

PERFIL DE VIRULÊNCIA E GEORREFERENCIAMENTO DE
Staphylococcus aureus E *Staphylococcus argenteus* ISOLADOS DE
PACIENTES ACAMADOS EM DOMICÍLIO OU VIVENDO EM
INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS

LUCAS PORANGABA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de microrganismos e imunidade*.

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU – SP
2023**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

PERFIL DE VIRULÊNCIA E GEORREFERENCIAMENTO DE
Staphylococcus aureus E *Staphylococcus argenteus* ISOLADOS DE
PACIENTES ACAMADOS EM DOMICÍLIO OU VIVENDO EM
INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS

LUCAS PORANGABA SILVA

Orientadora: MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de microrganismos e imunidade*.

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU – SP
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Silva, Lucas Porangaba.

Perfil de virulência e georreferenciamento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus argenteus* isolados de pacientes acamados em domicílio ou vivendo em instituições de longa permanência para idosos / Lucas Porangaba Silva. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Capes: 20100000

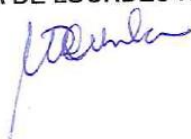
1. Idosos. 2. Pessoas Acamadas. 3. *Staphylococcus*.
4. *Staphylococcus aureus*. 5. Fatores de virulência.

Palavras-chave: Idosos; Pacientes acamados; *Staphylococcus argenteus*; *Staphylococcus aureus*; fatores de virulência.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LUCAS PORANGABA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU

Aos 29 dias do mês de agosto do ano de 2023, às 08:00 horas, no(a) Sala da Pós-Graduação da Central de Aulas, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de LUCAS PORANGABA SILVA, intitulada **Perfil de virulência e georreferenciamento de Staphylococcus aureus e Staphylococcus argenteus isolados de pacientes acamados em domicílio ou vivendo em instituições de longa permanência para idosos**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ADRIANA APARECIDA FELTRIN CORREA (Participação Presencial) do(a) Universidade Paulista - UNIP - Hospital de Base de Bauru - HBB, Dra. MÔNICA DA SILVEIRA (Participação Presencial) do(a) Bauru / Hospital Estadual de Bauru - HEB / Universidade de São Paulo - USP, Prof. Dr. ARY FERNANDES JÚNIOR (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. RICARDO DE SOUZA CAVALCANTE (Participação Presencial) do(a) Departamento de Infectologia, Dermatologia, Diagnóstico por Imagem e Radioterapia / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp. Após a exposição pelo doutorando e arquivado pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA



“O que fazemos para nós mesmos morre conosco. O que fazemos pelos outros e pelo mundo permanece e é imortal.”

Albert Pine.

Aos meus pais José Antônio Neto e Maria da Penha Porangaba,
pelo imenso amor, carinho e motivação que me foram dados.

À minha querida irmã Paloma Porangaba da Silva,
por todo apoio e disposição em ajudar.

Agradeço a Deus por sua imensa bondade e por tudo que faz na minha vida. Por permitir a realização desse trabalho, pois sei que nada acontece sem a sua vontade e, portanto, serei eternamente grato.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, por acreditar em mim, me incentivar e auxiliar. Por ser um exemplo em minha vida, me inspirando a melhorar e conquistar meus objetivos.

À minha mãe Maria da Penha Porangaba e irmã Paloma Porangaba da Silva por estarem sempre presentes, torcendo por mim e me amparando sempre que preciso. Pela disposição, pelo amor e pelo carinho.

Ao Renan Henrique Sales Lopes pela cumplicidade, pelo incentivo e pelo apoio. Por fazer a diferença em minha vida e por me ajudar a buscar meus sonhos.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia – IBB/UNESP, Nathalia Bibiana, Letícia Calixto Romero, Karen Vilegas de Camargo, Ana Cláudia Moro, Nayara de Oliveira Gonçalves da Silva, Guilherme de Lima Brenno, Julia Miotti Lara. Pela companhia, suporte, amizade e troca de conhecimentos.

A Thais Aline Monteiro Pereira e Patrícia Kelly Silvestre pela inestimável ajuda durante a coleta dos materiais biológicos e cuja dedicação foram fundamentais para o sucesso deste estudo.

Aos meus colegas discentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Aislan Quintiliano Delgado, Ariana Musa de Aquino, Jéssica Silvino Valente, Luan Felipe Toro. Por dividirem comigo essa caminhada na pós-graduação.

A todos professores e funcionários do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas - Setor de Microbiologia e Imunologia. Em especial, Aline Parisoto Missio, Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira, Ivana Castilho, Luiz Alquati e Silvia Helena Ferreira. Por toda competência, profissionalismo e disposição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo (Processo 88882.183592/2018-01).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro do Projeto (Processo N. 2017/21396-0).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 303603/2020-8)

Também a aqueles, não nomeados aqui, mas que de alguma forma me ajudaram na elaboração deste trabalho. Não se chega a lugar nenhum sozinho e sei que contei com muita ajuda de pessoas dispostas a me ver atingir esse objetivo. Obrigado a todos.

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.2 <i>Staphylococcus argenteus</i>	17
1.3 Pacientes acamados e as Instituição de Longa Permanência para Idosos (ILPI).....	19
1.4 Georreferenciamento da distribuição de clones.	20
2. Justificativa	22
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo geral.	23
3.2 Objetivos específicos.	23
4. Referências	24
5. Apresentação da tese	30
6. Artigo	31
7. Conclusões	73
8. Anexos	86

Resumo

Atualmente, microrganismos multidroga-resistentes já são responsáveis por quadros infecciosos adquiridos na comunidade. MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) representam grave risco à saúde pública em todo o mundo, devido à rápida propagação e diversificação de clones pandêmicos com virulência e resistência antimicrobiana cada vez maiores. A patogenicidade de *S. aureus* é uma ameaça para populações especiais como os indivíduos acamados e os idosos vivendo em casas de repouso e a presença de fatores de virulência favorece sua permanência no hospedeiro e pode aumentar a gravidade das infecções. Além disso, atualmente há uma dificuldade na diferenciação de espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos por metodologias clássicas, devido à alta similaridade fenotípica e genotípica de algumas espécies desse grupo. *Staphylococcus argenteus* é uma espécie de *Staphylococcus* coagulase-positivo recentemente reconhecida e que apresenta aproximadamente 10% de divergência de nucleotídeos da espécie *S. aureus*. A prevalência de *S. argenteus* em infecções estafilocócicas de início na comunidade tem aumentado nos últimos anos e estudos recentes sugerem que as infecções causadas por *S. argenteus* podem resultar em quadros graves comparáveis até mesmo às infecções causadas por *S. aureus*, com muitos dos genes que codificam fatores de virulência, ilhas de patogenicidade, bacteriófagos e até mesmo o gene de resistência *mecA*. Com isso, torna-se necessário a identificação e mapeamento da distribuição desses microrganismos patogênicos para avaliar o risco de exposição e controlar a disseminação na população. Assim sendo, esse estudo propôs determinar a prevalência de carreamento de *S. aureus* e *S. argenteus* entre indivíduos acamados em domicílio e idosos vivendo em casas de repouso no município de Botucatu (SP). Isolados provenientes de swabs nasal, oral e retal de 226 indivíduos que viviam em casas de repouso ou acamados em domicílio durante o período de 2017 e 2018, foram submetidos à determinação do perfil de suscetibilidade e detecção da heterorresistência à vancomicina, bem como a pesquisa dos fatores de virulência através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar os genes das enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec-1*), esfoliatinas A e B (*eta* e *etb*), toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*), leucocidina Pantón-Valentine (*lukS-PV* e *lukF-PV*), hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*), biofilme (operon *ica*), a proteína de adesão (*SasX*) e também o teste fenotípico de aderência em placa de poliestireno. Para a distinção correta entre

as duas espécies, foi feita a PCR do gene do peptídeo não-ribossômico sintetase (*nrps*). Foi feita tipagem molecular por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e MLST (*Multilocus Sequence Typing*). Observou-se uma prevalência de *S. aureus* de 33,6% e MRSA de 8%, sendo todos os isolados sensíveis ao sulfametoxazol/trimetoprim, à quinupristina/dalfopristina, à linezolida e à vancomicina. A prevalência dos genes da produção de biofilme foi de 74,2% para o gene *icaA*, 94,8% para os genes *icaD*, 38,1% para o gene *icaB* e 12,3% para o gene *icaC*. Apenas dois isolados (2,1%) carreavam o gene da enterotoxina A, um isolado (1%) o da enterotoxina B, nenhum da enterotoxina C. A prevalência do gene que codifica a toxina 1 da síndrome do choque tóxico foi de 7,2%, da hemolisina *hla* 93,8% e *hld* 90,7%. Apenas um isolado apresentou o gene *sasX* e nenhum isolado carregava os genes da esfoliatina A, esfoliatina B e da Leucocidina de Panton Valentine. Quanto ao teste de aderência em placa de poliestireno, 18 isolados (18,5%) apresentaram atividade de aderência, com 12 deles sendo MRSA. Não foi encontrado nenhum isolado de *S. argenteus* através da pesquisa do gene *nrps*. Foi possível detectar uma importante linhagem clonal entre os isolados MRSA (ST398). Essa linhagem está associada a infecções graves em animais e pode ser transmitida para os humanos. Devido a facilidade na aquisição de determinantes de virulência e resistência, além da grande capacidade adaptativa observada em *S. aureus*, faz-se necessário o constante monitoramento da evolução e epidemiologia desse patógeno. A análise de georreferenciamento dos resultados encontrados no estudo, indicou as regiões Nordeste e Leste da cidade, como as mais densas para *S. aureus* e com ocorrência de MRSA apenas nesses locais. Os achados sugerem uma alta disseminação de MSSA e MRSA com potencial patogênico na população estudada. Uma vez que esses indivíduos são mais suscetíveis às infecções, a colonização com cepas virulentas e resistentes pode contribuir para maior persistência e disseminação, bem como a possibilidade de evoluir para infecções mais graves e de maior dificuldade de tratamento.

Palavras-chave: Idosos, pacientes acamados, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus argenteus*, fatores de virulência, georreferenciamento.

Abstract

Currently, multidrug-resistant microorganisms are already responsible for infectious conditions acquired in the community. MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) represent a serious risk to public health worldwide, due to the rapid spread and diversification of pandemic clones with increasing virulence and antimicrobial resistance. The pathogenicity of *S. aureus* is a threat to special populations such as bedridden individuals and the elderly living in nursing homes, and the presence of virulence factors help its permanence in the host and may increase the severity of infections. In addition, there is currently a difficulty in differentiating coagulase-positive *Staphylococcus* species by classical methodologies, due to the high phenotypic and genotypic similarity of some species of this group. *Staphylococcus argenteus* is a newly recognized coagulase-positive *Staphylococcus* species that exhibits approximately 10% nucleotide divergence from the *S. aureus* species. The prevalence of *S. argenteus* in community-onset staphylococcal infections has increased in recent years, and recent studies suggest that infections caused by *S. argenteus* can result in serious conditions comparable even to infections caused by *S. aureus*, with many of the genes that encode virulence factors, pathogenicity islands, bacteriophages and even the *mecA* resistance gene. Therefore, it is necessary to identify and map the distribution of these pathogenic microorganisms to assess the risk of exposure and control dissemination in the population. Therefore, this study proposed to determine the prevalence of *S. aureus* and *S. argenteus* carriage among bedridden individuals and elderly people living in nursing homes in the city of Botucatu (SP). Isolates from nasal, oral and rectal swabs of 226 individuals who lived in nursing homes or bedridden at home during the period 2017 and 2018 were subjected to the determination of the susceptibility profile and detection of heteroresistance to vancomycin, as well as the research of virulence factors using Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect genes for enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec-1*), exfoliatins A and B (*eta* and *etb*), toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*), Pantone-Valentine leukocidin (*lukS-PV* and *lukF-PV*), alpha and delta hemolysins (*hla* and *hld*) and biofilm (operon *ica*) and adhesion protein (*SasX*) and also the phenotypic test of adhesion in polystyrene plate. For the correct distinction between the two species, PCR of the non-ribosomal peptide synthetase (*nrps*) gene was performed. Molecular typing was performed by PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) and

MLST (Multilocus Sequence Typing). There was a prevalence of *S. aureus* of 33.6% and MRSA of 8%, all isolates being sensitive to sulfamethoxazole/trimethoprim, quinupristin/dalfopristin, linezolid and vancomycin. The prevalence of biofilm production genes was 74.2% for the *icaA* gene, 94.8% for the *icaD* gene, 38.1% for the *icaB* gene, and 12.3% for the *icaC* gene. Only two isolates (2.1%) carried the gene for enterotoxin A, one isolate (1%) for enterotoxin B, none for enterotoxin C. The prevalence of toxin 1 in toxic shock syndrome was 7.2% of hemolysin *hla* 93.8% and *hld* and 90.7%. Only one isolate had the *sasX* gene and none of the isolates carried the exfoliatin A, exfoliatin B and Panton Valentine Leucocidin genes. As for the plaque adhesion test, 18 isolates (18.5%) showed adhesion activity, with 12 of them being MRSA. No isolates of *S. argenteus* were found by searching for the *nrps* gene. It was possible to detect an important clonal lineage among the MRSA isolates (ST398). This strain is associated with serious infections in animals and can be transmitted to humans. The ease in acquiring virulence and resistance determinants, in addition to the great adaptive capacity observed in *S. aureus*, makes it necessary to constantly monitor the evolution and epidemiology of this pathogen. The georeferencing analysis of the results found in the study indicated the Northeast and East regions of the city as the most dense for *S. aureus* and with the occurrence of MRSA only in these locations. The findings suggest a high spread of MSSA and MRSA with pathogenic potential in the studied population. Since these individuals are more susceptible to infections, colonization with virulent and resistant strains can contribute to greater persistence and dissemination, as well as the possibility of progressing to more severe infections that are more difficult to treat.

Keywords: Elderly, bedridden patients, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus argenteus*, virulence factors, georeferencing.

1. Introdução

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva que pode causar uma ampla gama de doenças, desde infecções de pele até endocardite¹. A sua presença em diversos locais do hospedeiro e a alta incidência, tanto em indivíduos hospitalizados e saudáveis, o tornam um microrganismo de grande preocupação para a saúde pública, gerando carga de doenças tanto no ambiente hospitalar como no comunitário².

Sua prevalência global está estimada entre 20 e 40% e a colonização prévia é um fator de risco para a posterior infecção por esse microrganismo³, pois *S. aureus* é capaz de romper as defesas inata do hospedeiro e ganhar acesso a tecidos mais profundos, causando uma variedade de infecções superficiais e invasivas⁴.

Pode ser isolado de várias superfícies do corpo humano, como a faringe, axilas e períneo, mas seu principal nicho ecológico e reservatório é conhecido por ser o nariz humano⁵. Sua transmissão ocorre por contato direto, contato pele-a-pele com indivíduos colonizados ou infectados, mas o contato com objetos contaminados e superfícies também podem desempenhar um papel na transmissão⁶.

A colonização do *S. aureus* é mediada pela aderência a componentes superficiais como fibrinogênio, fibronectina e citoqueratinas do epitélio nasal ou queratinócitos cutâneos. A superfície da bactéria reconhece moléculas de matriz adesiva para ligação, como proteínas de ligação a fibronectina (FnbpA e FnbpB), proteínas de ligação a fibrinogênio (ClfA e ClfB), determinante da superfície regulada pelo ferro (IsdA) e ácido teicóico da parede (WTA)⁷.

Possui diversos mecanismos para evadir e matar as células imunes do hospedeiro e inibir o recrutamento de neutrófilos e a atividade antimicrobiana. Produz toxinas que contribuem para sua virulência, tais como α -hemolisina, leucocidina de Panton-Valentine (PVL), γ -hemolisina, leucocidina E / D e modulinas fenol solúveis (PSM) que lisam as células hospedeiras⁷.

Os fatores de virulência de *S. aureus* são modulados por um circuito complexo e altamente interativo, proporcionando flexibilidade para as mudanças nas condições do hospedeiro influenciando na resposta imune em curso. Isso gera uma gama diversificada de infecções, que de forma geral, se caracterizam por infecções

agudas cujas características clínicas são definidas pela produção de toxinas e infecção crônica com as características clínicas associadas à formação de um biofilme⁸.

Os sintomas e características clínicas estão associados a ampla variedade de fatores de virulência produzidos por este microrganismo incluindo toxinas, exoenzimas e adesinas, que podem ser secretadas ou ligadas à membrana celular. Cepas de *S. aureus* produtoras de leucocidina Panton-Valentine (PVL), uma citotoxina bicomponente codificada pelo profago, mostram uma propensão à infecção da pele e tecidos moles e pneumonia necrotizante. As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) causam intoxicação alimentar com emese, enquanto a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) está associada à doença multissistêmica grave. Além disso, SEs e TSST-1 são superantígenos com capacidade de ativar muitos repertórios de células T via ligação a MHC de classe II e as cadeias V β do receptor de células T, levando à produção exacerbada de citocinas. Várias SEs e superantígenos SE-like, incluindo os clássicos (SEA-SEE) e toxinas recentemente descritas podem ser produzidas por esses microrganismos⁹.

A capacidade de persistência em diferentes sítios do hospedeiro e em dispositivos abióticos dificulta sua erradicação levando a infecções recorrentes¹⁰. A formação de biofilmes em implantes médicos e tecidos hospedeiros torna este patógeno uma das principais causas de infecções relacionadas ao dispositivo e resulta em infecções perigosas, crônicas e recorrentes¹⁰. Superfícies ambientais podem servir como potenciais reservatórios de patógenos e o *S. aureus* consegue permanecer viável por pelo menos uma semana¹¹. No entanto com a formação de biofilme esse tempo pode ser maior, uma vez que o biofilme contribui significativamente para a sobrevivência bacteriana conferindo alta resistência à dessecação, desinfecção por cloreto de benzalcônio e radiação UV¹².

A base genética e molecular da formação de biofilme em estafilococos é multifacetada. A capacidade de formar um biofilme proporciona aderência de células a uma superfície e acumulação para formação de aglomerados de células de múltiplas camadas, que ocorre através da produção da adesina intercelular polissacarídica (PIA) composto por N - acetilglucosaminas β - 1,6 com resíduos parcialmente desacetilados, no qual as células são incorporadas e protegidas contra a defesa imunológica do hospedeiro e ao tratamento antibiótico¹³. O biofilme é composto por

uma mistura complexa e altamente polar de biomoléculas, incluindo proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios¹⁴.

Os genes que medeiam a aderência intercelular e a produção da PIA são organizados em um operon (*icaADBC*) e foram caracterizados funcionalmente. IcaA confere a atividade propostada de N-acetilglucosaminiltransferase. No entanto, apenas IcaA mostra apenas baixa atividade de transferase. A coexpressão do gene *icaA* que codifica a enzima catalítica juntamente com *icaD* leva a uma atividade significativamente aumentada e à produção de oligômeros de N-acetilglucosamina com um comprimento máximo de 20 resíduos. IcaC catalisa a síntese do oligômero de cadeia longa, completo que reage com anti-soro anti-PIA / PNAG. IcaB é a enzima localizada na superfície celular que catalisa a desacetilação parcial dos resíduos de N-acetilglucosamina¹⁵.

S. aureus sempre esteve entre as primeiras espécies bacterianas relatadas a desenvolver resistência a novos antimicrobianos, por apresentar uma íntima associação com hospitais e pacientes¹⁶. Desde que a terapia antimicrobiana foi introduzida, certos clones de *S. aureus* mostraram ter a capacidade de ganhar resistência contra quase todas as classes de agentes antimicrobianos aos quais foram expostos. Especialmente antibióticos β -lactâmicos estáveis à β -lactamase¹⁷.

A resistência à meticilina, conferida por um cassete estafilocócico transmissível cromossomo *mec* (*SCCmec*), surgiu pela primeira vez em 1961 dando origem aos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Nos primeiros 30 anos tornou-se endêmica associada ao hospital (HA-MRSA) afetando pacientes com comorbidades subjacentes ou com exposição ao ambiente de cuidados de saúde. As primeiras infecções por MRSA relatadas na comunidade (CA-MRSA) datam da década de 1980 em surtos de infecções invasivas em usuários de drogas intravenosas em Detroit e em paralelo nas populações indígenas de áreas remotas na Austrália Ocidental. No final da década de 1990, as infecções por MRSA adquiridas da comunidade foram reconhecidas como uma entidade clínica distinta devido ao seu surgimento entre indivíduos jovens saudáveis sem os fatores de risco tradicionais de saúde, bem como seu histórico genético distinto e padrões de susceptibilidade antimicrobiana relativamente preservados. No entanto, a epidemiologia e a definição de MRSA associados à comunidade e ao hospital estão evoluindo à medida que as linhagens de CA-MRSA estão invadindo cada vez mais o sistema de saúde,

contribuindo para infecções nosocomiais e acumulando maior resistência aos medicamentos¹⁸.

1.2 Staphylococcus argenteus

Staphylococcus argenteus é uma espécie de *Staphylococcus* coagulase e catalase positivo recentemente identificada, que foi previamente identificada como *Staphylococcus aureus*, devido à sua alta similaridade fenotípica. A principal diferença fenotípica está na pigmentação, onde *S. argenteus* possui colônias não pigmentadas devido à falta do pigmento carotenóide, estafiloxantina, que protege contra o estresse oxidativo¹⁹.

