inicial de 5 M, sendo, então, realizada uma agitação manual para posterior incubação em temperatura ambiente, em repouso por 5 a 10 minutos. As amostras passaram pelo processo de refrigeração por 10 minutos e foi feita a adição de 250 μL de acetato de amônio 7,5 M (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), seguido novamente por uma agitação manual. Logo em seguida, 500 μL de clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1 (v/v) foram adicionados e homogeneizados manualmente. A solução gerada foi centrifugada a 13000 g por 12 minutos, sendo formado assim uma fase aquosa e uma orgânica, e aproximadamente 800 μL da fase aquosa, onde o DNA encontra-se, foram transferidos para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionado 0,54 volumes/ μL (aproximadamente 430 μL) de isopropanol gelado (Vetec). O microtubo foi agitado suavemente durante 1 min, e após centrifugação a 13000 xg por 5 min, o sobrenadante gerado foi descartado. Posteriormente, o precipitado foi lavado com 100 μL de etanol a 70% gelado (Vetec), centrifugado novamente a 13000 g por 5 min e o sobrenadante foi desprezado. Após todos esses processos, o DNA bacteriano obtido no sedimento foi acrescido de 50 μL de tampão TE 1X, com intuito de ressuspender o material, e este foi incubado em banho maria a 55 °C, por 1h. Na etapa final, foi necessário realizar a quantificação das amostras utilizando o aparelho Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Em seguida, os microtubos com o DNA obtido foram estocados a -20°C para realização posterior das técnicas de PCR e MLST.

4.4 Detecção dos genes *icaA* e *sasG*

A técnica de PCR foi realizada para detecção dos genes *icaA* e *sasG*, associados a capacidade de formação de biofilme, para todas as 93 amostras de *S. aureus*, utilizando-se um termociclador (*Eppendorf Mastercycler Gradient*, Hamburgo, Alemanha). As sequências dos oligonucleotídeos, o ciclo das reações e o tamanho dos amplicons (pb) estão descritos na tabela 4. Em ambas as reações, foi utilizado um tubo de microtitulação em que foram adicionados 2,5 μL de tampão da enzima 1 X (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 5 mM de MgCl_2 , 200 μM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 0,6 μM dos oligonucleotídeos, 0,3 μL de *Taq* DNA polimerase a 5 U/ μL , 3 μL (~150 ng) de DNA obtido de cada amostra, e água de injeção para completar o volume de 25 μL . Como controles positivos

das reações foram utilizadas as amostras de *S. aureus* ATCC 33591 para detecção do gene *icaA* e a amostra clínica 1125a para o gene *sasG*.

Após a etapa de amplificação dos genes, foi realizada a corrida de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Carlsbad, EUA), a 1,5% (p/v) para os genes *icaA* e *sasG*, em 100 mL de TBE 0,5 X (Tris 0,89 M; 0,89 M ácido bórico; 2,5 mM EDTA, pH 8,2) (Sigma; Saint Louis, MO, EUA), numa faixa de 80V e por 1 hora. O gel foi corado com Unisafe®. (Uniscience, Flórida, EUA) na concentração final de 0,5X. O padrão de tamanho molecular de 100pb (Life Technologies, Califórnia, EUA) foi usado na eletroforese. As bandas no gel foram visualizadas sob luz ultravioleta, por meio de um fotodocumentador (VilberLourmat/França).

Tabela 4. Descrição das sequências dos oligonucleotídeos, ciclo das reações e tamanho dos amplicons (pb) para a detecção dos genes *icaA* e *sasG* nas amostras de *Staphylococcus aureus*

Genes	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Ciclo de amplificação	Referência
<i>icaA</i>	icaAF: AAACCTGGTGCGGTTACAGG	750 pb	95°C – 4 min 95°C – 30 s } 50°C – 90 s } 35x 72°C – 45 s } 72°C – 1 min	Martín-Lopez <i>et al.</i> , 2002
	icaAR: TCTGGGCTTGACGTTG			
<i>sasG</i>	sasGF:CGCTGATCAGAGATAAGAAAG	311 pb	93°C – 3 min 94°C – 1 min } 50°C – 1 min } 30x 72°C – 1 min } 72°C – 1 min	Roche <i>et al.</i> , 2003
	GACCGG			
	sasGR:CGCTGATCATTAAATTCCTTCTT			
	CTACGAG			

pb: pares de bases.

4.5 Tipagem do sistema de *quorum-sensing* Agr e avaliação fenotípica de sua atividade

4.5.1 Tipagem do Sistema Agr

A técnica de PCR *multiplex* foi realizada para tipagem do sistema *quorum-sensing* Agr para todas as 93 amostras de *S. aureus*, de acordo com a metodologia estabelecida por Gilot e colaboradores (2002). Como controle positivo da reação, foram utilizadas as amostras clínicas de *S. aureus* 63a como controle do *agr* tipo I, 1342a para *agr* do tipo III, 1453a para o tipo IV e a amostra de *S. aureus* padrão Mu50 como controle do *agr* tipo II.

A amplificação dos fragmentos ocorreu através de um termociclador (*Eppendorf Mastercycler Gradient*, Hamburgo, Alemanha), utilizando o ciclo de amplificação descrito na tabela 5. Na reação foi utilizado um tubo de microtitulação em que foram adicionados 2,5 µL de tampão da enzima 1 X (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 5 mM de solução de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 0,3 µM de cada oligonucleotídeos pan-*agr*, *agr1*, *agr2*, *agr3* e *agr4* (Tabela 2), 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase a 5 U/µL, 2 µL (~ 100 ng) de DNA extraído de cada amostra, e água de injeção para completar o volume de 25 µL.

Após a etapa de amplificação dos genes, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) para observação dos tipos de *agr*, a 80 V, por 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado com 2,5 µL de Unisafe® (20.000x) (*Uniscience*, Flórida, EUA) em 100 mL de TBE 0,5 X (Tris 0,89 M; 0,89 M ácido bórico; 2,5 mM EDTA, pH 8,2) (Sigma; Saint Louis, MO, EUA), sendo a concentração final de 0,5 X de Unisafe® (*Uniscience*, Flórida, EUA). Os produtos amplificados foram analisados utilizando um padrão de tamanho molecular de 100pb (Life Technologies). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta por meio de um fotodocumentador (VilberLourmat/França).

Tabela 5. Descrição das sequências dos oligonucleotídeos, ciclo das reações e tamanho dos amplicons (pb) utilizados para tipagem do sistema Agr em amostras de *Staphylococcus aureus*

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Ciclo de amplificação	Referência
pan- <i>agr</i>	F- ATGCACATGGTGCA CATGC	-		
<i>agr1</i>	R1- TCACAAGTACTATA AGCTGCGAT	441pb		
<i>agr2</i>	R2- TATTACTAATTGAAA AGTGCAAGC	575pb	94°C – 5 min 94°C – 30 s 55°C – 30 s 72°C – 1 min 72°C – 10 min	26x Gilot <i>et al.</i> , 2002
<i>agr3</i>	R3- GTAATGTAATAGCTT GTATAATAATACCG	323pb		
<i>agr4</i>	R4- CGATAATGCCGTAA TACCCG	659pb		

pb: pares de base; F: forward; R: reverse

4.5.2 Determinação da atividade do sistema *agr* pela detecção da produção de δ -hemolisina

A δ -hemolisina (Hld) é codificada pelo gene *hld*, o qual se encontra inserido no operon *agr* (Janzon e Arvidson, 1990). Nesse sentido, com a funcionalidade do Agr há a produção de δ -hemolisina. Todas as 93 amostras MRSA do estudo foram analisadas quanto à funcionalidade do Agr por meio da detecção fenotípica da produção de δ -hemolisina em placas de ágar sangue contendo sangue de carneiro à 5% (Laborclin; Pinhais, PN, Brasil), para detecção da expressão do operon *agr*, conforme descrito por Adhikari e colaboradores (2007).

Inicialmente, uma cultura da cepa RN4220, anteriormente incubada à 37 °C por 18 horas em placas de TSA (Oxoid), foi semeada como estria única, de borda a borda, no centro do meio de ágar sangue. Em seguida, as amostras clínicas foram inoculadas de forma perpendicular à amostra RN4220 (produtora de β -hemolisina), também como estrias únicas, sem encostar nesta amostra (Figura 6). Posteriormente, as placas foram incubadas à 37 °C por 18 horas e, então, passaram pela análise visual. Caso a amostra seja produtora de δ -hemolisina haverá uma ação sinérgica com a β -hemolisina produzida pela amostra RN4220, promovendo o surgimento de uma zona de hemólise em forma de seta na interseção, o que indica a ativação do sistema Agr (Adhikari, Arvidson e Novick, 2007). As amostras controles utilizadas foram a amostra padrão Mu50 (negativa para δ -hemolisina) e a amostra clínica 523a (positiva para δ -hemolisina).

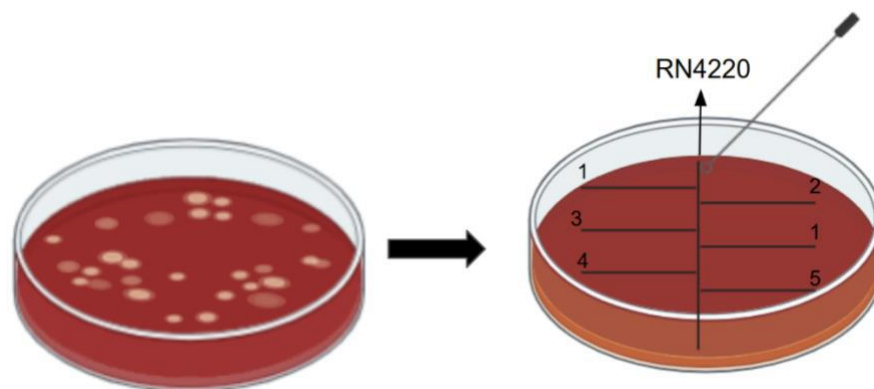


Figura 3. Esquema representando a semeadura para realização do teste de detecção fenotípica da produção de δ -hemolisina. 1 e 2: Controles negativo e positivo; 3,4 e 5: Amostras clínicas.

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

O perfil clonal das amostras fortes e moderadas produtoras de biofilme foi avaliado após a fragmentação do DNA cromossômico frente a ação das enzimas de restrição *SmaI* e/ou *ApaI*,

utilizando eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), segundo descrito por Vivoni e colaboradores, 2006, e Guimarães e colaboradores, 2022, com modificações.

Primeiramente, as amostras foram crescidas em ágar sangue de carneiro (Plast Labor; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e incubadas a 35°C durante 48 horas. Em seguida foram preparadas suspensões bacterianas em tubos de ensaio contendo 3 mL de TSB (BD), ajustadas de acordo com a turbidez da 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] e foram incubadas a 37 °C por 2 a 4 h sob agitação (250 rpm) até atingir turvação relativa à escala 2 de McFarland [Densidade ótica_{600nm} = 0,4 ou 0,5 (*Cell Density Meter*, Biochrom LTDA, Cambridge, Inglaterra); aproximadamente $6,0 \times 10^8$ UFC/ mL]. Em seguida, 1,5 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para um tubo de microtitulação e centrifugados a 5.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento 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), anteriormente preparada em tampão PIV e aquecida a 58°C. Ao terminar a homogeneização, a solução feita foi distribuída em moldes e mantidas 4 °C por 10 minutos com objetivo de solidificar a agarose. Após esse processo, os moldes gerados foram cortados com o auxílio de um bisturi em pequenos blocos com cerca de 35 µL cada e transferidos para tubos 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] adicionada de 0,05 mg/mL de lisostafina e 0,5 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich Chemical Company). Os tubos foram incubados a 37 °C sob leve agitação, por 16 a 18 horas. Após incubação, as amostras foram refrigeradas a 4 °C por 10 minutos e a solução de lise foi então descartada e substituída por 1 mL da solução ES [EDTA 0,4 M, pH 9,5, 1% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio] acrescida de 0,1 mg/mL de Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemical Company). Os tubos com as amostras foram mantidos por 18 horas em banho-maria, a 50 °C. Em seguida, os tubos foram novamente resfriados 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 obtidos foram armazenamento a 4 °C. Para as próximas etapas, apenas um bloco de agarose por amostra foi necessário para realização da quebra do DNA cromossômico. Com isso, o bloco foi colocado em um novo tubo e, então, foram realizadas cinco lavagens consecutivas com 1 mL TE em banho-maria a 37 °C, por 1 hora cada, exceto a penúltima, que foi realizada após 18 horas. Após a etapa das lavagens, o tampão TE foi substituído por 150 µL do tampão 4, ideal para o bom funcionamento da enzima de restrição *Sma*I (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra), na concentração final de 1X, a 25 °C pelo

período de 4 horas. Após esse tempo, o tampão foi removido e novamente 150 µL do tampão 4 a 1X foi adicionado, complementado nessa etapa com 20 U da enzima de restrição *SmaI*, e incubado por 18 horas a 25 °C.

Para as amostras que apresentam os marcadores genotípicos do CC398 e que foram previamente caracterizados, também foi preciso uma exposição à enzima *ApaI* após utilização da enzima *SmaI*. Assim, após a retirada do tampão e da enzima *SmaI* 150 µL do tampão 4 1X e 10 U da enzima *ApaI* (New England BioLabs) foram adicionados ao tubo com o DNA, acrescido de 1,5 µL de albumina sérica bovina a 10 mg/ml (Promega; Madison, WI, EUA), durante 1 h a temperatura de 25 °C.

Posteriormente, o bloco de agarose foi fundido a 70 °C e aplicado no gel de agarose a 1% (p/v), preparado com TBE 0,5X [Ácido bórico 50 mM (Promega, EUA); Tris 50mM (Invitrogen, EUA); EDTA 0,2 mM (Promega, EUA); pH 8,0]. Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad; Hercules, CA, EUA), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35 segundos durante 21 horas, numa voltagem de 6 V/cm e à temperatura 14 °C, com ângulo de 120°C. Decorrido o tempo da eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (Sigma, Aldrich Chemical Company, EUA) na concentração de 0,5 mg/L por um período de 40 minutos. O padrão molecular utilizado para esta técnica foi o marcador 50 – 1.000 Kb *Lambda Ladder PFGE Marker* (New England BioLabs, Massachussets, EUA). A obtenção da imagem do gel corado ao final do processo foi realizada por meio de um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Alemanha).

Os padrões dos fragmentos do DNA cromossômico obtidos com o PFGE foram analisados mediante a versão 7.6.3 do *software* Bionumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Com isso, foi gerado um dendograma com tolerância a 2% pelo programa frente a análise do perfil de bandejamento através do coeficiente de similaridade *Dice* e do método *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA). As amostras que apresentarem no máximo 4 bandas de diferença ou, pelo menos, 80% de similaridade foram consideradas e incluídas em um mesmo perfil de clonalidade (Van Belkum et al., 2009).

4.7 Determinação do perfil alélico por meio de MLST (*multilocus sequence typing*) das amostras MRSA

A definição da sequência tipo (ST) foi realizada através da técnica descrita por Enright *et al.* (2000) para *multilocus sequence typing* (MLST). Para avaliar a sequência tipo (ST) de cada amostra foi realizado o sequenciamento de genes constitutivos e altamente conservados em cepas *S. aureus*, importantes por serem essenciais para a sobrevivência bacteriana e correto

funcionamento do metabolismo celular. Sendo assim, foi selecionada uma amostra correspondente de cada clone observado por meio dos resultados gerados pela metodologia do PFGE. Os sete genes fundamentais dessas amostras foram submetidos à PCR *uniplex*, cujos amplicons passaram pelas etapas de purificação e sequenciamento.

A amplificação dos genes foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), como reações *uniplex* em microtubos contendo tampão de enzima 1X, MgCl_2 a 2 mM, dNTP na concentração de 200 μM cada, 0,3 μL de *Taq* DNA polimerase a 5 U/ μL (Promega), 3 μL de DNA bacteriano extraído, com cerca de 90 ng, obtido pela técnica demonstrada no item 4.6, 0,2 μM de cada oligonucleotídeos e água de injeção sem nucleases para completar o volume até 50 μL . Todos os genes procurados, o ciclo de amplificação e o tamanho correspondente de cada um dos fragmentos gênicos estão ilustrados na tabela 6.

Ao final do processo de amplificação dos genes, os *amplicons* obtidos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), complementada com Unisafe® 0,5X, utilizando-se o padrão molecular de 100 pb DNA *Ladder* (Biotools). A eletroforese ocorreu a 90 V durante um tempo 90 minutos em tampão TBE 0,5X, e a imagem foi obtida através de um fotodocumentador.

Os fragmentos obtidos pela PCR foram purificados por meio do sistema comercial *GTX PCR and band purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), conforme as orientações do fabricante. Em seguida, o DNA agora purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (Thermo Fisher Scientific), e posteriormente, foi sequenciado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, utilizando-se o sistema MegaBACE 1.000 com 96 poços. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo sistema comercial *DYEenamic ET Dye Terminator*, com Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase. Por fim, as sequências obtidas foram analisadas, utilizando o banco de dados oferecido pela página <http://pubmlst.org>, para que possa ser feita a determinação do ST por meio da comparação de cada amostra e dos sete alelos.

