

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E CONSERVAÇÃO

MARIANA CANTUÁRIA WALDMANN BRASIL

DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADAS DE AREIA DE PRAIAS DO LITORAL SUL DE MACAÉ

MACAÉ

2022

MARIANA CANTUÁRIA WALDMANN BRASIL

**DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADAS DE AREIA DE PRAIAS DO LITORAL SUL DE MACAÉ**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, do Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Gizele Duarte Garcia.
Coorientador: Prof^ª Dr^ª Fernanda Sampaio Cavalcante.

MACAÉ

2022

CIP - Catalogação na Publicação

C233d Cantuária Waldmann Brasil, Mariana
DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
Staphylococcus spp. ISOLADAS DE AREIA DE PRAIAS DO
LITORAL SUL DE MACAÉ / Mariana Cantuária Waldmann
Brasil. -- Rio de Janeiro, 2022.
82 f.

Orientadora: Gizele Duarte Garcia Duarte Garcia.
Coorientadora: Fernanda Sampaio Cavalcante.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Biodiversidade e
Sustentabilidade, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais e Conservação, 2022.

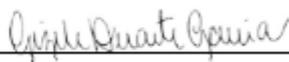
1. Diversidade antimicrobiana. 2. Resistência
antimicrobiana. 3. Staphylococcus spp.. I. Duarte
Garcia, Gizele Duarte Garcia, orient. II. Sampaio
Cavalcante, Fernanda, coorient. III. Título.

Mariana Cantuária Waldmann Brasil

DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADAS DE AREIA DE PRAIAS DO LITORAL SUL DE MACAÉ

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:



Prof.^a Dr.^a Gizele Duarte Garcia,
Centro Multidisciplinar Macaé - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Diogo Antonio Tschoeke
Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dr.^a Eidy de Oliveira Santos
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dr.^a Tamara Rocha Lopes de Oliveira
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dedico esta dissertação à minha amiga, Ma. Jacilene de Souza Mesquita, sem a qual eu não teria conseguido iniciar, conduzir e finalizar este trabalho. Mulher de consideração e imensa bondade ao próximo. Que desde o primeiro dia em que trabalhamos juntas, buscou me compreender e auxiliar com sua calma, sabedoria e experiência. Me acompanhou durante meu crescimento profissional e pessoal, estando presente em uma das piores situações da minha caminhada, mais uma vez me acolhendo com todo carinho. Espero que com essa dedicatória, Jaci, eu tenha conseguido mostrar a ti o quanto você foi e é importante para mim.

Gratidão por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao universo por me sustentar até aqui, me dando todo o suporte físico e espiritual.

A toda minha família e nossa ancestralidade, agradeço por terem iniciado esse caminho ao qual dou continuidade com toda a força e essência de todos. Em especial a meus pais, Eliane Cantuária Silva e Ricardo Waldmann Brasil, que com muito empenho e dificuldade me deram a educação necessária para eu estar onde estou e pensar sempre avante.

Aos meus avós, Neide Cantuária Silva, Waldyr Lisboa da Silva e Yara Waldmann Brasil, que foram por muitas vezes o suporte dos meus pais em meus cuidados e educação. Em especial, Dona Neide, que dizia: "...o estudo é o único bem que não podem tirar de nós...".

A todos que um dia trilharam parte do caminho junto a mim e aos que ainda estão ao meu lado nesta nova etapa. Aos meus irmãos Phillip Ferreira Waldmann Brasil e Thomaz Cantuária Waldmann Brasil. Ao meu companheiro, Ângelo Arruda Azevedo, meus amigos, meus tios e tias, primos e primas, que puderam compreender minha ausência e me apoiar sempre com muito carinho. Ao meu neném, Aira, que sempre está ao meu lado enquanto estudo.

Agradeço às minhas orientadoras, Dra. Gizele Duarte Garcia e Dra. Fernanda Sampaio Cavalcante, por enxergarem em mim o que eu ainda não tinha capacidade de enxergar. Mesmo percebendo que ainda estou engatinhando, foram pacientes e me mantiveram acreditando. Gratidão!!

A todos os amigos da Praia das Pedrinhas, que me incentivaram e emprestaram seus ouvidos enquanto eu falava do meu projeto. Agradeço o incentivo, a parceria e a visão de mundo que me ajudaram a ampliar!

A todos os professores e educadores que passaram pela minha vida acadêmica, gratidão.

Por fim, a toda equipe do Laboratório de Infecção Hospitalar do Instituto de Microbiologia Paulo Góes – UFRJ, que me recebeu sempre muito bem e tornaram possível os resultados desse trabalho.

RESUMO

BRASIL, Mariana Cantuária Waldmann. Diversidade e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isoladas de areia de praias do litoral sul de Macaé – RJ. Macaé, 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Conservação) - Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2022.