As colônias são grandes, com dois mm de diâmetro, redondas, convexas, lisas, brancas e cremosa e demonstram β -hemólise no ágar sangue. A diferença na pigmentação entre *S. aureus* e *S. argenteus* é particularmente evidente após o crescimento em ágar chocolate por 48 horas a 37°C. As células são positivas para Gram, cocóides, 1 μ m de diâmetro e formam aglomerados. Anaeróbiofacultativo e bioquimicamente positivo para fosfatase alcalina, arginina di-hidrolase, l-pirrolidonil arilamidase, galactose, maltose, manitol, manose, metil-p-glucopiranosido, sacarose e trealose; e negativo para urease, α -glucosidase, fosfatidilinositol fosfolipase C, β -galactosidase, alanina- fenilalanina-prolina arilamidase, ácido l-aspártico arilamidase, α -manosidase, β -glucuronidase, l-leucina arilamidase, prolina arilamidase, α -galactosidase, alanina arilamidase, tirosina arilamidase, amigdalina, xilose, α -ciclodextrina, sorbitol, ribose, lactose, N-acetilglucosamina, pululano, rafinose e salicina²⁰.

S. argenteus é considerada como parte do complexo *S. aureus* (incluindo também o *Staphylococcus schweitzeri*). Foi relatado como um complexo especial de clones de *S. aureus* (CC)(agrupado como CC75), que é altamente divergente nos loci da tipagem de locus de sequência múltipla (MLST) em comparação com *S. aureus* e, portanto, difícil de classificar. O CC75 é composto por quatro tipos de sequência (ST1223, ST2854, ST2198 e ST2250) que sendo o ST2250 o mais frequente. Até agora, *S. argenteus* tem sido relatado em todo o mundo, mas os estudos ainda são muito poucos para refletir sua distribuição clara ou características clínicas²⁰. Até pouco tempo não podia ser distinguido de *S. aureus* usando métodos de diagnóstico microbiológico de rotina, e a amplificação por PCR do gene *nucA*, que é usado como um marcador padrão confirmatório para *S. aureus*, também é

positivo em *S. argenteus*^{21, 22}. Apenas recentemente sua identificação se tornou possível no diagnóstico microbiológico de rotina em laboratórios que utilizam a Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção à Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) na identificação baseada em banco de dados atualizado para esta espécie²³.

Várias linhas de evidência, incluindo a distância genética de *S. aureus*, apoiaram sua reclassificação como uma espécie distinta. *S. argenteus* foi relatado pela primeira vez no norte da Austrália, e descrições precoces foram conectadas a comunidades remotas, mas um número crescente de relatos confirmou que esta espécie é distribuída globalmente, com a maioria dos relatos originários de áreas tropicais²⁴.

Os dados sobre as características clínicas da infecção por *S. argenteus* são limitados, mas estudos indicaram que *S. argenteus* está associado a infecções de pele e tecidos moles, infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), sepse estafilocócica invasiva e até a morte. *S. aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade (CA-MRSA), que foram subsequentemente caracterizados como *S. argenteus*, foram predominantes em comunidades aborígenes remotas da Austrália. Portanto, não há dúvida de que *S. argenteus* é uma ameaça à saúde humana²¹.

Descobrir a existência dessa nova espécie patogênica resulta na necessidade de determinar se *S. argenteus* e *S. aureus* devem ser distinguidos na prática rotineira. Isso pode ser necessário se a infecção por *S. argenteus* estiver associada a diferentes manifestações clínicas, gravidade ou desfecho, e / ou exigir diferentes regimes antimicrobianos. Dados sobre as características clínicas da infecção humana por *S. argenteus* são limitados. Ele tem sido relatado como mais suscetível ao estresse oxidativo e à morte de neutrófilos *in vitro*, e menos virulento em modelos de infecção de sepse e pele murina em comparação com *S. aureus*. Isso levanta a possibilidade de que a infecção humana por *S. argenteus* possa estar associada a um curso mais moderado. A presença de genes de virulência em *S. argenteus* não foi submetida à investigação detalhada. Vários estudos relataram que *S. argenteus* é negativo para genes que codificam a leucocidina Pantón-Valentine (PVL), embora um relato de caso recente de dois pacientes com infecção por *S. argenteus* positiva para PVL indicam que essa espécie pode adquirir fatores de virulência. Um estudo também detectou o gene que codifica a enterotoxina estafilocócica B em todos os isolados de *S. argenteus* cultivados em aldeões da floresta amazônica²⁵.

1.3 Pacientes acamados e as Instituições de Longa Permanência para Idosos (ILPI)

O domicílio é um espaço onde pessoas, idosas ou não, portadoras de doenças crônicas e outras afecções podem viver com boa qualidade de vida e manter estabilidade da doença. Esta é uma realidade que tem se tornado cada vez mais frequente²⁶. Os idosos incapacitados, dependentes ou com autonomia reduzida na realização de suas atividades diárias, tem a família como alternativa de suporte sendo ela a sua principal fonte de cuidados²⁷.

Pacientes acamados são fator de risco para MRSA. A manipulação do dependente acamado, pelo cuidador ou responsável, em vários procedimentos como lavagem e outras atividades relacionadas à higiene pessoal, mudança de roupa e vestuário, alimentação, manutenção do processo de mudança de posições ou movimento contribuem para o transporte da bactéria. Além disso eles também estão expostos a feridas, como úlceras de pressão e outras alterações da pele devido à falta de mobilidade (deitado), condição da pele (fina, seca, inflexível, exigindo cuidados intensivos) e presença permanente de curativos e / ou fralda²⁸.

Estudos revelam que o estado acamado está associado ao desenvolvimento de úlceras de pele em decúbito e infecções da corrente sanguínea²⁹ e é fator de risco para infecções por MRSA²⁹, com carreamento de *SCC_{mec} II/III*³¹.

Outra condição que oferece risco aos indivíduos é a residência em instituição de longa permanência, que normalmente fornece cuidados de longo prazo para doentes crônicos e/ou idosos, sendo fator de risco bem estabelecido para transporte e infecção por MRSA estando associado a aumento da mortalidade³².

Os lares de idosos representam um reservatório único e importante de MRSA, pois os pacientes colonizados por MRSA tendem a introduzir o microrganismo do ambiente hospitalar para a casa de repouso e transportar o MRSA de volta aos hospitais e à comunidade³².

A troca de pacientes não ocorre somente entre hospitais, mas também em outros institutos de saúde, como os asilos ou Instituições de Longa Permanência para Idosos (ILPs). Embora os hospitais ofereçam o atendimento mais intenso e especializado e tratem a maioria dos pacientes, os lares de idosos superam em termos de locais diferentes e número estimado de leitos. Enquanto nos hospitais, existem medidas rigorosas de controle para MRSA e outros microrganismos resistentes a antimicrobianos, em casas de repouso, diretrizes são menos rigorosas e a adesão, por exemplo, às recomendações de higiene das mãos é geralmente baixa.

A baixa adesão higiênica em combinação com a população vulnerável do lar de idosos e medidas de controle e triagem infrequentes criam um ambiente favorável para a transmissão de cepas de patógenos resistentes a antimicrobianos³³.

Assim as ILPIs são importantes reservatórios de organismos resistentes a múltiplos medicamentos especialmente MRSA, que tende a ser mais prevalente em muitos locais de cuidado de longo prazo³⁴. Uma série de fatores podem influenciar a dinâmica do MRSA em casas de repouso. Estudos prévios demonstraram que dispositivos médicos invasivos, uso recente de antibióticos, feridas crônicas, comorbidade e fragilidade são fatores de risco para colonização por MRSA³⁵. Sabe-se que os portadores (sintomáticos e assintomáticos) transmitem MRSA por contato com outros e se disseminam extensamente pelo ambiente, o que também pode levar à transmissão de MRSA aos demais residentes³⁶.

1.4 Georreferenciamento da distribuição de clones

O mapeamento da distribuição geográfica de doenças infecciosas possui diversos benefícios. Seu objetivo primário na epidemiologia espacial é avaliar a distribuição e intensidade da doença que permite uma visualização imediata da extensão e magnitude do problema para a saúde pública. Podem servir de apoio para avaliações ponderadas para a tomada de decisões sobre as vantagens e desvantagens de intervenções em locais específicos. Além disso, podem documentar uma base que permite monitorar o sucesso ou falha das intervenções realizadas³⁷.

Entender a dinâmica de transmissão da comunidade que contribui para a aquisição de *S. aureus* e *S. argenteus* é essencial. Pois pode existir uma relação espacial subjacente nas populações onde as prevalências desses microrganismos são elevadas. A utilização de ferramentas como sistemas de informações geográficas permite a compreensão de tendências das doenças nas populações que normalmente não podem ser visíveis usando outros métodos³⁸.

Essa caracterização espacial permite identificar áreas específicas que apresentam maior risco de resistência a antibióticos e, assim, identificar as comunidades com maior probabilidade de se beneficiar de intervenções direcionadas. É possível verificar a dispersão de clones importantes que podem estar em circulação³⁹.

Diversas ferramentas para a tipagem se tornaram disponíveis, os quais variam desde métodos baseados em impressões digitais como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), até métodos baseados em PCR, métodos baseados em sequência como tipificação de sequenciamento multilocus (MLST) e, mais recentemente, ao sequenciamento genômico completo (WGS). A baixa taxa de mutação dos fragmentos de sequência de genes housekeeping torna o MLST mais adequado para estudos epidemiológicos globais e de longo prazo⁴⁰.

Assim, aliando as técnicas de análise da correlação espacial através do georreferenciamento, com a identificação de linhagens clonais por MLST, será possível estabelecer uma precisa distribuição de clones importantes na população estudada.

2. Justificativa

A população do estudo apresenta grande risco de colonização e infecção por *S. aureus* e MRSA. O conhecimento sobre a patogenicidade desse microrganismo se torna imprescindível pois este pode apresentar diversos fatores de virulência que podem comprometer a saúde dos indivíduos portadores gerando um aumento na morbidade e mortalidade. Além disso, existe uma carência de estudos relacionados a *S. argenteus* que não permite estabelecer se há diferença nas manifestações clínicas, gravidade, desfecho e aos regimes antimicrobianos que devem ser adotados quando comparados ao *S. aureus*. O georreferenciamento da distribuição dos patógenos permite um mapeamento preciso para melhor avaliar as zonas de risco onde os picos de distribuição elevados poderão ser alvos prioritários de intervenção.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Estudo transversal com amostras obtidas no período de 2017 a 2018 que busca avaliar a diversidade genética e os fatores de virulência de *S. aureus* e *S. argenteus* entre indivíduos acamados em domicílio e em indivíduos institucionalizados em ILPIs no município de Botucatu (SP), bem como o mapeamento da distribuição desses microrganismos patogênicos no município estudado.

3.2. Objetivos específicos

- Pesquisar a presença de *S. argenteus* entre os isolados;
- Detectar os fatores de virulência relacionados à colonização e patogenicidade de *S. aureus* e *S. argenteus* em indivíduos acamados ou residindo em instituições de longa permanência;
- Determinar a relação clonal e caracterizar as linhagens isoladas;
- Verificar a distribuição geográfica através do georreferenciamento.

4. Referências

01 – Guerra FE, Borgogna TR, Patel DM, Sward EW, Voyich JM. Epic Immune Battles of History: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:286. Published 2017 Jun 30. doi:10.3389/fcimb.2017.00286

02 – Alonzo F, Torres VJ. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(2):199-230.

03 – Braga ED, Aguiar-Alves F, de Freitas Mde F, et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14:538. Published 2014 Oct 6. doi:10.1186/1471-2334-14-538

04 – Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603-61.

05 – Krismer B, Liebeke M, Janek D, et al. Nutrient limitation governs *Staphylococcus aureus* metabolism and niche adaptation in the human nose. *PLoS Pathog*. 2014;10(1):e1003862.

06 – Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(9):629-41.

07 – Reddy PN, Srirama K, Dirisala VR. An Update on Clinical Burden, Diagnostic Tools, and Therapeutic Options of *Staphylococcus aureus*. *Infect Dis (Auckl)*. 2017;10:1179916117703999. Published 2017 May 22. doi:10.1177/1179916117703999

08 – Rom JS, Atwood DN, Beenken KE, et al. Impact of *Staphylococcus aureus* regulatory mutations that modulate biofilm formation in the USA300 strain LAC on virulence in a murine bacteremia model. *Virulence*. 2017;8(8):1776-1790.

- 09 – Aung MS, San T, Aye MM, et al. Prevalence and Genetic Characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* Isolates Harboring Panton-Valentine Leukocidin, Enterotoxins, and TSST-1 Genes from Food Handlers in Myanmar. *Toxins* (Basel). 2017;9(8):241. Published 2017 Aug 4. doi:10.3390/toxins908024.
- 10 – Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis*. 2017;75(1):ftx005.
- 11 – Katzenberger RH, Rösel A, Vonberg RP. Bacterial survival on inanimate surfaces: a field study. *BMC Res Notes*. 2021 Mar 15;14(1):97. doi: 10.1186/s13104-021-05492-0. PMID: 33722269; PMCID: PMC7962391.
- 12 – Nunez C, Kostoulas X, Peleg A, Short F, Qu Y. A comprehensive comparison of biofilm formation and capsule production for bacterial survival on hospital surfaces. *Biofilm*. 2023 Jan 22;5:100105. doi: 10.1016/j.biofilm.2023.100105. PMID: 36711324; PMCID: PMC9880390.
- 13 – Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1367-78
- 14 – Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2017;9(1):522-554.
- 15 – Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):870-926.
- 16 – Thurlow LR, Joshi GS, Richardson AR. Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(1):5-22.

17 – Crombé F, Argudín MA, Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P. Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs. *Front Microbiol.* 2013;4:57. Published 2013 Mar 20. doi:10.3389/fmicb.2013.00057

18 – Sowash MG, Uhlemann AC. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* case studies. *Methods Mol Biol.* 2014;1085:25-69.

19 – Hansen TA, Bartels MD, Høgh SV, et al. Whole Genome Sequencing of Danish *Staphylococcus argenteus* Reveals a Genetically Diverse Collection with Clear Separation from *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2017;8:1512. Published 2017 Aug 9. doi:10.3389/fmicb.2017.01512

20 – Tong SY, Schaumburg F, Ellington MJ, et al. Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(Pt 1):15-22.

21 – Zhang DF, Zhi XY, Zhang J, et al. Preliminary comparative genomics revealed pathogenic potential and international spread of *Staphylococcus argenteus*. *BMC Genomics.* 2017;18(1):808. Published 2017 Oct 23. doi:10.1186/s12864-017-4149-9

22 – Chantratita N, Wikraiphat C, Tandhavanant S, et al. Comparison of community-onset *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus aureus* sepsis in Thailand: a prospective multicentre observational study. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(5):458.e11-9.

23 – Alhussein F, Fürstenberg J, Gaupp R, Eisenbeis J, Last K, Becker SL, Papan C. Human infections caused by *Staphylococcus argenteus* in Germany: genetic characterisation and clinical implications of novel species designation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Dec;39(12):2461-2465. doi: 10.1007/s10096-020-03950-4. Epub 2020 Jun 23. PMID: 32572654; PMCID: PMC7669802.

24 – Moradigaravand D, Jamrozy D, Mostowy R, et al. Evolution of the *Staphylococcus argenteus*ST2250 Clone in Northeastern Thailand Is Linked with the Acquisition of Livestock-Associated Staphylococcal Genes. MBio. 2017;8(4):e00802-17. Published 2017 Jul 5. doi:10.1128/mBio.00802-17

25 – Chantratita N, Wikraiphath C, Tandhavanant S, et al. Comparison of community-onset *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus aureus* sepsis in Thailand: a prospective multicentre observational study. Clin Microbiol Infect. 2016;22(5):458.e11-9.

26 – Cattani RB, Girardon-Perlini NMO. Cuidar do idoso doente no domicílio na voz decuidadores familiares. Revista Eletrônica de Enfermagem, v. 06, n. 02, p. 254-271, 2004. Disponível em www.fen.ufg.br

27 – Dias DSG, Carvalho CS, Araújo CV. Comparação da percepção subjetiva de qualidade de vida e bem-estar de idosos que vivem sozinhos, com a família e institucionalizados. Rev. bras. geriatr. gerontol. 2013 Mar;16(1):127-138.

28 – Romaniszyn D, Pobiega M, Wójkowska-Mach J, et al. The general status of patients and limited physical activity as risk factors of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* occurrence in long-term care facilities residents in Krakow, Poland. BMC Infect Dis. 2014;14:271. Published 2014 May 18. doi:10.1186/1471-2334-14-271

29 – Rebelo M, Pereira B, Lima J, Decq-Mota J, Vieira JD, Costa JN. Predictors of in-hospital mortality in elderly patients with bacteraemia admitted to an Internal Medicine ward. Int Arch Med. 2011;4(1):33. Published 2011 Oct 4. doi:10.1186/1755-7682-4-33

30 – Qi F, Zhang GX, She DY, et al. Healthcare-associated Pneumonia: Clinical Features and Retrospective Analysis Over 10 Years. Chin Med J (Engl). 2015;128(20):2707-13.

- 31 – Wang JL, Wang JT, Chen SY, Chen YC, Chang SC. Distribution of Staphylococcal cassettechromosome mec Types and correlation with comorbidity and infection type in patients with MRSA bacteremia. PLoS One. 2010;5(3):e9489. Published 2010 Mar 5.doi:10.1371/journal.pone.0009489
- 32 – Hudson LO, Reynolds C, Spratt BG, et al. Diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from residents of 26 nursing homes in Orange County, California. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3788-95.
- 33 – van den Dool C, Haenen A, Leenstra T, Wallinga J. The Role of Nursing Homes in the Spread of Antimicrobial Resistance Over the Healthcare Network. Infect Control Hosp Epidemiol. 2016;37(7):761-7.
- 34 – Lee BY, Bartsch SM, Wong KF, et al. The importance of nursing homes in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among hospitals. Med Care. 2013;51(3):205-15.
- 35 – Batina NG, Crnich CJ, Anderson DF, Döpfer D. Models to predict prevalence and transition dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community nursing homes. Am J Infect Control. 2016;44(5):507-14.
- 36 – Lee BY, Singh A, Bartsch SM, et al. The potential regional impact of contact precaution use in nursing homes to control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2012;34(2):151-60.
- 37 – Hay SI, Battle KE, Pigott DM, et al. Global mapping of infectious disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2013;368(1614):20120250. Published . doi:10.1098/rstb.2012.0250
- 38 – Parrish KL, Hogan PG, Clemons AA, Fritz SA. Spatial relationships among public places frequented by families plagued by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. BMC Res Notes. 2018;11(1):692. Published 2018 Oct 1. doi:10.1186/s13104-018-3797-4).

39 – Immergluck LC, Leong T, Matthews K, et al. Geographic surveillance of community associated MRSA infections in children using electronic health record data. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):170. Published 2019 Feb 18. doi:10.1186/s12879-019-3682-3

40 – Park KH, Greenwood-Quaintance KE, Uhl JR, et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single large Minnesota medical center in 2015 as assessed using MLST, core genome MLST and spa typing. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179003. Published 2017 Jun 2. doi:10.1371/journal.pone.0179003

5. Apresentação da tese

Os resultados e a discussão dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de artigo científico.

5.1 Artigo científico: AVALIAÇÃO DO PERFIL PATOGÊNICO DE LINHAGENS COMUNITÁRIAS DE *Staphylococcus aureus* E MRSA EM INDIVÍDUOS ACAMADOS OU INSTITUCIONALIZADOS

Artigo escrito segundo as normas do Periódico: Future Microbiology (Fator de impacto: 3,190).

6. Artigo

AVALIAÇÃO DO PERFIL PATOGENICO DE LINHAGENS COMUNITÁRIAS DE *Staphylococcus aureus* E MRSA EM INDIVÍDUOS ACAMADOS OU INSTITUCIONALIZADOS

Lucas Porangaba Silva*¹, Cassiano Victória², Nathalia Bibiana Teixeira¹, Letícia Calixto Romero¹, Karen Vilegas de Camargo¹, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha¹.

¹ Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – Setor Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) - Laboratório de Bacteriologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

² Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

***Autor correspondente:**

Lucas Porangaba Silva

Fone: +55 14 98811-9636

E-mail: lucas-porangaba@hotmail.com

Resumo

Objetivo: Avaliar a diversidade genética e os fatores de virulência de *S. aureus* e MRSA entre indivíduos acamados em domicílio e idosos vivendo em casas de repouso no município de Botucatu (SP) e pesquisar a presença de *S. argenteus* entre os isolados. **Resultados:** A prevalência de *S. aureus* e MRSA foi de 33,6% e 8%, respectivamente. O perfil de virulência encontrado foi de 74,2% para o gene *icaA*, 94,8% para os genes *icaD*, 38,1% para o gene *icaB* e 12,3% para o gene *icaC*. Dois isolados (2,1%) carreavam o gene da enterotoxina A e um isolado (1%) o da enterotoxina B. A prevalência do gene que codifica a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) foi de 7,2%, da hemolisina alfa (*hla*) de 93,8% e o gene *hld* de 90,7%. Apenas um isolado apresentou o gene *sasX*. Quanto ao teste de adesão em placa de poliestireno, 18 isolados de *S. aureus* (18,5%) apresentaram atividade de aderência, sendo que 12 desses eram MRSA. Não foi encontrado nenhum isolado de *S. argenteus* através da pesquisa do gene *nrps*. A caracterização molecular dos MRSA mostrou maior frequência de CC5-ST105-II (n=4), CC5-ST105-IV (n=1) e CC5-ST5-IV (n=2) e foi detectado a linhagem clonal ST398 entre os isolados MRSA. As regiões Nordeste e Leste do município foram as que apresentaram maior densidade de *S. aureus* e as únicas positivas para MRSA. **Conclusão:** o surgimento de novas linhagens de *S. aureus* na comunidade evidencia a evolução epidemiológica desse patógeno. Isso traz preocupação para a população estudada que costuma ser suscetível às infecções. Monitorar a disseminação de *S. aureus* e MRSA se faz necessário para que cepas patogênicas não causem infecções mais graves e de difícil tratamento.