Tabela 6. Descrição das características dos amplicons para detecção dos sete genes essenciais para a avaliação da sequência tipo de *Staphylococcus aureus*

Gene	Sequência (5' – 3')	Fragmento (pb)
<i>arcC</i>	F: TTGATTACACCAGCGGTATTGTC R: AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	570
<i>aroE</i>	F: ATCGGAAATCCTATTTACATTC R:GGTGTTGTATTAATAACGATATC	536
<i>glpF</i>	F:CTAGGAACTGCAATCTTAATCC R:TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	543
<i>gmk</i>	F: ATCGTTTTATCGGGACCATC R:TCATTAACACAACGTAATCGTA	488
<i>pta</i>	F: GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG R: GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	575
<i>tpi</i>	F:TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAATTR: TGCACCTTCTAACAATTGTAC	475
<i>yqiL</i>	F: CAGCATACAGGACACCTATTGGC R:CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	598

Ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final de 7 minutos a 72 °C. Enright *et. al.* (2000). F: forward; R: reverse

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas mediante o uso do *software* GraphPad Prism versão 8 (GraphPad^R, San Diego, USA). As análises das variáveis foram executadas utilizando os testes exatos de Fisher, Qui-quadrado e Mann-Whitney U. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes na circunstância em que o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Detecção da capacidade de formação de biofilme

Todas as 93 MRSA foram avaliadas quanto a capacidade de formação de biofilme em placa de microtitulação de poliestireno com TSB acrescido com 1% glicose e corada com safranina a 0,1% (p/v) (Figura 2). Dessa forma, observou-se que a maioria das amostras (42; 45,2%) foi classificada como fraca produtora de biofilme, seguida de amostras moderadas (33; 35,5%) e fortes (18; 19,3%) produtoras de biofilme.

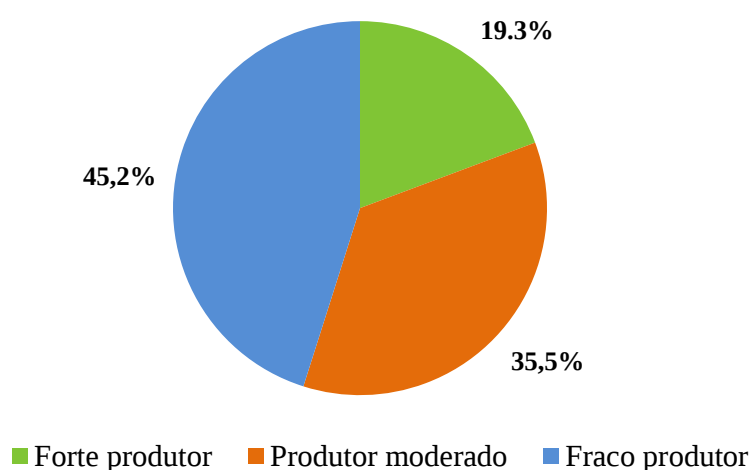


Figura 4 – Distribuição das 93 amostras MRSA de acordo com a capacidade de formação de biofilme

Em relação às amostras oriundas da UTI COVID (33/93) podemos observar que 33,3% (11/33) foram classificadas como fortes produtoras, 24,2% (8/33) foram produtoras moderadas, e 42,5% (14/33) foram avaliadas como fracas produtoras. Por outro lado, dentre as amostras da UTI não COVID (60/93), pode-se destacar que somente 11,7% (7/60) das amostras foram fortes produtoras de biofilme, 41,7% (25/60) foram produtoras moderadas e 46,6% (28/60) foram classificadas como fracas produtoras. Assim, verificou-se que as amostras MRSA fortes produtoras de biofilme (18/93) foram mais frequentemente detectadas dentre aquelas oriundas da UTI COVID (33,3% [11/33]; $p = 0,0114$) (Figura 3).

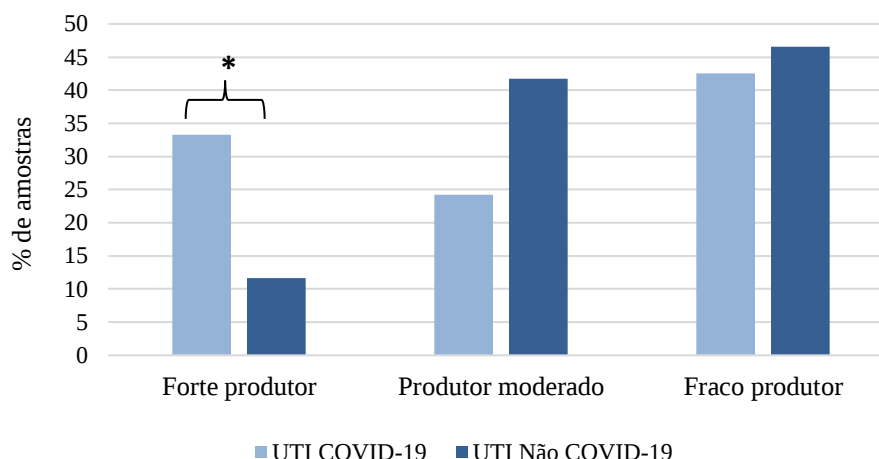


Figura 5. Distribuição da capacidade de formação de biofilme em 93 amostras MRSA oriundas de pacientes com e sem diagnóstico de COVID-19 em UTIs de um hospital do Rio de Janeiro durante a pandemia de COVID-19. * $p = 0.0114$

Além disso, foi realizada uma análise dos resultados da capacidade de formação de biofilme em relação ao tipo de *SCCmec* apresentado pelas amostras testadas (Figura 4). Dentre as amostras que apresentaram o *SCCmec* tipo II (21/93) observou-se que apenas 1 (4,7%) era forte produtora de biofilme, 3 (14,3%) eram produtoras moderadas e 17 (81%) eram fracas produtoras. Já em relação às amostras com *SCCmec* tipo IV (66/93), 14 (21,2%) foram fortes produtoras de biofilme, 28 (42,4%) foram produtoras moderadas e 24 (36,4%) foram produtoras fracas. Entre aquelas que apresentaram o *SCCmec* tipo V (2/93), uma amostra foi forte produtora de biofilme e a outra foi fraca produtora. A única amostra MRSA do estudo com *SCCmec* tipo III foi classificada como sendo forte produtora de biofilme.

Logo, pode-se observar que as amostras que apresentaram o *SCCmec* tipo IV foram mais frequentemente produtoras de biofilme, havendo uma relação significativa entre as amostras com produção moderada e *SCCmec* tipo IV ($p = 0.0287$). Assim, ao avaliarmos as amostras fortes e moderadas em conjunto, verificou-se que 42 (63,6%) das 66 amostras com *SCCmec* tipo IV apresentavam este perfil de forte ou moderada produção de biofilme. Além disso, houve uma relação significativa das amostras fracas produtoras de biofilme com o *SCCmec* tipo II ($p = 0,0002$).

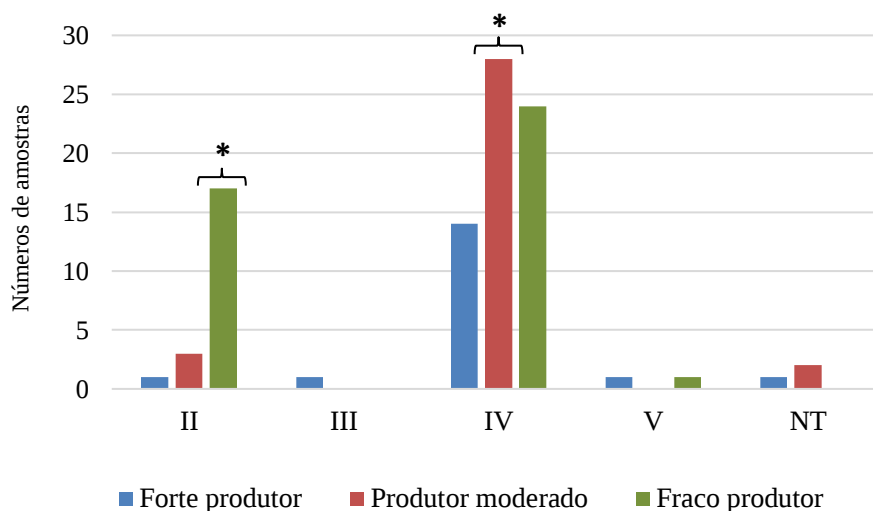


Figura 6. Correlação da capacidade de formação de biofilme com o tipo de cassette cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) em 93 amostras MRSA. Produção moderada em amostras com o SCC*mec*IV: $p = 0,0287$; Fraca produção em amostras com o SCC*mec*II: $p = 0,0002$.

5.2 Detecção dos genes associados à formação de biofilme

As 93 amostras MRSA foram submetidas à técnica de PCR *uniplex* para detecção dos genes *icaA* e *sasG*, os quais estão relacionados à capacidade de ligação entre as células que compõem o biofilme. Os resultados mostraram que todas as 93 amostras testadas foram positivas para o gene *icaA*, o que destaca uma alta prevalência desse gene (Figura 5). Além disso, em 82 (88,2%) amostras também foi possível detectar a presença do gene *sasG* (Figura 6), com 90,9% (30/33) das amostras provenientes da UTI COVID-19 positivas para este gene e 86,6% (52/60) daquelas oriundas da UTI não COVID-19. Além disso, em média 60% (7/11) das amostras com ausência do gene *sasG* foram também classificadas como fracas produtoras de biofilme ($p = 0.5515$), já dentre as amostras positivas para presença deste gene 57% (47/82) apresentaram fenótipo de produção de biofilme forte/moderado.

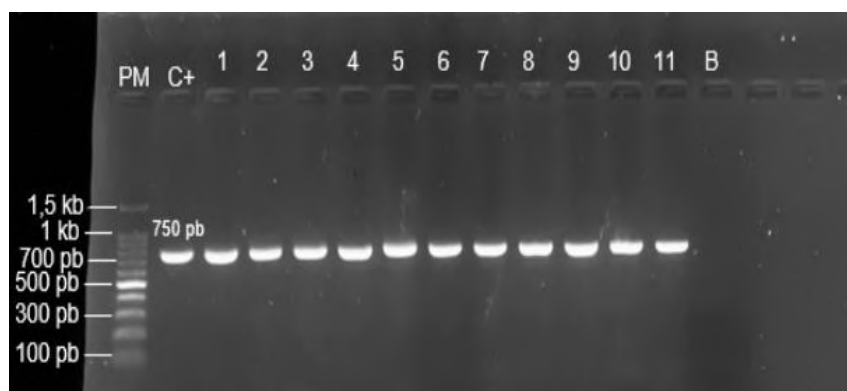


Figura 7. Gel representativo de eletroforese para a detecção do gene *icaA* (750 pb). PM: Padrão molecular (100 pb DNA Ladder); C+: Controle positivo; 1 ao 11: Amostras positivas no estudo; B: branco; pb: Pares de base; kb: kilobases

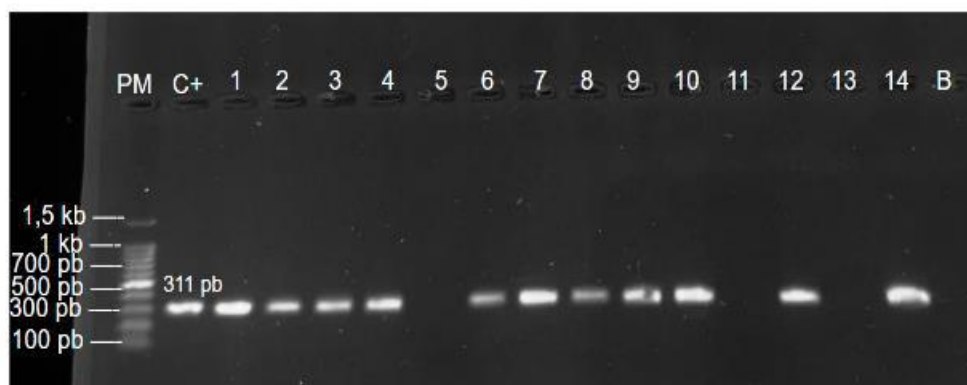


Figura 8. Gel representativo de eletroforese para a detecção do gene *sasG* (311 pb). PM: Padrão molecular (100 pb DNA Ladder); C+: Controle positivo; 1 - 4, 6 - 10, 12 e 14: Amostras positivas no estudo; 5, 11 e 13: Amostras negativas; B: branco; pb: Pares de base; kb: kilobases

5.3 Tipagem do sistema Agr

Todas as amostras do estudo foram submetidas a PCR *multiplex* e eletroforese dos amplicons para tipagem do sistema Agr (Figura 7). Os resultados mostraram que a maior parte das amostras (61; 65,5%) apresentou o Agr tipo II, seguido por amostras com Agr tipo I (23; 24,8%) e amostras com Agr tipo III (9; 9,7%). A análise dos diferentes tipos de Agr de acordo com a UTI pode ser observada na tabela 7. O Agr tipo II foi prevalente nas UTIs, não tendo sido observada relação do tipo de sistema Agr com uma UTI específica.

Tabela 7. Distribuição dos tipos de Agr nas 93 amostras MRSA oriundas de pacientes internados nas UTIs COVID-19 e não-COVID

Tipo de Sistema Agr	UTI de origem N (%) de amostras		
	Total (n=93)	UTI COVID-19 (n=33)	UTI Não COVID-19 (n=60)
I	24 (25,8%)	10 (30,3%)	13 (21,7%)
II	60 (64,5%)	20 (60,7%)	41 (68,3%)
III	9 (9,7%)	3 (9%)	6 (10%)

Agr: Regulador de genes acessórios; n: número de amostras; UTI: Unidade de terapia intensiva

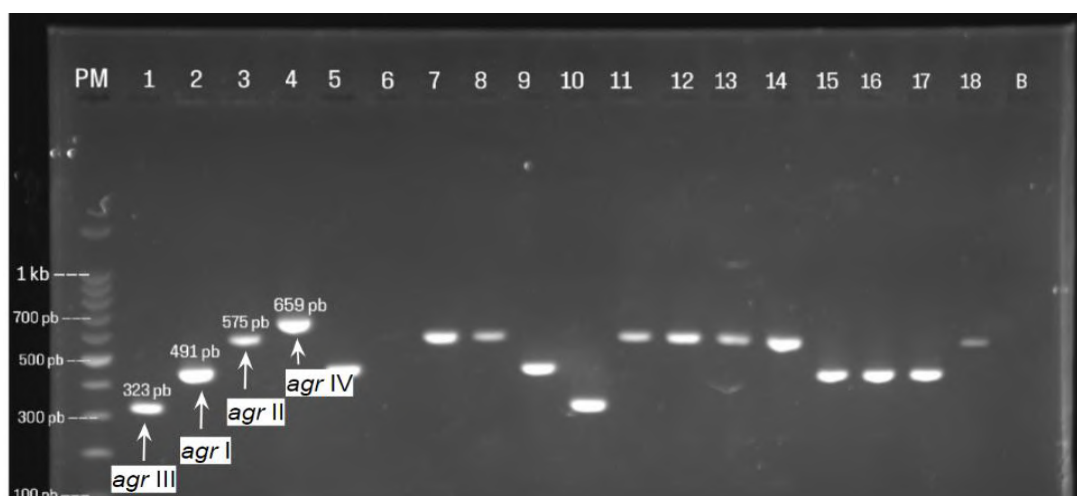


Figura 9. Gel de eletroforese representativo dos tipos de Agr. PM: Padrão Molecular (100 pb); Coluna 1: controle positivo do *agr* III; coluna 2 controle positivo *agr* I; coluna 3: controle positivo *agr* II; coluna 4: controle positivo *agr* IV; colunas 5, 9, 15, 16 e 17: amostras clínicas representativas do *agr* I; colunas 7, 8, 11, 12, 13, 14 e 18: amostras clínicas representativas do *agr* II; coluna 10: amostra clínica representativa do *agr* III; B: branco.

Entre as amostras carreadoras do SCCmec II (21/93), 95,2% (20/21) apresentaram o Agr II e apenas uma o Agr tipo I. Já entre aquelas com SCCmec IV (66/93), um total de 60,6% (40/66) apresentou o Agr tipo II, 28,8% (19/66) o Agr tipo I e 10,6% (7/66) o Agr tipo III (Tabela 8). Com base na análise estatística o Agr tipo II foi associado ao SCCmecII ($p = 0,0024$). O Agr IV não foi detectado nas amostras estudadas.

Tabela 8. Correlação entre os tipos de Agr e os tipos de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) das 93 amostras MRSA testadas

Tipo de Sistema Agr	Tipo de SCC <i>mec</i> N (%) de amostras				
	II (n=21)	III (n=1)	IV (n=66)	V (n=2)	NT (n=3)
I	1 (4,8%)	1 (100%)	18 (27,3%)	2 (100%)	1 (33,3)
II	20* (95,2%)	0	41 (62,1%)	0	0
III	0	0	7 (10,6%)	0	2 (66,7)

Agr: Regulador de genes acessórios; n: número de amostras; * $p = 0,0024$

Também foi avaliada a relação entre o tipo de sistema Agr e a capacidade de formação de biofilme. Dentre as amostras com Agr tipo II 56,7% (34/61) eram fracas produtoras de biofilme, 26,3% (16/61) eram produtoras moderadas e 18% (11/61) eram fortes produtoras. Enquanto, entre as amostras com Agr tipo I a produção moderada, forte e fraca de biofilme foi observada em 65,2% (15/23), 26% (6/23) e 8,7% (2/23) das amostras, respectivamente. Além disso, entre as poucas amostras que apresentaram Agr tipo III 6 eram fracas produtoras de biofilme, 2 moderadas e apenas 1 forte produtora (Tabela 9). Houve relação significativa entre amostras com Agr tipo I e produção moderada de biofilme ($p = 0,0006$) e entre aquelas com Agr tipo II e fraca produção de biofilme ($p = 0,0047$).