Os gêneros *Staphylococcus* e *Mammalicoccus* pertencem à família Staphylococcaceae, sendo constituídos por espécies resistentes a altas concentrações de sal (NaCl), e são encontradas em humanos, animais e solo. Assim, areias de praia podem ser reservatórios desses microrganismos, incluindo cepas patogênicas multirresistentes. O presente estudo objetivou isolar e identificar *Staphylococcus* spp. em areias de praias do litoral sul de Macaé, avaliando a susceptibilidade antimicrobiana destas estirpes. As amostras foram coletadas de três praias entre setembro/2020 e janeiro/2021. Um protocolo para isolamento de *Staphylococcus* spp. a partir de areia foi elaborado e as estirpes isoladas foram identificadas por espectrometria de massas. A susceptibilidade antimicrobiana foi avaliada por disco-difusão. Os genes *mecA*, *mecC* e da leucocidina de Panton-Valentine (PVL) foram detectados por PCR. Entre 71 estirpes isoladas, 69% foram *Staphylococcus*, que foram detectados em 60% das amostras de areia. Foram encontradas as espécies *S. sciuri* e *S. epidermidis* (22,4% cada), *S. warnerii* (16,3%), *S. aureus* (12,2%), *S. saprophyticus* (10,2%) e *S. simulans* (4,1%). Maiores taxas de resistência foram detectadas para penicilina (PEN) (55,1%), oxacilina (OXA) (38,8%), eritromicina (ERI) (36,7%), sulfametoxazol-trimetoprima (STX) (26,5%), clindamicina (CLI) (24,5%) e ciprofloxacina (CIP) (20,4%). Todas as estirpes de *S. epidermidis* foram resistentes a PEN e ERI, e 72,7% delas a STX. Estirpes de *S. sciuri* foram principalmente resistentes a OXA (90%) e CLI (81,8%), estirpes de *S. aureus* foram resistentes a PEN (100%) e ERI (30%) e *S. saprophyticus* foram resistentes a OXA (100%) e STX (80%). O gene *mecA* foi encontrado em 11 (22,4%) estirpes, sendo 70% *S. epidermidis*. Os genes da PVL não foram detectados. A maioria dos *Staphylococcus* foi oriunda da praia de Cavaleiros. *S. epidermidis mecA+* foram mais isolados nas praias de Cavaleiros e Pecado, *S. saprophyticus* resistentes a STX na praia do Pecado e *S. sciuri* resistentes à CLI, na praia de Pedrinhas. Os resultados apontam uma frequência relativamente baixa de *Staphylococcus*, incluindo cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR), no litoral sul de Macaé, com prevalência de determinadas espécies estafilocócicas e perfis de resistência que podem estar refletindo o padrão da comunidade e da fauna.

Palavras-chave: Susceptibilidade; solo; múltiplas drogas.

ABSTRACT

BRASIL, Mariana Cantuária Waldmann. Diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from sand beaches of south coast of Macaé. Macaé, 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Conservação) - Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2022.

The *Staphylococcus* and *Mammalicoccus* genera belong to the Staphylococcaceae family, consisting of species resistant to high concentrations of salt (NaCl), found in humans, animals and soil. Thus, beach sands can be reservoirs of these microorganisms, including multiresistant pathogenic strains. The present study aimed to isolate and identify species of *Staphylococcus* spp. in sand from recreational beaches on the south coast of Macaé, evaluating the antimicrobial susceptibility of these strains. Sand samples were collected from three beaches between September/2020 and January/2021. A protocol for the isolation of *Staphylococcus* from sand was elaborated and the isolates were identified by mass spectrometry. Antimicrobial susceptibility was assessed by disc diffusion method. The *mecA*, *mecC* and Pantone-Valentine leukocidin (PVL) genes were detected by PCR. Among 71 isolates, 69% were *Staphylococcus*, which were detected in 60% of sand samples. Were found the follow species: *S. sciuri* and *S. epidermidis* (22.4% each), *S. warnerii* (16.3%), *S. aureus* (12.2%), *S. saprophyticus* (10.2%) and *S. simulans* (4.1%). High rates of resistance were detected for penicillin (PEN) (55.1%), oxacillin (OXA) (38.8%), erythromycin (ERI) (36.7%), trimethoprim-sulfamethoxazole (STX) (26.5 %), clindamycin (CLI) (24.5%) and ciprofloxacin (CIP) (20.4%). All strains of *S. epidermidis* were resistant to PEN and ERI, and 72.7% of them to STX. *S. sciuri* strains were mostly resistant to OXA (90%) and CLI (81.8%), *S. aureus* strains were resistant to PEN (100%) and ERI (30%) and *S. saprophyticus* were resistant to OXA (100%) and STX (80%). The *mecA* gene was found in 11 (22.4%) strains, 70% of which were *S. epidermidis*. PVL genes were not detected. Most of the *Staphylococcus* isolates were recovered from Cavaleiros beach. *S. epidermidis mecA+* were more isolated from Cavaleiros and Pecado beaches, *S. saprophyticus* resistant to STX on the Pecado beach and *S. sciuri* resistant to CLI on the Pedrinhas beach. The results indicate a relatively low frequency of *Staphylococcus*, including multi-drug resistant strains (MDR), on the south coast of Macaé, with a prevalence of certain staphylococcal species and antimicrobial profiles that may be reflecting the patterns found in community and fauna.