Palavras-chave: Idosos, pacientes acamados, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Staphylococcus argenteus*, fatores de virulência, ST398.

Abstract

Objective: To evaluate the genetic diversity and virulence factors of *S. aureus* and MRSA among individuals bedridden at home and elderly people living in nursing homes in the city of Botucatu (SP) and to investigate the presence of *S. argenteus* among the isolates. **Results:** The prevalence of *S. aureus* and MRSA was 33.6% and 8%, respectively. The virulence profile found was 74.2% for the *icaA* gene, 94.8% for the *icaD* genes, 38.1% for the *icaB* gene and 12.3% for the *icaC* gene. Two isolates (2.1%) carried the gene for enterotoxin A, one isolate (1%) for enterotoxin B. The prevalence of the gene that encodes the toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*) was 7.2%, alpha hemolysin (*hla* gene) was 93.8% and *hld* gene was 90.7%. Only one isolate showed the *sasX* gene. As for the plaque adhesion test, 18 isolates of *S. aureus* (18.5%) showed adhesion activity, with 12 of them being MRSA. No isolates of *S. argenteus* were found by searching for the *nrps* gene. The molecular characterization of MRSA showed a higher frequency of CC5-ST105-II (n=4), CC5-ST105-IV (n=1) and CC5-ST5-IV (n=2) and the clonal lineage ST398 was detected among the MRSA isolates. The Northeast and East regions of the city were the ones with the highest density of *S. aureus* and the only positive ones for MRSA. **Conclusion:** the emergence of new strains of *S. aureus* in the community demonstrates the epidemiological evolution of this pathogen. This brings concern to the population studied, who is often susceptible to infections. Monitoring the spread of *S. aureus* and MRSA is necessary so that pathogenic strains do not cause more serious and difficult-to-treat infections.

Keywords: Elderly, bedridden patients, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Staphylococcus argenteus*, virulence factors, ST398.

Introdução

Staphylococcus aureus é uma agente comensal com potencial para causar uma ampla gamade doenças tanto em hospitais quanto na comunidade e pode ser encontrado na pele, dentro da cavidade oral, trato respiratório superior, trato urogenital inferior e trato gastrointestinal de humanos. A colonização permanente por esse patógeno na população é de 25 a 30% e a colonização transitória é de 60%¹.

É capaz de causar uma variedade de infecções com gravidade leves e fatais. A presença defatores de virulência pode levar à dermatite atópica (DA), psoríase, fibrose cística pulmonar, asma alérgica, pneumonia, intoxicação alimentar, doença granulomatosa crônica, osteomielite, infecções do pé diabético e muitas outras doenças².

Diferentes de outras bactérias que podem apresentar apenas uma ou poucas toxinas para promover a doença, *S. aureus* possui uma variedade impressionante de fatores de virulência, que incluem diversas toxinas, fatores de evasão imune e fatores proteicos e não proteicos que promovem a colonização e infecção do hospedeiro³.

As infecções começam com a produção de proteínas de superfície que garantem a adesão da bactéria aos tecidos do hospedeiro e a secreção de toxinas extracelulares e enzimas que atuam destruindo células, prevenindo ou inativando o sistema imune e o crescimento e expansão de outras bactérias. Enterotoxinas, toxina 1 da síndrome do choque toxico (TSST-1), toxinas esfoliativas (ETs), hemolisinas, leucocidina Panton-Valentine (PVL) são enzimas que aumentam sua patogenicidade e auxiliam sua disseminação no hospedeiro⁴.

Possui um genoma central conservado e com evolução impulsionada por meio de mutação e transferência horizontal de genes. A variação se dá por elementos genéticos móveis como bacteriófagos integrados (profagos) onde a transdução acaba sendo um modo frequente de transferência de DNA entre as cepas. Como fator de virulência encontrada em profagos podemos citar a PVL, toxina esfoliativa A, o fator de virulência ancorado na parede celular SasX, entre outros. As ilhas de patogenicidade estafilocócica também são elementos genéticos móveis capazes de codificar toxinas pirogênicas chamadas superantígenos como TSST-1 e enterotoxina B. Os plasmídeos também contribuem para a virulência, com genes

auxiliando na aquisição de resistência a antibióticos e em alguns casos codificando toxinas como a toxina esfoliativa B, a enterotoxina D dentre outras⁰⁵.

Outro fator de virulência que possui é a formação de biofilme, comunidades tridimensionais de microrganismos circundadas por uma matriz extracelular que consiste de polissacarídeos, DNA extracelular e proteínas, e que promove adesão a uma variedade de superfícies bióticas e abióticas⁰⁶. O principal componente da matriz do biofilme de *S. aureus* é o polissacarídeo intercelular adesina (PIA) sintetizado por quatro genes organizados em um operon *icaADBC* e cuja expressão é afetada por fatores regulatórios e ambientais. O gene *icaR*, regulador transcricional, está localizado adjacente ao *icaADBC*, e é transcrito de forma divergente a partir deste operon, e codifica uma proteína que se liga ao códon inicial do *ica*, inibindo-o⁰⁷. A presença de biofilme confere resistência a antibióticos e a respostas imune do hospedeiro tornando sua eliminação um desafio. Este pode ainda se dispersar resultando na colonização de nichos adicionais⁰⁶.

Além disso, algumas cepas possuem resistência aos antibióticos β -lactâmicos devido à produção de proteína de ligação à penicilina (PBP-2a) codificada pelo gene *mecA* presentes num grande elemento genético móvel conhecido Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) e adquirido por meio de transferência horizontal de genes entre bactérias sendo conhecidas como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)⁰⁸.

A transmissão de MRSA aumentou o desafio do controle de infecção com a constante mudança epidemiológica observada. Sendo inicialmente associado a infecções nosocomiais as cepas foram denominadas de *hospital-acquired* MRSA (HA-MRSA). No entanto o surgimento de isolados na comunidade com fatores de risco distintos e padrões únicos de resistência antimicrobiana e características moleculares levaram a classificação de *community-acquired* MRSA (CA-MRSA). Assim, os SCC*mec* I, II e III sendo comumente encontrados em HA-MRSA e SCC*mec* IV e V em CA-MRSA. Outra mudança observada é o surgimento de MRSA associada a animais de gado, *Livestock-Associated* MRSA (LA-MRSA), causando altas taxas de colonização e infecção entre seres humanos sugerindo uma transmissão zoonótica⁰⁹.

S. aureus possui um genoma plástico que o permite colonizar diferentes espécies hospedeiras. A parte central do seu genoma contempla informações para síntese de proteínas de superfície e de reguladores de transcrição. Porém seu genoma

acessório, que corresponde a 15%, se dá principalmente por elementos genéticos móveis e desempenha o papel na adaptação permitindo mudanças ao ambiente e para com as espécies hospedeiras¹⁰.

Mudanças na composição de fatores de virulência e dos elementos genéticos móveis são necessários para a adaptação bem sucedida aos vários nichos e hospedeiros. A estrutura populacional de *S. aureus* é principalmente clonal e para entender a dinâmica evolutiva é feito a tipagem de sequência multilocus (MLST) e discriminação de tipos de sequência (STs) e complexos clonais (CC)¹¹.

A caracterização molecular por MLST se dá através da análise de sequências de fragmentos de sete genes housekeeping altamente conservados, responsáveis por codificar enzimas importantes do metabolismo da bactéria, onde é atribuído um número a cada sequência locus com base na similaridade a alelos conhecidos e gerando uma sequência ST. Estes podem ser agrupados sob um mesmo complexo clonal. Os CA-MRSA pertencem principalmente aos complexos clonais CC8 (ST8), CC30 (ST30), CC59, CC80 e CC93; HA-MRSA são atribuídos principalmente a CC5, CC8 (ST239), CC22, CC30 (ST36) e CC45; e LA-MRSA são principalmente atribuídos a CC398¹².

Com o passar dos anos o *S. aureus* tem sido vastamente estudado gerando muitos dados sobre sua diversidade de espécie. O ST75 geneticamente divergente foi inicialmente relatado na Austrália e seguido por outros isolados geneticamente relacionados ao CC75 passaram a ser descritos na Bélgica, Camboja, China, Fiji, França, Guiana Francesa, Nova Zelândia, Tailândia, Trinidad e Tobago, Reino Unido e Estados Unidos. As linhagens divergentes foram formalmente reconhecidas taxonomicamente como *Staphylococcus argenteus* e *Staphylococcus schweitzeri* como novas espécies dentro do complexo *S. aureus* (SAC)¹³.

S. argenteus apresenta colônias brancas e cremosas em ágar sangue devido à falta do operon *crtOPQMN* responsável pela produção da estafiloxantina, pigmento carotenóide, essencial para proteção contra estresse oxidativo e morte de neutrófilos. Tem emergido como patógeno relacionado a amplo espectro de doenças infecciosas como de pele e tecidos moles, fascíte necrosante, infecção relacionada a próteses, bacteremia e infecções endovasculares invasivas. Já foi descrito como colonizante em indivíduos saudáveis¹⁴. Isolados de *S. argenteus* já foram descritos como *mecA* positivos, resistentes à meticilina, e com SCC*mec* tipo IV, além de uma variedade de fatores de virulência como PVL e as cinco enterotoxinas clássicas¹⁵.

Não é possível a diferenciação entre *S. aureus* e *S. argenteus* pelos métodos de diagnósticos clínicos de rotina como teste da coagulase ou fator de aglomeração, pois ambas apresentam muitas características fenotípicas iguais¹⁶. Algumas características genotípicas, no entanto, permitem a distinção das espécies, como a pesquisa dos genes do operon *crtOPQMN* e da sequência gênica de peptídeo sintetase não ribossômica (*nrps*) e alguns genes conservados¹⁷.

A descoberta desta nova espécie implica na necessidade de determinar se elas devem ser diferenciadas na rotina caso ela se apresente com diferentes manifestações clínicas ou exigir esquemas antimicrobianos diferenciados¹⁸. Portanto, este estudo objetivou avaliar a diversidade genética e os fatores de virulência de *S. aureus* e MRSA entre indivíduos acamados em domicílio e idosos vivendo em casas de repouso no município de Botucatu (SP) e pesquisar a presença de *S. argenteus* entre os isolados.

Materiais e métodos

Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal realizado no município de Botucatu-SP, que segundo censo de 2018 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, possuía uma população estimada de 144.820 habitantes, sendo destes 17.008 idosos¹⁹.

A Secretaria Municipal da Saúde contabilizava em seu cadastro 188 residentes em Casas de Repouso e 222 acamados em domicílio. Foi realizado um cálculo amostral com base nesse número onde obteve-se um “n” sugerido de 173 indivíduos. A fórmula utilizada para calcular o número de amostras está disposto no Anexo I.

Os indivíduos foram abordados em visitas domiciliares e em nove instituições de longa permanência, **ILPI A** (N=7), **ILPI B** (N=6), **ILPI C** (N=12), **ILPI D** (N=6), **ILPI E** (N=7), **ILPI F** (N=18), **ILPI G** (N=60), **ILPI H** (N=16) e **ILPI I** (N=18), através de endereços fornecidos pela própria secretaria ou pelas unidades de saúde do município, e convidados a participar da pesquisa, após uma explicação detalhada sobre o estudo e sua importância. A participação foi confirmada com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo indivíduo e nos casos de déficit cognitivo, foi solicitado o consentimento do responsável legal ou (na ausência deste) o da instituição.

Foram incluídos todos os indivíduos que consentiram participar da pesquisa e nos casos dos que se encontravam impossibilitados de compreender (ex.: demência), estes foram incluídos mediante consentimento do responsável. O critério de exclusão foi indivíduos institucionalizados ou acamados há menos de 30 dias.

Também foi aplicado questionário (Anexo 2), que incluiu dados demográficos (gênero e idade), tempo de institucionalização, dados clínicos (comorbidades), dispositivos invasivos, internações recentes (últimos 6 meses), doenças infecciosas atuais ou recentes, e uso de antimicrobianos (últimos 6 meses). Essas informações foram levantadas através de entrevista com o próprio participante e/ou seu responsável.

As coletas foram realizadas no período de julho de 2017 a dezembro de 2018. Após o procedimento de cultura para isolamento e identificação fenotípica e

genotípica de *Staphylococcus aureus* conforme descrito nos itens abaixo, os isolados foram mantidos em freezer a -70°C e -20°C .

Coleta de culturas

Amostras de vestíbulo nasal, da orofaringe e do reto de 226 indivíduos (150 residentes de nove casas de repouso e 76 acamados em domicílio) do município de Botucatu, SP, Brasil, coletadas utilizando um *swab* estéril com meio de transporte para cada um dos sítios citados. Devido a recusa por parte de 47 indivíduos, somente 179 *swabs* retais foram coletados. Já para os sítios nasal e oral não houve nenhuma recusa entre os 226 indivíduos incluídos no estudo.

A técnica de coleta incluiu a umidificação do *swab* em solução fisiológica 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas as narinas, até a maior profundidade tolerável pelo participante da pesquisa, com rotação da haste pressionando gentilmente a extremidade contra a mucosa. Para coleta da orofaringe o *swab* foi levemente pressionado e girado sobre as tonsilas e atrás da úvula (faringe posterior), evitando-se tocar na língua, mucosa bucal e úvula. Já para a coleta retal passou-se a ponta do *swab* a aproximadamente dois centímetros do esfíncter anal, rotacionando cuidadosamente para coletar amostra das criptas anais, certificando-se de que houvesse coloração fecal no algodão após a retirada do *swab*. Após a coleta, os *swabs* foram transportados em meio de Stuart para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – Setor de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

Identificação fenotípica de *Staphylococcus aureus*

As amostras coletadas dos três sítios foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Baird Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 48 horas as culturas que se desenvolveram foram submetidas à coloração de Gram objetivando-se sua pureza e a observação da morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram feitas as provas de catalase e coagulase em tubo conforme preconizado por Koneman *et al*²⁰ e provas bioquímicas adicionais de fermentação dos açúcares maltose, trealose e manitol.

Identificação genotípica de *Staphylococcus aureus*

As amostras foram submetidas à técnica de PCR para amplificação do fragmento de DNA *Sa442*, específico da espécie *S. aureus* seguindo o protocolo descrito por Martineau *et al*²¹ na qual foram utilizados os primers *Sa442-1* (5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG3') e *Sa442-2* (5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3') gerando um produto amplificado de 241pb.

Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico total foi extraído de *S. aureus* cultivados em ágar sangue e inoculados individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubados a 37°C por 24 horas.

Para a extração foi utilizado o Kit Illustra (GE Healthcare) que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. Líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas novamente a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a -20°C.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado para todos os isolados obtidos por meio da técnica de disco difusão a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI)^{22,23}. As drogas utilizadas foram: Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg), Linezolid (30µg), Quinupristina/Dalfopristina (15µg), Sulfametoxazol/Trimetoprim (25 µg). A atividade do antimicrobiano foi avaliada

pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI^{22,23} e BrCAST²⁴.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM de Vancomicina foi avaliada por meio do método de *E-test*. Este procedimento é um método quantitativo, que utiliza tiras de plástico inerte e transparente, medindo 60 mm de comprimento por 5,5 mm de largura, na qual é incorporado um gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado.

Os resultados da CIM foram denominados sensível, intermediário ou resistente de acordo com as definições pré-estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*²³ e BrCAST²⁴.

A determinação da CIM de Vancomicina foi avaliada por meio do método de E-test. Este procedimento é um método quantitativo, que utiliza tiras de plástico inerte e transparente, medindo 60 mm de comprimento por 5,5 mm de largura, na qual é incorporado um gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado.

Teste de triagem para detecção de heterorresistência à vancomicina

Para verificação de heterorresistência à vancomicina foi utilizado o meio de triagem preparado com ágar BHI adicionado de 6 µg/ml de vancomicina conforme recomendação do CLSI^{22,23}. As linhagens de *S. aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, susceptíveis a vancomicina, foram utilizadas como controle negativo e a amostra *E. faecalis* ATCC51299, resistente a vancomicina, foi utilizada como controle positivo.

Deteção do gene *sasX* e dos genes envolvidos na formação de biofilme

As amostras de *S. aureus* foram submetidas à pesquisa do gene *sasX* através da técnica de PCR, segundo metodologia descrita por Li et al²⁵. Os primers utilizados e o tamanho do respectivo fragmento estão listados na Tabela 4.

As reações de PCR para a detecção dos genes codificadores do biofilme foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Arciola et al²⁶. Da mesma forma, se procedeu as reações de PCR para identificação dos genes *bap* (proteína associada

ao biofilme), *aap* (proteína associada a acúmulo) e *atlE* (autolisina, envolvida na adesão do biofilme) segundo as definições de Cucarella et al²⁷ e Vandecasteele et al²⁸, respectivamente. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1. Em todas as reações realizadas, foram utilizadas linhagens de referência internacional como controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35985 (produtora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para detecção dos genes envolvidos na codificação da proteína SasX e formação de biofilme.

Primer	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Produtos amplificados
<i>sasX1</i>	AGAATTAGAAGTACGTCTAAATGC	588 pb*
<i>sasX2</i>	GCTGATTATGTAAATGACTCAAATG	588 pb*
<i>icaA1</i>	ACAGTCGCTACGAAAAGAAA	103 pb**
<i>icaA2</i>	GGAAATGCCATAATGAGAAC	103 pb**
<i>icaD1</i>	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198 pb**
<i>icaD2</i>	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	198 pb**
<i>icaB1</i>	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA	302 pb**
<i>icaB2</i>	AAAGTCCCATAAGCCTGTTT	302 pb**
<i>icaC1</i>	TAACTTTAGGCGCATATGTTT	400 pb**
<i>icaC2</i>	TTCCAGTTAGGCTGGTATTG	400 pb**
<i>bap1</i>	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC	971 pb***
<i>bap2</i>	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971 pb***
<i>aap1</i>	ATACAACGGTGCAGATGGTTG	399 pb****
<i>aap2</i>	GTAGCCGTCCAAGTTTACCAG	399 pb****
<i>atlE1</i>	CAACTGCTCAACCGAGAACA	500 pb****
<i>atlE2</i>	CATCGTTTTTCAGCGCTATCA	500 pb****

Fonte: *Li et al²⁵; **Arciola et al²⁶; ***Cucarella et al²⁷ e ****Vandecasteele et al²⁸.

Pesquisa de genes das hemolisinas e toxinas estafilocócicas

As reações de PCR para os genes das hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*), assim como os primers utilizados, foram realizadas de acordo com Marconi et al²⁹. As reações de amplificação dos genes das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec-1*), e para o gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) foram realizadas segundo Cunha et al³⁰ e Johnson et al³¹. Os parâmetros para a detecção dos genes da leucocidina

Panton-Valentine (*pvl*) e genes das toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*), foram utilizados conforme descritos por Tristan et al³² e Koning et al³³. A Tabela 2 demonstra a sequência de primers utilizados, o tamanho do amplicon e as cepas utilizadas como controles.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a detecção de genes de hemolisinas e toxinas.

Fator de virulência	Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Produtos amplificados pb	Controle
Enterotoxina A	<i>sea</i>	SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120	ATCC 13565
		SEA-2	GAACCTTCCATCAAAAACA		
Enterotoxina B	<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACGACAAACG	478	ATCC 14458
		SEB-2	GACGGTACTCTATAAGTGCC		
Enterotoxina C	<i>sec-1</i>	SEC-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	ATCC 19095
		SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC		
Tox. 1 da Síndrome Choque Tóxico	<i>tst</i>	TSST-1	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	N315
		TSST-2	TTTCCAATAACCACCCGTTT		
Toxina Esfoliativa A	<i>eta</i>	ETA-1	CTAGTGCATTTGTTATTCAA	119	N5
		ETA-2	TGCATTGACACCATAGTACT		
Toxina Esfoliativa B	<i>etb</i>	ETB-1	ACGGCTATATACATTCAATT	200	ZM
		ETB-2	TCCATCGATAATATACCTAA		
Hemolisina alfa	<i>hla</i>	HLA-1	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	N315
		HLA-2	CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
Hemolisina delta	<i>hld</i>	HLD-1	ATGGCAGCAGATATCATTTTC	357	N315
		HLD-2	CGTGAGCTTGGGAGAGAC		
Leucocidina de Panton Valentine	<i>pvl</i>	LUK-PV1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433	ATCC 49775
		LUK-PV2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAGC		

Fonte: Marconi et al²⁹; Cunha et al³⁰; Johnson et al³¹; Tristan et al³²; Koning et al³³.

Identificação de *Staphylococcus argenteus*

Para identificação de *Staphylococcus argenteus* foi feita a reação de PCR para amplificação do gene do peptídeo não-ribossômico sintetase (*nrps*) baseada na deleção de 60 aminoácidos que ocorre em *S. aureus*, mas não em *S. argenteus* conforme descrito por Zhang et al³⁴. Os primers utilizados foram: *nrps*-F (5'-TTGARWCGACATTACCAGT-3') e *nrps*-R (5'-TWRCRTACATYTCRTTATC-3'). O produto amplificado esperado é de 340pb para *S. argenteus* e 160pb para *S. aureus*.

Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1,0X. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb. O DNA foi corado com Sybr® Safe e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno

O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al. (1985)³⁵ foi utilizado com algumas modificações propostas por Oliveira e Cunha (2010)³⁶. Este método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da densidade óptica (DO) do material aderente produzido pela bactéria. Foram utilizadas culturas em TSB, incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas a 1:1 com TSB, preparado com 2% de glicose. Foram utilizadas placas previamente esterilizadas de 96 cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599 fabricado pela *Corning Incorporated*). Os poços foram preenchidos em quaduplicata com 200µl da cultura diluída, utilizando pipeta multicanal. Em todos os testes foram utilizados uma amostra como controle positivo, uma como controle negativo e uma com TSB estéril. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C e posteriormente o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente utilizando-se pipeta multicanal, e então, lavados quatro vezes com 200µl de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o volume foi aspirado e o excesso de corante retirado através de uma lavagem das placas com água destilada utilizando-se de pipeta multicanal. A seguir, foi feita secagem das placas em temperatura ambiente por 60 minutos e realizada a leitura da densidade óptica no leitor de Elisa, da marca LabSystem modelo Multiskan EX em filtro 540 nm.

As amostras foram classificadas em três categorias e a Tabela 3 mostra os valores do ponto de corte:

Não aderente (NA), DO igual ou menor que o ponto de corte,

Fraco aderente (FRA), DO maior que o ponto de corte igual ou menor que o dobro,

Forte aderente (FOA), DO maior que o dobro do ponto de corte.

Tabela 3: Valores do ponto de corte

Resultado	Filtro 540nm
NA	$\leq 0,111$
FA	$>0,111$ ou $\leq 0,222$
FOA	$>0,222$

Nota. NA- Não aderente; FA- Fraco aderente; FOA- Forte aderente

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

Todos os isolados de *S. aureus* foram tipados através do Pulsed-Field Gel Eletroforesis (PFGE) utilizando o protocolo modificado de McDougal et al³⁷. As amostras foram colocadas em caldo BHI para o crescimento durante 24 horas. Em um microtubo, foram adicionados 400µl da amostra e centrifugada à 12.000 rpm por 50 segundos. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos à 37°C. Após agitação em vortex, foram adicionados 5µl de lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300µl de agarose *lowmelt*.

As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em placa de 24 poços com 2 ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por no mínimo 4 horas. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora.

Para a restrição do DNA genômico foi utilizada a enzima *SmaI* (*Fast Digest SmaI*, *Fermentas Life Science*, Canadá). A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo depulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (*New England BioLabs*) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV.

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo

método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,2% e 1%, respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para determinação dos *clusters*. Foi considerado *cluster* o agrupamento de dois ou mais isolados agrupados com $\geq 80\%$ de similaridade.

Os isolados que não puderam ser tipados utilizando a enzima *SmaI*, foram tipados através da digestão com a enzima *ApaI*.

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

O MLST foi realizado segundo as normas descritas por Enright et al³⁸. Cada par de *primer* amplifica um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de 500 pb), estes são demonstrados na Tabela 4: carbamatoquinase (*arcC*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*).

A purificação foi realizada pelo *Kit HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction* e a reação de sequenciamento é descrita abaixo. A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<https://pubmlst.org/>) (2023).

Tabela 4. Sequência de primers utilizados na PCR

Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos (5' a 3')	Produtos amplificados
Carbamato quinase	<i>arcC</i> -Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	570pb
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
Desidrogenase do chiquimato	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	536pb
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC	
Glicerol quinase	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	534pb
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
Guanilato quinase	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	488pb
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACTACAACGTAATCGTA	
Fosfato acetiltransferase	<i>pta</i> -Up	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG	575pb
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	
Triose-fosfato isomerase	<i>tpi</i> -Up	TCGTTCACTCTGAACGTCGTGAA	475pb
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
Acetil coenzima A acetil transferase	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	598pb
	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Fonte: Enright et al³⁸.

Reação de sequenciamento

As reações foram realizadas em sequenciador ABI3500 de 8 capilares (de 50cm) usando como polímero o POP7 (*Applied Biosystems*). A visualização das sequências (eletroforograma) foi realizada pelo programa *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica).

Georreferenciamento

As coordenadas geográficas dos locais de coleta foram levantadas e analisadas utilizando os softwares MapInfo (© MapInfo Corporation North Greensburg, NY, USA), ArcGIS (©ESRI, San Diego, CA, USA) e para os mapas de calor (Estimativa de densidade Kernel) foi utilizado o software QGIS 3.32.1, com raio empregado de 500 metros e a resolução 10 do pixel no raster de saída.

Resultado

Prevalência da colonização de S. aureus e MRSA

Como previamente publicado pelo nosso grupo³⁹, identificamos nas amostras dos 226 indivíduos acamados ou residindo em instituições de longa permanência uma prevalência de 33,6% (n=76) como sendo portadores de *S. aureus* e 8% (n=18) de MRSA, em pelo menos um dosswítios coletados. Quanto as ILPIs a prevalência de *S. aureus* foi de 85,7% (A), 50,0% (B), 58,3% (C), 33,3% (D), 42,9% (E), 27,7% (F), 33,3% (G), 50,0% (H) e 16,6% (I). Apenas quatro das nove instituições apresentaram residentes colonizados por MRSA, com prevalência de 14,3% (A), 16,7% (B), 13,3% (G) e 25% (H). Já dos 76 indivíduos acamados 20 (26,3%) estavam colonizadospor *S. aureus*. Desses, quatro (5,2%) eram MRSA. O número total de isolados de *S. aureus* obtidofoi de 97 sendo que alguns deles foram de sítios distintos de um mesmo indivíduo devido a colonização simultânea. A Tabela 5 mostra a relação das características clínicas dos indivíduos com o isolado identificado.

Tabela 5. Dados clínicos dos indivíduos acamados ou institucionalizados em ILPIs.

Indivíduo	Idade	Origem	Condição	Procedimentos	Antibiótico prévio	Cultura
2	64	ILPI A	Esquizofrenia	Internação		MRSA
3	94	ILPI A	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
4	82	ILPI A	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
5	63	ILPI A	Doença Pulmonar			<i>S. aureus</i>
6	84	ILPI A	Demência	Sonda		<i>S. aureus</i>
7	77	ILPI A	Diabetes	Cirurgia		<i>S. aureus</i>
8	70	ILPI B	Esquizofrenia	Internação	sim	MRSA
10	86	ILPI B	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
12	73	ILPI B	Neuropatia		sim	<i>S. aureus</i>
15	80	ILPI C	AVC	Cirurgia		<i>S. aureus</i>
16	74	ILPI C	Diabetes		sim	<i>S. aureus</i>
17	81	ILPI C	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
20	80	ILPI C	Doença Pulmonar		sim	<i>S. aureus</i>
21	82	ILPI C	Diabetes			<i>S. aureus</i>
24	85	ILPI C	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
25	88	ILPI C	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
27	92	ILPI D	Diabetes		sim	<i>S. aureus</i>
30	87	ILPI D	Demência			<i>S. aureus</i>
34	84	ILPI E	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
38	80	ILPI E	Diabetes			<i>S. aureus</i>
42	85	ILPI F	Demência			<i>S. aureus</i>

47	100	ILPI F	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
54	82	ILPI F	Diabetes			<i>S. aureus</i>
55	74	ILPI F	AVC			<i>S. aureus</i>
56	77	ILPI F	Demência			<i>S. aureus</i>
58	86	ILPI G	Diabetes			MRSA
65	75	ILPI G	Diabetes			<i>S. aureus</i>
79	80	ILPI G	Hipertensão			<i>S. aureus</i>
82	86	ILPI G	Osteoporose			<i>S. aureus</i>
84	83	ILPI G	Coagulopatia			MRSA
86	80	ILPI G	Alzheimer			MRSA
89	81	ILPI G	Diabetes			<i>S. aureus</i>
92	79	ILPI G	Diabetes			<i>S. aureus</i>
93	72	ILPI G	Doença Renal			<i>S. aureus</i>
94	83	ILPI G	Coagulopatia			<i>S. aureus</i>
95	91	ILPI G	Osteoporose			<i>S. aureus</i>
96	82	ILPI G	Anemia			MRSA
97	70	ILPI G	Hipertensão			MRSA
101	67	ILPI G	Epilepsia			<i>S. aureus</i>
105	66	ILPI G	Diabetes			<i>S. aureus</i>
106	55	ILPI G	Anemia			MRSA
112	67	ILPI G	Doença Cardíaca			MRSA
113	70	ILPI G	Úlcera			MRSA
114	69	ILPI G	Diabetes			<i>S. aureus</i>
116	69	ILPI G	Esquizofrenia			<i>S. aureus</i>
119	82	Acamado	AVC			<i>S. aureus</i>
121	43	Acamado	Hipertensão	Cirurgia		<i>S. aureus</i>
122	34	Acamado	Meningite	Internação	sim	<i>S. aureus</i>
128	52	Acamado	Doença Renal	Internação		<i>S. aureus</i>
132	76	Acamado	AVC		sim	<i>S. aureus</i>
136	67	Acamado	Hipertensão			MRSA
138	70	Acamado	Diabetes		sim	<i>S. aureus</i>
139	70	Acamado	Diabetes			<i>S. aureus</i>
143	83	Acamado	Glaucoma			<i>S. aureus</i>
144	74	Acamado	Diabetes	Cirurgia		<i>S. aureus</i>
152	83	Acamado	Hipertensão		sim	MRSA
160	60	Acamado	Diabetes	Cirurgia	sim	<i>S. aureus</i>
161	27	Acamado	Neuropatia			<i>S. aureus</i>
162	74	Acamado	Diabetes		sim	<i>S. aureus</i>
165	82	Acamado	Hipertensão		sim	MRSA
169	87	Acamado	Doença Pulmonar	Internação		MRSA
174	80	ILPI H	AVC	Internação	sim	MRSA
176	82	ILPI H	Alzheimer			MRSA
178	86	ILPI H	Hipertensão	Cirurgia		<i>S. aureus</i>
181	83	ILPI H	Diabetes			<i>S. aureus</i>
186	88	ILPI H	Alzheimer			<i>S. aureus</i>

187	74	ILPI H	Infecção do Trato Urinário	Internação	sim	MRSA
188	80	ILPI H	Alzheimer			MRSA
189	76	ILPI H	Alzheimer		sim	<i>S. aureus</i>
190	72	Acamado	Hipertensão			<i>S. aureus</i>
194	83	Acamado	Diabetes			<i>S. aureus</i>
196	98	ILPI I	Diabetes			<i>S. aureus</i>
209	81	ILPI I	Alzheimer			<i>S. aureus</i>
211	91	ILPI I	Doença Pulmonar			<i>S. aureus</i>
216	87	Acamado	Diabetes			<i>S. aureus</i>
223	82	Acamado	Alzheimer			<i>S. aureus</i>

Nota. Características clínicas dos indivíduos incluídos no estudo e a relação com a presença de *S. aureus* ou MRSA. ILPI: Instituição de Longa Permanência para Idosos. AVC: Acidente Vascular Cerebral.

Determinação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos

A análise dos 97 isolados de *S. aureus* dos indivíduos acamados ou institucionalizados revelou que 11 se mostraram resistentes à oxacilina e à cefoxitina simultaneamente, cinco resistentes somente à oxacilina e dois resistentes somente à cefoxitina, resultando em um total de 18 isolados apresentando resistência fenotípica.

É importante observar que houve isolados resistentes à oxacilina *in vitro* e que não carregavam o gene *mecA*. Além disso, alguns isolados foram fenotipicamente sensíveis à oxacilina e cefoxitina e carregavam o gene *mecA*. Neste estudo, classificamos isolados portadores do gene *mecA* como MRSA, independentemente do resultado fenotípico observado nos testes de suscetibilidade.

Não foram encontrados casos de resistência à sulfametoxazol/trimetoprim, quinupristina/dalfopristina e linezolida e o CIM da vancomicina também mostrou todos isolados sensíveis (Tabela 6).

Tabela 6. Perfil de sensibilidade dos isolados de MSSA e MRSA dos indivíduos acamados em domicílio ou institucionalizados

<i>S. aureus</i> (97)	Gene <i>mecA</i>	Oxacilina		Cefoxitina		Linezolida		Q/D		S/T		Vancomicina CIM* (µg/mL)
		R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	
MSSA (77)	0	3*	74	0	77	0	77	0	77	0	77	0,19 - 1,5
MRSA (20)	20	13	7**	13	7**	0	20	0	20	0	20	0,19 - 1,5
Total (97)	20	16	81	13	84	0	97	0	97	0	97	0,19 - 1,5

Nota. Isolados identificados como MSSA e MRSA a partir da presença do gene *mecA*. R: resistente. S: sensível. Q/D: Quinupristina/dalfopristina. S/T: Sulfametoxazol/trimetoprim. CIM: Concentração Inibitória Mínima. *Faixa de variação de sensibilidade à vancomicina obtida nos isolados genes *mecA* negativos (MSSA) e gene *mecA* positivos (MRSA). *Isolados Oxacilina resistentes que não carregavam gene *mecA*. **Isolados Oxacilina e Cefoxitina sensíveis que carregavam gene *mecA*

Detecção de heterorresistência à vancomicina

Nenhum dos 97 isolados de *S. aureus* provenientes dos indivíduos acamados ou institucionalizados, apresentou crescimento no método de triagem para h-VISA (vancomycin- intermediate *S. aureus* heteroresistant), não sendo, portanto, detectado nenhum isolado com heterorresistência à vancomicina na população estudada.

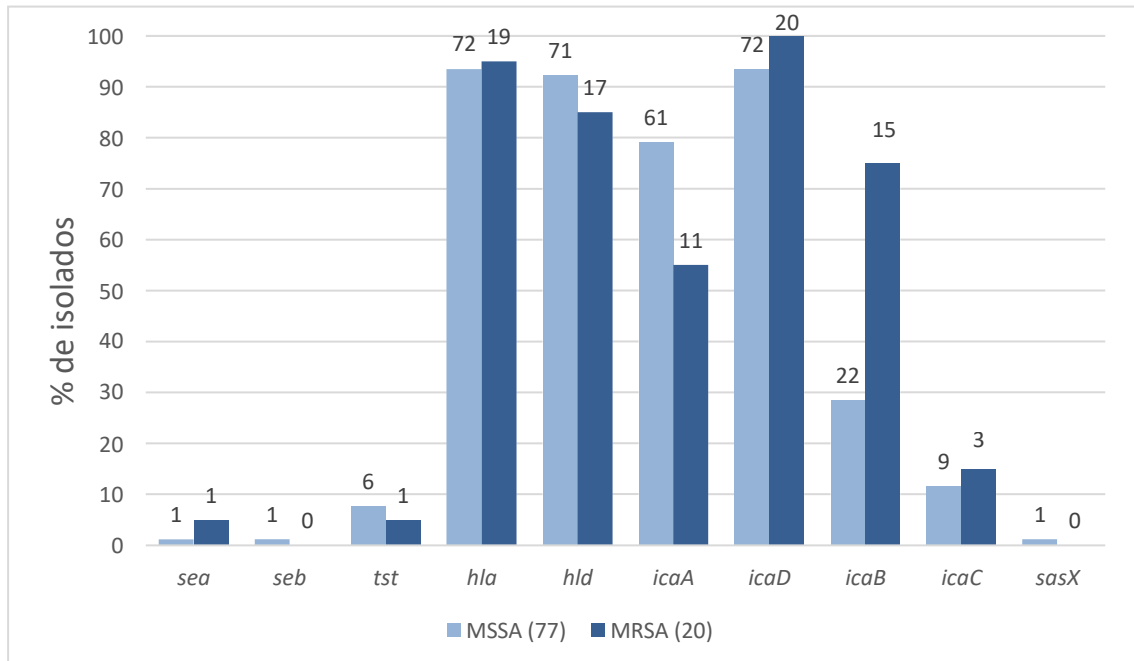
Detecção dos genes relacionados a virulência de S. aureus

A prevalência dos genes da produção de biofilme observados foi de 74,2% (72) para o gene *icaA*, 94,8% (92) para os genes *icaD*, 38,1% (37) para o gene *icaB* e 12,3% (12) para o gene *icaC*. Destes, 70,1% (68) apresentaram simultaneamente os genes *icaA* e *icaD* e 4,1% (4) apresentaram o operon *icaADBC* completo. Não foi detectado os genes da proteína associada ao biofilme (*bap*), da autolisina (*atlE*) e da proteína associada a acúmulo (*aap*) em nenhuma das amostras e apenas um isolado foi positivo para o gene *sasX*.

Dentre os isolados foi identificado que apenas dois (2,1%) carregavam o gene da enterotoxina A (*sea*), apenas um isolado (1%) carregava o gene da enterotoxina B (*seb*) e nenhum deles carregava o gene da enterotoxina C (*sec-1*). A prevalência observada para o gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) foi de 7,2% (7). Já em relação às hemolisinas, encontrou-se uma prevalência de 93,8% (91) para o gene *hla* e 90,7% (88) para o gene *hld*. Quanto aos genes da esfoliatina A (*eta*),

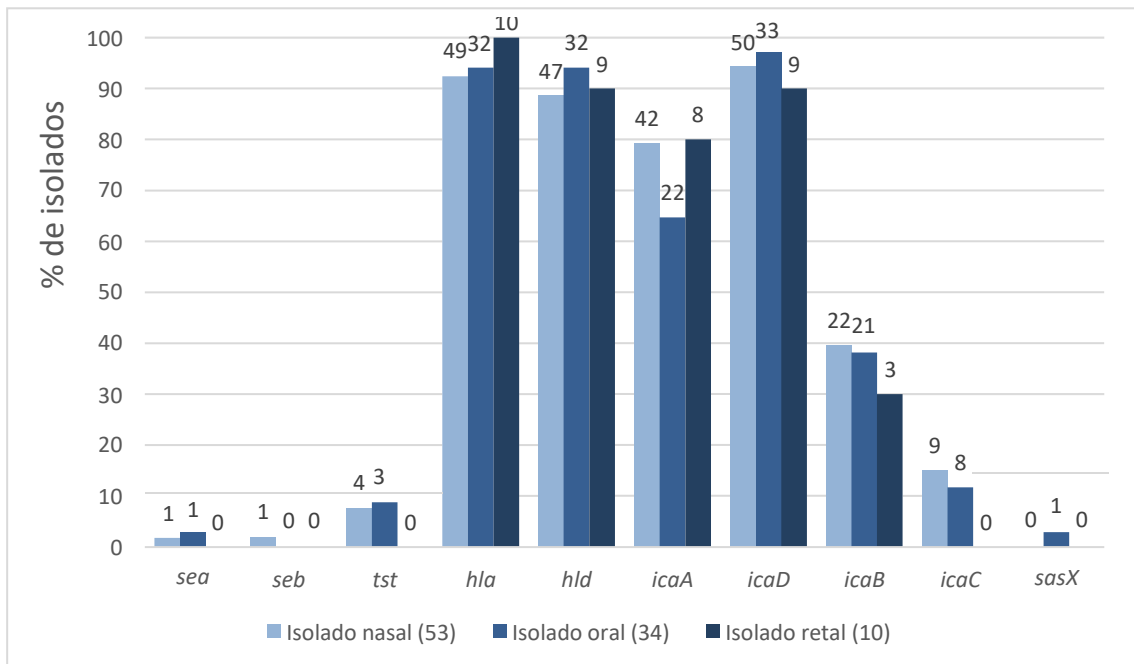
esfoliatina B (*etb*) e da Leucocidina de Panton Valentine (*pvl*), estes não foram identificados em nenhum dos isolados.

A prevalência dos fatores de virulência entre os isolados de MSSA e MRSA é demonstrada na Figura 1. A comparação entre a presença dos fatores de virulência nos isolados de *S. aureus* provenientes da mucosa nasal, orofaríngea e retal é demonstrada na Figura 2.



Nota. Genes pesquisados quanto a virulência dos isolados de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas (*sea* e *seb*). Gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*). Genes das citotoxinas, alfa hemolisina (*hla*) e delta hemolisina (*hld*). Genes relacionados à produção de biofilme (operon *icaADBC*). Gene da proteína relacionada a adesão (*sasX*). O eixo y está expresso em porcentagem e o rótulo de dados está em número absoluto de isolados.

Figura 1. Pesquisa dos genes de virulência em isolados de MSSA e MRSA provenientes de idosos acamados ou residindo em instituições de longa permanência.



Nota. Genes pesquisados quanto a virulência dos isolados de *S. aureus* de acordo com sítio de coleta. Enterotoxinas estafilocócicas (*sea* e *seb*). Gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*). Genes das citotoxinas, alfa hemolisina (*hla*) e delta hemolisina (*hld*). Genes relacionados à produção de biofilme (operon *icaADBC*). Gene da proteína relacionada a adesão (*sasX*). O eixo y está expresso em porcentagem e o rótulo de dados está em número absoluto de isolados.

Figura 2. Comparação entre os genes de virulência dos isolados encontrados na mucosa nasal, orofaríngea e retal de idosos acamados ou residindo em instituições de longa permanência.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno

A partir da leitura das placas com filtro de 540nm foi verificado que 18 isolados (18,5%) apresentaram atividade de aderência, com 12 deles sendo MRSA. A Tabela 7 mostra a relação da aderência com expressão dos genes relacionados.