Tabela 9. Correlação entre os tipos de Agr e a capacidade de produção de biofilme das 93 amostras MRSA testadas

Tipo de Sistema Agr	Produção de biofilme N (%) de amostras		
	Forte (n=18)	Moderada (n=33)	Fraca (n=42)
I	6 (33,3%)	15* (45,4%)	2 (4,8)
II	11 (61,1)	16 (48,5%)	34* (80,9%)
III	1 (5,6)	2 (2,1)	6 (14,3%)

Agr: Regulador de genes acessórios; n: número de amostras; * $p < 0,05$

5.4 Análise fenotípica da funcionalidade do sistema Agr

A avaliação da funcionalidade do operon *agr* por meio da detecção da presença de δ -hemolisina em placas de ágar sangue de carneiro foi realizada para todas as amostras. A visualização de uma hemólise em forma de seta, que ocorre na área de interseção com a amostra RN4220, indica a ativação desse sistema (Figura 8). Dessa forma, observou-se que a maioria das amostras apresentou o operon *agr* ativo, totalizando 66,7% (62/93) (Figura 9).



Imagem de autoria própria

Figura 10. Placa de Ágar Sangue ilustrativa para avaliação da funcionalidade do operon *agr* nas amostras MRSA através do teste fenotípico de detecção de δ - hemolisina. 1: RN4220: Amostra produtora de beta-hemolisina; 2: Controle negativo; 3: Controle positivo; 4, 5 e 6: Amostras clínicas positivas; 7: Amostra clínica negativa

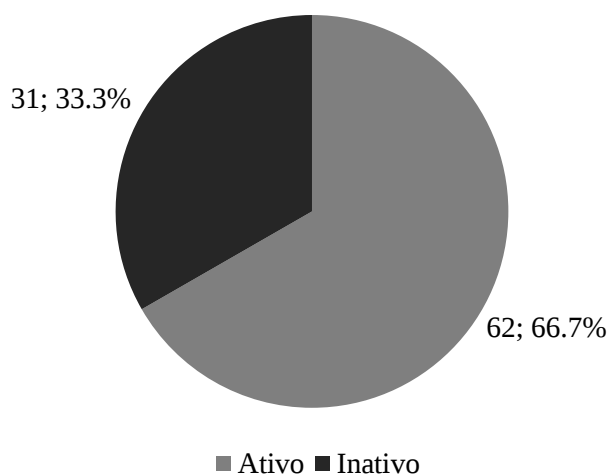


Figura 11. Distribuição das 93 amostras MRSA segundo a funcionalidade do sistema Agr.

Ao analisar a distribuição das amostras ativas e inativas em relação à UTI de origem do paciente, os resultados indicaram que dentre as amostras provenientes da UTI COVID-19, 63,6% (21/33) e 36,4% (12/33) eram ativas e inativas, respectivamente, sendo também observados percentuais próximos nas amostras da UTI Não COVID-19 (Tabela 10). Na análise estatística, não houve relação significativa.

Tabela 10. Caracterização da funcionalidade do sistema Agr nas 93 amostras MRSA oriundas de pacientes com e sem diagnóstico de COVID-19 internados em UTIs

Funcionalidade do Sistema Agr	UTI de origem N (%) de amostras	
	UTI COVID-19 (n=33)	UTI Não COVID-19 (n=60)
Ativo	21 (63,6%)	41 (68,3%)
Inativo	12 (36,4%)	19 (31,7%)

Agr: Regulador de genes acessórios; n: número de amostras, UTI: Unidade de terapia intensiva

A correlação dos tipos de sistema Agr com sua funcionalidade foi realizada para as 93 amostras MRSA. Assim, foi possível verificar que dentre aquelas que apresentaram o sistema Agr ativo, 37 (59,6%) das 62 amostras apresentava o Agr tipo II, 17 (27,4%) tinha o Agr tipo I e 8 (13%) apresentava o Agr tipo III (Figura10).

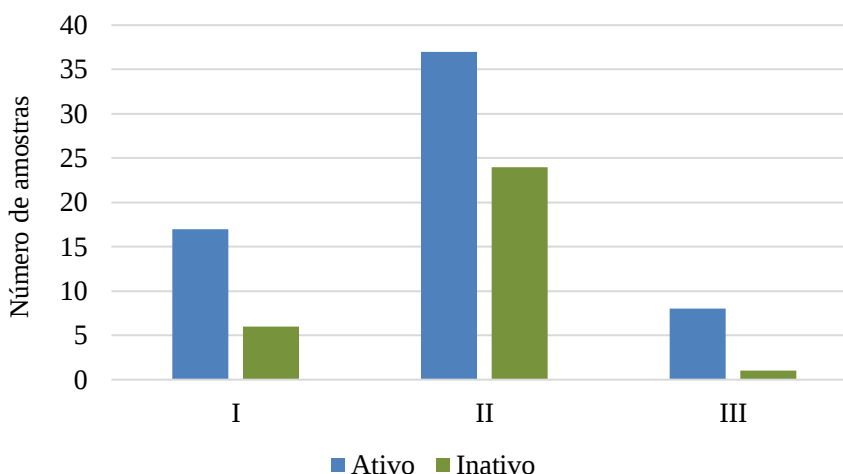


Figura 12. Correlação dos tipos de sistema Agr com sua funcionalidade em 93 amostras MRSA testadas.

Neste estudo, quando avaliamos a inatividade do sistema Agr em relação a forte/moderada produção de biofilme, verificamos 51% (16/31) das amostras com sistema inativo apresentaram esse perfil de formação de biofilme, porém não houve relação significativa entre essas características ($p = 0.6585$). Houve uma distribuição semelhante dos perfis de formação de biofilme entre os grupos com Agr ativo ou inativo, como mostrado na Figura 11.

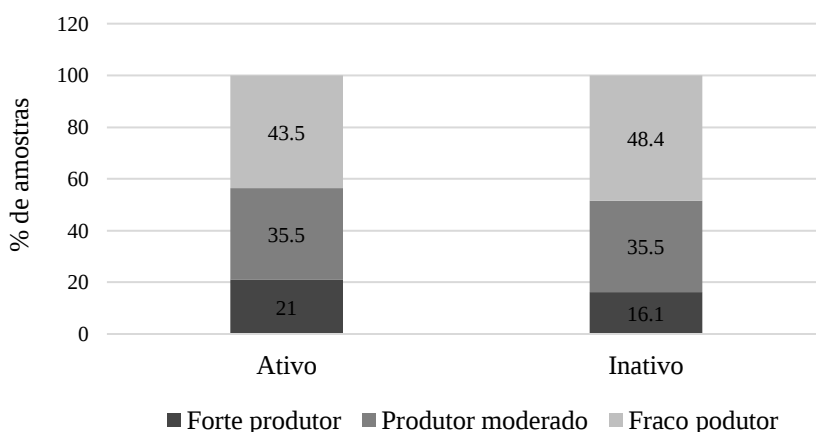


Figura 13. Distribuição dos fenótipos de formação de biofilme das 93 amostras MRSA de acordo com a funcionalidade do operon *agr*.

5.5 Análise genômica por eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e MLST (*multilocus sequence typing*)

Para a identificação do perfil de fragmentação do DNA genômico foram selecionadas as 51 amostras MRSA classificadas como fortes ou moderadas produtoras de biofilme. Além disso, essa tipificação foi complementada pela determinação da sequência tipo (ST) por meio da técnica de MLST para amostras selecionadas de cada *cluster* e para aquelas que não foram passíveis de serem tipificadas por PFGE. Dentre as amostras analisadas, 44 foram visualizadas após tratamento com a enzima de restrição *SmaI*, método padrão de fragmentação do DNA genômico em amostras de *S. aureus*. Enquanto 3 amostras, que apresentaram os marcadores genéticos para o CC398, previamente caracterizados, foram tratadas com as enzimas *SmaI* e *ApaI*, conforme previamente demonstrado na literatura. Para outras 4 amostras não foi possível a tipagem através da técnica de PFGE.

A análise dos resultados e parâmetros de classificação foi baseada no seguinte critério: amostras com até quatro bandas de diferença, ou com mais de 80% de similaridade foram consideradas como da mesma linhagem clonal. Dessa forma, dentre as 51 (54,8%) amostras

fortes/moderadas produtoras de biofilme, 52,9% apresentaram CC5/SCC*mec* tipos IV ou II e 31,4% eram amostras associadas à comunidade e foram inseridas nos CC8/ST8-IV e CC30-IV.

As linhagens relacionadas às 47 amostras MRSA que conseguiram ser tipificadas pelo PFGE estão representadas nas figuras 12 e 13, que demonstram os perfis de PFGE, os STs e os tipos de SCC*mec*. Foi possível assim observar que entre as 44 amostras tratadas apenas com a enzima *SmaI* (Figura 12), 50% (22/44) pertenciam à linhagem USA800/CC5-SCC*mec*IV, 31,82% (14/44) eram USA300/CC8-IV, 6,82% (3/44) eram da linhagem USA100/CC5-II, 4,54% (2/44) eram USA1100/CC30-IV e outras duas eram USA400/CC1 com o SCC*mec* não tipável. Foi detectada uma única amostra pertencente ao CC8/ST239 e classificada como clone endêmico brasileiro (CEB).

A partir do dendrograma gerado (Figura 12), amostras de cada grupo foram selecionadas para determinar o ST. Obteve-se assim uma maioria de amostras associadas ao perfil USA800/SCC*mec*IV que pertenciam ao ST5/CC5, e uma delas apresentou *double allele*, sendo o ST5 a classificação mais próxima. Aquelas com perfil USA300/SCC*mec*IV eram do ST8/CC8 e as amostras USA100/SCC*mec*II foram associadas ao ST105/CC5, das quais 1 apresentou *single allele*, sendo também o ST105 o mais próximo. Dentre as amostras USA1100/SCC*mec*IV, uma pertencia ao ST714/CC30 e a outra ao ST30/CC30, enquanto para aquelas com perfil USA400 o SCC*mec* foi não tipável e elas foram associadas ao ST1/CC1.

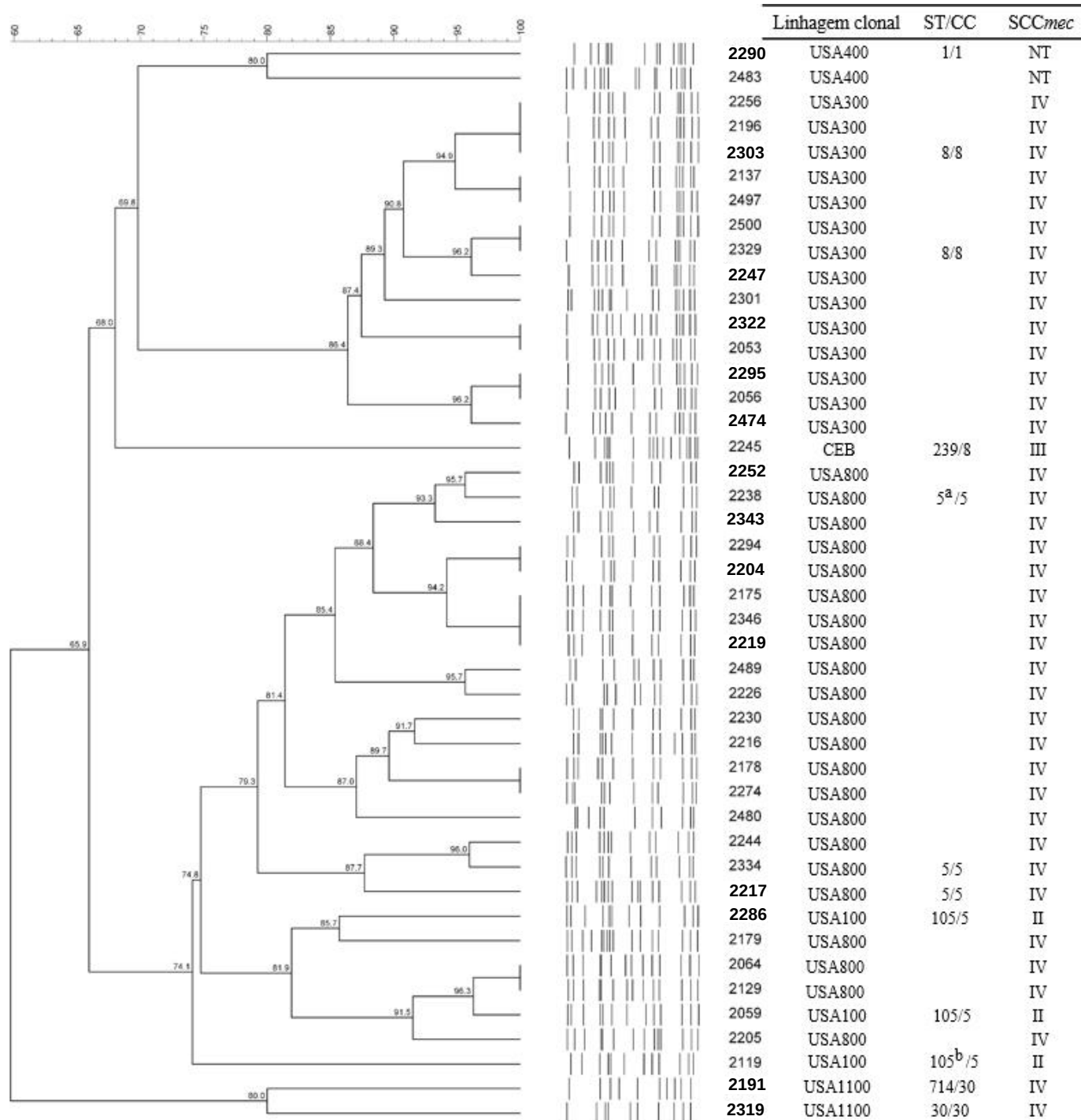


Figura 14. Dendrograma do perfil genômico das 44 amostras MRSA tratadas apenas com a enzima *SmaI* (Dendrograma gerado pela versão 7.6.3 do programa *software* Bionumerics).

NT: Não tipável; SCCmec: cassete estafilocócico *mec*; CEB: clone endêmico brasileiro; ^a: double allele, ST5 a combinação mais próxima; ^b: single allele, ST105 mais próximo; ^c: amostra negativa para gene *sasG*; Linha vermelha: delimita 80% de similaridade; Amostras oriundas da UTI COVID-19 em negrito.

Dentre as 3 amostras MRSA tratadas com *SmaI* e *ApaI* (Figura 13), os resultados do PFGE mostraram um perfil de bandejamento característico do complexo clonal 398, o que foi confirmado com a técnica de MLST pelo sequenciamento da amostra 2062. Assim, observou-se que entre as amostras pertencentes a este complexo clonal, duas apresentaram o *SCCmec* não tipável e a outra o *SCCmec* V.

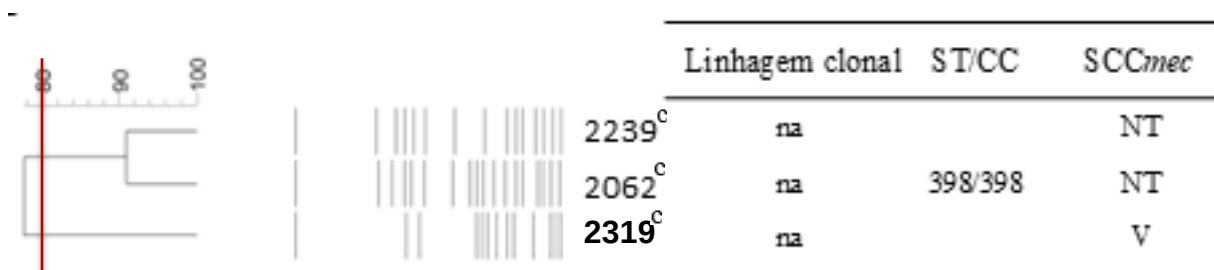


Figura 15: Dendrograma do perfil genômico das 3 amostras MRSA tratadas com as enzimas *SmaI* e *ApaI*

NT: Não tipável; CC: Complexo Clonal; ST: Sequência Tipo; *SCCmec*: cassete estafilocócico *mec*; ^c: amostras negativas para gene *sasG* Linha vermelha: delimita 80% de similaridade; Amostra oriunda da UTI COVID-19 em negrito.

As amostras que não foram passíveis de serem tipadas por PFGE (4/51) foram também incluídas no MLST. Dessa forma, as amostras 2246 e 2293, ambas carreando o *SCCmecIV*, foram classificadas no CC8/ST8, a amostra 2249 apresentou o *SCCmecII* e foi incluída no CC5/ST105, enquanto a amostra 2472 apresentou o *SCCmec IV* e foi classificada como CC5/ST5286.

5.6 Análise e correlação microbiológica das 51 amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme

Com base na observação e correlação dos resultados, em geral, obteve-se uma distribuição heterogênea das características microbiológicas das 51 amostras testadas, assim como quando observados estes aspectos em relação a UTI de origem. Dentre as amostras provenientes da UTI COVID-19 (19/51) não houve uma prevalência significativa de determinada linhagem e/ou complexo clonal neste grupo (Tabela 11). Entretanto, entre as amostras da UTI Não COVID-19, mesmo não sendo significativo, houve uma maior prevalência de amostras pertencentes ao CC5 (20/32), com $p = 0,0759$ (Tabela 12). Ainda, amostras do CC30 não foram detectadas nesta UTI.

O CC5, que agrupa as linhagens USA800 e USA100, foi associado a cerca de 61% de todas as amostras fortes produtoras do estudo. Por outro lado, as amostras pertencentes ao CC8, tendo linhagens como USA300, foram associadas a produção moderada de biofilme (82,3%). Contudo, não foi detectada relação significativa entre as variáveis analisadas ($p = 0,0728$).