Keywords: Susceptibility; ground; multiple drugs.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos e habitats referenciais	17
Quadro 2	Identificação, data de coleta, local de coleta e perfil de resistência de estirpes de <i>Staphylococcus mecA+</i> isoladas de amostras de areia coletadas de praias do litoral sul de Macaé/RJ.	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Imagem de satélite dos pontos de coleta (em amarelo) de amostras de areia deste estudo. Da esquerda para direita: Pedrinhas (22°25'30.0"S 41°49'46.0"W); Cavaleiros (22°24'17.0"S 41°47'46.9"W); Pecado (22°24'40.2"S 41°48'30.6"W). Fonte:<www.google.com.br/maps/@-22.4021022,-41.8054606,9750m/data=!3m1!1e3!5m1!1e4>. Acessado em 30 de Junho de 2022. 29
- Figura 2 Imagem de satélite, com indicação dos pontos de coleta (em amarelo) de amostras de areia na Praia dos Cavaleiros. Da esquerda para a direita temos os cinco pontos de coletas, escolhidos de acordo com o fluxo de entrada, saída e permanência de banhistas. 30
- Figura 3 Imagem de drone, com indicação dos pontos de coleta (em vermelho) de amostras de areia na Praia do Pecado. Da esquerda para a direita temos os cinco pontos de coletas, escolhidos de acordo com o fluxo de entrada, saída e permanência de banhistas. 31
- Figura 4 Imagem de drone, com indicação dos pontos de coleta (em laranja) de amostras de areia na Praia das Pedrinhas. Da esquerda para a direita temos os cinco pontos de coletas, escolhidos de acordo com o fluxo de entrada, saída e permanência de banhistas. 32
- Figura 5 Modelo resumido do protocolo proposto para isolamento e identificação de espécies de *Staphylococcus*. Adaptado de GOODWIN et al; PINTO et al, 2012. 35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição das 49 estirpes isoladas das amostras de areia das praias avaliadas neste estudo.	45
Gráfico 2	Identificação em nível de espécie das 49 estirpes isoladas neste estudo.	46
Gráfico 3	Distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> em relação ao local de coleta- Macaé/RJ.	47
Gráfico 4	Distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> em relação à data de coleta.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições meteorológicas do município de Macaé nas datas em que as amostras de areia foram coletadas	33
Tabela 2	Identificação das amostras através dos scores, após a leitura no MALDI-TOF/MS (Adaptada de Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results)	37
Tabela 3	Descrição das categorias de susceptibilidade e seus respectivos pontos de corte para interpretação dos valores de halo de inibição de acordo com o <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (2022) e <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (2022) para amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> .	38
Tabela 4	Descrição das categorias de susceptibilidade e seus respectivos pontos de corte para interpretação dos valores de halo de inibição de acordo com o <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (2022) e <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (2022) para amostras de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	39
Tabela 5	Descrição das categorias de susceptibilidade e seus respectivos pontos de corte para interpretação dos valores de halo de inibição de acordo com o <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (2022) e <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (2022) para amostras de <i>Staphylococcus spp.</i> (exceto <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>).	40
Tabela 6	Perfil de resistência aos antimicrobianos das estirpes de <i>Staphylococcus spp.</i> isoladas de amostras de areia de praias do litoral sul de Macaé/RJ.	44
Tabela 7	Perfis de resistência aos antimicrobianos identificados entre 49 espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas de amostras de areia coletadas em praias do litoral sul de Macaé/RJ.	49
Tabela 8	Resistência aos antimicrobianos em estirpes estafilocócicas isoladas de areia coletadas de praias do litoral sul de Macaé/RJ, de acordo com a espécie identificada.	50
Tabela 9	Perfil microbiológico detectado em cada ponto das praias avaliadas, de acordo com a data de coleta da amostra de areia.	51
Tabela 10	Identificação, data, local de coleta e perfil de resistência de estirpes de <i>Staphylococcus mecA+</i> isoladas de amostras de areia coletadas de praias do litoral sul de Macaé/RJ.	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Gêneros <i>Staphylococcus</i> e <i>Mammaliicoccus</i>	14
1.1.1 Principais espécies de <i>Staphylococcus</i>	16
1.1.2 <i>Staphylococcus</i> resistente à meticilina	21
1.1.3 <i>Staphylococcus</i> em areias de praias	23
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Local de estudo	29
4.1.1 Praia dos Cavaleiros	30
4.1.2 Praia do Pecado	31
4.1.3 Praia das Pedrinhas	32
4.2 Coleta das amostras, enriquecimento e isolamento bacteriano	34
4.3 Caracterização das linhagens bacterianas isoladas	36
4.3.1 Identificação das espécies estafilocócicas por MALDI-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry)	36
4.3.2 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos através da técnica de difusão a partir do disco	37
4.3.3 Extração do DNA	40
4.3.4 Detecção dos genes associados à resistência à meticilina (<i>mecA</i> e <i>mecC</i>)	41
4.3.5 PCR para detecção dos genes que codificam a Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL)	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Espécies bacterianas identificadas e correlação com o local de coleta	43
5.2 Susceptibilidade antimicrobiana e correlação com o local de coleta	48
5.3 Presença dos genes <i>mecA</i> , <i>mecC</i> e <i>epvl</i> e correlação com data e local da coleta.	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gêneros *Staphylococcus* e *Mammaliicoccus*

Os gêneros *Staphylococcus* e *Mammaliicoccus* pertencem à família Staphylococcaceae, e incluem bactérias com aspecto morfo-tintorial de cocos Gram positivos, imóveis, não esporuladas, anaeróbias facultativas e com baixo teor G+C (SCHLEIFER; BELL, 2009). Os demais gêneros da família são *Albissicoccus*, *Albococcus*, *Aliicoccus*, *Auricoccus*, *Corticococcus*, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrooccus*, *Nosocomiicoccus* e *Salinicoccus* (LPSN, 2022).