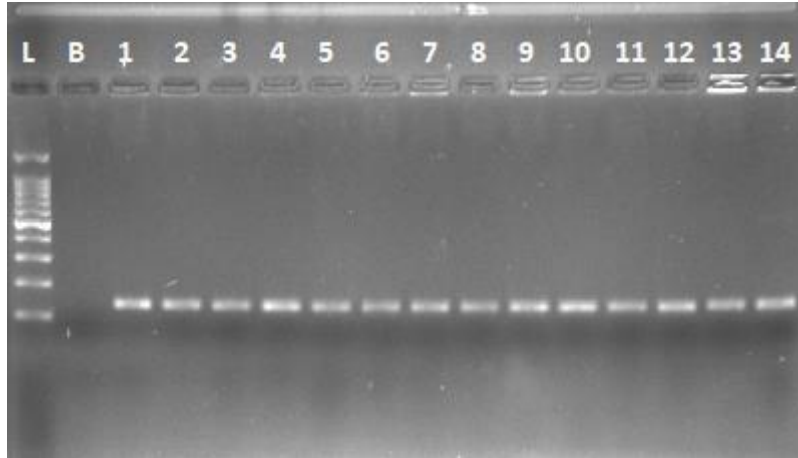
Tabela 7 – Relação dos isolados aderentes com a expressão genes do biofilme

Isolado	Perfil	Aderência	Expressão dos genes
58.O	MRSA	FA	<i>icaD</i>
84.N	MRSA	FA	<i>icaADB</i>
86.N	MRSA	FA	<i>icaADB</i>
96.N	MRSA	FA	<i>icaADB</i>
113.O	MRSA	FA	<i>icaADBC</i>
136.O	MRSA	FA	<i>icaD</i>
152.N	MRSA	FA	<i>icaDB</i>
152.O	MRSA	FA	<i>icaDB</i>
165.N	MRSA	FA	<i>icaAD</i>
169.A	MRSA	FO	<i>icaAD</i>
176.N	MRSA	FA	<i>icaADB</i>
187.N	MRSA	FA	<i>icaDBC</i>
4.N	MSSA	FA	<i>icaAD</i>
56.A	MSSA	FA	<i>icaADB</i>
97.A	MSSA	FA	<i>icaADB</i>
114.N	MSSA	FA	<i>icaDC</i>
132.O	MSSA	FA	-
181.N	MSSA	FA	<i>icaD</i>

Nota. N:mucosa nasal. O: mucosa orofaríngea. A: mucosa retal. FA: fraco aderente. FO: Forte aderente.

Identificação de S. argenteus

A pesquisa para identificação do gene do nrps não identificou a presença de *S. argenteus* dentre os isolados do estudo. Todos os produtos amplificados pela PCR geraram fragmentos de 160pb característicos de *S. aureus* (Figura 3).



Nota. L: 100 pb ladder. B: branco. 1-14: Amostras de *S. aureus*

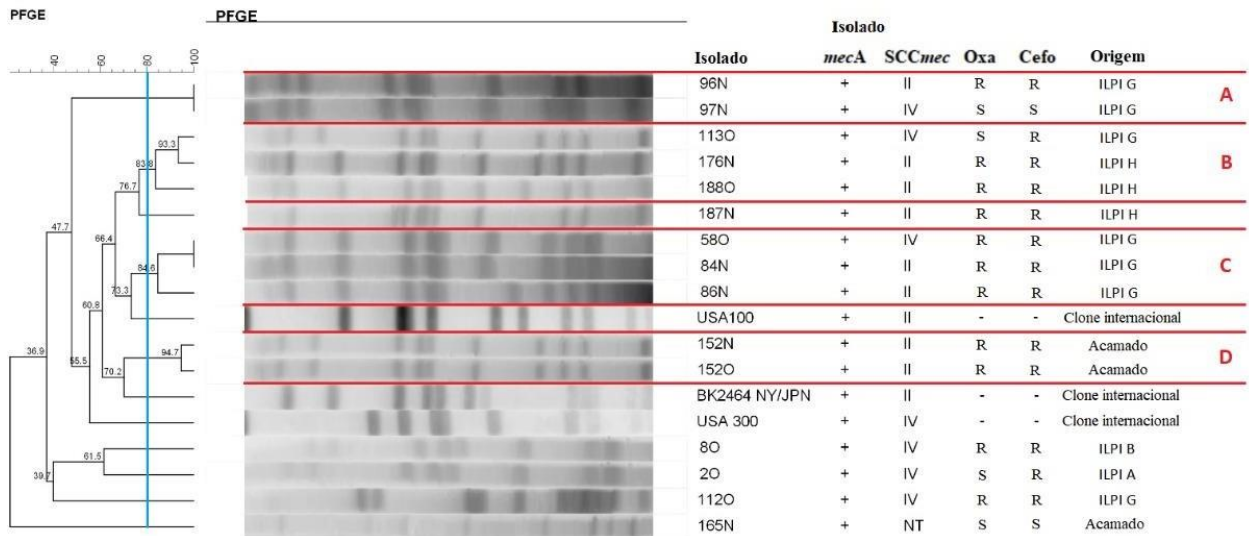
Figura 3 – Foto do gel da amplificação do gene *nrps*

Detecção Determinação do perfil clonal dos isolados de S. aureus e MRSA por PFGE (PulsedField Gel Electrophoresis)

Os 20 isolados positivos para o gene *mecA* foram analisados pela técnica de PFGE. Através da análise do dendrograma foi possível identificar a presença de *clusters* com similaridade $\geq 80\%$ (Figuras 4 e 5).

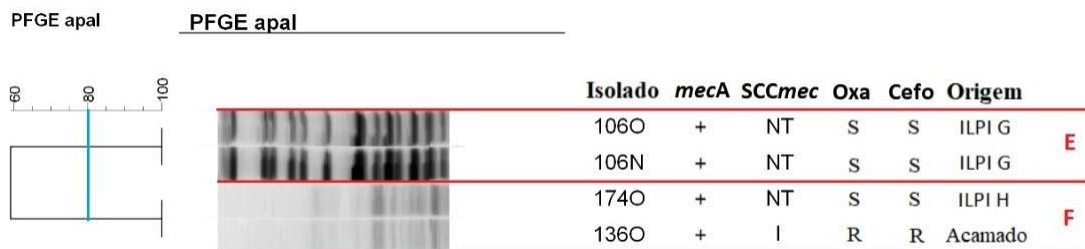
Na Figura 4 é possível verificar a presença de quatro *clusters* de MRSA após digestão com a enzima *SmaI*. O *cluster A* agrupou dois isolados de indivíduos diferentes (96N e 97N), mas provenientes da mesma ILPI. O *cluster B* apresentou três isolados de indivíduos diferentes (113O, 176N e 188O) sendo um deles residente em ILPI diferente. O *cluster C* também agrupou três isolados de indivíduos diferentes (58O, 84N e 86N) todos provenientes da mesma ILPI. Já o *cluster D* agrupou dois isolados (152N e 152O) de um mesmo indivíduo acamado.

Os MRSA que não foram digeridos com a enzima *SmaI* foram submetidos à tipagem por PFGE com a enzima de restrição *ApaI* (Figura 5). A análise do dendrograma revelou a formação de dois *clusters* tipados com *ApaI*. O *cluster E* agrupou dois isolados (106N e 106O) de sítios diferentes de um mesmo indivíduo institucionalizado. Já o *cluster F* agrupou isolados de dois indivíduos (174O e 136O), sendo um MRSA isolado de residente de ILPI e outro isolado de indivíduo acamado em domicílio.



Nota: N: mucosa nasal. O: mucosa orofaríngea. NT: não tipado. Oxa: oxacilina. Cefo: cefoxitina. S: sensível. R: resistente. ILPI: instituição de longa permanência para idoso.

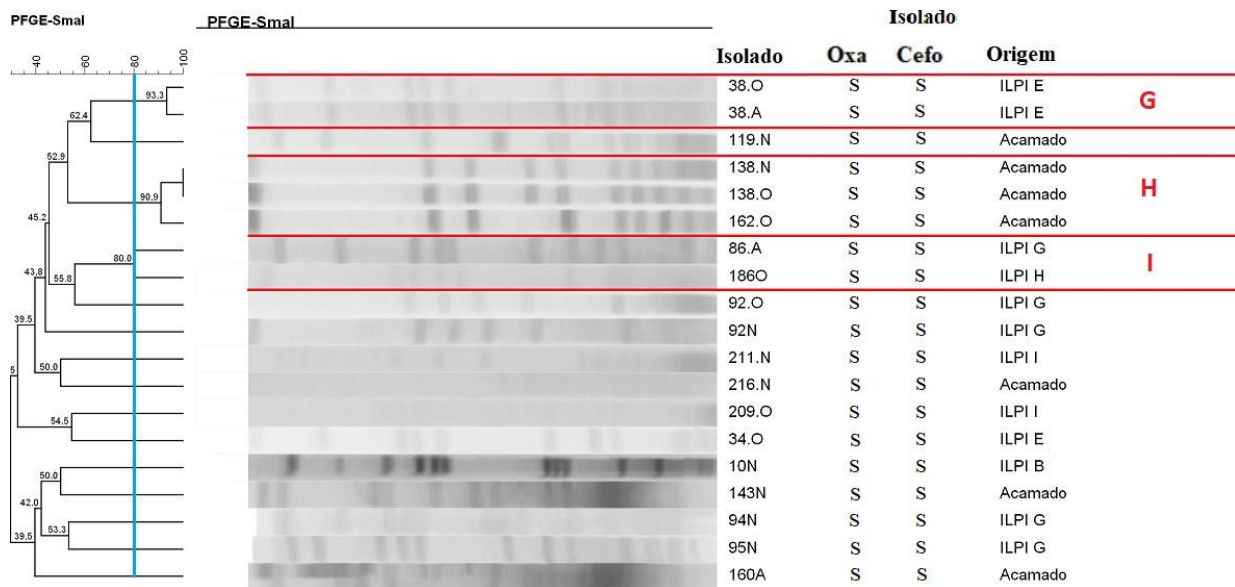
Figura 4: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*SmaI* de isolados de MRSA provenientes de indivíduos acamados em domicílio ou de Instituição de Longa Permanência.



Nota: N: mucosa nasal. O: mucosa orofaríngea. NT: não tipado. Oxa: oxacilina. Cefo: cefoxitina. S: sensível. R: resistente. ILPI: instituição de longa permanência para idoso.

Figura 5: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*ApaI* de isolados de MRSA provenientes de indivíduos acamados em domicílio ou de Instituição de Longa Permanência.

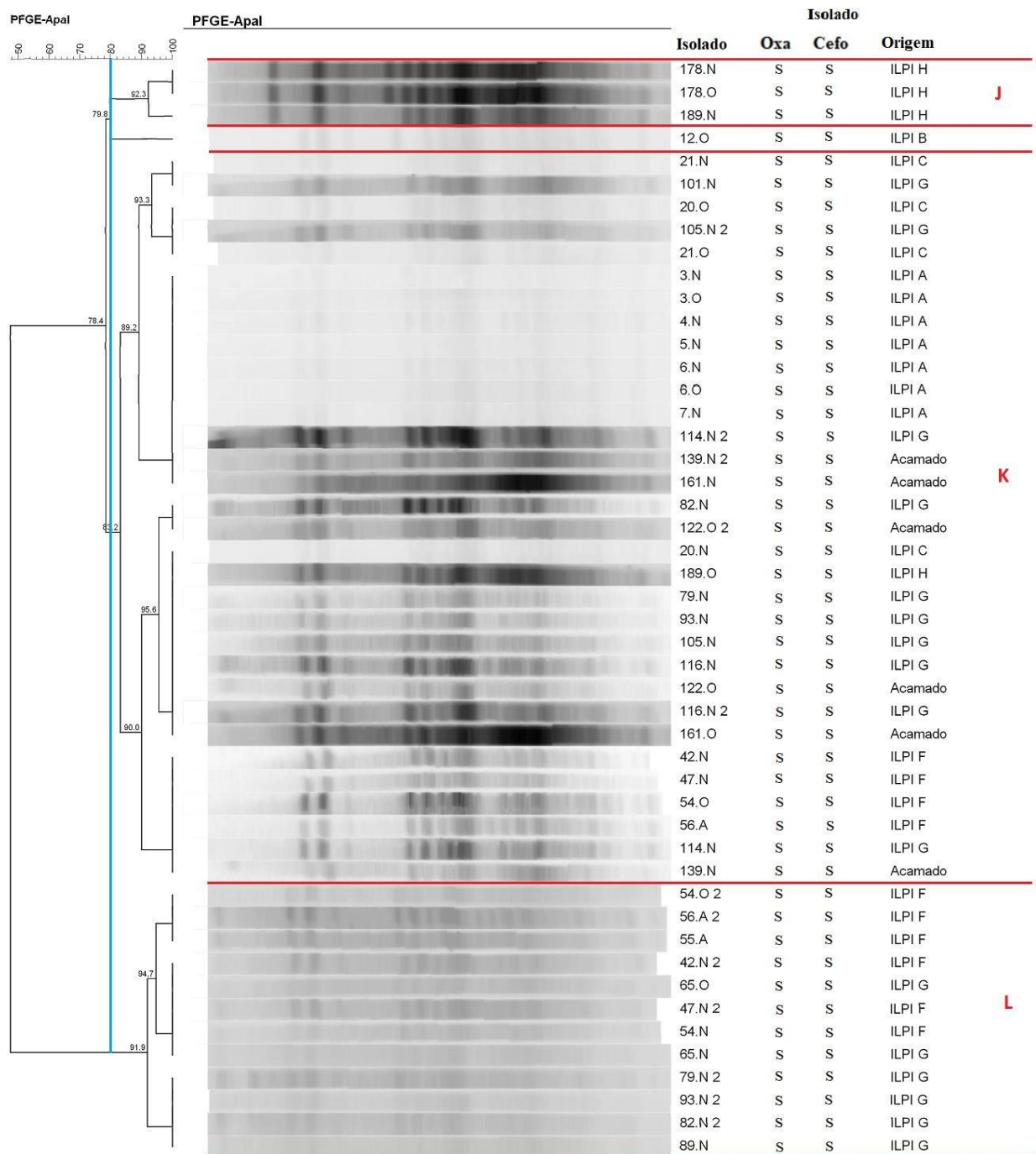
Quanto aos isolados sensíveis, 55 foram analisados pela técnica de PFGE. A digestão pela enzima *SmaI* revelou a presença de três *clusters* sendo o *cluster G* isolados de um mesmo indivíduo da ILPI E (38.O e 38.A), o *cluster H* com isolados de indivíduos acamados (138.N, 138.O e 162.O) e o *cluster I* com isolados de indivíduos da ILPI G e H (86.A e 186.O) (Figura 6).



Nota: N: mucosa nasal. O: mucosa orofaríngea. A: mucosa retal. Oxa: oxacilina. Cefo: cefoxitina. S: sensível. ILPI: instituição de longa permanência para idoso.

Figura 6: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*SmaI* de isolados de MSSA provenientes de indivíduos acamados em domicílio ou de Instituição de Longa Permanência.

A maioria dos isolados sensíveis só foram digeridos pela enzima *Apal* revelando também a presença de três *clusters* com um grande número de isolados. O *cluster J* agrupou isolados de indivíduos da ILPI H (178.N, 178.O e 189.N). O *cluster K* foi o maior agrupamento encontrado com isolados de diversas origens variando em diferentes ILPIs e indivíduos acamados. O *cluster L* agrupou isolados das ILPIs F e G (Figura 7).

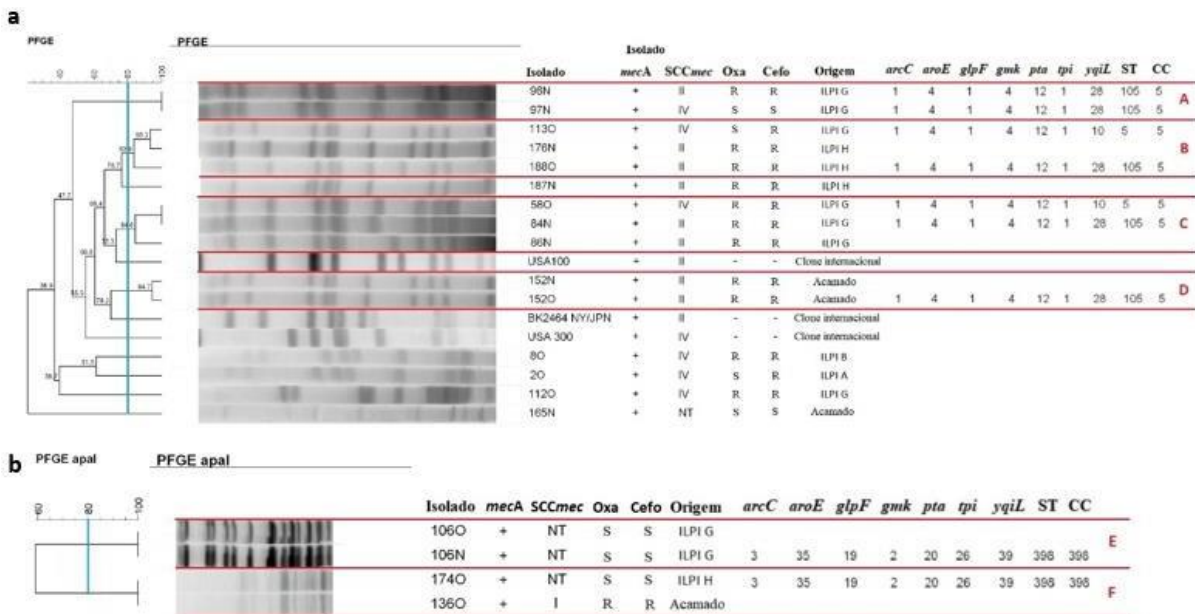


Nota: N: mucosa nasal. O: mucosa orofaríngea. A: mucosa retal. Oxa: oxacilina. Cefo: cefoxitina. S: sensível. ILPI: instituição de longa permanência para idoso.

Figura 7: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-ApaI de isolados de MSSA provenientes de indivíduos acamados em domicílio ou de Instituição de Longa Permanência.

Tipagem molecular dos MRSA pela técnica de Multilocus Sequence Typing (MLST)

Dentre os *clusters* dos MRSA encontrados pela técnica de PFGE foram selecionadas nove linhagens para a tipagem do perfil alélico pela técnica de MLST. Cinco linhagens foram identificadas como ST105, duas como ST5 e duas linhagens como ST398 (Figura 8).



Nota. I=Isolados resistentes que agruparam com > 80% de similaridade (*clusters* A, B, C, D, E e F) através da digestão com a enzima de restrição *SmaI* (a) e *ApaI* (b). N: mucosa nasal. O: mucosa orofaríngea. *arcC*: gene carbamato quinase. *aroE*: gene desidrogenase do chiquimato. *glpF*: glicerol quinase. *gmk*: guanilato quinase. *pta*: fosfato acetiltransferase. *tpi*: triose-fosfato isomerase. *yqiL*: acetil coenzima A. ST: *sequence types*. CC: Complexo clonal.

Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*SmaI* e PFGE-*ApaI* de isolados de MRSA de indivíduos acamados ou institucionalizados e os *sequence types* (ST) obtidos pela técnica de MLST.

Análise do potencial patogênico dos isolados MRSA agrupados pelas técnicas de PFGE e MLST

Os isolados MRSA dos indivíduos institucionalizados ou acamados que formaram seis *clusters* pelo PFGE, sendo quatro deles pela digestão com a enzima *SmaI* (A, B, C e D) e dois pela enzima *ApaI* (E e F) apresentaram o gene *icaD*, porém, em cada *cluster*, com exceção do *cluster* E, houve um isolado que não apresentou o gene *icaA*. Já o gene *hla* foi observado em quase todos os isolados, exceto em um isolado do *cluster* F e o gene *hld* exceto no *cluster* E e em um isolado

do *cluster* D. Os genes das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec-1*) e da toxina 1 da síndrome choque tóxico (*tst*) não estavam presentes em nenhum isolado que agrupou em *clusters*.

Pelo menos uma linhagem de cada *cluster* foi submetida à tipagem molecular pelo MLST, revelando prevalência do ST105-II (n=4), sendo possível ainda, observar o ST105-IV (n=1) e ST5-IV (n=2). Nos dois isolados caracterizados como ST398 não foi possível tipar o SCC*mec* pelo protocolo utilizado (Tabela 8).

Tabela 8. Perfil de virulência dos *Clusters* de MRSA provenientes de indivíduos institucionalizados ou acamados tipados por PFGE e MLST.