Ainda, de acordo com a análise estatística dos dados obtidos no estudo, verificou-se que todas as amostras pertencentes ao CC5 apresentaram Agr tipo II ($p = 0,0001$) e aquelas do CC8 foram associadas ao Agr tipo I ($p = 0,0001$), enquanto as únicas duas amostras do CC1 apresentaram o Agr tipo III ($p = 0,0024$). Acerca do perfil de resistência das amostras, observou-se uma relação significativa das amostras do CC8 com o fenótipo MDR, das quais destacam-se as linhagens clonais USA300 e CEB, visto que mais de 80% das amostras deste complexo clonal apresentaram tal fenótipo ($p = 0,0155$).

Todos os resultados, segundo as características das amostras, estão descritos no ANEXO 1, incluindo as amostras fracas produtoras de biofilme.

Tabela 11. Características genotípicas e fenotípicas das 19 amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme oriundas da UTIc

CC (n)	ST (n)	Linhagem (n)	SCC <i>mec</i> (n)	Tipo de sistema Agr (n)	Funcionalidade (n)	Biofilme (n)	Perfil de não susceptibilidade (n)
CC8 (8)	ST8 (7)	USA300 (6)	IV (7)	I (7)	Ativo (6)	Forte produtor (2)	cef (1) cef, cip, eri (1)
						Moderado (4)	cef (1) cef, eri (1) cef, cip, eri (2)
						Inativo (1)	Moderado (1) cef, cip, eri (1)
	ST239 (1)	CEB (1)	III (1)	I (1)	Inativo (1)	Forte produtor (1)	cef, cli, eri, gen, rif, tet, sxt (1)
CC5 (7)	ST5 (6)	USA800 (6)	IV (6)	II (6)	Ativo (5)	Forte produtor (4)	cef, cip (1) cef, cli, eri (2) cef, cli, eri, gen (1)
						Moderado (1)	cef, cli, eri (1)
						Inativo (1)	Forte produtor (1) cef (1)
	ST105 (1)	USA100 (1)	II (1)	II (1)	Inativo (1)	Moderado (1)	cef, cip, cli, eri (1)
CC30 (2)	ST714 (1)	USA1100	IV (1)	I (1)	Inativo (1)	Forte produtor (1)	cef, eri (1)
	ST30 (1)	USA1100	IV (1)	III (1)	Ativo (1)	Moderado (1)	cef (1)
CC1 (1)	ST (1)	USA400	NT	III (1)	Ativo (1)	Forte produtor (1)	cef (1)
CC398 (1)	ST398 (1)	na	V (1)	I (1)	Ativo (1)	Forte produtor (1)	cef, cli, eri, tet (1)

Cef: Cefoxitina, Gen: Gentamicina; Cli: Clindamicina; Eri: Eritromicina; Tet: tetraciclina; Cip: Ciprofloxacina; Rif: Rifampicina; Sxt: Sulfametoxazol/trimetoprim. UTIc: UTI COVID-19; CC: Complexo Clonal; ST: Sequência Tipo; SCC*mec*: cassette estafilocócico *mec*.

Tabela 12. Características genotípicas e fenotípicas das 32 amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme provenientes da UTInc

CC (n)	ST (n)	Linhagem (n)	SCCmec (n)	Tipo de sistema Agr (n)	Funcionalidade (n)	Biofilme (n)	Perfil de não susceptibilidade (n)
CC8 (9)	ST8 (9)	USA300 (8)	IV (9)	I (9)	Ativo (7)	Moderado (7)	cef, cip, eri (5) cef, cip, eri, cli (1) cef, cip, eri, gen (1) cef, cip, eri (1)
					Inativo (2)	Moderado (2)	cef, cip, eri, gen (1)
CC5 (20)	ST5 (16)	USA800 (16)	IV (16)	II (16)	Ativo (12)	Forte (5)	cef (1) cef, eri (1) cef, cip (2) cef, cli, eri, gen (1)
						Moderado (7)	cef (1) cef, eri (3) cef, cli, eri (3)
					Inativo (4)	Moderado (4)	cef (2) cef, eri (2)
					Inativo	Forte (1)	cef, cip, eri (1)
						Moderado (2)	cef, cip, cli, eri (1) cef, cip, cli, eri, gen (1) cef, eri (1)
	ST105 (3)	USA100 (2)	II (3)	II (3)			
CC1 (1)	ST5286 (1)	na	IV (1)	II (1)	Ativo (1)	Moderado (1)	cef, eri (1)
	ST (1)	USA400	NT	III (1)	Inativo (1)	Moderada (1)	cef (1)
CC398 (2)	ST398 (2)	na	NT (1)	I (1)	Ativo (1)	Moderado (1)	cef, cip, cli, eri, gen, tet (1)
			II (1)	I (1)	Inativo (1)	Forte (1)	cef, cli, eri (1)

Cef: Cefoxitina, Gen: Gentamicina; Cli: Clindamicina; Eri: Eritromicina; Tet: tetraciclina; Cip: Ciprofloxacina. UTInc: UTI Não COVID-19; CC: Complexo Clonal; ST: Sequência Tipo; SCCmec: cassete estafilocócico *mec*.

6. DISCUSSÃO

Em 2020 foi decretada a pandemia de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, a qual se disseminou rapidamente em escala global, gerando uma elevada pressão no sistema de saúde em diversos países (WHO, 2020; Ranzani *et al.*, 2021). Tal cenário acarretou o aumento das taxas de hospitalização, requerendo equipamentos médicos de assistência ao paciente, principalmente os relacionados ao auxílio respiratório para ventilação mecânica (Olivas-Martinez *et al.*, 2021; El Zahran *et al.*, 2023). Além disso, foi possível verificar a ocorrência de coinfeções bacterianas em indivíduos diagnosticados com a doença, quadro este que impacta nas taxas de morbidade e mortalidade destes pacientes, e também no aumento do uso de antimicrobianos para o tratamento (Hughes *et al.*, 2020, Neto *et al.*, 2020; He *et al.*, 2021; Karami *et al.*, 2021; Hoque *et al.*, 2021; Pakzad *et al.*, 2021). Em São Paulo, no Brasil, Polly e colaboradores (2022) verificaram, nos primeiros meses da pandemia, um aumento na incidência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) causadas por cepas MRSA em comparação a três anos anteriores a pandemia por COVID-19, ressaltando a necessidade de vigilância e estudos envolvendo amostras clínicas provenientes do período pandêmico.

Staphylococcus aureus é considerado um dos principais microrganismos causadores de infecções associadas ao ambiente hospitalar (Paling *et al.*, 2017). Em indivíduos saudáveis, a presença desse patógeno na microbiota não se apresenta como risco para estabelecimento de infecções. Contudo, esse cenário pode ser alterado quando há a utilização de dispositivos médicos invasivos e susceptibilidade do sistema imunológico do paciente, como indivíduos internados, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs) (Paling *et al.*, 2020). Dessa forma, a colonização prévia por *S. aureus*, principalmente por amostras MRSA, é considerada um relevante fator de risco para posterior estabelecimento de infecções, como as IRAS (Sakr *et al.*, 2018; Taki *et al.*, 2023). Em uma coorte prospectiva realizada com 33 hospitais em 10 países europeus distintos, por Troeman e colaboradores, 2024, envolvendo pacientes cirúrgicos, que foram triados para a presença de *S. aureus* nas narinas, garganta ou períneo dentro de 30 dias antes da cirurgia, mostrou que dentre os 100 casos de infecção de sítio cirúrgico (ISC) ou infecção de corrente sanguínea (ICS) que ocorreram durante o acompanhamento dos indivíduos participantes do estudo, 86% estavam colonizados por *S. aureus*, o que ressalta a relevante associação entre indivíduos colonizados por este patógeno e a maior possibilidade de desenvolvimento de infecções em cenários de internação hospitalar.

A capacidade de *S. aureus* colonizar e persistir no organismo tem sido associada à sua habilidade em formar biofilme, entre outros fatores de virulência (Moormeier e Bayles, 2017).

O biofilme pode promover o aumento da resistência antimicrobiana devido à dificuldade de penetração da droga em sua estrutura, além de ser uma forma de evasão do sistema de defesa do hospedeiro, favorecendo a persistência bacteriana e sendo um foco de disseminação para outros sítios do organismo (Lister e Horswill, 2014; Veerachamy *et al.*, 2014 Otto, 2018). Frente a importância desse mecanismo de virulência e do possível impacto da pandemia da COVID-19 no fitness bacteriano o presente estudo avaliou 93 amostras MRSA isoladas de colonização nasal de 93 pacientes internados em duas UTIs, COVID-19 (UTIC) e Não COVID-19 (UTINC), de um hospital público do Rio de Janeiro quanto a sua capacidade de formação de biofilme. Foi possível verificar que todas as amostras MRSA produziram biofilme, sendo 55% consideradas produtoras fortes (19%) ou moderadas (36%). Dados semelhantes foram observados em um estudo chinês realizado por Hong e colaboradores, 2023, que realizou a tipagem molecular e caracterização de 90 amostras de *S. aureus* de infecções de feridas por queimaduras, em que 80% delas produziram biofilme em algum grau e dentre estas 37,8% foram fracas produtoras, 26,7% moderadas e 15,6% foram fortes produtoras de biofilme.

A análise das amostras provenientes da UTIC e da UTINC em relação ao potencial de formação de biofilme é importante para entender a possível influência das condições de hospitalização e estado do paciente de cada tipo de UTI na virulência deste patógeno. Com isso, observou-se no presente estudo que as amostras MRSA fortes produtoras de biofilme foram mais frequentes na UTIC ($p = 0,0114$). Apesar dos poucos dados na literatura sobre caracterização de virulência bacteriana de amostras isoladas durante a pandemia, alguns autores têm discutido sobre microrganismos oriundos de espécimes do trato respiratório e de sangue de indivíduos com COVID-19 poderem exibir uma maior capacidade de formação de biofilme. Esse cenário seria facilitado pela utilização prolongada de ventiladores mecânicos, hiperinflamação e também pelo desequilíbrio da microbiota decorrente do uso exacerbado de antimicrobianos, como visto durante a pandemia de COVID-19 (Mirzaei *et al.*, 2020, Grasselli *et al.*, 2021, Qu *et al.*, 2021, Sulayyim *et al.*, 2022, Zhu *et al.*, 2022). Contudo, há necessidade de outros estudos que possam ratificar estes resultados. É importante ressaltar também que em nossos estudos o fato de o paciente apresentar diagnóstico de COVID-19 poderia favorecer a produção de biofilme decorrente da pressão seletiva pelo maior uso de antimicrobianos, de corticoides e outras terapias imunomoduladores específicas, e também pela maior utilização de dispositivos médicos invasivos, como o uso de aparelhos de assistência ventilatória para pacientes com COVID-19 (Adalbert *et al.*, 2021; Grasselli *et al.*, 2021; Sulayyim *et al.*, 2022)

Além disso, nosso estudo também mostrou associação da formação de biofilme com o tipo de *SCCmec*, em que a maioria das amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme

apresentava o SCC*mec*IV, totalizando um percentual de 63,6%, enquanto, enquanto aquelas com o SCC*mec* tipo II apresentaram uma associação significativa com fraca produção deste fator de virulência. Essa correlação foi vista em um estudo realizado por Vanhommerig e colaboradores, 2014, na Bélgica, no qual amostras MRSA com SCC*mec* tipo IV promoveram uma produção de biomassa significativamente maior em condições estáticas do que amostras com outros tipos de SCC*mec*, como I e III, o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo. Tal associação também foi encontrada por Cardoso Guimarães e colaboradores, 2021, a qual utilizou 60 amostras clínicas de *S. aureus* da coleção de culturas do mesmo laboratório do presente estudo provenientes de um hospital universitário do Rio de Janeiro. Os autores detectaram que cepas com SCC*mec* tipo II tendem significativamente a formar biofilmes em menor quantidade, especialmente quando comparadas a cepas com SCC*mec* tipo IV. Além disso é importante destacar também que o SCC*mec* codifica também o gene *psm-mec*, que desempenha um papel na regulação de fatores de virulência, como modulinas solúveis em fenol (PSMs) e formação de biofilmes. Nesse sentido, um estudo realizado por Aoyagi e colaboradores, 2014, Japão, detectaram a ocorrência de mutações no promotor de *psm-mec* presente no SCC*mec*II em cepas MRSA, o que foi associado a um aumento da virulência, mas a supressão e/ou redução da capacidade de formação de biofilme. Tal estudo nos mostra uma possível hipótese de que a regulação de PSMs poderia estar associada ao fato da maioria das amostras com fraca produção de biofilme apresentar SCC*mec*II no presente estudo.

A detecção de genes relacionados ao biofilme também foi verificada neste estudo, no qual foi detectada uma prevalência de 100% para o gene *icaA* e 82% para o *sasG* dentre todas as 93 amostras testadas. De forma semelhante, Wang e colaboradores, 2023, em um trabalho realizado com amostras coletadas também dentro do período pandêmico (2020-2022) e provenientes de um hospital terciário na China, observaram a presença de *icaA* em 100% das amostras. Além disso, um estudo realizado por Cardoso Guimarães e colaboradores, 2021, ao avaliar a produção de biofilme em 60 isolados clínicos de *S. aureus* de diferentes linhagens clonais isolados em hospitais do Rio de Janeiro e investigar a presença de genes associados ao biofilme, verificou também a prevalência do gene *icaA* em todas as amostras testadas. Esse gene é bem comum em amostras de *S. aureus*, sendo associado principalmente a síntese de polissacarídeos na composição do biofilme e encontrado na maioria ou todas as amostras em diferentes estudos já realizados (De Matos *et al.*, 2014; Batistão *et al.*, 2016, Puah *et al.*, 2018, Otto, 2018; Alabdullatif e Alzahrani, 2022, Wang *et al.*, 2023). Além disso, um estudo publicado em 2022 por Carrera-Salinas *et al.*, descrevendo a formação de biofilme associada à presença da proteína de superfície G de *S. aureus* (SasG) e suas variantes alélicas em amostras

de bacteremia por clones endêmicos (CC5, CC8, CC22) e esporádicos de MRSA, na Espanha, entre 2008 e 2015, demonstrou uma alta prevalência do gene *sasG*, sendo detectado em todos os clones endêmicos avaliados. Vale ressaltar que os autores também verificaram que as amostras que carregavam *sasG* desenvolveram a formação de um biofilme mais forte do que aqueles que foram negativos para a presença do gene. Essa tendência também foi vista neste estudo, uma vez que entre as amostras positivas para esse gene 57,3% (47/82) foram produtoras forte/moderadas de biofilme ($p = 0.2141$), enquanto dentre aquelas que foram negativas, tendo menor quantidade, em média 60% (7/11) das amostras foram classificadas como fracas produtoras de biofilme ($p = 0.5515$).

Um importante fator de dispersão do biofilme de *S. aureus* é o sistema de *quorum-sensing* Agr, capaz de promover a indução da expressão de moléculas responsáveis pela degradação da matriz do biofilme e a inibição da expressão de adesinas relevantes para estruturação do mesmo. Tal sistema pode ser dividido em quatro tipos conforme polimorfismo em *agrD*, o precursor do peptídeo autoindutor do operon *agr* (Le *et al.*, 2014; Le e Otto, 2015; Jenul e Horswill, 2019). No atual estudo foi detectado três tipos de sistema Agr, I, II e III, sendo Agr II o mais prevalente dentre todas as amostras MRSA testadas. Entretanto, alguns trabalhos mais recentes, como o realizado por Sohail e colaboradores, 2023, no Paquistão, com 2965 amostras clínicas de *S. aureus* isoladas de diferentes sítios, e o estudo de Cai e colaboradores, 2023, realizado na China com 715 amostras de *S. aureus* isoladas de *swabs* nasais de crianças. Esses estudos demonstraram resultados opostos aos encontrados neste estudo, uma vez que o Agr tipo I foi o mais frequente entre as amostras dos estudos, ambos com amostras provenientes de um período dentro da pandemia de COVID-19. Essa discordância possivelmente é decorrente das diferenças geográficas e epidemiológicas associadas a linhagens de *S. aureus* isoladas nas diferentes localidades.

Vale ressaltar que alguns estudos da Europa já relataram que amostras com o sistema Agr tipo II apresentavam maior propensão para produção de biofilme (Cafiso *et al.*, 2007 e Kawamura *et al.*, 2011), enquanto outro estudo realizado na Coreia identificou esse cenário entre amostras com o sistema Agr tipo I (Lim *et al.*, 2013). Encontramos no presente trabalho uma relação significativa das amostras com Agr tipo I e produtoras moderadas de biofilme ($p = 0.0006$) e aquelas com Agr tipo II com a fraca produção de biofilme ($p = 0.0047$). Por outro lado, dentre as 18 amostras fortes produtoras foi possível verificar que 61% (11/18) apresentaram Agr tipo II, e foram relacionadas diretamente a amostras do complexo clonal 5. Esse resultado se assemelha a de estudos que detectaram amostras com *agr* tipos II ou III como principais produtoras de biofilme em comparação com aquelas que apresentaram os tipos I e IV

(Ikonomidis *et al.*, 2009, Khoramrooz *et al.*, 2016, Tan *et al.*, 2018). Aqui vale destacar o fato do tipo de sistema *agr* estar diretamente relacionado às linhagens clonais presentes naquele país ou localidade, como já demonstrado previamente (Croes *et al.*, 2009, Lim *et al.*, 2013, Tan *et al.*, 2018, Cardoso Guimarães *et al.*, 2021). Além da comparação do tipo de *Agr* com a capacidade de formação de biofilme, realizamos também sua comparação com o tipo de *SCCmec*. Assim, dentre as amostras com *SCCmec* tipo II, 95% apresentaram *agr* tipo II ($p = 0.0024$). No entanto, esse tipo de análise é pouco encontrado na literatura. Alguns estudos já sugeriram que o tipo de sistema *agr* estaria relacionado com a clonalidade de cada amostra, como já mencionado, e assim, também teria relação com o tipo de *SCCmec* mais frequentemente associado aquele determinado clone. Contudo, são necessários estudos adicionais para se confirmar essa hipótese.