O gênero *Staphylococcus* é o mais antigo da família, tendo sido descrito em 1884 (ROSENBACH, 1884; SKERMAN et al, 1980) e possui, até o momento, 85 espécies e 30 subespécies relatadas (LPSN, 2022). As células bacterianas deste gênero se agrupam em forma de cachos, possuem temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 37 °C e são tolerantes a altas concentrações de sal, multiplicando-se em ambientes com até 10% de NaCl. São resistentes a 0,04 UI de bacitracina e, em geral, produzem a enzima catalase, com exceção de *S. aureus* subespécie *anaerobius* e *S. saccharolyticus* (HOLT et al, 1994; PEACOCK, 2005; BANNERMAN; PEACOCK, 2007). A enzima catalase promove a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, o que permite diferenciá-los de outros cocos Gram positivos em testes laboratoriais (RYAN & DREW, 2010). Bactérias do gênero (ou estafilococos) *Staphylococcus* podem produzir ou não uma proteína extracelular chamada coagulase, que converte o fibrinogênio do plasma em fibrina formando um coágulo, o que divide as espécies do gênero em dois grandes grupos. Aqueles que produzem esta proteína são chamados de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e aqueles que não a produzem são os *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) (KLOOS; BANNERMAN, 1999; ARCHER, 2000).

Mammaliicoccus é o gênero mais recente da família (MADHAIYAN et al, 2020). Foi descrito a partir de sequências de genoma completo e índices gerais relacionados ao genoma (OGRIs), onde estes últimos demonstraram aumentar a resolução taxonômica dentro de uma família (CHUNet al, 2018; GUPTA et al, 2018). Os OGRIs mais comuns são, hibridização digital DNA-DNA (dDDH), identidade média de nucleotídeos (ANI), identidade média de

aminoácidos (AAI) e proteínas de assinatura conservada (CSPs). No estudo de Madhaiyan e colaboradores (2020), o valor de corte selecionado foi a AAI de 60-80% onde se observa gêneros filogeneticamente distintos, embora relacionados (LUO et al, 2014). Os autores verificaram que, analisando as espécies de *Staphylococcus*, observa-se a divisão em dois cladogramas principais. Um clado, composto por *S. sciuri*, *S. fleurettii*, *S. lentus*, *S. stepanovicii*, e *S. vitulinus*, é profundamente ramificado das demais espécies de *Staphylococcus* e é distinto dos outros gêneros dentro da família *Staphylococcaceae* (Figura 1). Compartilham de 82,6 a 97,6% (média: 86,2%) AAI uns com os outros, mas compartilham apenas de 64,2 a 67,3% (média: 65%) AAI com outras espécies de *Staphylococcus*. Da mesma forma, as espécies de *Macrococcus* compartilham entre 69,2 e 97,1% (média: 75,2%) AAI entre si, mas compartilham apenas 61,1–64,3% (média: 62,2%) AAI com as outras espécies do gênero *Staphylococcus*. Como o clado contendo *S. sciuri* está tão distante das outras espécies de *Staphylococcus* quanto no gênero *Macrococcus* está de *Staphylococcus*, os autores propuseram que este clado fosse movido para o novo gênero *Mammaliicoccus*, com *Mammaliicoccus sciuri* sendo espécie-tipo.

Sua descrição é baseada em dados anteriores e recentes (KLOOS et al, 1976; SCHLEIFER et al, 1983; VERNIZY-ROZANDE et al, 2000; MADHAIYAN et al, 2020). As células são cocos Gram positivos, imóveis, não formadores de esporos que ocorrem isoladamente, aos pares ou ainda em aglomerados irregulares. Possuem crescimento aeróbio e anaeróbio facultativo. São catalase positivo e com atividades de oxidase variável. O conteúdo de DNA G+C (% molar) varia de 31,6 a 35,7 e o tamanho do genoma varia de 2,44 a 2,81 Mbp.

Mammaliicoccus sciuri, anteriormente chamado *S. sciuri*, era considerada uma das espécies mais antigas do gênero *Staphylococcus* (KLOOS, 1976). É amplamente disseminada em diversos nichos ambientais, podendo ser encontrada no solo (FAISSAL et al, 2017; KUMAR et al, 2018), na mucosa nasal de animais selvagens (REY PÉREZ et al, 2021), em carnes suínas de varejo (NEYAZ et al, 2020; ZHENG et al, 2021) e nas mucosas traqueais e cloacais de aves tropicais (SARAIVA et al, 2021). Por exemplo, avaliando a mucosa nasal de coelhos selvagens nos Açores, Sousa e colaboradores (2020) verificaram que *S. sciuri* era uma das espécies de *Staphylococcus* mais encontradas, atrás apenas de *S. fleuretti*, atualmente classificado como *Mammaliicoccus fleuretti*. Raramente é detectado em infecções humanas (MESERVEY et al, 2019). Acredita-se que o gene *mecA*, que confere a resistência à meticilina, o antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções causadas por

Staphylococcus, tenha tido origem nesse grupo de espécies, sendo depois transferido para *S. aureus* (SARAIVA et al, 2021). Tendo em vista que o início do presente estudo se deu antes da designação do gênero *Mammaliicoccus*, as espécies remanejadas para este novo gênero serão aqui nomeadas como *Staphylococcus*.