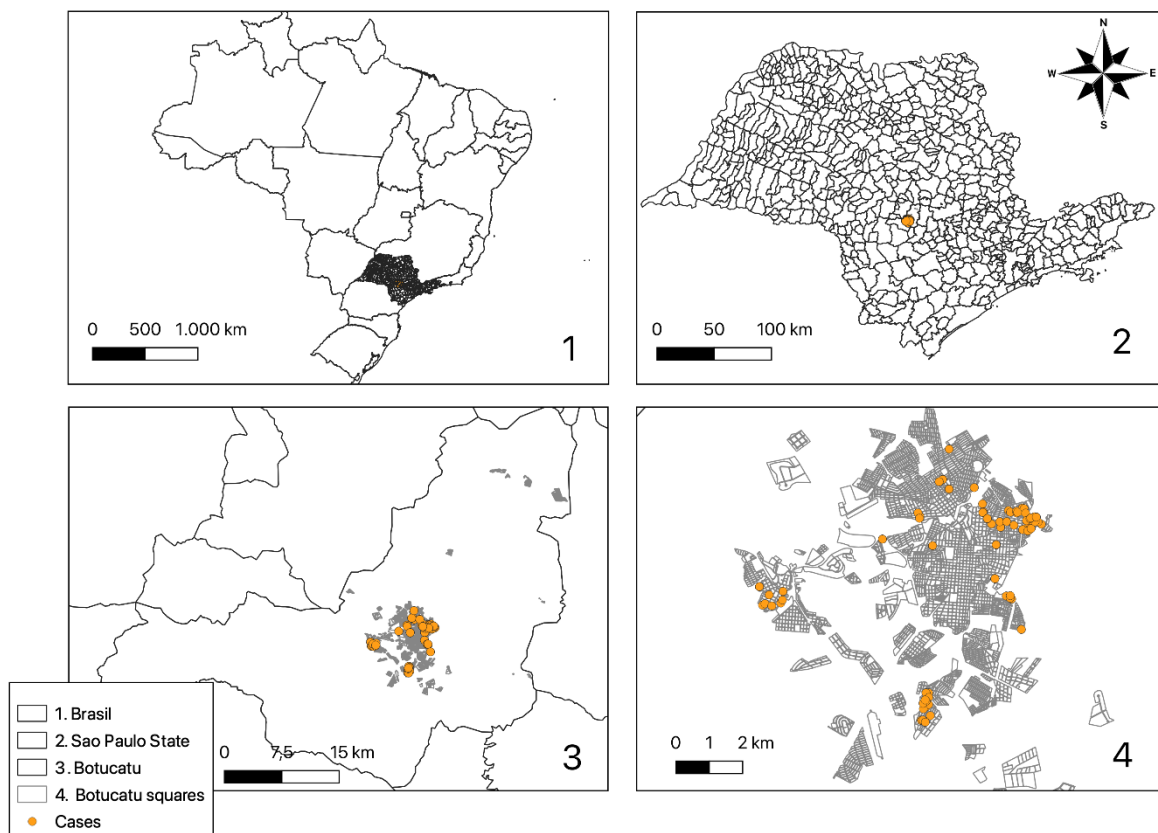
PFGE	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	Origem	Tipo de SCC <i>mec</i>	ST	Genes de virulência
Cluster A	96N	+	ILPI (G)	II	105	<i>icaADB, hld, hld</i>
	97N	+	ILPI (G)	IV	105	<i>icaDB, hla, hld</i>
Cluster B	113O	+	ILPI (G)	IV	5	<i>icaADBC, hla, hld</i>
	176N	+	ILPI (H)	II	-	<i>icaADB, hla, hld</i>
	188O	+	ILPI (H)	II	105	<i>icaD, hla, hld</i>
Cluster C	58O	+	ILPI (G)	IV	5	<i>icaD, hla, hld</i>
	84N	+	ILPI (G)	II	105	<i>icaADB, hla, hld</i>
	86N	+	ILPI (G)	II	-	<i>icaADB, hla, hld</i>
Cluster D	152N	+	Acamado	II	-	<i>icaDB, hla, hld</i>
	152O	+	Acamado	II	105	<i>icaDB, hla, hld</i>
Cluster E	106N	+	ILPI (G)	nt	398	<i>icaADB, hla,</i>
	106O	+	ILPI (G)	nt	-	<i>icaADB, hla</i>
Cluster F	174O	+	ILPI (H)	nt	398	<i>icaADB, hla, hld</i>
	136O	+	Acamado	I	-	<i>icaD</i>

Nota. PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, MLST: *Multilocus Sequence Typing*, ST: *Sequence Types*, ILPI: Instituição de longa permanência para idosos. Isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) baseados na detecção do gene *mecA* agrupados por PFGE com > 80% de similaridade. *Cluster A*: SCC*mec* hospitalar (II) e comunitário (IV), ambos tipados por MLST como ST105. *Cluster B* e *C*: Presença de SCC*mec* tipo IV tipado como ST5 e SCC*mec* tipo II tipado como ST105. *Cluster D*: SCC*mec* tipo II tipados como ST 105. *Cluster E*: presença de SCC*mec* tipo I e outro não tipado pela metodologia utilizada identificado pelo MLST como ST398. *Cluster F*: SCC*mec* não tipado com ST398. N: mucosa nasal. O: mucosa orofaríngea. *icaA/icaD*: genes codificando para formação de biofilme. *hla*: gene da hemolisina alfa. *hld*: gene da hemolisina delta.

Análise da distribuição espacial pelo Georreferenciamento

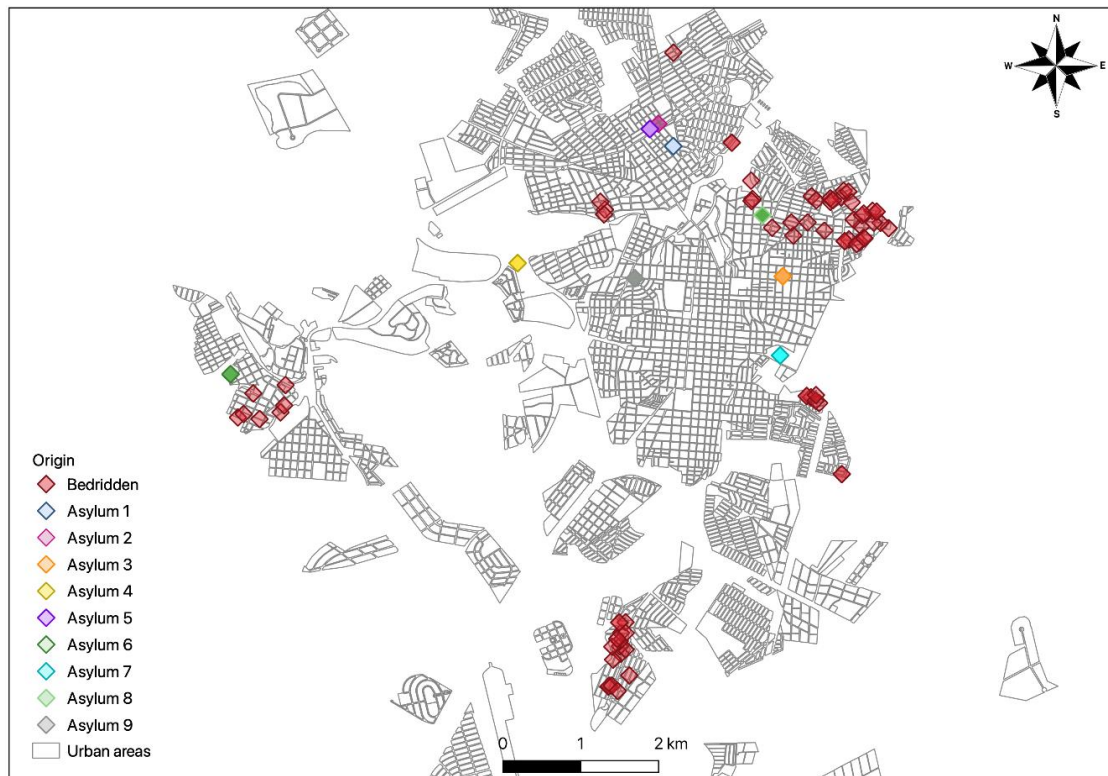
Foi realizado o georreferenciamento dos domicílios e das ILPIs da área urbana de Botucatu incluídas no estudo (Figura 9 e 10). Para efeitos desta análise, levou-se em conta a positividade para *S. aureus* (Figura 11) ou MRSA (Figura 12) e distribuição do SCCmec (Figura 13). Além disso, foram realizados mapas de calor (mapas de Kernel) (Figuras 14 e 15).

Observamos que embora *S. aureus* tenham sido isolados de indivíduos de diferentes localidades, houve certas regiões do município que apresentaram maior densidade (Jd. Peabiru, Jd Cristina, Jd. Brasil). O pico de densidade observado corresponde a ILPI G (Jd. São Vicente) que possui um porte grande de indivíduos institucionalizados. Além disso, essas localidades foram as únicas que apresentaram positividade para MRSA. Áreas do distrito de Rubião Junior também mostraram certa densidade para *S. aureus* porém inferior se comparadas com as mencionadas anteriormente e nenhum relato de MRSA.



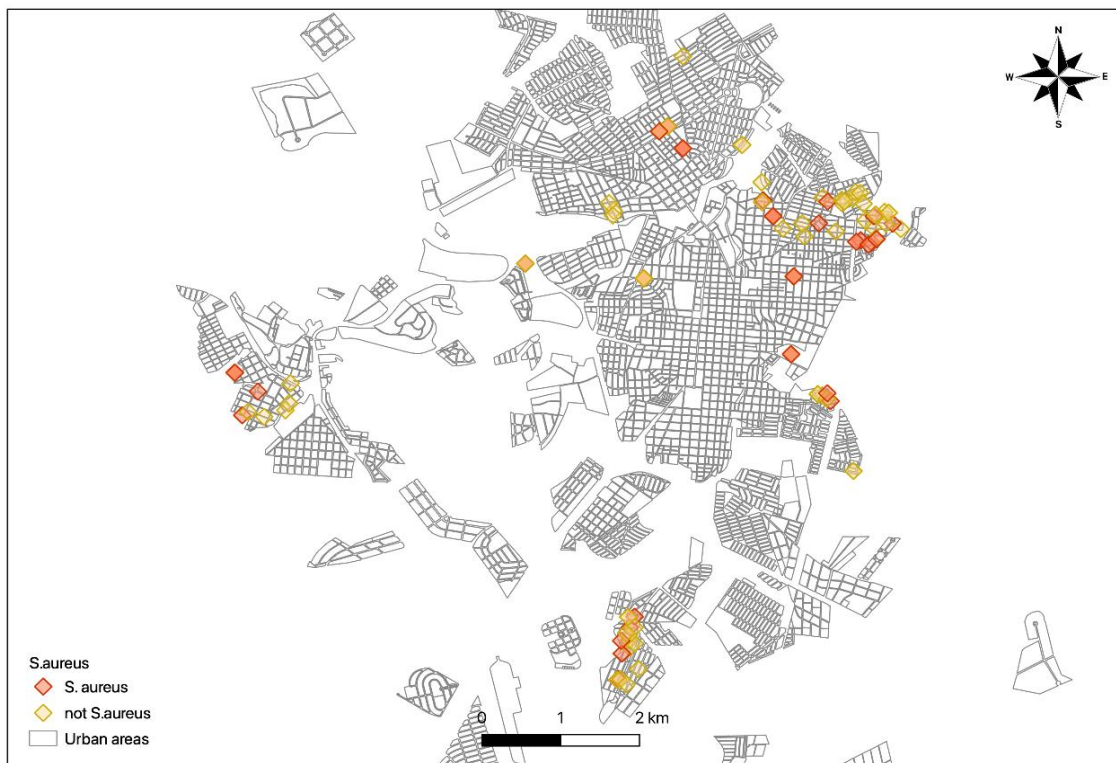
Nota. Locais de coleta (Laranja).

Figura 9 – Distribuição dos locais coletados



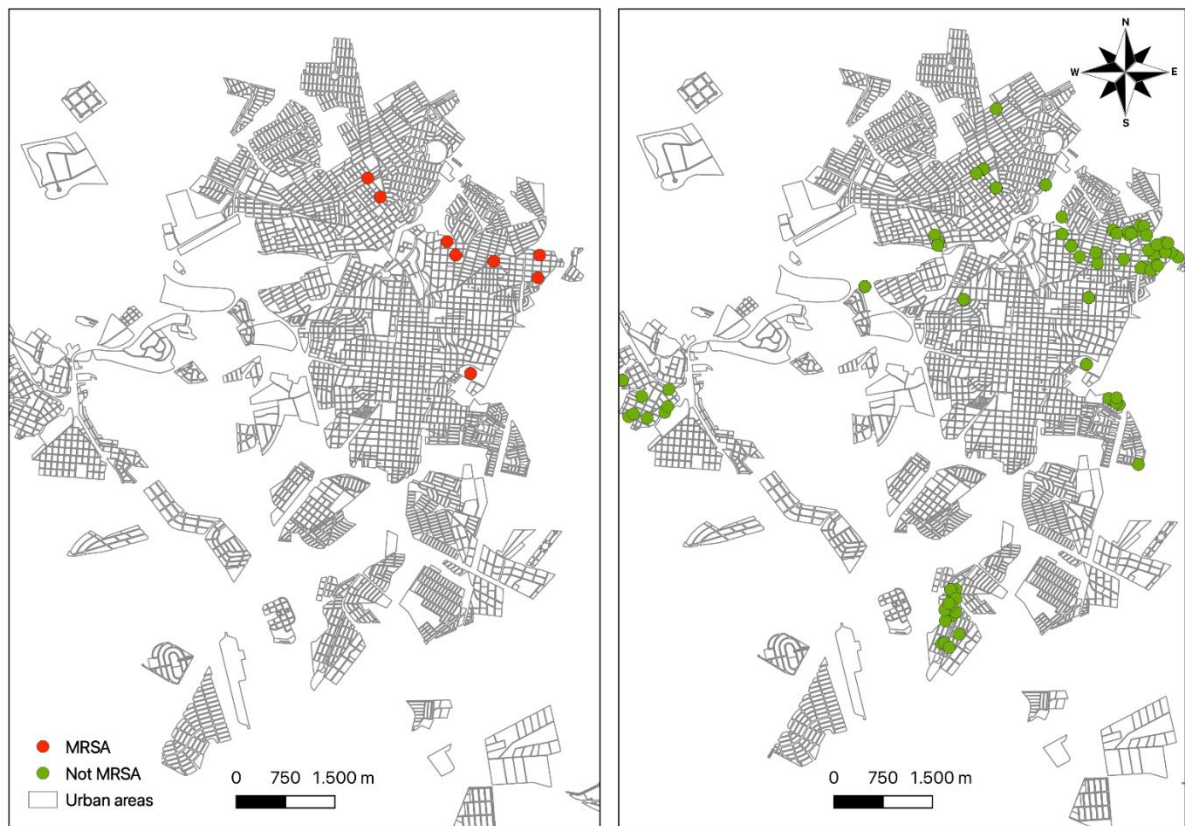
Nota. Acamados (vermelho), ILIPA (azul), ILIP B (rosa), ILIP C (laranja), ILIP D (amarelo), ILIP E (roxo), ILIP F (verde forte), ILIP G (ciano), ILIP H (verde fraco) e ILIPI I (cinza).

Figura 10 – Distribuição das Instituições e dos domicílios visitados.

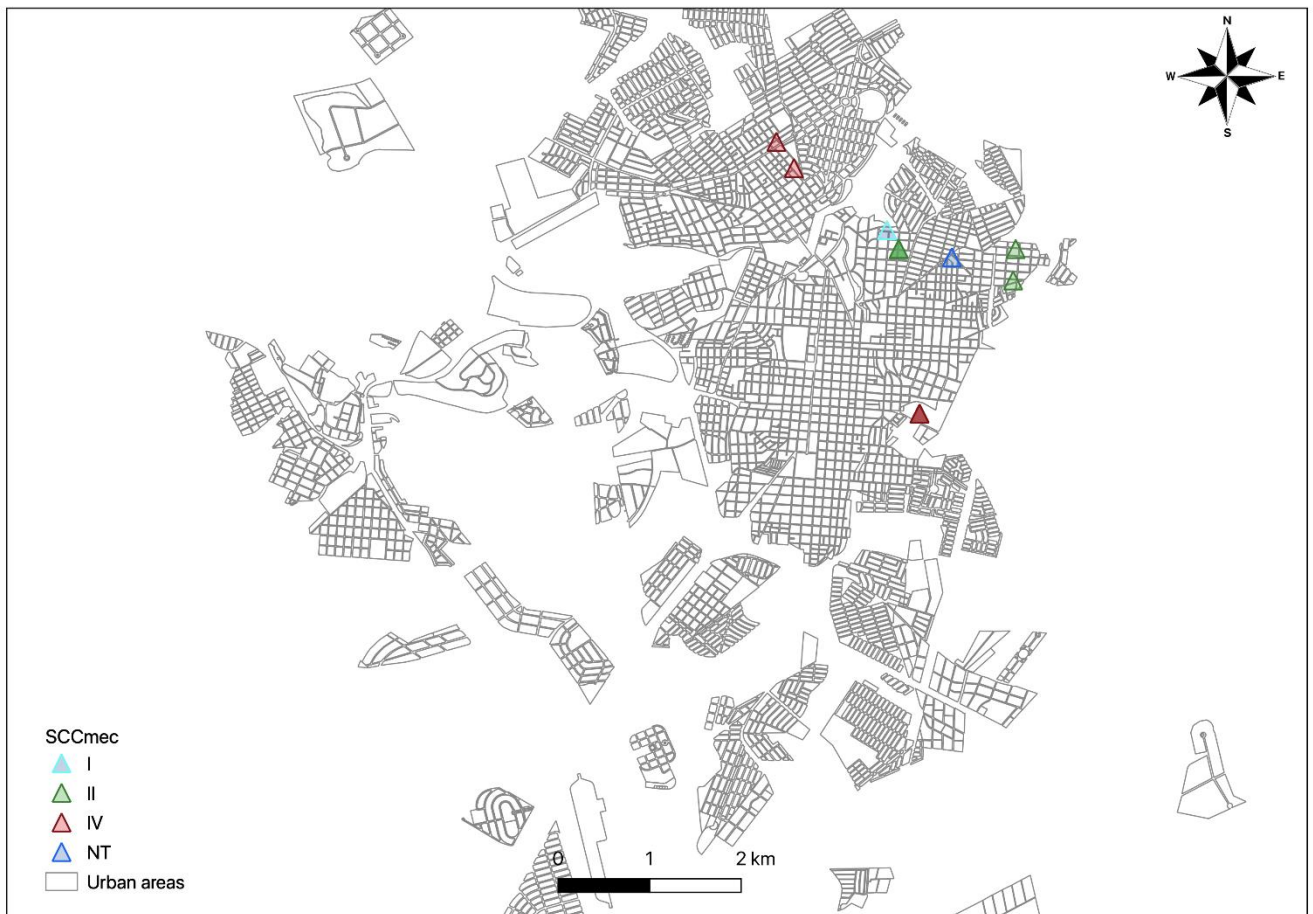


Nota. Indivíduos não colonizados (amarelo) e colonizados (Laranja) por *S. aureus*

Figura 11 – Distribuição de *S. aureus*

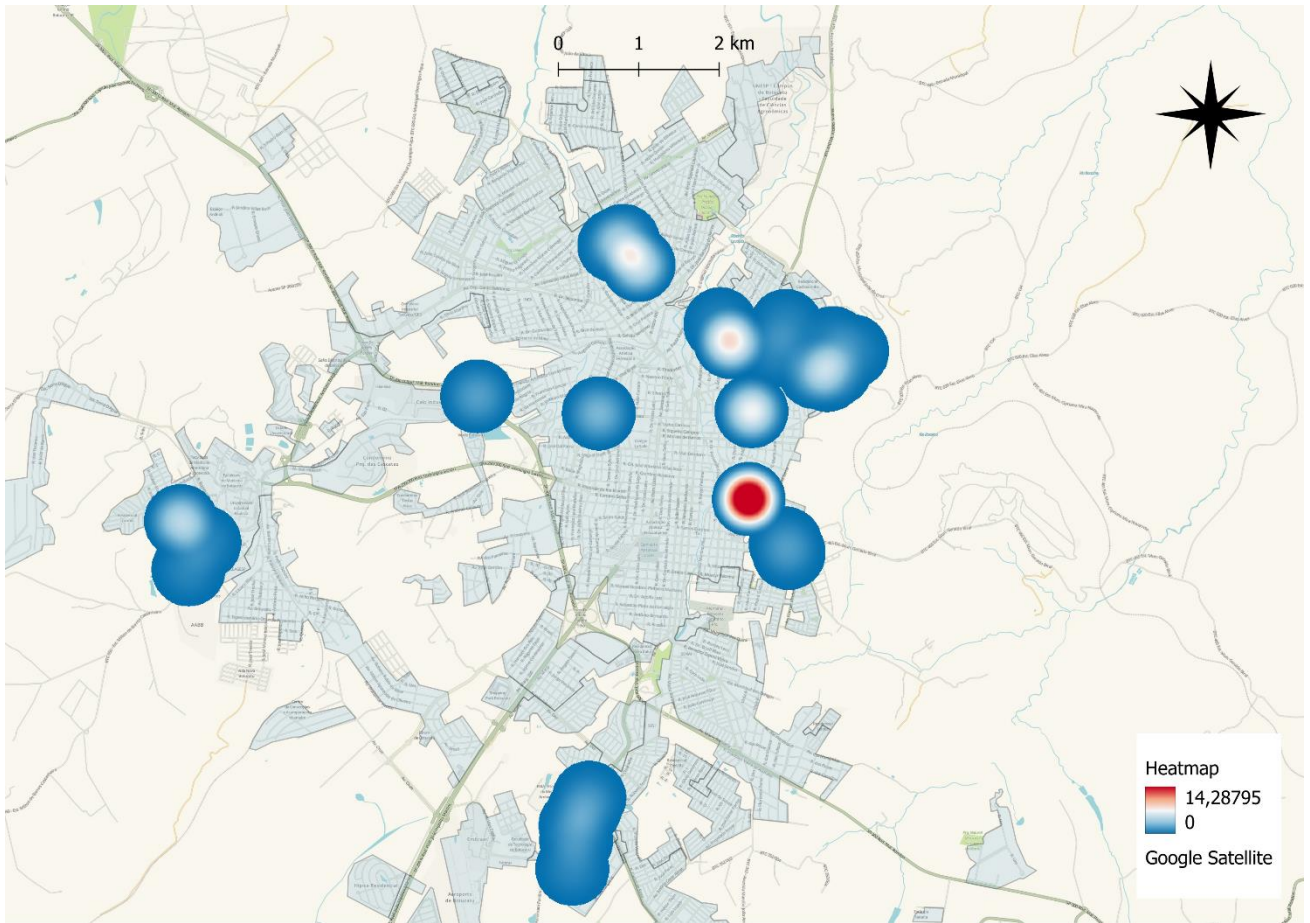


Nota. Ausência de MRSA (verde) e colonizados por MRSA (Vermelho).
Figura 12 – Distribuição de MRSA.