O sistema *Agr* em *S. aureus* também apresenta um papel essencial na comunicação entre células, o qual é realizada por meio de peptídeos sinalizadores que propiciam respostas de acordo com a densidade populacional naquele ambiente, sendo um mecanismo de regulação por *quorum sensing* importante para capacidade ou não de produção de biofilme (Lee *et al.*, 2021). Alguns autores já observaram uma relação entre a inatividade desse sistema e a maior capacidade de produção de biofilme (Cafiso *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2013; Le *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019). No presente estudo, o sistema *Agr* se mostrou ativo na maioria das amostras, porém o perfil de formação de biofilme e a atividade do operon *agr*, segundo o teste fenotípico, foi variado, não sendo possível verificar esta correlação. De forma semelhante, alguns estudos também não observaram essa associação (Côrtes *et al.*, 2015; Pérez-Montarelo *et al.*, 2017; Guimarães, 2018). Além disso, como já descrito na literatura, a funcionalidade do sistema *Agr* é um aspecto variável entre amostras de *S. aureus*, nas quais algumas podem produzir RNAlII em níveis mais baixos e outras, como amostras pertencentes a linhagem USA300, em níveis mais altos (Li *et al.*, 2009; Paharik e Horswill, 2016), resultando em uma maior expressão de fatores de virulência da bactéria e impactando também na regulação da formação de biofilme. Além disso, outros sistemas regulatórios podem estar envolvidos, como os genes *sarA*, *rot* e *mgrA* (Guo *et al.*, 2022). Uma limitação do estudo atual é o fato de que nenhum teste molecular quantitativo foi realizado para analisar a expressão do operon *agrBDCA*, conjuntamente com o teste fenotípico, a fim de avaliar o impacto deste mecanismo regulador na virulência das amostras MRSA testadas.

Nesse sentido e de acordo com o exposto, destaca-se a importância dos fatores de virulência em *S. aureus* e como sua expressão impacta nos processos de colonização e infecção por este microrganismo. Também pode-se ressaltar que o período pandêmico e o uso de agentes

antimicrobianos indutores de pressão seletiva sobre esse microrganismo podem levar a mudanças no perfil epidemiológico. Assim, um dos objetivos do presente estudo foi também analisar a dinâmica clonal de amostras provenientes de colonização decorrentes deste período na pandemia de COVID-19.

As técnicas de PFGE e MLST foram utilizadas para análise das 51 amostras fortes/moderadas produtoras de biofilme a fim de identificar as linhagens que circulavam no hospital do estudo durante a pandemia. Assim, foi possível detectar a prevalência de linhagens, como USA800/ST5/SCCmecIV e USA300/ST8/SCCmecIV. Amostras da linhagem USA800/ST5 têm sido descritas em infecções hospitalares no Brasil e também no HUCFF (Cavalcante *et al.*, 2015; Lakhundi e Zhang, 2018, Damasco *et al.*, 2019). Em um estudo realizado por Augusto e colaboradores, 2022, utilizando 123 amostras de *S. aureus* provenientes de ICS coletadas de Jan/2016 a Dec/2018 no HUCFF, os autores observaram a emergência de cepas MRSA pertencentes à linhagem comunitária USA300/ST8/SCCmecIV pela primeira vez neste hospital e também a linhagem USA800/ST5/SCCmecIV como a segunda mais descrita. Já Whitaker, 2022, em trabalho realizado no período entre Set/2019 a Mar/2021 com 94 amostras de ICS demonstrou que a linhagem USA800/ST5/SCCmecIV também foi a mais frequente (44,2%), seguida pela linhagem USA100/ST105/SCCmecII (25,6%). Perfis clonais envolvendo amostras comunitárias, tais como as linhagens USA1100/ST30/SCCmecIV e USA300/ST8/SCCmecIV também foram descritos no estudo citado, realizado durante a pandemia (Whitaker, 2022). Assim, ao contrário do encontrado por Whitaker, 2022, que mostrou uma maior prevalência da linhagem USA800/ST5/SCCmecIV entre os pacientes com COVID-19, em nosso estudo houve uma distribuição heterogênea das linhagens e complexos clonais nas duas UTI's estudadas, apesar do maior isolamento de amostras desta linhagem na UTInc do que na UTIc ($p = 0.0759$).

É importante destacar que nos anos anteriores à pandemia de COVID-19, a linhagem USA100/ST5/SCCmecII (Clone Nova York/Japão) foi reportada como prevalente no ambiente hospitalar causando infecções por amostras MRSA em todo Brasil (Caiaffa-Filho *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2018; Damasco *et al.*, 2019; Fernandes, 2019), sendo também associada a redução ou quase substituição do CEB/ST239/SCCmecIII, clone inicialmente relacionado e prevalente na maioria das infecções hospitalares por cepas MRSA no começo dos anos 2000 (Vivoni *et al.*, 2006; Caboclo *et al.*, 2013; Chamon *et al.*, 2017; Damasco *et al.*, 2019; Veloso *et al.*, 2019). Assim, nossos resultados sugerem a ocorrência de alterações no cenário epidemiológico do hospital do estudo no período pandêmico avaliado, já que o local recebeu muitos indivíduos oriundos da comunidade, havendo um aumento na detecção de linhagens clonais associadas à

comunidade no ambiente hospitalar, como, por exemplo, a linhagem USA300/ST8/SCC*mec*IV. Vale destacar que independente da fonte clínica das amostras, de colonização ou infecção e pertencentes ou não ao período da pandemia de COVID-19, os estudos envolvendo este hospital têm demonstrado tal mudança epidemiológica, ao longo dos anos, reforçando nossa hipótese (Chamon *et al.*, 2017; Damasco *et al.*, 2019; Augusto *et al.*, 2022; Whitaker, 2022).

É relatado na literatura a associação entre formação de biofilme e a clonalidade de cepas de *S. aureus*, utilizando-se em sua maioria amostras resistentes à meticilina (De Matos *et al.*, 2014; Vanhommerig *et al.*, 2014; Côrtes *et al.*, 2015; Naicker *et al.*, 2016; Batistão *et al.*, 2016; King *et al.*, 2016; El-Baz *et al.*, 2017; Pérez-Montarelo *et al.*, 2017). Neste estudo, foram detectados quatro diferentes complexos clonais, sendo os CC5 e CC8 os mais prevalentes entre as amostras MRSA fortes/moderadas produtoras de biofilme. Notou-se que a maioria das amostras do CC8 eram produtoras moderadas de biofilme (14/17) e aquelas do CC5 eram mais associadas a forte produção deste mecanismo de virulência. Um trabalho retrospectivo e multicêntrico realizado por Carrera-Salinas e colaboradores, 2022, incluiu cepas MRSA de pacientes com infecções de corrente sanguínea internados em hospitais na Espanha, no qual os autores observaram que cepas pertencentes aos CC5 e CC8 tendiam a apresentar uma maior produção de biofilme do que outros complexos clonais testados, dados que se assemelham aos nossos. Além disso, vale ressaltar que no presente estudo foi encontrada apenas uma única amostra do clone endêmico Brasileiro (CEB), apresentando o SCC*mec* III e uma formação de biofilme superior em termos de densidade óptica às outras linhagens prevalentes neste trabalho, como aqueles com SCC*mec* tipos IV e II. De acordo com a literatura, a forte produção de biofilme por esse clone é bem determinada, assim como a presença do SCC*mec* III (Caboclo *et al.*, 2013; Côrtes *et al.*, 2015; Batistão *et al.*, 2016; Damasco *et al.*, 2019; Augusto *et al.*, 2022).

Aqui também correlacionamos os tipos de sistema Agr e a linhagem clonal, destacando-se as amostras pertencentes ao CC5, que apresentaram Agr tipo II ($p=0,0001$) e aquelas do CC8, que possuíam o Agr I ($p=0,0001$). Diferentes autores já descreveram a associação dos tipos de Agr com o complexo clonal em *S. aureus* (Monecke, Slickers e Ehricht, 2008; Croes *et al.*, 2009; Monecke *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2018, Foster *et al.*, 2020, Carrera-Salinas *et al.*, 2022). Em um estudo realizado no mesmo laboratório do presente estudo envolvendo amostras advindas do mesmo hospital verificou-se essa relação, no qual todas as amostras do CC8 (USA300, CEB e Húngaro) possuíam Agr tipo I, enquanto as pertencentes ao CC5 (USA100 e USA800) apresentaram Agr tipo II e aquelas do CC1 (USA400) e CC30 (USA200 e USA1100) possuíam Agr tipo III, dados esses que corroboram com os resultados encontrados no presente estudo (Cardoso Guimarães *et al.*, 2021).

Além dos fatores de virulência, vale destacar os determinantes de resistência, impactados diretamente pelo elevado uso de antimicrobianos e saneantes, não só no ambiente hospitalar, como também na comunidade no período pandêmico, o que viabilizou uma grande pressão seletiva sobre os microrganismos, podendo aumentar a aquisição de resistência e seleção de cepas MRSA e MDR. Dentre as 93 amostras MRSA testadas nesse estudo, em média 55% apresentou o fenótipo MDR. Em relação ao cenário observado nas UTIs avaliadas, foi possível verificar a detecção de amostras MDR, tanto na UTIc (66,7%), quanto na UTInc (50%), indicando que a pressão seletiva ocorreu em ambas as unidades. Em um trabalho realizado por Bhargava e colaboradores, 2021, foi feita uma revisão retrospectiva dos prontuários de pacientes adultos internados em um centro de atendimento terciário com 776 leitos em Michigan, EUA, sendo incluídos casos de COVID-19 diagnosticados entre março e junho de 2020. Os autores verificaram que as taxas de microrganismos multirresistentes (MDR) foram mais altas (52,1%) na admissão hospitalar em comparação à aquisição nosocomial (25%) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi o patógeno predominante.

No presente estudo observou-se uma relação significativa das amostras do CC8, destacando-se as linhagens USA300/ST8/SCCmecIV e CEB/ST239/SCCmecIII, com o fenótipo MDR, tendo cerca de 80% das amostras deste complexo clonal apresentando tal fenótipo ($p = 0,0155$). Tal associação entre resistência e amostras do CC8, especialmente da linhagem ST239, já foi descrito em estudos anteriores (Caboclo *et al.*, 2013; Cavalcante *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2023). Entretanto, a detecção de amostras USA300 MDR tem sido poucas vezes citada na literatura (Karanika *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Sansom *et al.*, 2021), visto que esta é associada a comunidade, ambiente este que em circunstâncias normais apresenta menor pressão seletiva em comparação ao ambiente hospitalar.

Nosso estudo foi realizado em um hospital referência no atendimento de pacientes com COVID-19, inclusive casos graves, com pacientes admitidos em UTIs, ambiente no qual os indivíduos se encontram mais debilitados, necessitando de uma contínua assistência e supervisão dos profissionais de saúde. Associado ao uso constante de antimicrobianos e saneantes, estes fatos podem influenciar na transmissão de patógenos entre indivíduos e nas taxas de resistência, com a seleção de cepas MDR, por exemplo. Além disso, sabe-se que tal cenário de pressão seletiva impacta no fitness bacteriano, culminando na seleção de cepas mais bem adaptadas a determinado ambiente, o que pode estar associado a um pior prognóstico do paciente, visto que em caso de colonização prévia há um maior risco para posterior aquisição de IRAS.

7. CONCLUSÕES

- Todas as amostras MRSA produziram biofilme, sendo mais de 50% produtoras fortes ou moderadas. Amostras fortes produtoras de biofilme foram mais frequentes na UTI COVID-19.
- Amostras MRSA carreando o SCCmec tipo IV apresentaram principalmente perfis forte ou moderado de produção de biofilme, enquanto aquelas com o SCCmec tipo II apresentaram uma associação significativa com fraca produção deste fator de virulência.
- Os genes *icaA* e *sasG*, associados ao biofilme, foram detectados em todas as amostras e em 88,2% delas, respectivamente, demonstrando sua alta prevalência entre as amostras avaliadas.
- A tipagem do sistema Agr mostrou que mais de 60% das amostras eram do *agr* tipo II, tanto na UTI COVID quanto na UTI não COVID, seguido pelos tipos I e III. Além disso, o *agr* tipo II foi associado significativamente com amostras carreadoras do SCCmec tipo II.
- O sistema Agr se mostrou ativo em 66,7% das amostras. Não foi observada relação entre o resultado do sistema inativo e maior produção de biofilme nas amostras.
- Cerca de 80% das amostras MRSA produtoras de biofilme moderado ou forte eram de duas linhagens clonais: CC5-SCCmec tipos IV/II (hospitalar) e CC8-SCCmecIV (comunitária). Amostras do CC5 carreavam o Agr tipo II e 61% foram fortes produtoras de biofilme, enquanto amostras do CC8 carreavam o Agr tipo I, sendo 82,3% produtoras moderadas.
- Uma maior prevalência de amostras pertencentes ao CC5 foi observada entre aquelas provenientes da UTI Não COVID-19 e amostras do CC30 não foram detectadas nesta UTI. Ainda, amostras do CC8 mostraram maior relação com resistência antimicrobiana, visto que mais de 80% das amostras deste complexo clonal apresentaram fenótipo MDR.
- O estudo mostra grande potencial para a produção de biofilme entre amostras MRSA de colonização e a emergência de clones comunitários no hospital durante a pandemia, no período avaliado, reforçando a importância de estratégias de vigilância e controle de infecções e colonização pelo patógeno.

REFERÊNCIAS

- Adalbert, J. R., Varshney, K., Tobin, R. e Pajaro, R. (2021). Clinical outcomes in patients co-infected with COVID-19 and *Staphylococcus aureus*: a scoping review. *BMC Infect Dis*, 21, 985.
- Adhikari, R.P., Arvidson, S. e Novick, R.P. (2007). A nonsense mutation in *agrA* accounts for the defect in *agr* expression and the virulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 traP: kan. *Infect. Immun.*, 75, 4534-4540.
- Ahammad, S. Z. e Rizvi, S. G. (2022). COVID-19 and antimicrobial resistance: A cross-study. *Sci. Total Environ.*, 807, 150873.
- Ahirrao, P., Tambat, R., Chandal, N., Mahey, N., Kamboj, A., Jain, U. K. e Nandanwar, H. S. (2020). *msrA* efflux pump inhibitory activity of Piper cubeba leaf and its phytoconstituents against *Staphylococcus aureus* RN4220. *Chem. Biodivers.*, 17, e2000144.
- Alabdullatif, M. e Alzahrani, A. (2022). Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* during storage of platelet concentrates. *Transfus. Apher. Sci.*, 61, 103456.
- André, E. D., Pereira, R. F. A., Snyder, R. E., Machado, T. S., André, L. S. P., Cardoso, C. A. A. e Aguiar-Alves, F. (2017). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clonal complex 398 with no livestock association in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 112, 647-649.
- Aoyagi, T., Kaito, C., Sekimizu, K., Omae, Y., Saito, Y., Mao, H., Inomata, S., Hatta, M., Endo, S., Kanamori, H., Gu, Y., Tokuda, K., Yano, H., Kitagawa, M. e Kaku, M. (2014). Impact of psm-mec in the mobile genetic element on the clinical characteristics and outcome of SCCmec-II methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Japan. *Clin. Microbiol. Infect*, 20, 912–919.
- Arciola, C.R., Campoccia, D. e Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.*, 16, 397-409.
- Augusto, M. F., da Silva Fernandes, D. C., de Oliveira, T. L. R., Cavalcante, F. S., Chamon, R. C., Ferreira, A. L. P., Nouér, S. A., Infection Control Group HUCFF/UFRJ e 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. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 11, 1-10.
- Aurilio, C., Sansone, P., Paladini, A., Barbarisi, M., Coppolino, F., Pota, V. e Pace, M. C. (2021). Multidrug resistance prevalence in COVID area. *Life*, 11, 601.
- Baker, M. A., Sands, K. E., Huang, S.S., Kleinman, K., Septimus, E. J., Varma, N., Blanchard, J., Poland, R. E., Coady, M. H., Yokoe, D. S., Fraker, S., Froman, A., Moody, J., Goldin, L., Isaacs, A., Kleja, K., Korwek, K. M., Stelling, J., Clark, A., Platt, R., Perlin, J.B. e CDC Prevention Epicenters Program (2022). The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-associated infections. *Clin. Infect. Dis.*, 74, 1748-1754.
- Bannerman, T.L.A. e Peacock, S.J. (2007). *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. (Washington: ASM Press.), pp. 390-411.
- Batistão D.W., Campos, P.A., Camilo, N.C., Royer, S., Araujo, B.F., Naves, K.S., Martins, M., Pereira, M.O., Henriques, M., Gontijo-Filho, P.P., Botelho, C., Oliveira, R. e Ribas, R.M. (2016). Biofilm formation of Brazilian MRSA strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. *J. Med. Microbiol.*, 65, 286–297.
- Becker, K., Heilmann, C. e Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 27, 870-926.
- Becker, K. e Von Eiff, C. (2015). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Murray PR et al.; *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed. (Washington: ASM Press, USA).

- Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E. A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U., Peters, G. (2018). Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.*, 24, 242-248.
- Bhargava, A., Riederer, K., Sharma, M., Fukushima, E. A., Johnson, L. e Saravolatz, L. (2021). High rate of multidrug-resistant organisms (MDROs) among COVID-19 patients presenting with bacteremia upon hospital admission. *Am. J. Infect. Control*, 49, 1441-1442.
- Boles, B.R. e Horswill, A.R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 4, e1000052.
- Bride, L.L., Pereira, M.F., Barbosa, M.C., Silva, N.C., Klein, N.M., Nascimento, T.C. e Schuenck, R.P. (2019). Differences in resistance profiles and virulence genes among methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of different lineages at a public tertiary hospital. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 52, e20190095.
- Bronesky, D., Wu, Z., Marzi, S., Walter, P., Geissmann, T., Moreau, K., Vandenesch, F., Caldelari, I. e Romby, P. (2016). *Staphylococcus aureus* RNAIII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 299-316.
- Buonsenso, D., Giaimo, M., Pata, D., Rizzi, A., Fiori, B., Spanu, T., Ruggiero, A., Attinà, G., Piastra, M., Genovese, O., Vento, G., Costa, S., Tiberi, E., Sanguinetti, M. e Valentini, P. (2023). Retrospective Study on *Staphylococcus aureus* Resistance Profile and Antibiotic Use in a Pediatric Population. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 12, 1378
- Buvelot, H., Posfay-Barbe, K.M., Linder, P., Schrenzel, J. e Krause, K.H. (2017). *Staphylococcus aureus*, phagocyte NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 139-157.
- Caboclo, R.M., Cavalcante, F.S., Iorio, N.L., Schuenck, R.P., Olendzki, A.N., Felix, M.J., Chamon, R.C. e Dos Santos, K.R. (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. *Am. J. Infect. Control.* 41, 21-6.
- Cadena, J., Thinwa, J., Walter, E.A. e Frei, C.R. (2016). Risk factors for the development of active methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in patients colonized with MRSA at hospital admission. *Am. J. Infect. Control.* 44, 1617-1621.
- Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Demelio, V., Spina, D., Nicoletti, G. e Stefani, S. (2007). agr-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 220-227.
- Caiaffa-Filho, H. H., Trindade, P. A., Cunha, P. G., Alencar, C. S., Prado, G. V. B., Rossi, F. e Levin, A. S. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 76, 518-520.
- Cai, H., Li, X., Zhang, C., Zhong, H., Xie, Y., Huang, L., Zhang, B., Long, Y., Zhou, Z. e Liang, B. (2023). Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* in school-age children in Guangzhou: associations among agr types, virulence genes, sequence types, and antibiotic resistant phenotypes. *BMC Microbiol.*, 23, 368.
- Callejo-Torre, F., Eiros Bouza, J.M., Olaechea Astigarraga, P., Coma Del Corral, M.J., Palomar Martínez, M., Alvarez-Lerma, F. e López-Pueyo, M.J. (2016). Risk factors for *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* colonisation or infection in intensive care units and their reliability for predicting MRSA on ICU admission. *Le Infezioni in Med.* 24, 201-209.
- Cardoso Guimarães, L., Marques de Souza, B., de Oliveira Whitaker, C., Abreu, F., Barreto Rocha Ferreira, R. e Dos Santos, K. R. N. (2021). Increased biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates on surfaces covered with plasma proteins. *J. Med. Microbiol.*, 70, 10.1099.
- Carroll, K.C. (2014). Estafilococos. In: *Microbiologia Médica*. 26. ed. (New York: McGraw-Hill), pp. 199-207.

- Carrera-Salinas, A., González-Díaz, A., Vázquez-Sánchez, D.A., Camoez, M., Niubó, J., Càmara, J., Ardanuy, C., Martí, S., Domínguez, M.Á. e REIPI/GEIH Study Groups (2022). *Staphylococcus aureus* surface protein G (*sasG*) allelic variants: correlation between biofilm formation and their prevalence in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clones. *Res. Microbiol.* 173, 103921.
- Carvalho, S.P.D., Almeida, J.B.D., Andrade, Y.M., da Silva, L.S., Chamon, R.C., Santos, K. e Marques, L.M. (2019). Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and community environments in northeastern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 23, 134-138.
- Cavalcante, F. S., Schuenck, R. P., Ferreira, D. C., da Costa, C. R., Nouér, S. A. e dos Santos, K. R. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: spread of specific lineages among patients in different wards at a Brazilian teaching hospital. *The Journal of hospital infection*, 86, 151–154.
- Cavalcante, F. S., Abad, E. D., Lyra, Y. C., Saintive, S. B., Ribeiro, M., Ferreira, D. C. e Santos, K. D. (2015). High prevalence of methicillin resistance and PVL genes among *Staphylococcus aureus* isolates from the nares and skin lesions of pediatric patients with atopic dermatitis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 48, 588-594.
- Cavalcante, F.S., Saintive, S., Carvalho Ferreira, D., Rocha Silva, A.B., Guimarães, L.C., Braga, B.S., Dios Abad, E., Ribeiro, M. e 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.
- Chambers, H.F. e DeLeo, F.R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629.
- Chamon, R.C., da Silva Ribeiro, S., da Costa, T.M., Nouér, S.A. e 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. *Braz. J. Infect. Dis.* 21, 185-189.
- Chamon, R.C. (2017). Avaliação da expressão fenotípica e genotípica de fatores de virulência e o papel da modulação antimicrobiana no biofilme de amostras de *Staphylococcus aureus* carreadores dos genes *pvl*. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências - Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, f: 186.
- Cheung, G. Y., Bae, J. S. e Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12, 547-569.
- Christianson, S., Golding, G. R., Campbell, J. e Mulvey, M. R. (2007). Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1904-1911.
- Côrtes, M. F., Beltrame, C. O., Ramundo, M. S., Ferreira, F. A. e Figueiredo, A. M. (2015). The influence of different factors including *fnbA* and *mecA* expression on biofilm formed by MRSA clinical isolates with different genetic backgrounds. *Int. J. Med. Microbiol.*, 305, 140-147.
- Costa, A.C., Silva, M.G. e Noriega, E. (2007). Manual de operacionalização do programa nacional de prevenção e controle da infecção associada aos cuidados de saúde. Ministério da Saúde, Portugal.
- Croes, S., Deurenberg, R. H., Boumans, M. L., Beisser, P. S., Neef, C. e Stobberingh, E. E. (2009). *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiol.*, 9, 229.
- Crosby, H. A., Kwiecinski, J. e Horswill, A. R. (2016). *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host–pathogen interactions. *Adv. Appl. Microbiol.*, 96, 1-41.
- Cusumano, J. A., Dupper, A. C., Malik, Y., Gavioli, E. M., Banga, J., Berbel Caban, A., Nadkarni, D., Obla, A., Vasa, C. V., Mazo, D. e Altman, D. R. (2020). *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients infected with COVID-19: a case series. *Open Forum Infect. Dis.*, 7, ofaa518.

- Da Costa, T. M., Morgado, P. G., Cavalcante, F. S., Damasco, A. P., Nouér, S. A. e Dos Santos, K. R. N. (2016). Clinical and microbiological characteristics of heteroresistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from bloodstream infections in a Brazilian teaching hospital. *PLoS One*, 11, e0160506.
- Da Silva, L. S., Andrade, Y. M., Oliveira, A. C., Cunha, B. C., Oliveira, E. G., Cunha, T. S., Mafra, S. S., Almeida, J. B., Carvalho, S. P., Nascimento, F. S., Santos Junior, M. N., Chamon, R. C., Santos, K. R. N., Campos, G. B. e Marques, L. M. (2020). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare workers at a tertiary care hospital in northeastern Brazil. *Infect. Prev. Pract.*, 2, 100084.
- Damasco, A. P., Costa, T. M. D., Morgado, P. G. M., Guimarães, L. C., Cavalcante, F. S., Nouér, S. A. e 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. *Braz. J. Infect. Dis.*, 23, 139-142.
- David, M. Z., Cadilla, A., Boyle-Vavra, S. e 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., Whitener, C. J. e Silbergeld, E. K. (2013). Household risk factors for colonization with multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One*, 8, e54733.
- Deiters, C., Günnewig, V., Friedrich, A. W., Mellmann, A. e Köck, R. (2015). Are cases of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex (CC) 398 among humans still livestock-associated?. *Int. J. Med. Microbiol.*, 305, 110-113.
- Del Fiol, F. D. S., Bergamaschi, C. D. C., De Andrade Jr, I. P., Lopes, L. C., Silva, M. T. e Barberato-Filho, S. (2022). Consumption trends of antibiotics in Brazil during the COVID-19 pandemic. *Front. Pharmacol.*, 13, 844818.
- De Matos, P.D., Sedaca, S., Ferreira, D.C., Iorio, N.L., Toledo, V.C., Freitas, A.I., Coelho, F.L., Sousa, C., Dos Santos, K.R., e Pereira, M.O. (2014). Antimicrobial synergism against different lineages of *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* carrying SCCmec IV. *J. Appl. Microbiol.*, 116, 1418-1426.
- Derakhshan, S., Navidinia, M. e Haghi, F. (2021). Antibiotic susceptibility of human-associated *Staphylococcus aureus* and its relation to *agr* typing, virulence genes, and biofilm formation. *BMC Infect. Dis.*, 21, 1-10.
- Deurenberg, R. H. e Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.*, 8, 747-763.
- Diekema, D. J., Richter, S. S., Heilmann, K. P., Dohrn, C. L., Riahi, F., Tendolkar, S., McDanel, J. S. e Doern, G. V. (2014). Continued emergence of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: results from a nationwide surveillance study. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 35, 285-292.
- Duarte, F. C., Tavares, E. R., Danelli, T., Ribeiro, M. A. G., Yamauchi, L. M., Yamada-Ogatta, S. F. e Perugini, M. R. E. (2018). Disseminated Clonal Complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec type II in a tertiary hospital of Southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 60, e32.
- Edwin Erayil, S., Palzer, E. e Kline, S. (2022). An evaluation of risk factors for *Staphylococcus aureus* colonization in a pre-surgical population. *Access Microbiol.*, 4, 000316.
- El-Baz, R., Rizk, D.E., Barwa, R. e Hassan, R. (2017). Virulence characteristics and molecular relatedness of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* harboring different staphylococcal cassette chromosome *mec*. *Microb. Pathog.*, 113, 385-395.
- El Zahran, T., Kalot, N., Cheaito, R., Khalifeh, M., Estelly, N. e 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. e Voigt, R. M. (2021). Nasopharyngeal microbiota in SARS-CoV-2 positive and negative patients. *Biol. Proced. Online*, 23, 1-6.

- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J. e Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1008-1015.
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. e Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 7687-7692.
- Eyler, R. F. e Shvets, K. (2019). Clinical pharmacology of antibiotics. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 14, 1080-1090.
- Fernandes, D. C. S. (2019). *Staphylococcus aureus* de infecção de corrente sanguínea: Aspectos da resistência antimicrobiana, clonalidade e da clínica associada ao paciente. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 110f.
- Fernández, P., Moreno, L., Yagüe, G., Andreu, E., Jara, R. e Segovia, M. (2021). Colonization by multidrug-resistant microorganisms in ICU patients during the COVID-19 pandemic. *Med. Intensiva*, 45, 313.
- Ferreira, F.A., Souza, R.R., de Sousa Moraes, B., de Amorim Ferreira, A.M., Américo, M.A., Fracalanza, S.E., Dos Santos Silva Couceiro, J.N. e Sá Figueiredo, A.M. (2013). Impact of agr dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) variant of the lineage ST1-SCCmec IV. *BMC Microbiol.*, 13, 1-12.
- FIOCRUZ (1987). Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Manual de Saneantes. Rio de Janeiro.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. e O'Gara, J.P. (2005). Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 1973-1976.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K. e Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12, 49-62.
- Foster, T. J. (2019). Surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectrum*, 7, 10-1128.
- Foster, C. E., Kok, M., Flores, A. R., Minard, C. G., Luna, R. A., Lamberth, L. B., Kaplan, S. L. e Hulten, K. G. (2020). Adhesin genes and biofilm formation among pediatric *Staphylococcus aureus* isolates from implant-associated infections. *PLoS One*, 15, e0235115.
- Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D. e Simon, J.C. (2011). Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*, 32, 6692-6709.
- García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, W., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L.R., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J. e Holmes, M.A. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.*, 11, 595-603.
- Ghasemian, A., Peerayeh, N., Bakhshi, B. e Mirzaee, M. (2015). Os componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs) genes entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* de crianças hospitalizadas. *IJ Pathogen.*, 10, 4, 258-64.
- Ghosh, S., Bornman, C. e Zafer, M. M. (2021). Antimicrobial resistance threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand? *J. Infect. Public Health*, 14, 555-560.
- Gilot, P., Lina, G., Cochard, T. e Poutrel, B. (2002). Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 4060-4067.
- Gordon, R. J. e Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.*, 46 (Supplement_5), S350-S359.

Graf, A. C., Leonard, A., Schäuble, M., Rieckmann, L. M., Hoyer, J., Maass, S., Lalk, M., Becher, D., Pané-Farré, J. e Riedel, K. (2019). Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. *Mol. Cell. Proteomics*, 18, 1036-1053.

Grasselli, G., Scaravilli, V., Mangioni, D., Scudeller, L., Alagna, L., Bartoletti, M., Bellani, G., Biagioni, E., Bonfanti, P., Bottino, N., Coloretti, I., Cutuli, S. L., De Pascale, G., Ferlicca, D., Fior, G., Forastieri, A., Franzetti, M., Greco, M., Guzzardella, A., Linguadoca, S., Meschiari, M., Messina, A., Monti, G., Morelli, P., Muscatello, A., Redaelli, S., Stefanini, F., Tonetti, T., Antonelli, M., Cecconi, M., Foti, G., Fumagalli, R., Girardis, M., Ranieri, M., Viale, P., Raviglione, M., Pesenti, A., Gori, A. e Bandera, A. (2021). Hospital-acquired infections in critically ill patients with COVID-19. *Chest*, 160, 454-465.

Gudiol, C., Cuervo, G., Shaw, E., Pujol, M. e Carratalà, J. (2017). Pharmacotherapeutic options for treating *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Expert Opin. Pharmacother.*, 18, 1947–1963.

Guimarães, L.C. (2018). Adesão e formação de biofilme por linhagens brasileiras de *Staphylococcus aureus* isoladas de hospitais do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências - Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, f. 107.

Guimarães, L. C., Assunção, M. I. D. M. M., de Oliveira, T. L. R., Cavalcante, F. S., Saintive, S., Abad, E. D. D., Goudouris, E. S., do Prado, E. A., Ferreira, D. C. e 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.

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J. e Wang, Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10, 107.

Guo, H., Tong, Y., Cheng, J., Abbas, Z., Li, Z., Wang, J., Zhou, Y., Si, D. e Zhang, R. (2022). Biofilm and Small Colony Variants-An Update on *Staphylococcus aureus* Strategies toward Drug Resistance. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 1241.

Han, Q., Lin, Q., Ni, Z. e You, L. (2020). Uncertainties about the transmission routes of 2019 novel coronavirus. *Influenza Other Respir. Viruses*, 14, 470.

Hardy, K. J., Hawkey, P. M., Gao, F. e Oppenheim, B. A. (2004). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br. J. Anaesth.*, 92, 121–130.

Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., de Lencastre, H., Bentley, S. D., Kearns, A. M. e Holden, M. T. G. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol.*, 18, 1–11.

He, S., Liu, W., Jiang, M., Huang, P., Xiang, Z., Deng, D., Chen, P. e Xie, L. (2021). Clinical characteristics of COVID-19 patients with clinically diagnosed bacterial co-infection: A multi-center study. *PLoS One*, 16, e0249668.

Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T. e Tenover, F. C. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40, 135–136.

Hong, X., Zhou, S., Dai, X., Xie, D., Cai, Y., Zhao, G. e Li, B. (2023). Molecular typing and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from burn wound infections in Fujian, China. *Front. Microbiol.*, 14, 1236497.

Hoque, M. N., Akter, S., Mishu, I. D., Islam, M. R., Rahman, M. S., Akhter, M., Islam, I., Hasan, M. M., Rahaman, M. M., Sultana, M., Islam, T. e Hossain, M. A. (2021). Microbial co-infections in COVID-19: Associated microbiota and underlying mechanisms of pathogenesis. *Microb. Pathog.*, 156, 104941.

Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M. e 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.