1.1.1 Principais espécies de *Staphylococcus*

Os SCN são bactérias comuns na microbiota humana e eram considerados não patogênicos até a década de 1990, quando começaram a ser descritos como agentes causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (KLOOS; BANNERMAN, 1994; VERMONT et al, 1998). Nas últimas duas décadas, com a emergência da multirresistência aos antimicrobianos, mais atenção foi direcionada aos SCN, principalmente em ambientes hospitalares (SINGHAL et al, 2006; ABOU-WARDA et al, 2022; DARGAHI et al, 2022). Em comparação com *S. aureus*, apresentam poucos fatores de virulência, mas podem causar infecções importantes mediante situações de imunossupressão e/ou utilização de procedimentos invasivos (HERNÁNDEZ-MENESES et al, 2022; LEE et al, 2022). Além disso, algumas características são frequentes em muitas espécies do grupo, como a formação de biofilme e a aquisição de resistência a antibióticos, o que pode dificultar o tratamento dessas infecções. O quadro 1 apresenta as principais espécies de *Staphylococcus* relatadas em infecções em seres humanos e seus principais locais de ocorrência.

Quadro 1 - Principais espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos e habitats referenciais.

Espécies	Local de isolamento
<i>S. auricularis</i>	Meato auditivo externo de humano e primatas
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	Pele humana (regiões com glândulas sebáceas)
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	Primatas
<i>S. caprae</i>	Cabras, humanos (pele, unhas, mucosa nasal)
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Pele humana
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	Couro cabeludo humano, primatas, musaranhos
<i>S. epidermidis</i>	Pele humana
<i>S. haemolyticus</i>	Pele humana (região de glândulas apócrinas), primatas, artiodáctilos, cavalos
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Pele humana (região de glândulas apócrinas)
<i>S. intermedius</i>	Carnívoros, cavalos
<i>S. lugdunensis</i>	Pele humana (virilha e períneo)
<i>S. pettenkoferi</i>	Mamíferos em geral
<i>S. saccharolyticus</i>	Pele humana
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	Mucosa do trato genital e gastrointestinal de humanos, primatas, musaranhos, roedores
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	Narinas de ruminantes
<i>S. schleiferi</i>	Região pré-axilar em humanos, cães
<i>S. simulans</i>	Ruminantes, carnívoros, solo
<i>S. warnerii</i>	Pele e mucosas humanas, artiodáctilos*, cavalos, peixes
<i>S. xylosum</i>	Animais de rebanho, roedores, mamíferos, pássaros

*Mamíferos ungulados de dedos pares; Adaptado de Mathema, 2010; VANDERHAEGHEN *et al.* 2015; LEROY *et al.*, 2017.

Dentre as diversas espécies que compõem o grupo, destaca-se *Staphylococcus epidermidis*, por ser o representante mais frequentemente encontrado como agente de infecções em seres humanos (VUONG, 2002; ROGERS, 2009; DARGAHI *et al.*, 2022). A espécie faz parte do microbioma humano, sendo encontrado principalmente na pele na região das axilas, cabeça e mucosa das narinas. Acredita-se que, nesses nichos, apresente função probiótica, expressando moléculas que impedem que o hospedeiro seja colonizado por patógenos virulentos (CHESSA, GANAU, MAZZARELLO, 2015; OTTO, 2009; GLATTHARDT *et al.*, 2020). Esta bactéria utiliza a glicose para crescer em condições anaeróbias, e em condições aeróbias, usa diferentes carboidratos, como frutose, maltose, sacarose e glicerol (NANVAR *et al.*, 2014). Quando se trata de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), dentre os SCN, *S. epidermidis* possui maior potencial patogênico e é um dos principais agentes relacionados a infecções que envolvem dispositivos intravenosos, como cateteres, próteses, sondas, “shunts”, entre outros. Sua capacidade de

causar infecções está associada principalmente à formação de biofilme (CHESSA, GANAU, MAZZARELLO, 2015; NANVAR et al, 2014). Com o passar do tempo, as taxas de resistência antimicrobiana vem aumentando progressivamente nesta espécie. A maioria das estirpes isoladas de infecções hospitalares é resistente aos beta-lactâmicos e casos de cepas resistentes aos glicopeptídeos já são descritos (MONTUFAR et al, 2016; MARINCOLA et al, 2021; KRESKEN et al, 2022). Os relatos de *S. epidermidis* em ambiente e solo são muito raros (NAKULESHWAR et al, 2013), sendo uma bactéria associada a locais com grande circulação de pessoas (WANG et al, 2020).