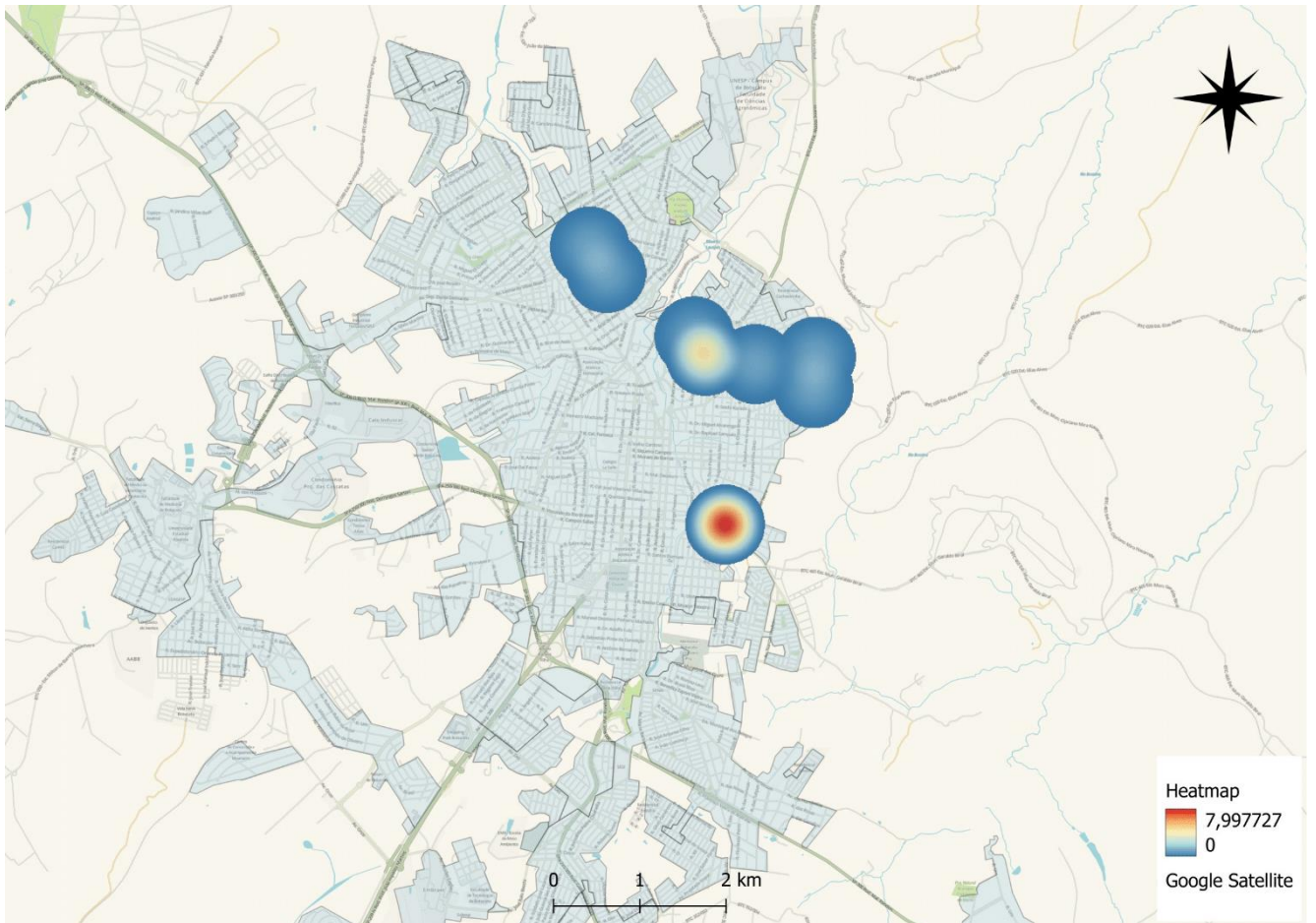
Nota. SCCmec I (ciano), SCCmec II (verde), SCCmec IV (vermelho) e SCCmec não tipado (azul).

Figura 13 – Distribuição de SCCmec.



Nota. Mapa de calor (Kernel) com escala de cor indicando menor densidade (tons frios) e maior densidade (tons quentes)

Figura 14 – Densidade dos indivíduos colonizados por *S. aureus*



Nota. Mapa de calor (Kernel) com escala de cor indicando menor densidade (tons vermelhos) e maior densidade (tons azuis)

Figura 15 – Densidade dos indivíduos colonizados por *MRSA*

Discussão

S. aureus coloniza de forma assintomática diferentes locais do corpo em indivíduos saudáveis servindo como um reservatório do patógeno e aumentando as chances de infecção. Vários clones distintos estão em circulação em diferentes países e regiões⁴⁰. Essa colonização pode ser transitória ou permanente¹. E a presença de biofilme influencia diretamente nisso.

No estudo verificamos que 12 (60%) dos 20 MRSA apresentaram aderência em superfície abiótica, com prevalência observada para o gene *icaA* de 55% e para o gene *icaD* de 100%. Em um estudo com isolados clínicos de MRSA foi descrito uma prevalência de gene *icaA* de 69.8% e gene *icaD* de 65.1%⁴¹. Ambos são fatores essenciais para o processo de adesão intracelular, e, portanto, exercem papel fundamental na formação da multicamada do biofilme, sendo esse fator de extrema importância para colonização e persistência do microrganismo, permitindo a evasão do sistema imune e proteção contra ação de antimicrobianos^{42,43}. Na formação do biofilme, para formar as camadas bacterianas, as células vão se ligando umas às outras através do PIA, uma molécula polissacarídica que favorece a adesão entre as células. O PIA é sintetizado a partir de UDP-N-acetilglicosamina por uma enzima N-acetilglicosaminatransferase, a qual é codificada pelo locus de adesão intercelular (*ica*), em particular pelo *icaA*. A expressão única deste gene induz uma baixa atividade enzimática produzindo baixa quantidade do polissacarídeo. Entretanto, a expressão simultânea dos genes *icaA* e *icaD* promovem um aumento significativo da N-acetilglicosaminatransferase, que atua formando oligômeros com 10-20 resíduos aproximadamente de β -1,6-N-acetilglicosamina^{44,45}. Foi demonstrado que o gene *icaD* sozinho não induz atividade enzimática de transferase, enquanto o gene *icaA* isolado induz pouca atividade. Entretanto, quando os genes *icaA* e *icaD* são expressos conjuntamente, a atividade enzimática da transferase é aumentada, formando maior quantidade de PIA. Outra possibilidade proposta é que a proteína transcrita por *icaA*, uma proteína transmembrana que contém aproximadamente 412 aminoácidos, necessita de *icaD* para obter uma conformação ativa⁴⁶.

Estudos descrevem uma proteína, denominada SasX, responsável pela adesão a mucosa nasal, evasão do sistema imune e virulência em isolados de MRSA em países asiáticos. Segundo Li et al.²⁵ essa proteína está envolvida com infecções de pele e quadros pulmonares graves. Diferente de outros estudos^{25,47,48} apenas um

isolado sensível apresentou resultado positivo na pesquisa para o gene *sasX* sugerindo que cepas de MSSA também possam carrear esse fator de virulência.

A prevalência dos genes que codificam as hemolisinas alfa e delta em *S. aureus* se mostrou elevada, com detecção do gene *hla* em 93,8% e do gene *hld* em 90,7%, respectivamente. Já em MRSA *hla* foi encontrado em 95% e *hld* em 85%. Em estudo de Souza et al⁴⁹ foi verificada uma prevalência de 100% para ambas as hemolisinas nos isolados de *S. aureus* provenientes de casas de repouso.

As hemolisinas estão entre os principais fatores de virulência na patogênese de *S. aureus*, tendo papel na disseminação do microrganismo por promover a lise de hemácias, leucócitos e fibroblastos através da formação de poros nas membranas das células alvo^{50,51}. Em estudo recente, Bonesso et al⁵² confirmaram o papel crucial da alfa hemolisina em infecções pulmonares associadas à ventilação mecânica causadas por *S. aureus* produtores dessa citotoxina, não somente em MRSA, mas também em MSSA. Esse dado reforça a ideia de que isolados de MSSA carreando fatores de virulência podem causar infecções tão graves e de difícil tratamento, como as causadas por MRSA.

Em contraste com outros estudos conduzidos na mesma região, não foi encontrado nenhum isolado carreando o gene da Leucocidina de Panton Valentine (*pvl*)^{53,54,55}. A PVL é uma leucotoxina bicomponente formadora de poros com a habilidade de lisar leucócitos e é codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*. Sua apresentação clínica em humanos é a infecção severa de pele e tecidos moles e/ou pneumonia necrotizante⁵⁶. Souza et al⁴⁹, trabalhando com isolados de *S. aureus* de diferentes origens, notaram a presença de isolados positivos para *pvl* apenas em pacientes dermatológicos com infecção primária ou secundária.

O estudo revelou também que 2,1% dos isolados (um MSSA e um MRSA) carreavam o gene da enterotoxina A, 1% dos isolados o gene da enterotoxina B e nenhum isolado apresentou o gene da enterotoxina C. Apenas um isolado MRSA apresentou apenas o gene toxina A. Um estudo global realizado com isolados de MRSA provenientes de diferentes continentes observou-se uma prevalência de 0% nos isolados da França, Austrália e Oceania em relação as enterotoxinas A, B e C, porém nos USA a prevalência foi de 79%, 28% e 69% respectivamente⁵⁷, indicando grande variação.

Segundo estudos publicados anteriormente, a prevalência dos genes *eta* e *etb* varia de 0,5% a 3% entre isolados de MSSA, sendo que em isolados de MRSA, essa prevalência gira em torno de 10%⁸⁶. Em nosso estudo não foi encontrando nenhum isolado carregando o gene *eta* ou gene *etb*, o que contrasta com o relato de Post et al⁵⁸ que demonstraram presença importante dos genes *eta* (13%) e *etb* (17%) em isolados clínicos de *S. aureus*.

MRSA com resistências intermediárias a vancomicina apareceram primeiro no Japão em 1996 e com resistência completa em 2002 nos Estados Unidos. A conversão das cepas sensíveis à resistentes ocorre por mutações espontâneas que conferem amplas alterações fenotípicas como mudanças na carga da membrana, biossíntese da parede celular, espessamento da parede celular, formação de biofilme e modulação da evasão imune, virulência e autólise⁶². No estudo, um isolado de MRSA e um de MSSA apresentaram CIM de 1,5 µg/mL para vancomicina e, segundo alguns autores, essa CIM pode apresentar um potencial risco terapêutico⁵⁹⁻⁶¹. Uma exposição prolongada à vancomicina pode favorecer o crescimento e surgimento de população homogênea de *Staphylococcus aureus* vancomicina intermediários (VISA)⁶².

Não foi verificado a presença de *S. argenteus* na população estudada. Esta população por ficar confinada nas residências ou nas instituições de longa permanência parece ainda não ter sofrido exposição a esta nova espécie. Estudo recente publicado em janeiro de 2023 relatou quatro isolados de *S. argenteus* de infecções em humanos, um isolado de secreção de mastite em São Paulo e um isolado de hemocultura em Porto Alegre, ambos de infecção relacionada à assistência à saúde⁶³. Os outros dois isolados identificados foram de hemocultura e de abscesso cutâneo de infecção adquirida na comunidade na cidade de São Paulo. Este estudo é o primeiro relato de *S. argenteus* causando infecções adquiridas na comunidade e nosocomiais na América do Sul⁶³.

Quanto à tipagem por PFGE dos MRSA foi possível verificar a formação de seis clusters. A ILPI G mostrou isolados em quatro deles (clusters A, B, C e E) com nove (45%) dos 20 MRSA encontrados no estudo. Estudos demonstram que a equipe de enfermagem tem um risco aumentado de colonização por MRSA⁶⁴. Este fato pode também contribuir para a transmissão cruzada verificada dentro desta instituição, visto que ela contava com um maior grupo de profissionais para cuidar de seus residentes institucionalizados. Os resultados do PFGE também mostraram a

formação de um cluster com MRSA isolado da ILPI G e MRSA isolado da ILPI H, indicando disseminação de MRSA entre diferentes instituições. A tipagem dos MRSA também mostrou similaridade entre um MRSA isolado de acamado e de MRSA isolado da ILPI H. Os reservatórios de clones bem sucedidos presentes na comunidade facilitam a disseminação, colocando a população sob risco aumentado de infecção³⁵. Silveira et al⁶⁵ também encontraram a formação de clusters que indicam a disseminação de linhagens entre as ILPI's.

A tipagem dos MSSA por PFGE também revelou a formação de clusters entre os isolados das ILPI G e H. Porém, a grande maioria dos isolados tiveram que ser tipados pela enzima *ApaI* e resultaram na formação de três clusters, com dois deles apresentando muitos isolados e de origens diferentes, entre diferentes ILPIs e também diferentes indivíduos acamados.

Os MRSA tipados pela enzima *ApaI* foram identificados no MLST como a linhagem ST398. Isolados pertencentes a essas linhagens não são digeridas pela enzima *SmaI*, resultado de um sistema de restrição/metilação do DNA ainda desconhecido no gênero *Staphylococcus* spp. No entanto, é possível digerir essas amostras utilizando a enzima *ApaI*^{66,67}. Entre os MSSA foi possível identificar 39 isolados, não tipáveis pela técnica de PFGE convencional (restrição com *SmaI*) que agruparam após a digestão com a enzima de restrição *ApaI*. A habilidade de criar variantes genéticas é crucial para sobrevivência de *S. aureus*, e esse mecanismo está relacionado a transferência horizontal de genes que permite a rápida adaptação a novos sítios ecológicos⁶⁸.

A linhagem ST398 tem sido relacionada à infecção e colonização em seres humanos e animais de companhia, como cão, cavalo e suínos em muitos países ao redor do mundo⁶⁹, sendo denominada *livestock-associated S. aureus*. ST398 foi descrito pela primeira vez tanto em MSSA quanto MRSA em criadores de suínos na França^{65,66} e, desde então, essa linhagem se disseminou rapidamente para outros animais e tem sido cada vez mais relacionada a infecções, não só em trabalhadores rurais, como em pessoas e animais sem fatores de risco⁷⁰. Essa linhagem de *S. aureus* mesmo sensível à oxacilina está associada com infecções graves, conforme relatado por Bonesso et al⁵² em estudo com pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica, em que a maioria evoluiu para óbito.

Além do ST398, foi possível observar um elevado número de isolados de MRSA isolados pertencentes ao complexo clonal 5 (CC5). Presente nesse complexo

clonal, o ST5-II apresentou uma rápida expansão e subsequente proliferação, assim como o SLV ST105-II⁷¹. Um exemplo do impacto desse CC é Portugal, que conta com uma das maiores taxas de prevalência de MRSA da Europa (54.3%), e em sua maioria devido a disseminação de clone como o ST5-II, além disso, o ST105-II já corresponde a aproximadamente 20% dos MRSA hospitalares do país⁷². Um estudo realizado em casas de repouso na Califórnia também encontrou esses ST como prevalentes⁷³.

A presença de MRSA identificados como ST398 nesses indivíduos acamados ou institucionalizados revela a importância desse estudo. A linhagem ST398 é tipicamente relacionada à animais rurais tanto em isolados resistentes (MRSA) quanto sensíveis (MSSA) e estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa encontrou apenas os MSSA ST398 relacionados à disseminação entre seres humanos⁵⁵. Bonesso et al⁵⁵ trabalhando com isolados de pacientes que utilizavam ventilação mecânica hospitalizados na unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital das clínicas da UNESP de Botucatu, relataram que pacientes colonizados por esta linhagem desenvolveram pneumonia com elevada taxa de mortalidade. Assim como em estudo de Bonesso et al⁵⁵, todos os ST 398 identificados apresentaram o gene da citotoxina alfa (*hla*), além dos genes *hld* e *icaAD* indicando alto potencial patogênico dessas linhagens, bem como a resistência à meticilina encontrada em ST398 isolados em nosso estudo.

Quanto ao georreferenciamento, observamos a presença de *S. aureus* com maior densidade nas regiões Nordeste e Leste da cidade. Em estudo realizado no mesmo município, Pereira-Franchi et al⁷⁴ verificaram maior densidade de *S. aureus* isolados de feridas crônicas de pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde (UBSs) nas regiões Leste e Sul, correspondentes às áreas das UBSs Cecap, Jd. Iolanda e Cohab I. Em ambos os estudos as áreas mais densas também registraram isolados MRSA, algo que não foi verificado por Souza et al⁵⁴, em estudo no mesmo município de da relação clonal e virulência de *S. aureus* isolados de pacientes vivendo com hiv/aids e seus familiares, onde os casos de MRSA identificados ocorreram independentemente das zonas de maior densidade de *S. aureus*.

Monitorar a disseminação de *S. aureus* e MRSA se faz necessário para que cepas patogênicas não causem infecções mais graves e de difícil tratamento. Podemos citar a descolonização como estratégia para ser empregada numa possível

intervenção. Dentre os principais métodos utilizados para isso está a aplicação de uma pomada antimicrobiana no nariz (mupirocina) e o uso de um sabonete antisséptico na pele (gluconato de clorexidina)⁷⁵. Entretanto, a descolonização se mostra eficaz apenas em um curto período de tempo, pois os pacientes tendem a ser recolonizados com *S. aureus* dentro de semanas ou meses após serem descolonizados e tratamentos muito prolongados pode levar a resistência aos agentes colonizantes⁷⁶.

Conclusão

S. aureus parece ser um organismo muito adaptável, prosperando em ambientes únicos, com o constante surgimento de novas cepas causando diversos tipos de doenças e apresentando rápida disseminação epidemiológica e/ou resposta às intervenções, resultando em significativo impacto nos cuidados de saúde.

O perfil de virulência de clones majoritários de MRSA e MSSA, demonstrado pela presença de genes codificadores das hemolisinas e genes relacionados à produção de biofilme demonstram o elevado potencial patogênico de *S. aureus* carregados pelos acamados e institucionalizados, sugerindo que a colonização com essas cepas resistentes e virulentas pode implicar em maior persistência e disseminação, bem como a possibilidade de evoluir para infecções mais graves e de maior dificuldade de tratamento. O georreferenciamento da distribuição de *S. aureus* e MRSA indica as regiões Nordeste e Leste da cidade como os picos de distribuição mais elevados e poderão ser alvos prioritários de intervenção.

Embora *S. argenteus* não tenha sido encontrado na população estudada, a pesquisa pela espécie deve continuar sendo incentivada para sua melhor compreensão. A identificação de *S. aureus* ST398 na população estudada mostra que há uma mudança na epidemiologia de *S. aureus*, podendo trazer desafios clínicos, portanto, precisa ser monitorada com atenção.

Referências

01 – Jaradat ZW, Ababneh QO, Sha'aban ST, Alkofahi AA, Assaleh D, Al Shara A. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and public fomites: a review. *Pathog Glob Health*. 2020 Dec;114(8):426-450. doi: 10.1080/20477724.2020.1824112. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33115375; PMCID: PMC7759291.

02 – Chen H, Zhang J, He Y, Lv Z, Liang Z, Chen J, Li P, Liu J, Yang H, Tao A, Liu X. Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases. *Toxins (Basel)*. 2022 Jul 6;14(7):464. doi: 10.3390/toxins14070464. PMID: 35878202; PMCID: PMC9318596.

03 – Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688. PMID: 33522395; PMCID: PMC7872022.

04 – Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, Molle V. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins (Basel)*. 2021 Sep 23;13(10):677. doi: 10.3390/toxins13100677. PMID: 34678970; PMCID: PMC8540901.

05 – Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr*. 2019 Apr 5;7(2):10.1128/microbiolspec. GPP3-0031-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. PMID: 30953424; PMCID: PMC6452892.

06 – Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020 Aug 12;84(3):e00026-19. doi: 10.1128/MMBR.00026-19. PMID: 32792334; PMCID: PMC7430342.

07 – Yu L, Hisatsune J, Hayashi I, Tatsukawa N, Sato'o Y, Mizumachi E, Kato F, Hirakawa H, Pier GB, Sugai M. A Novel Repressor of the *ica* Locus Discovered in Clinically Isolated Super- Biofilm-Elaborating *Staphylococcus aureus*. *mBio*. 2017 Jan 31;8(1):e02282-16. doi: 10.1128/mBio.02282-16. PMID: 28143981; PMCID: PMC5285506.

08 – Shoaib M, Aqib AI, Muzammil I, Majeed N, Bhutta ZA, Kulyar MF, Fatima M, Zaheer CF, Muneer A, Murtaza M, Kashif M, Shafqat F, Pu W. MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. *Front Microbiol*. 2023 Jan 10;13:1067284. doi: 10.3389/fmicb.2022.1067284. PMID: 36704547; PMCID: PMC9871788.

09 – Abdullahi IN, Lozano C, Ruiz-Ripa L, Fernández-Fernández R, Zarazaga M, Torres C. Ecology and Genetic Lineages of Nasal *Staphylococcus aureus* and MRSA Carriage in Healthy Persons with or without Animal-Related Occupational Risks of Colonization: A Review of Global Reports. *Pathogens*. 2021 Aug 8;10(8):1000. doi: 10.3390/pathogens10081000. PMID: 34451464; PMCID: PMC8400700.