- Hosseini, M., Shapouri Moghaddam, A., Derakhshan, S., Hashemipour, S. M. A., Hadadi-Fishani, M., Pirouzi, A. e Khaledi, A. (2020). Correlation Between Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in MRSA and MSSA Isolated from Clinical Samples in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microb. Drug. Resist*, 26, 1071–1080.
- Hughes, S., Troise, O., Donaldson, H., Mughal, N. e Moore, L. S. P. (2020). Bacterial and fungal co-infection among hospitalized patients with COVID-19: A retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clin. Microbiol. Infect.*, 26, 1395–1399.
- Ikonomidis, A., Vasdeki, A., Kristo, I., Maniatis, A.N., Tsakris, A., Malizos, K.N. e Pournaras, S. (2009). Association of biofilm formation and methicillin-resistance with accessory gene regulator (*agr*) loci in Greek *Staphylococcus aureus* clones. *Microb. Pathog.*, 47, 341–344
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M. e Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.*, 81, 7–11.
- Janzon, L. e Arvidson, S. (1990). The role of the δ -lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.*, 9, 1391–1399.
- Javdan, S., Narimani, T., Shahini Shams Abadi, M. e Gholipour, A. (2019). Agr typing of *Staphylococcus aureus* species isolated from clinical samples in training hospitals of Isfahan and Shahrekord. *BMC Res. Notes*, 12, 363.
- Jenul, C. e Horswill, A. R. (2019). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol. Spectrum*, 7, 7–2.
- Joo, H. S. e Otto, M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem. Biol.*, 19, 1503–1513
- Karami, Z., Knoop, B. T., Dofferhoff, A. S. M., Blaauw, M. J. T., Janssen, N. A., van Apeldoorn, M., Kerckhoffs, A. P. M., van de Maat, J. S., Hoogerwerf, J. J. e Oever, J. T. (2021). Few bacterial co-infections but frequent empiric antibiotic use in the early phase of hospitalized patients with COVID-19: results from a multicenter retrospective cohort study in The Netherlands. *Infect. Dis.*, 53, 102–110.
- Karanika, S., Kinamon, T., Grigoras, C. e Mylonakis, E. (2016). Colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and risk for infection among asymptomatic athletes: A Systematic Review and Metanalysis. *Clin. Infect. Dis.*, 63, 195–204.
- Katayama, Y., Ito, T. e Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 1549–1555.
- Kawamura, H., Nishi, J., Imuta, N., Tokuda, K., Miyanoara, H., Hashiguchi, T., Zenmyo, M., Yamamoto, T., Ijiri, K., Kawano, Y. e Komiya, S. (2011). Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 63, 10–15.
- Khoramrooz, S.S., Mansouri, F., Marashifard, M., Malek Hosseini, S.A., Akbarian Chenarestane-Olia, F., Ganavehei, B., Gharibpour, F., Shahbazi, A., Mirzaii, M. e Darban-Sarokhalil, D. (2016). Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and *agr* typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microb. Pathog.*, 97, 45–51.
- King, J. M., Kulhankova, K., Stach, C. S., Vu, B. G. e Salgado-Pabón, W. (2016). Phenotypes and virulence among *Staphylococcus aureus* USA100, USA200, USA300, USA400, and USA600 clonal lineages. *Msphere*, 1, e00208–16.
- Krismer, B., Weidenmaier, C., Zipperer, A. e Peschel, A. (2017). The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.*, 15, 675–687.
- Krismer, B., Liebeke, M., Janek, D., Nega, M., Rautenberg, M., Hornig, G., Unger, C., Weidenmaier, C., Lalk, M. e Peschel, A. (2014). Nutrient limitation governs *Staphylococcus aureus* metabolism and niche adaptation in the human nose. *PLoS Pathog.*, 10, e1003862.

- Lai, C. C., Chen, S. Y., Ko, W. C. e Hsueh, P. R. (2021). Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 57, 106324.
- Lakhundi, S. e Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 31, e00020-18.
- Larsen, J., Petersen, A., Sørum, M., Stegger, M., van Alphen, L., Valentiner-Branth, P., Knudsen, L. K., Larsen, L. S., Feingold, B., Price, L. B., Andersen, P. S., Larsen, A. R. e Skov, R. L. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. *Eurosurveillance*, 20, 30021.
- Laux, C., Peschel, A. e Krismer, B. (2019). *Staphylococcus aureus* colonization of the human nose and interaction with other microbiome members. *Microbiol. Spectr.*, 7, e00379-19.
- Le, K. Y., Dastgheyb, S., Ho, T. V. e Otto, M. (2014). Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 4, 167.
- Le, K. Y. e Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front. Microbiol.*, 6, 167362.
- Le, K. Y., Park, M. D. e Otto, M. (2018). Immune evasion mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. *Front. Microbiol.*, 9, 359.
- Lee, G. C., Dallas, S. D., Wang, Y., Olsen, R. J., Lawson, K. A., Wilson, J. e Frei, C. R. (2017). Emerging multidrug resistance in community-associated *Staphylococcus aureus* involved in skin and soft tissue infections and nasal colonization. *J. Antimicrob. Chemother.*, 72, 2461–2468.
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A. e Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 4, 18033.
- Lenz, K. D., Klosterman, K. E., Mukundan, H. e Kubicek-Sutherland, J. Z. (2021). Macrolides: From toxins to therapeutics. *Toxins*, 13, 347.
- Li, M., Diep, B. A., Villaruz, A. E., Braughton, K. R., Jiang, X., DeLeo, F. R., Chambers, H. F., Lu, Y. e Otto, M. (2009). Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PNAS*, 106, 5883–5888.
- Li, L., Yeaman, M. R., Bayer, A. S. e Xiong, Y. Q. (2019). Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) related to persistent endovascular infection. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8, 71.
- Lim, Y., Shin, H.J., Kwon, A.S., Reu, J.H., Park, G. e Kim, J. (2013). Predictive genetic risk markers for strong biofilm-forming *Staphylococcus aureus*: *fnbB* gene and *SCCmec* type III. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 76, 539–541.
- Lister, J.L. e Horswill, A.R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 4, 178.
- Liu, J., Chen, D., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Xu, Z. e Shirliff, M.E. (2016). Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (*SCCmec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.*, 101, 56–67.
- Liu, M., Liu, J., Guo, Y. e Zhang, Z. (2010). Characterization of virulence factors and genetic background of *Staphylococcus aureus* isolated from Peking University People's Hospital between 2005 and 2009. *Curr. Microbiol.*, 61, 435–443.
- LPSN (2024). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso em 20/03/2024.
- Madhaiyan, M., Wirth, J.S. e 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 *Mammaliicoccus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family Staphylococcaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70, 5926–5936.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. e Stahl, D.A. (2016). Microbiologia diagnostica. In: Microbiologia de Brock. 14. ed. (Porto Alegre: ArtMed), pp. 794–797.

Martín-López, J.V., Pérez-Roth, E., Claverie-Martín, F., Díez Gil, O., Batista, N., Morales, M. e Méndez-Álvarez, S. (2002). Detecção de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* contendo o agrupamento de genes *ica* necessário para o estabelecimento do biofilme. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 1569–1570.

Marschalek, R. (2023). SARS-CoV-2: The virus, its biology and COVID-19 disease-counteracting possibilities. *Front. Biosci. Landmark*, 28, 273.

Matos, P.D.M. (2013). Caracterização da resistência antimicrobiana e da virulência em amostras de *Staphylococcus aureus* portadoras do SCCmec IV de diferentes linhagens isoladas de hospitais do Rio de Janeiro. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências - Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pp. 99–135.

Małyszko, I., Schwarz, S. e Hauschild, T. (2014). Detection of a new *mecC* allotype, *mecC2*, in methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69, 2003–2005.

McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E. e O'Gara, J.P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 5, 1.

McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K. e Tenover, F.C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 5113–5120.

McDougal, L. K., Fosheim, G. E., Nicholson, A., Bulens, S. N., Limbago, B. M., Shearer, J. E., Summers, A. O. e Patel, J. B. (2010). Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54, 3804–3811.

Mikłasińska-Majdanik, M. (2021). Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 10, 1406.

Mirzaei, R., Goodarzi, P., Asadi, M., Soltani, A., Aljanabi, H.A.A., Jeda, A.S., Dashtbin, S., Jalalifar, S., Mohammadzadeh, R., Teimoori, A., Tari, K., Salari, M., Ghiasvand, S., Kazemi, S., Yousefimashouf, R., Keyvani, H. e Karampoor, S. (2020). Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*, 72, 2097–2111.

Młynarczyk, B., Młynarczyk, A., Kmera-Muszynska, M., Majewski, S. e Młynarczyk, G. (2010). Mechanisms of resistance to antimicrobial drugs in pathogenic Gram-positive cocci. *Mini Rev. Med. Chem.*, 10, 928–937.

Młynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A. e Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 8088.

Möllers, M., Von Wahlde, M.K., Schuler, F., Mellmann, A., Böing, C., Schwierzeck, V., Schneider, J.S. e Kampmeier, S. (2022). Outbreak of MRSA in a gynecology/obstetrics department during the COVID-19 pandemic: a cautionary tale. *Microorganisms*, 10, 689.

Monecke, S., Slickers, P. e Ehricht, R. (2008). Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 53, 237–251.

Monecke, S., Coombs, G., Shore, A.C., Coleman, D.C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F.G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., Tan, H.L., Weber, S. e Ehricht, R. (2011). A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 6, e17936.

Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R. e Bayles, K.W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio*, 5, 10-1128.

- Moormeier, D.E. e Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.*, 104, 365–376.
- Naicker, P.R., Karayem, K., Hoek, K.G.P., Harvey, J. e Wasserman, E. (2016). Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage. *Microb. Pathog.*, 90, 41–49.
- Naimi, T.S., Ledell, K.H., Boxrud, D.J., Groom, A.V., Steward, C.D., Johnson, K., Besser, J.M., O’Boyle, C., Danila, R.N., Cheek, J.E., Osterholm, K.A., Moore, M.T. e Smith, K.E. (2001). Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996–1998. *Clin. Infect. Dis.*, 33, 990–996.
- Nascimento, T.C., Diniz, C.G., Silva, V.L., Ferreira-Machado, A.B., Fajardo, M.O., de Oliveira, T.L.R., Ferreira, D.C., Cavalcante, F.S. e Santos, K.R. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. *Braz. J. Infect. Dis.*, 22, 55–59.
- Neto, A.G.M., Lo, K.B., Wattoo, A., Salacup, G., Pelayo, J., DeJoy 3rd, R., Bhargav, R., Gul, F., Peterson, E., Albano, J., Patarroyo-Aponte, G., Rangaswami, J. e Azmaiparashvili, A. (2020). Bacterial infections and patterns of antibiotic use in patients with COVID-19. *J. Med. Virol.*, 93, 1489–1495.
- Nichol, K.A., Adam, H.J., Golding, G.R., Lagacé-Wiens, P.R., Karlowsky, J.A., Hoban, D.J. e Zhanel, G.G. (2019). Characterization of MRSA in Canada from 2007 to 2016. *J. Antimicrob. Chemother.*, 74(Supplement_4), iv55–iv63.
- Novick, R. (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology*, 33, 155–166.
- Novick, R.P. e Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.*, 42, 541–564.
- Nowicka, D. e Grywalska, E. (2019). *Staphylococcus aureus* and host immunity in recurrent furunculosis. *Dermatology*, 235, 295–305.
- Nurjadi, D., Last, K., Klein, S., Boutin, S., Schmack, B., Mueller, F., Heeg, K., Ruhparwar, A., Heininger, A. e 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. *J. Infect.*, 80, 511–518.
- Okorie-Kanu, O. J., Anyanwu, M. U., Ezenduka, E. V., Mgbeahuruike, A. C., Thapaliya, D., Gerbig, G., Ugwuijem, E. E., Okorie-Kanu, C. O., Agbowo, P., Olorunleke, S., Nwanta, J. A., Chah, K. F. e 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., Medrano-Borromeo, C., Martínez-Valenzuela, A., Román-Montes, C.M., Martínez-Guerra, B., González-Lara, M.F., Hernandez-Gilsoul, T., Herrero, A.G., Tamez-Flores, K.M., Ochoa-Hein, E., Ponce-de-León, A., Galindo-Fraga, A., Kershenovich-Stalnikowitz, D. e 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.
- O’Gara, J.P. (2017). Into the storm: Chasing the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* from skin colonization to life-threatening infections. *Environ. Microbiol.*, 19, 3823–3833.
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A. e O’Gara, J.P. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1379–1388.
- O’Toole, R.F. (2021). The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 27, 1772–1776.
- Oliveira, D., Borges, A. e Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10, 252.

- 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: 26 abril 2024.
- Otto, M. (2008). *Staphylococcal* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322, 207–228.
- Otto, M. (2012). MRSA virulence and spread. *Cell. Microbiol.*, 14, 1513–1521.
- Otto, M. (2013). *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.*, 64, 175–188.
- Otto, M. (2018). *Staphylococcal* biofilms. *Microbiol. Spectr.*, 6, 1–17.
- Paharik, A. E. e Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol. Spectr.*, 4, 10.1128.
- Pakzad, R., Malekifar, P., Shateri, Z., Zandi, M., Akhavan Rezayat, S., Soleymani, M., Karimi, M.R., Ahmadi, S.E., Shahbahrani, R., Pakzad, I., Abdi, F., Farahani, A., Soltani, S., Kesheh, M.M. e Hosseini, P. (2021). Worldwide prevalence of microbial agents' coinfection among COVID-19 patients: A comprehensive updated systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Lab. Anal.*, 36, e24151.
- Paling, F.P., Wolkewitz, M., Bode, L.G., Klouwenberg, P.K., Ong, D.S., Depuydt, P., de Bus, L., Sifakis, F., Bonten, M.J.M. e Kluytmans, J.A.J.W. (2017). *Staphylococcus aureus* colonization at ICU admission as a risk factor for developing *S. aureus* ICU pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 23, 49–e9.
- Paling, F.P., Hazard, D., Bonten, M.J.M., Goossens, H., Jafri, H.S., Malhotra-Kumar, S., Sifakis, F., Weber, S., Kluytmans, J.A.J.W. e ASPIRE-ICU Study Team (2020). Association of *Staphylococcus aureus* colonization and pneumonia in the intensive care unit. *JAMA Netw. Open*, 3, e2012741.
- Park, S.H., Kim, S.Y., Lee, J.H., Park, C. e Lee, D.G. (2013). Community-genotype strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level mupirocin resistance in a neonatal intensive care unit. *Early Hum. Dev.*, 89, 661–665.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N. e Jensen, S.O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 31, 10–1128.
- Pérez-Montarelo, D., Viedma, E., Murcia, M., Muñoz-Gallego, I., Larrosa, N., Brañas, P., Fernández-Hidalgo, N., Gavalda, J., Almirante, B. e Chaves, F. (2017). Pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* endovascular infection isolates from different clonal complexes. *Front. Microbiol.*, 8, 917.
- Pires, F.V., da Cunha, M.D.L.R.D.S., Abraao, L.M., Martins, P.Y., Camargo, C.H. e 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. e Owen, R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 151–156.
- Plumet, L., Ahmad-Mansour, N., Duniach-Remy, C., Kissa, K., Sotto, A., Lavigne, J.P., Costechareyre, D. e Molle, V. (2022). Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* infections: a review of animal models, treatments, and clinical trials. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 12, 907314.
- Polly, M., de Almeida, B.L., Lennon, R.P., Cortês, M.F., Costa, S.F. e Guimarães, T. (2022). Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. *Am. J. Infect. Control*, 50, 32–38.
- Pozzi, C., Waters, E.M., Rudkin, J.K., Schaeffer, C.R., Lohan, A.J., Tong, P., Loftus, B.J., Pier, G.B., Fey, P.D., Massey, R.C., e O'Gara, J.P. (2012). Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathog.*, 8: e1002626.
- Puah, S.M., Tan, J.A.M.A., Chew, C.H. e Chua, K.H. (2018). Diverse profiles of biofilm and adhesion genes in *Staphylococcus aureus* food strains isolated from sushi and sashimi. *J. Food Sci.*, 83, 2337–2342.

- Qu, J., Cai, Z., Liu, Y., Duan, X., Han, S., Liu, J., Zhu, Y., Jiang, Z., Zhang, Y., Zhuo, C., Liu, Y., Liu, Y., Liu, L. e Yang, L. (2021). Persistent bacterial coinfection of a COVID-19 patient caused by a genetically adapted *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonizer. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 11, 641920.
- Ranzani, O. T., Bastos, L. S., Gelli, J. G. M., Marchesi, J. F., Baião, F., Hamacher, S., Bozza, F. A. (2021). Characterisation of the first 250,000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: A retrospective analysis of nationwide data. *Lancet Respir. Med.*, 9, 407-418.
- Rawson, T. M., Moore, L. S., Zhu, N., Ranganathan, N., Skolimowska, K., Gilchrist, M. e Holmes, A. (2020). Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin. Infect. Dis.*, 71, 2459-2468.
- Reynolds, D. e Kollef, M. (2021). The epidemiology, pathogenesis, and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: An update. *Drugs*, 81, 2117-2131.
- Ribeiro, A., Coronado, A. Z., Silva-Carvalho, M. C., Ferreira-Carvalho, B. T., Dias, C., Rozenbaum, R., Del Peloso, P. F., da Costa Ferreira Leite, C., Teixeira, L. A. e Figueiredo, A. M. (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. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 59, 339-345.
- Rizvi, S. G. e Ahammad, S. Z. (2022). COVID-19 and antimicrobial resistance: A cross-study. *Sci. Total Environ.*, 807, 150873.
- Roche, F. M., Massey, R., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Visai, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M. e Foster, T. J. (2003). Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology*, 149, 643-654.
- Rohde, M. (2019). The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiol. Spectrum*, 7, 10-1128.
- Romanelli, F., Stolfi, S., Ronga, L., Del Prete, R., Bavaro, D., Saracino, A., Dalfino, L. e Mosca, A. (2023). Coinfections in intensive care units. Has anything changed with COVID-19 pandemic? *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 94.
- Rossi, F., Diaz, L., Wollam, A., Panesso, D., Zhou, Y., Rincon, S., Arias, C. A. (2014). Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N. Engl. J. Med.*, 370, 1524-1531.
- Saderi, H., Emadi, B. e Owlia, P. (2011). Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Med. Sci. Monit.*, 17, BR48.
- Sahli, F., Feidjel, R. e Laalaoui, R. (2017). Hemodialysis catheter-related infection: Rates, risk factors, and pathogens. *J. Infect. Public Health*, 10, 403-408.
- Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J. L., Rolain, J. M. e Blin, O. (2018). *Staphylococcus aureus* nasal colonization: An update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Front. Microbiol.*, 9, 2419.
- Sakr, A., Brégeon, F., Rolain, J. M. e Blin, O. (2019). *Staphylococcus aureus* nasal decolonization strategies: A review. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 17, 327-340.
- Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Moellering Jr, R. C., Wennersten, C., Venkataraman, L., Novick, R. P. e Gold, H. S. (2002). Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 1492-1502.
- Salina, A., Guimarães, F. F., Pereira, V. B., Menozzi, B. D., Rall, V. L. M. e Langoni, H. (2020). Detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* e produção de biofilme por *Staphylococcus aureus* e estafilococos não-aureus isolados de mastite clínica e subclínica bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 72, 1034-1038.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. e 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.