A segunda espécie de SCN mais relacionada com infecções humanas é *Staphylococcus haemolyticus*, que é um patógeno frequentemente envolvido em septicemias, peritonites, endocardites e infecções ósseas e articulares de origem hospitalar (GIORMEZIS et al, 2014). *S. haemolyticus* sempre foi considerado uma bactéria oportunista, sem atributos significativos de virulência (CZEKAJ et al, 2015). Recentemente, no entanto, Eltwisy e colaboradores (2020) demonstraram que a espécie pode apresentar genes de adesinas, citolisinas e enterotoxinas, além de ser capaz de induzir células humanas à apoptose. Esse patógeno é conhecido por apresentar baixa susceptibilidade aos antimicrobianos, inclusive os mais recentes, como vancomicina e linezolida (GUPTA et al, 2020; BATHAVATCHALAM et al, 2020). Embora a grande maioria dos estudos sobre *S. haemolyticus* indique a presença dessas estirpes em infecções humanas, sabe-se que a espécie é causa de mastite bovina (PIESSENS et al, 2011; DANMALLAN & PINEMOV, 2019; CHUPROM et al, 2022), sendo inclusive isolada do ambiente rural, como do ar, piso e serragem de estábulos (PIESSENS et al, 2011).

Outra espécie relevante clinicamente é *Staphylococcus saprophyticus*, que é encontrado na microbiota humana especialmente na pele na região do períneo, e mucosas do reto, da uretra, do colo do útero e do trato gastrointestinal (SCHLEIFER, KLOOS, WESLEY, 1975). Faz parte da microbiota intestinal de porcos e vacas, podendo ser transferido aos seres humanos através do consumo contínuo desses alimentos (LAWAL et al, 2021). Ao contrário de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, que estão associados a infecções relacionadas à saúde, o *Staphylococcus saprophyticus* é comumente causador de infecções do trato urinário de origem comunitária (ITUs), geralmente em mulheres jovens (KLINE; LEWIS, 2016). Porém, em pacientes imunocomprometidos, idosos, grávidas, diabéticos e naqueles que utilizam cateteres permanentes, a espécie pode ser responsável por ITUs graves (EHLERS; HILLS, 2022). *S. saprophyticus* possui adesinas que são provavelmente a causa de sua capacidade de

sobrevivência no trato urinário, como a lipase por exemplo, que forma apêndices superficiais semelhantes a fímbrias, e que permitem uma forte aderência a este sítio. Esta bactéria possui, ainda, hemaglutininas que possuem propriedades adesivas e autolíticas (EHLERS, 2022). As cepas isoladas de infecções do trato urinário em geral são formadoras de biofilme e apresentam resistência aos antimicrobianos (HASHEMZADEH et al, 2020). Apesar da maioria dos estudos estarem relacionados a infecções humanas, *S.saprophyticus* já foi encontrado em outras fontes como no meio ambiente, mais precisamente em águas residuais urbanas, na Espanha (GÓMEZ et al, 2016) e em água coletada de praias da cidade do Rio de Janeiro (SOUSA et al, 2017).

S. warnerii é outro SNC comensal na superfície epitelial, mas que aparentemente possui distribuição ubíqua. No organismo humano, é encontrado em nichos variados como pele na região dos pés (WULANDARI et al, 2020), mucosa vaginal (PANT et al, 2018) e microbiota oral (SCHIERZ et al, 2021). Apesar de ter sido reconhecido como SCN de menor frequência como patógeno humano (SZEMRAJ et al, 2020), foi relatado como causa de infecções graves como endocardite, osteomielite vertebral hematogênica e meningite relacionada à derivação ventriculoperitoneal, empiema subdural e discite em pacientes imunocomprometidos (KINI et al, 2010; NOSHAK et al, 2020). Além disso, são frequentes as descrições da ocorrência de *S.warnerii* em animais selvagens (LAUKOVÁ et al, 2019), de rebanho (DOUDER et al, 2017) e peixes (MUSHARRAFIEH et al, 2014). A espécie também já foi relatada em solo contaminado por óleo (DEGTYAREVA et al, 2020) e em esgoto (AMIRSOLEIMANI et al, 2021). *S. warnerii* foi relatada com prevalência de 13% em um estudo que avaliou bactérias presentes no interior de automóveis, indicando presença de contaminação humana (STEPHENSON et al, 2014).

Algumas espécies do gênero *Staphylococcus*, embora possam ser encontradas no hospedeiro humano, são mais associadas a animais e ao meio ambiente. Por exemplo, *S.simulans* ainda é raramente encontrado como patógeno único em infecções humanas (NATSIS & COHEN, 2018; DOBRENIUC et al, 2021). No entanto, é comumente detectado em colonização de animais selvagens (SOUSA et al, 2020) e infecções veterinárias, especialmente em animais rurais como galinhas, vacas, ovelhas, cabras e cavalos (ÜNAL, 2012, VANDERHAEGHEN et al, 2015, STEPIEŃ-PYŚNIAK et al, 2017). Também já foi encontrado em amostras de solo (FAISSAL et al, 2017; KALSOOM et al, 2022). *S. simulans* produz uma proteína denominada lisostafina. Essa protease é uma glicilglicina endopeptidase, que possui atividade contra várias espécies de *Staphylococcus*, entre eles *S. epidermidis*, *S.*

haemolyticus, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, sendo capaz de clivar as ligações cruzadas de pentaglicina na parede celular destes microrganismos (BASTOS et al, 2010).