10 – Raafat D, Mrochen DM, Al'Sholui F, Heuser E, Ryll R, Pritchett-Corning KR, Jacob J, Walther B, Matuschka FR, Richter D, Westerhüs U, Pikula J, van den Brandt J, Nicklas W, Monecke S, Strommenger B, van Alen S, Becker K, Ulrich RG, Holtfreter S. Molecular Epidemiology of Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Wild, Captive and Laboratory Rats: Effect of Habitat on the Nasal *S. aureus* Population. *Toxins (Basel)*. 2020 Jan 24;12(2):80. doi: 10.3390/toxins12020080. PMID: 31991690; PMCID: PMC7076793.

11 – Busche T, Hillion M, Van Loi V, Berg D, Walther B, Semmler T, Strommenger B, Witte W, Cuny C, Mellmann A, Holmes MA, Kalinowski J, Adrian L, Bernhardt J, Antelmann H. Comparative Secretome Analyses of Human and Zoonotic *Staphylococcus aureus* Isolates CC8, CC22, and CC398. *Mol Cell Proteomics*. 2018 Dec;17(12):2412-2433. doi: 10.1074/mcp.RA118.001036. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30201737; PMCID: PMC6283302.

12 – Silva V, Capelo JL, Igrejas G, Poeta P. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Lineages in Wild Animals in Europe: A Review. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Mar 14;9(3):122. doi:10.3390/antibiotics9030122. PMID: 32183272; PMCID: PMC7148531.

13 – Zhang DF, Zhi XY, Zhang J, Paoli GC, Cui Y, Shi C, Shi X. Preliminary comparative genomics revealed pathogenic potential and international spread of *Staphylococcus argenteus*. *BMC Genomics*. 2017 Oct 23;18(1):808. doi: 10.1186/s12864-017-4149-9. PMID: 29058585; PMCID: PMC5651615.

14 – Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Hirose M, Ike M, Ito M, Kobayashi N. Distribution of Virulence Factors and Resistance Determinants in Three Genotypes of *Staphylococcus argenteus* Clinical Isolates in Japan. *Pathogens*. 2021 Feb 3;10(2):163. doi: 10.3390/pathogens10020163. PMID: 33546443; PMCID: PMC7913748.

15 – Witteveen S, Hendrickx APA, de Haan A, Notermans DW, Landman F, van Santen- Verheuvél MG, de Greeff SC, Kuijper EJ, van Maarseveen NM, Vainio S, Schouls LM. Genetic Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus argenteus* Isolates Collected in the Dutch National MRSA Surveillance from 2008 to 2021. *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5):e0103522. doi: 10.1128/spectrum.01035-22. Epub 2022 Aug 25. PMID: 36005448; PMCID: PMC9603934.

16 – Goswami C, Fox S, Holden M, Leanord A, Evans TJ. Genomic Analysis of Global *Staphylococcus argenteus* Strains Reveals Distinct Lineages With Differing Virulence and Antibiotic Resistance Gene Content. *Front Microbiol.* 2021 Dec 2;12:795173. doi: 10.3389/fmicb.2021.795173. PMID: 34925305; PMCID: PMC8677677.

17 – Jiang B, You B, Tan L, Yu S, Li H, Bai G, Li S, Rao X, Xie Z, Shi X, Peng Y, Hu X. Clinical *Staphylococcus argenteus* Develops to Small Colony Variants to Promote Persistent Infection. *Front Microbiol.* 2018 Jun 27;9:1347. doi: 10.3389/fmicb.2018.01347. PMID: 30013523; PMCID: PMC6036243.

18 – Chantratita N, Wikraiphath C, Tandhavanant S, Wongsuvan G, Ariyaprasert P, Suntornsut P, Thaipadungpanit J, Teerawattanasook N, Jutrakul Y, Srisurat N, Chaimanee P, Anukunananchai J, Phiphitaporn S, Srisamang P, Chetchotisakd P, West TE, Peacock SJ. Comparison of community-onset *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus aureus* sepsis in Thailand: a prospective multicentre observational study. *Clin Microbiol Infect.* 2016 May;22(5):458.e11-9. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.008. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26806258; PMCID: PMC4898209.

19 – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage]. Panorama do município de Botucatu, SP [Accessed November 10, 2018]. Available at: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/botucatu/panorama>.

20 – Konemann EW, Allen SD, Dowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: *Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido*. 5th ed. Rio de Janeiro: Medsi. (2001).

21 – Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 36(3). 618–23 (1998).

22 – Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Tenth Edition (M02-A10). CLSI, 2009.

- 23 – Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd Edition (M100S). CLSI, 2023.
- 24 – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Versão 13, EUCAST versão BrCAST 15-03-2023.
- 25 – Li M, Du X, Villaruz AE, Diep BA, Qang D, Song Y et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nature Med.* 2012, 18(5): 816-20.
- 26 – Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassari L, Montanaro L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. Wiley Periodicals. 2005.
- 27 – Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2001; 183(9):2888-2896.
- 28 – Vandecasteele et al. Expression of Biofilm-Associated Genes and In Vivo Foreign Body Infections. *J Infect Dis.* 2003; 188:730–7
- 29 – Marconi C, Cunha MLRS, Araújo JP, Rugolo LMSS. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus* spp. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 2004;11(2):117-128
- 30 – Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RA, Araújo JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz J Micr.* 2006; 37: 64-69

- 31 – Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of 61 genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29(3):426-30
- 32 – Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):594-600
- 33 – Koning S, van Belkum A, Snijders S, van Leeuwen W, Verbrugh H, Nouwen J, et al. Severity of nonbullous *Staphylococcus aureus* impetigo in children is associated with strains harboring genetic markers for exfoliative toxin B, Panton-Valentine leukocidin, and the multidrug resistance plasmid pSK41. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3017-21
- 34 – Zhang DF, Xu X, Song Q, Bai Y, Zhang Y, Song M, Shi C, Shi X. Identification of *Staphylococcus argenteus* in Eastern China based on a nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene. *Future Microbiol.* 2016 Sep;11:1113-21. doi: 10.2217/fmb-2016-0017. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27561462.
- 35 – Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985 Dec;22(6):996-1006. doi: 10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985. PMID: 3905855; PMCID: PMC271866.
- 36 – Oliveira A, Cunha MLRS. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes.* 2010 Oct 14;3:260. doi: 10.1186/1756-0500-3-260. PMID: 20946672; PMCID: PMC2973941.

37 – McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol. 2003;41(11):5113-20.

38 – Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 38(3), 1008-1015 (2000).

39 – Silva LP, Fortaleza CMCB, Teixeira NB, Silva LTP, de Angelis CD, Ribeiro de Souza da Cunha ML. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and MRSA in Bedridden Patients and Residents of Long-Term Care Facilities. Antibiotics (Basel). 2022 Nov 1;11(11):1526. doi: 10.3390/antibiotics11111526. PMID: 36358181; PMCID: PMC9686811.

40 – He WP, Gu FF, Zhang J, Li XX, Xiao SZ, Zeng Q, Ni YX, Han LZ. Molecular characteristics and risk factor analysis of *Staphylococcus aureus* colonization put insight into CC1 colonization in three nursing homes in Shanghai. PLoS One. 2021 Oct 7;16(10):e0253858. doi: 10.1371/journal.pone.0253858. PMID: 34618818; PMCID: PMC8496869.

41 – Haddad O, Merghni A, Elargoubi A, Rhim H, Kadri Y, Mastouri M. Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. BMC Infect Dis. 2018;18(1):560. Published 2018 Nov 13. doi:10.1186/s12879-018-3457-2.

42 – Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. J Pathog. 2011, 1-13

43 – Oliveira A, Pereira VC, Pinheiro L, Riboli DFM, Martins KB, cunha MLRS. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase- Negative staphylococci. Int. J. Mol. Sci. 17: 1423, 2016

44 – Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322: 207-28.

45 – McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(12):1551-1571.

46 – Mack D, Riedewald J, Rohde H, Magnus T, Feucht HH, Elsner HA, et al. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect Immun*. 1999;67(2):1004-8.

47 – Liu Q, Du X, Hong X, Li T, Zheng B, He L, Wang Y, Otto M, Li M. 2015. Targeting surface protein SasX by active and passive vaccination to reduce *Staphylococcus aureus* colonization and infection. *Infect Immun* 83:2168 –2174. doi:10.1128/IAI.02951-14.

48 – Nakaminami H, Ito T, Han X, Ito A, Matsuo M, Uehara Y, Baba T, Hiramatsu K, Noguchi N. First report of sasX-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *FEMS Microbiology Letters*, 364, 2017, fnx171. doi: 10.1093/femsle/fnx171

49 – de Souza CS, Fortaleza CM, Witzel CL, et al. Toxigenic profile of methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* isolated from special groups. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016; 15:9. Published 2016 Feb 16. doi:10.1186/s12941-016-0125-5

50 – Kocsis E, Lagler H, Pesti N, Stich K, Kristóf K, Nagy K, et al. Comparison of Austrian, Hungarian and Macedonian methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains in relation to prevalence of cytotoxin genes. *Microb Pathog* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Jan 17];46(6):328–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366626>.

51 – Waryah CB, Gogoi-tiwari J, Wells K, Eto KY, Masoumi E, Costantino P, et al. Diversity of Virulence Factors Associated with West Australian Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates of Human Origin. 2016;2016.

52 – Bonesso MF, et al. Key role of α -toxin in fatal pneumonia caused by sequence type 398. Amer J Respirat and Critl Care Med.193, 217-220 (2016).

53 – Abraão LM. Carreamento nasal/oral de *Staphylococcus aureus* em populações indígenas do norte e sudeste do brasil: resistência antimicrobiana, virulência, fatores de risco e epidemiologia molecular. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, 2017.

54 – Souza, CSM. Determinação da relação clonal e virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes vivendo com HIV/AIDS e seus familiares. Tese (Doutorado). Programa de Pós- Graduação em Doenças Tropicais, 2018.

55 – Bonesso MF, Marques SA, Camargo CH, Fortaleza CMCB, Cunha MLRS. Community- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in non-outbreak skin infections. Braz J Microbiol. 2014; 45:1401–7.

56 – Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of panton–valentine leukocidin. Lab Invest. 2007;87(1):3–9. doi:10.1038/labinvest.3700501.

57 – Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. 2003;9(8):978-984. doi:10.3201/eid0908.030089.

58 – Post V, Wahl P, Uçkay I, Ochsner P, Zimmerli, W, Corvec S, Loiez C, Richards RG, Moriarty F. Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. Int. J. Med. Microbiol. 2014, 304, 565–576.

59 – Soriano A, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 46,193-200 (2008).

60 – Howden BP, et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin Infect Dis.* 38, 521-528 (2004).

61 – Yeg, YC, et al. Impact of vancomycin MIC creep on patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Microbiol Immunol Inf.* 45, 214-220 (2012).

62 – Li G, Walker MJ, De Oliveira DMP. Vancomycin Resistance in *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms.* 2022 Dec 21;11(1):24. doi: 10.3390/microorganisms11010024. PMID: 36677316; PMCID: PMC9866002.

63 – Rocha Balzan LDL, Rossato AM, Riche CVW, Cantarelli VV, D'Azevedo PA, Valério de Lima A, Rodrigues B, França E Silva ILA, Dias CAG, Sampaio JLM. *Staphylococcus argenteus* Infections, Brazil. *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 14;11(1):e0117922. doi: 10.1128/spectrum.01179-22. Epub 2023 Jan 23. PMID: 36688721; PMCID: PMC9927369.

64 – Dulon M, Peters C, Schablon A, Nienhaus A. MRSA carriage among healthcare workers in non-outbreak settings in Europe and the United States: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2014;14:363. Published 2014 Jul 3. doi:10.1186/1471-2334-14-363.

65 – da Silveira M, da Cunha MLRS, de Souza CSM, Correa AAF, Fortaleza CMCB. Nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among elderly living in nursing homes in Brazil: risk factors and molecular epidemiology. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2018 May 4;17(1):18. doi: 10.1186/s12941-018-0271-z. PMID: 29728115; PMCID: PMC5934845.

66 – Bens CCPM, Voss A, Klaassen CHW. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. J Clin Microbiol.44(5),1875-1876 (2006).

67 – Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. Emerg Infect Dis.13(2), 255-258 (2007).

68 – Witzel CL, Fortaleza CM, de Souza CS, Riboli DF, Cunha MLRS. Nasopharyngeal carriage of *Staphylococcus aureus* among imprisoned males from Brazil without exposure to healthcare: risk factors and molecular characterization. Ann Clin Microbiol Antimicrob.13, 1-6 (2014).

69 – Camoez M, et al. Prevalence and Molecular Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 resistant to tetracycline at a Spanish hospital over 12 years. Plos One. 8(9), 1-6 (2013).

70 – Chung M, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed- field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. Microb Drug Resist. 6, 189–198 (2000).

71 – Challagundla L, Reyes J, Rafiqullah I, et al. Phylogenomic Classification and the Evolution of Clonal Complex 5 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Western Hemisphere. Front Microbiol. 2018; 9:1901. Published 2018 Aug 22. doi:10.3389/fmicb.2018.01901

72 – Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev. 2018;31(4): e00020-18. Published 2018 Sep 12. doi:10.1128/CMR.00020-18

73 – Hudson LO, Reynolds C, Spratt BG, et al. Diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from residents of 26 nursing homes in Orange County, California. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3788-3795. doi:10.1128/JCM.01708-13

74 - Pereira-Franchi EPL. Epidemiologia molecular e estudo dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de feridas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu. [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2016.

75 – Knox J, Uhlemann AC, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends Microbiol.* 2015 Jul;23(7):437-44. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.007. Epub 2015 Apr 9. PMID: 25864883; PMCID: PMC4490959.

76 – Septimus EJ, Schweizer ML. Decolonization in Prevention of Health Care-Associated Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Apr;29(2):201-22. doi: 10.1128/CMR.00049-15. PMID: 26817630; PMCID: PMC4786886.

7. ANEXOS

Anexo I – cálculo amostral

Foi selecionada amostra representativa, baseada nos seguintes parâmetros:

- Tamanho da população (para o fator de correção da população finita ou fcp) (N): 350
- Frequência % hipotética do fator do resultado na população (p): 33% +/- 5
- Limites de confiança como % de 100 (absoluto +/-%) (d): 5%
- Efeito de desenho (para inquéritos em grupo-EDFF): 1
- Equação: $n = [EDFF * Np(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$
- Tamanho da amostra (Intervalo de confiança 95%): 173

*Anexo II – Questionário***QUESTIONÁRIO**

Nome: _____ Gênero: _____ Idade: _____

Casa de Repouso (S/N): _____

Tempo de institucionalização (meses): _____ Tempo de restrição ao leito (meses): _____

Co-morbidades/Charlson score

- 1 - () IAM () ICC () Doença vascular periférica
 () Demência () DPOC () Doença do tecido conjuntivo
 () Úlcera péptica () Hepatopatia leve
 () Doença cerebrovascular () Diabetes

- 2 - () Hemiplegia () Doença renal moderada/severa
 () Neoplasia maligna () Leucemia () Linfoma
 () Diabetes com dano de órgão

- 3 - () Doença hepática moderada/severa

- 4 - () AIDS () Tumor sólido metastático

Score de Charlson: _____

Outras co-morbidades:

Demência senil? (S/N): _____

Karnofsky: _____

Internações em hospitais no último ano:

Hospital	Data Entrada	Data Saída	Motivo

Uso de antimicrobianos no último ano

Antimicrobiano	Data início	Data fim	Motivo

Cirurgias e procedimentos invasivos no último ano

Procedimento	Data	Motivo

Outras informações de interesse:

Anexo III – TCLE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 466/2012**

CONVIDO, o Senhor (a) _____ responsável pelo paciente _____ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado "EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* EM PACIENTES ACAMADOS EM DOMICÍLIO OU VIVENDO EM INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SP." E do subprojeto "PREVALÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS EM PACIENTES ACAMADOS EM DOMICÍLIO OU VIVENDO EM INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SP.", que será desenvolvido por mim, Lucas Porangaba Silva, aluno regularmente matriculado no Programa de Pós-graduação (Mestrado) em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP e pela Patrícia Kelly Silvestre aluna regularmente matriculada no programa de Pós-graduação (Doutorado) em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, com orientação da Professora Dr.^a Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

Algumas pessoas podem carregar em suas narinas, na garganta e ânus bactérias chamadas estafilococo e/ou bacilos Gram-negativos. Essas bactérias podem migrar de um local para outro e ocasionar infecções graves, dentre elas, infecção da corrente sanguínea, infecção do trato urinário, infecções intestinais, infecções de pele e pneumonia. Nosso estudo tem o objetivo de verificar se essas bactérias são comuns nas pessoas que vivem em casas de repouso ou são acamadas. Para isso, faremos um exame, que consiste em passar uma espécie de "cotonete" nos locais de coleta. Esse exame não causa dor. A partir dele, saberemos se existem ou não as bactérias, e também se elas são ou não resistentes a antibióticos.

Além disso, o (a) Senhor (a) responderá um questionário que levará uns 15 minutos de duração e que nos ajudarão a identificar os fatores que aumentam a chance de adquirir essa bactéria.

As informações serão complementadas com consulta ao prontuário da casa de repouso e/ou do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (quando necessário). Solicito também seu consentimento para consultar este prontuário médico para coletar outras informações lá contidas como (Tempo de institucionalização; Co-morbidades; Dispositivos invasivos; Internações recentes; Doenças infecciosas; Uso de antimicrobianos) referentes a consultas feitas anteriormente pelo (a) Senhor (a).

Os benefícios serão para os futuros pacientes visto que no Brasil há uma carência de estudos relacionados à colonização e infecção por esta bactéria na comunidade. Este trabalho poderá servir de apoio para a compreensão da epidemiologia da colonização e infecção, pois avaliará a prevalência e os fatores associados.

Informo que a participação do paciente neste estudo é voluntária e que mesmo após o senhor ter dado o consentimento para que o mesmo participe da pesquisa, o senhor poderá retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior - Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, **CONCORDO** na qualidade de "Representante Legal" do paciente acima mencionado, **SUA PARTICIPAÇÃO** de forma voluntária, estando ciente que todos os seus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador

Representante Legal pelo Participante da Pesquisa

Nome: Lucas Porangaba Silva

Endereço: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu

Telefone: 14 - 3880-0429/ 14 - 98811-9636

Email: lucas-porangaba@hotmail.com

Nome: Patrícia Kelly Silvestre

Endereço: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu

Telefone: 14 - 3880-0429/ 14 - 998557180

Email: pakesil@yahoo.com.br

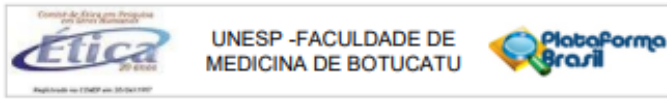
Nome: Dr.^a Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Endereço: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu

Telefone: 14 - 3880-0428

Email: cunhamlr@ibb.unesp.br

Anexo IV – Parecer do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de virulência e georeferenciamento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus argenteus* isolados de indivíduos acamados em domicílio ou vivendo em instituições de longa permanência para idosos

Pesquisador: LUCAS PORANGABA SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 43255121.5.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.919.998

Apresentação do Projeto:

Trata o presente projeto de avaliar perfil de virulência de *staphylococcus aureus* e *argenteus* em indivíduos acamados ou vivendo em instituições de longa permanência, tendo ficado pendente para esclarecimentos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as respostas às pendências solicitadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

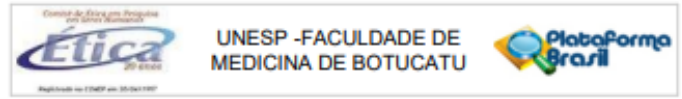
Já avaliados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Referente às pendências, o pesquisador esclarece:

Pendência 1: Apresentar termo de biorepositório do projeto aprovado CAAE: 68268017.9.0000.5411 - que finalizou em 12/2018. Ou primeiro regularizar o biorepositório do projeto aprovado junto à PB -para depois apresentar. para este projeto.

Resposta à pendência 1: O documento solicitado foi anexado na plataforma.



Continuação do Parecer: 4.919.998

Pendência 1: Apresentar termo de biorepositório do projeto aprovado CAAE: 68268017.9.0000.5411 - que finalizou em 12/2018. Ou primeiro regularizar o biorepositório do projeto aprovado junto à PB -para depois apresentar. para este projeto.

Resposta à pendência 1: O documento solicitado foi anexado na plataforma.

Pendência 3: Qual local de execução da pesquisa? há anuência? apresentar ou esclarecer.

Resposta à pendência 3: A pesquisa será realizada no Laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências/UNESP-Botucatu. A anuência já foi assinada pelo chefe do departamento e pelo diretor do Instituto e foi anexada na plataforma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi solicitado aplicação do TCLE mas o pesquisador esclarece a questão de pacientes serem difíceis de contactar novamente por conta de óbito, residência na zona rural, dentre outros fatores. Esclarece que nenhuma informação dos pacientes será utilizada.

Recomendações:

Apresentar Relatório Final de Atividades após o término da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais e critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 19/08/2021, o Projeto de Pesquisa encontra-se APROVADO.

O Projeto de Pesquisa deverá ser iniciado após aprovação do CEP.

Após a execução da Pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Endereço: Chácara Bulgroli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br

Endereço: Chácara Bulgroli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br