- Sansom, S. E., Benedict, E., Thiede, S. N., Hota, B., Aroutcheva, A., Payne, D., Zawitz, C., Snitkin, E. S., Green, S. J., Weinstein, R. A. e Popovich, K. J. (2021). Genomic Update of Phenotypic Prediction Rule for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) USA300 Discloses Jail Transmission Networks with Increased Resistance. *Microbiol. Spectr.*, 9, e0037621.
- Schuenck, R. P., Nouér, S. A., de Oliveira Winter, C., Cavalcante, F. S., Scotti, T. D., Ferreira, A. L. P., Giambiagi-de Marval, M. e dos Santos, K. R. (2009). Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 64, 434-441.
- Serio, A. W., Keepers, T., Andrews, L. e Krause, K. M. (2018). Aminoglycoside revival: Review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation. *EcoSal Plus*, 8, 10-1128.
- Sharara, S. L., Maragakis, L. L., Cosgrove, S. E. (2021). Decolonization of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 35, 107-133.
- Silva, L. P., Fortaleza, C. M. C. B., Teixeira, N. B., Silva, L. T. P., de Angelis, C. D., e 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.
- Singh-Moodley, A., Lowe, M., Mogokotleng, R. e Perovic, O. (2020). Diversity of SCCmec elements and spa types in South African *Staphylococcus aureus mecA*-positive blood culture isolates. *BMC Infect. Dis.*, 20, 1-12.
- Smith, J. T. e Andam, C. P. (2021). Extensive horizontal gene transfer within and between species of coagulase-negative *Staphylococcus*. *Genome Biol. Evol.*, 13, evab206.
- Smith, K., Perez, A., Ramage, G., Lappin, D., Gemmell, C. G. e Lang, S. (2008). Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 57, 1018-1023.
- Sohail, M., Muzzammil, M., Ahmad, M., Rehman, S., Garout, M., Khojah, T. M., Al-Eisa, K. M., Breagesh, S. A., Hamdan, R. M. A., Alibrahim, H. I., Alsoliabi, Z. A., Rabaan, A. A. e Ahmed, N. (2023). Molecular characterization of community-and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during COVID-19 pandemic. *Antibiotics*, 12, 157.
- Solanky, D., McGovern, O. L., Edwards, J. R., Mahon, G., Patel, T. S., Lessa, F. C., Hicks, L. A. e 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. *Clin. Infect. Dis: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 77, S12–S19.
- Spaan, A. N., van Strijp, J. A. e Torres, V. J. (2017). Leukocidins: *Staphylococcal* bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat. Rev. Microbiol.*, 15, 435-447.
- Spížek, J. e Řezanka, T. (2017). Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem. Pharmacol.*, 133, 20-28.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I. e Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115, 891-899.
- Sulayyim, H. J. A., Ismail, R., Hamid, A. A. e Ghafar, N. A. (2022). Antibiotic resistance during COVID-19: A systematic review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19, 11931.
- Szymanek-Majchrzak, K., Mlynarczyk, A., Kawecki, D., Pacholczyk, M., Durlík, M., Deborska-Materkowska, D., Paczek, L. e Mlynarczyk, G. (2018). 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. *Transplant. Proc.*, 50, 2170-2175.

- Taki, E., Jabalameli, F., Tehrani, M. R. M., Feizabadi, M. M., Halimi, S., Sanjari, M., Amini, M. R., Beigverdi, R. e Emameini, M. (2023). Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal cavity and wound infections among diabetic patients. *Curr. Microbiol*, 80, 147.
- Tam, K. e Torres, V. J. (2019). *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol. Spectr*, 7, 10-1128.
- Tan, L., Li, S.R., Jiang, B., Hu, X.M. e Li, S. (2018). Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system. *Front. Microbiol.*, 9, 55.
- Teixeira, L. A., Resende, C. A., Ormonde, L. R., Rosenbaum, R., Figueiredo, A. M., De Lencastre, H. e Tomasz, A. (1995). Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J. Clin. Microbiol*, 33, 2400-2404.
- Teixeira, L. M. T., dos Santos, K. R. N., Bueris, V. e Trabulsi, L. R. (2008). *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi, L. R. e Alterthum, Microbiologia, 5ª ed. São Paulo: Atheneu, Brasil.
- Tenover, F. C., McAllister, S., Fosheim, G., McDougal, L. K., Carey, R. B., Limbago, B., Lonsway, D., Patel, J. B., Kuehnert, M. J. e Gorwitz, R. (2008). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *J. Clin. Microbiol*, 46, 2837-2841.
- Thampi, N., Showler, A., Burry, L., Bai, A. D., Steinberg, M., Ricciuto, D. R. e Morris, A. M. (2015). Multicenter study of health care cost of patients admitted to hospital with *Staphylococcus aureus* bacteremia: impact of length of stay and intensity of care. *Am J Infect Control*, 43, 739-744.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Flack, C. E. e Horswill, A. R. (2011). Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev*, 111, 117-151.
- Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L. e Fowler Jr, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661.
- Torres, G., Vargas, K., Sánchez-Jiménez, M., Reyes-Velez, J. e Olivera-Angel, M. (2019). Genotypic and phenotypic characterization of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections in Colombian dairy farms. *Heliyon* 5, e02535.
- Troeman, D.P.R., Hazard, D., van Werkhoven, C.H.W., Timbermont, L., Malhotra-Kumar, S., Wolkewitz, M., Ruzin, A., Sifakis, F., Harbarth, S., Kluytmans, J.A.J.W. e ASPIRE-SSI Study Group (2024). Association of *Staphylococcus aureus* bacterial load and colonization sites with the risk of postoperative *S. aureus* infection. *Open Forum Infect. Dis.* 11, ofae414.
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Baba, T. e Hiramatsu, K. (2010). *Staphylococcal* cassette chromosome *mec*-like element in *Macroccoccus caseolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1469–1475.
- Tuominen, K., Frosth, S., Pedersen, K., Rosendal, T. e Sternberg Lewerin, S. (2023). Survival of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 on different surface materials. *Acta Vet. Scand.* 65, 13.
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L. e Fowler Jr, V.G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 203–218.
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M. e 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. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1–46.
- Vanhommerig, E., Moons, P., Pirici, D., Lammens, C., Hernalsteens, J.P., de Greve, H., Kumar-Singh, S., Goossens, H. e Malhotra-Kumar, S. (2014). Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 9, e104561.

- Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G. e Yarlagadda, P.K. (2014). Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc. Inst. Mech. Eng. H* 228, 1083–1099.
- Veloso, J.O., Lamaro-Cardoso, J., Neves, L.S., Borges, L.F., Pires, C.H., Lamaro, L. e André, M.C.P. (2019). Methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* colonizing patients and intensive care unit environment: virulence profile and genetic variability. *APMIS* 127, 717–726.
- Visansirikul, S., Kolodziej, S.A. e Demchenko, A.V. (2020). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective. *Org. Biomol. Chem.* 18, 783–798.
- Vivoni, A.M., Diep, B.A., de Gouveia Magalhães, A.C., Santos, K.R.N., Riley, L.W., Sensabaugh, G.F. e Moreira, B.M. (2006). Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1686–1691.
- Wang, L. e Archer, G.L. (2010). Roles of CcrA and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome mec, a *Staphylococcus aureus* genomic island. *J. Bacteriol.* 192, 3204–3212.
- Wang, L., Liu, Y., Yang, Y., Huang, G., Wang, C., Deng, L., Zheng, Y., Fu, Z., Li, C., Shang, Y., Zhao, C., Sun, M., Li, X., Yu, S., Yao, K. e Shen, X. (2012). Multidrug-resistant clones of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children and the resistance genes to clindamycin and mupirocin. *J. Med. Microbiol.*, 61, 1240–1247.
- Wang, W., Hu, Y., Baker, M., Dottorini, T., Li, H., Dong, Y., Bai, Y., Fanning, S. e Li, F. (2022). Novel SCCmec type XV (7A) and two pseudo-SCCmec variants in foodborne MRSA in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 77, 903–909.
- Wang, W., Zhong, Q., Cheng, K., Tan, L. e Huang, X. (2023). Molecular characteristics, antimicrobial susceptibility, biofilm-forming ability of clinically invasive *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect. Drug Resist.* 16, 7671–7681.
- WHO (2014). World Health Organization. Health care-associated infections: Fact Sheet. Disponível em: https://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf. Acesso em 09/04/2024.
- WHO – World Health Organization (2020). WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic. Europe: World. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Acesso em 10/04/2024.
- Whitaker, C.O. (2022). *Staphylococcus aureus* de infecção da corrente sanguínea em um hospital público do rio de janeiro: aspectos da resistência antimicrobiana, virulência e clonalidade de amostras antes e durante a pandemia de covid-19. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências - Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, f. 115.
- Wolk, D.M., Struelens, M.J., Pancholi, P., Davis, T., Della-Latta, P., Fuller, D. e Chapin, K. (2009). Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *J. Clin. Microbiol.* 47, 823–826.
- Yang, X., Dong, F., Qian, S., Wang, L., Liu, Y., Yao, K., Song, W., Zhen, J., Zhou, W., Xu, H. e Zheng, H. (2019). Accessory gene regulator (*agr*) dysfunction was unusual in *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. *BMC Microbiol.*, 19, 95.
- Yao, W., Xu, G., Li, D., Bai, B., Wang, H., Cheng, H., Zheng, J., Sun, X., Lin, Z., Deng, Q. e 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 Infect. Dis.* 19, 175.
- Yuki, K., Fujiogi, M. e Koutsogiannaki, S. (2020). COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin. Immunol.* 215, 108427.
- Zecconi, A. e Scali, F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol. Lett.* 150, 12–22.

Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H. e Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 395, 1054–1062.

Zhu, T., Jin, J., Chen, M. e Chen, Y. (2022). The impact of infection with COVID-19 on the respiratory microbiome: A narrative review. *Virulence* 13, 1076–1087.

ANEXO 1

Tabela 13. Descrição das características gerais e resultados de todas as 93 amostras MRSA avaliadas no presente estudo.

Nº	Tipo de CTI	Antibiograma							SCCmec	Formação Biofilme	Funcionalidade Agr	Tipo Agr	icaA	sasG	Clonalidade	ST/CC
		CIP	CLI	ERI	GEN	RIF	TET	SXT								
2053	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	105 CC398
2055	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2056	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2059	Não COVID-19	R	R	R	R	S	S	S	II	Moderado	Inativo	II	positivo	positivo	USA100	
2062	Não COVID-19	I	halo D	R	R	S	I	S	II	Forte produtor	Inativo	I	positivo	Negativo	CC398	
2064	Não COVID-19	S	S	I	S	S	S	S	IV	Moderado	Inativo	II	positivo	positivo	USA800	
2072	COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2073	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	I	positivo	positivo	nd	
2084	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	III	positivo	Negativo	nd	
2095	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2119	Não COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Moderado	Inativo	II	positivo	positivo	USA100	105
2125	Não COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2129	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2137	Não COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2166	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	I	positivo	positivo	nd	
2175	Não COVID-19	I	S	S	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2178	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Moderado	Inativo	II	positivo	positivo	USA800	
2179	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2182	COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2185	Não COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2189	Não COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	714
2191	COVID-19	S	S	I	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Inativo	I	positivo	positivo	USA1100	
2195	Não COVID-19	R	R	R	S	R	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2196	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2202	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2204	COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2205	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2207	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2209	COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2215	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	

2216	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2217	COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	5
2219	COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Inativo	II	positivo	positivo	USA800	
2220	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	III	positivo	Negativo	nd	
2226	Não COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2227	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2230	Não COVID-19	R	S	S	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2234	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2238	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2239	Não COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	NT	Moderado	Ativo	I	positivo	negativo	CC398	CC398
2244	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2245	COVID-19	S	R	R	R	I	R	R	III	Forte produtor	Inativo	I	positivo	positivo	CEB	239
2246	COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	NT	8
2247	COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2249	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	II	Forte produtor	Inativo	II	positivo	positivo	NT	105
2252	COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2253	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2254	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2255	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2256	Não COVID-19	R	S	R	R	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2269	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2274	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Moderado	Inativo	II	positivo	positivo	USA800	
2278	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2280	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2286	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Moderado	Inativo	II	positivo	positivo	USA100	105
2290	COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	NT	Forte produtor	Ativo	III	positivo	positivo	USA400	1
2293	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	NT	8
2294	COVID-19	R	S	S	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2295	COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Inativo	I	positivo	positivo	USA300	
2301	COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2303	COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	8
2304	Não COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2306	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	III	positivo	negativo	nd	
2317	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2319	COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	III	positivo	negativo	USA1100	30

2322	COVID-19	R	S	R	I	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2329	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Inativo	I	positivo	positivo	USA300	8
2334	Não COVID-19	S	halo D	R	R	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	5
2337	Não COVID-19	S	S	I	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2341	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	III	positivo	negativo	nd	
2343	COVID-19	S	halo D	R	R	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2345	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2346	Não COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2349	Não COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2352	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2456	Não COVID-19	R	R	R	S	S	R	S	V	Fraco produtor	Ativo	I	positivo	negativo	nd	
2457	Não COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2462	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2463	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	III	positivo	negativo	nd	
2464	Não COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Inativo	II	positivo	positivo	nd	
2468	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2472	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	NT	
2474	COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Forte produtor	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2476	COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	III	positivo	negativo	nd	
2480	Não COVID-19	S	R	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	II	positivo	positivo	USA800	
2483	Não COVID-19	S	S	S	S	S	S	S	NT	Moderado	Inativo	III	positivo	positivo	USA400	1
2485	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2488	COVID-19	S	halo D	R	S	S	R	S	V	Forte produtor	Ativo	I	positivo	negativo	CC398	CC398
2489	Não COVID-19	S	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Inativo	II	positivo	positivo	USA800	
2493	Não COVID-19	S	halo D	R	S	S	S	S	IV	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	
2497	Não COVID-19	R	S	R	S	S	S	S	IV	Moderado	Ativo	I	positivo	positivo	USA300	
2500	Não COVID-19	R	S	R	R	S	S	S	IV	Moderado	Inativo	I	positivo	positivo	USA300	
2511	COVID-19	R	R	R	S	S	S	S	II	Fraco produtor	Ativo	II	positivo	positivo	nd	

Gen: Gentamicina; Cli: Clindamicina; Eri: Eritromicina; Tet: tetraciclina; Cip: Ciprofloxacina; Sxt: Sulfametoxazol/trimetoprim; R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário; ST: Sequência tipo; CC: Complexo clonal; SCCmec: Cassete cromossômico estafilocócico mec. Todos os isolados neste estudo apresentaram resistência à penicilina e cefoxitina, e sensíveis à mupirocina e linezolida. NT: Não tipável; nd: Não determinado.

ANEXO 2

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

UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ/ UNESA/RJ



Continuação do Parecer: 4.398.497

antimicrobianos e o impacto destas ultimas na mortalidade associada a COVID-19, utilizando como indicadores as características dos agentes bacterianos envolvidos, a mortalidade associada a estas infecções, e o uso de antimicrobianos em pacientes adultos e pediátricos admitidos em UTIs de três instituições hospitalares de excelência com tratamento dedicado a COVID-19.

Descrever os marcadores críticos de resistência a antimicrobianos em agentes bacterianos de IRAS.

Estimar e comparar a intensidade de transmissão de agentes de IRAS entre pacientes admitidos nas UTI COVID-19 e Não-COVID-19 por inferências a partir da determinação da composição clonal das amostras das espécies bacterianas predominantes entre os agentes de episódios de colonização e infecção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A avaliação de riscos e benefícios está de acordo com as diretrizes da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos de apresentação obrigatória estão de acordo com as diretrizes da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e do CEP UNESA.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto e demais documentos de apresentação obrigatória não apresentam pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este colegiado aprova o projeto e solicita envio de relatórios semestrais da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1630663.pdf	16/10/2020 18:24:52		Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	16/10/2020 18:23:56	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito

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

UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ/ UNESA/RJ



Continuação do Parecer: 4.398.497

Folha de Rosto	folhaDeRostoKarisAssinado.pdf	16/10/2020 18:15:56	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoBACTCOVIDFinal.docx	24/09/2020 19:07:25	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	InfraEstacio.pdf	24/09/2020 19:06:28	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Declaração de concordância	CNHassinada.pdf	24/09/2020 07:56:16	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cartapesquisador.docx	18/09/2020 12:40:08	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	17/09/2020 16:57:27	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Outros	CCIHIPPMG.pdf	17/09/2020 16:57:09	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Outros	CCIHUUFF.pdf	17/09/2020 16:56:40	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Outros	Bacterio.pdf	17/09/2020 16:56:14	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	InfraestruturaMICROAssi.pdf	17/09/2020 16:54:44	Káris Maria de Pinho Rodrigues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 13 de Novembro de 2020

Assinado por:

Luciana de Paula Lima e Schmidt de Andrade
(Coordenador(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