Apesar dos SCN serem mais abundantes em humanos, em animais e no ambiente, *Staphylococcus aureus*, que faz parte do grupo dos *Staphylococcus* coagulase positivo, assume maior relevância entre as espécies do gênero, por ser um dos principais agentes etiológicos de infecções, tanto no contexto comunitário quanto hospitalar (GALLI et al, 2019; DIEKEMA et al, 2019; COHEN et al, 2017). É considerado um dos principais patógenos humanos, podendo causar desde infecções de pele e tecidos moles até quadros invasivos, como infecção de corrente sanguínea, endocardite infecciosa e osteomielite (PEACOCK; PATERSON, 2015; TONG et al, 2015). A espécie é uma das principais causas IRAS no mundo (TONG et al, 2015). Somente as infecções de corrente sanguínea provocadas por este patógeno resultam em mais de 20 mil óbitos anuais nos Estados Unidos (KOURTIS et al, 2019). Na comunidade, um estudo realizado nos Estados Unidos em 2006 verificou que infecções de pele causadas por *S. aureus* são responsáveis por 11 milhões de atendimentos médicos ao ano (MCCAIG et al, 2006). Na microbiota humana, *S. aureus* tem como principal nicho de colonização as narinas anteriores, mas pode ser encontrado axilas e virilha e também estar presente na microbiota intestinal (GORDON E LOWY, 2008; LEE et al, 2018).

Dentre os fatores que contribuem para o sucesso de *S. aureus* como patógeno estão a expressão de adesinas, produção de múltiplas toxinas, citolisinas e enzimas proteolíticas, capacidade de formação de biofilme, e facilidade na aquisição de mecanismos de resistência ou de tolerância aos antimicrobianos (MCCARTHY et al, 2015). A capacidade de formar biofilme faz desta bactéria uma das principais causas de infecções relacionadas a dispositivos médicos, como próteses e cateteres, bem como permitem que o patógeno sobreviva por longos períodos em superfícies abióticas (MACCARTHY et al, 2015). Um dos fatores de virulência mais relacionados à gravidade da infecção estafilocócica é a leucocidina de Pantone-Valentine (*pvl*). Essa toxina consiste em 2 subunidades monoméricas hidrossolúveis que se ligam a membrana de leucócitos do hospedeiro formando poros em formato de barril, que atravessam a bicamada fosfolipídica da célula (GORDON et al, 2021; ALONZO et al, 2014). Assim, a *pvl* leva à lise de neutrófilos, estando associadas a dermonecrose, infecções cutâneas crônicas ou recorrentes e pneumonia necrosante em indivíduos previamente saudáveis (RARCH et al, 2017; JAUNEIKAITE et al, 2020; SHETTIGAR; MURALI, 2020). A prevalência dos genes da *pvl* varia bastante entre os estudos, mas é maior entre cepas

comunitárias do que entre as hospitalares (SANTOSANINGSIH et al, 2018; EL-BAGHDADY et al, 2020)

Estudos têm demonstrado que a *pvl* e outros fatores de virulência de *S. aureus* podem ser compartilhados com SCN (ELTWISY et al, 2020; RUIZ-RIPA et al, 2020), assim como SCN *mecA* positivos são capazes de transferir horizontalmente esse gene para diversas espécies do gênero *Staphylococcus* (ÜNAL, 2012), o que indica uma frequência de transmissão de genes entre estirpes de espécies distintas.

1.1.2 *Staphylococcus* resistente à meticilina

Até a introdução da penicilina, na década de 1940, as infecções estafilocócias invasivas apresentavam um desfecho quase sempre fatal. As reduções significativas nas taxas de mortalidade proporcionada por este antimicrobiano levaram ao seu uso indiscriminado, favorecendo a emergência de cepas resistentes (SHINEFIELD; RUFF, 2009). Em 1958, 90% dos funcionários de um hospital na Escócia colonizados por *S. aureus* já carregavam estirpes resistentes à penicilina. Para contornar este problema, em 1959 foram introduzidas as penicilinas semi-sintéticas, que são resistentes à ação de beta-lactamases (Garrod, 1960; ENRIGHT et al, 2002). No ano seguinte após sua introdução, em 1960, a primeira cepa resistente foi descrita na Inglaterra (JEVONS, 1961 apud DAVID; DAUM, 2017). A primeira penicilina deste grupo a ser utilizada foi a celbenina, mas esta foi sendo substituída, com o tempo, pela meticilina. Assim, as cepas que apresentavam resistência a estas penicilinas semi-sintéticas ficaram conhecidas como “MRSA” (“methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”). Atualmente, a meticilina não é mais utilizada, tendo sido substituída pela oxacilina e nafcilina, porém a nomenclatura MRSA foi mantida. As estirpes sensíveis são denominadas MSSA (“methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*”)

A resistência à meticilina está quase sempre relacionada à expressão de uma proteína denominada PBP2a, que é codificada pelo gene *mecA*. Essa proteína é capaz de manter a formação de ligações cruzadas na parede celular bacteriana, mesmo na presença de agentes beta-lactâmicos, porque apresenta baixa afinidade por estes antimicrobianos. Assim, a presença da PBP torna a bactéria resistente a praticamente todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (CHAMBERS, 1993). Atualmente, o gene *mecA* encontra-se altamente conservado entre as espécies de *Staphylococcus*, especialmente entre *S. aureus*. Uma das hipóteses mais aceitas é que este gene teve origem no clado que engloba *S. sciuri*, *S. vitulinus*

e *S. fleurettii*, e que recentemente foi redesignado como gênero *Mammaliicoccus* (MIRAGAIA et al, 2018). A transferência do gene *mecA* para *S. aureus* aparentemente ocorreu algumas vezes ao longo do tempo, em amostras de *S. aureus* de diferentes linhagens genéticas (CHAMBERS; DELEO, 2009; ROBINSON; WRIGHT, 2003). Em 2011 foi relatada a ocorrência do gene *mecC*, um homólogo do *mecA*, com 69% de identidade na sequência nucleotídica, em amostras isoladas de gado bovino e em humanos, e que produz a PBP2c, um terceiro tipo de PBP (GARCIA-ALVAREZ et al, 2011). Rasmussen e colaboradores (2019) propuseram a hipótese de que *S. aureus* carreadores do gene *mecC* já circulavam desde o século XIX, antes da descoberta dos antimicrobianos, colonizando porcos-espinhos e ouriços. Esses animais possuem em sua microbiota um fungo dermatófito denominado *Trichophyton erinacei*, que produz substâncias antimicrobianas da classe dos beta-lactâmicos, o que provavelmente gerou um ambiente de pressão seletiva que favoreceu a emergência desse gene. Em relação ao perfil de resistência que promove, é maior a resistência às cefalosporinas que às ampicilinas e penicilinas, isto pode se manifestar como resultados discordantes entre a determinação de sensibilidade à oxacilina e cefoxitina, já que pode apresentar resistência à cefoxitina e sensibilidade à oxacilina (CARTWRIGHT et al, 2013).

Os genes *mecA* ou *mecC* se encontram inseridos em um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, “staphylococcal cassette chromosome *mec*”) (KATAYAMA; HIRAMATSU, 2000). Esse cassete é composto por dois elementos centrais: um deles é o complexo *mec*, que contém o gene *mecA* e formas intactas e deletadas de seus reguladores (*mecI* e *mecRI*). O segundo elemento essencial ao SCC*mec* é complexo *ccr*, composto por recombinases (*ccr*) envolvidos na sua mobilidade (KATAYAMA et al, 2000). As outras porções do SCC*mec* são elementos não essenciais, como genes adicionais de resistência a metais pesados e outros antimicrobianos carreados por transpósons e plasmídeos, além das regiões J, que contém genes de função ainda desconhecida (WU et al, 2015; MIRAGAIA, 2018; URUSHIBARA, 2020).

Até o momento foram descritos quatorze tipos de SCC*mec*. Cada um deles é caracterizado pela combinação da classe do complexo *mec* e do tipo do complexo do gene *ccr*, e são descritos utilizando números romanos (IWG-SCC, 2022). O gene *mecA* é encontrado em quase todos cassetes, enquanto o *mecC* é carreado pelo tipo XI.

1.1.3 *Staphylococcus* em areias de praias

O solo é estruturado de maneira heterogênea, o que possibilita a ocorrência de micro-habitats que variam entre si em função das suas características físicas e químicas e da disponibilidade de nutrientes, sendo essa variação também em função do tempo e do espaço. A formação dos micro-habitats está associada com a formação de agregados de solo (MOREIRA et al, 2009; DUCHICELA et al, 2013). Os agregados são formados por diferentes proporções de areia, argila e silte, que funcionam como um suporte físico para a aderência microbiana e proporcionam condições diferenciadas de aeração e disponibilidade de nutrientes que possibilitam a coexistência de milhares de microrganismos, com diferentes capacidades metabólicas (DUCHIELA et al, 2013).

A areia é o produto do processo sedimentar do ciclo das rochas, aparecendo em uma etapa intermediária. Seus processos de formação e acumulação, associados à dinâmica externa da Terra, são facilmente observáveis em vários cenários naturais (praias, dunas eólicas, rios, lagos). Em geologia, a areia refere-se a fração granulométrica de solos ou sedimentos entre cerca de 0,06 e 2 mm. É macroscopicamente observável a diversidade das areias de praias, em suas cores, texturas (formas, tamanhos, rugosidades) e composição. Suas propriedades dependem de sua história sedimentar, que é relacionada com contextos geológicos e climáticos (BOUROTTE, 2014). O norte do estado do Rio de Janeiro, por exemplo, apresenta um litoral arenoso dominado por ondas contínuas (BASTOS; SILVA, 2003).

Nessa região as areias são resultado da fragmentação de três tipos de rochas: as rochas sedimentares e metamórficas, que datam da era Pré-Cambriana, e de onde provém minerais ricos em alumínio (granadas, biotita, sillimanita, estauroлита e feldspato; os granitos, da era paleozóica, e que também contribuíram com quartzo, feldspato, biotita e minerais acessórios como titanita, ilmenita e magnetita; do chamado “Grupo Barreiras” uma formação geológica presente na Bacia de Campos e no nordeste do Brasil, que é constituída de camadas variadas de sedimentos quartzosos a argilosos. Isso resulta em areias quartzosas, com grãos de tamanho médio a muito finos, cor amarelo claro a marrom, muitas vezes enriquecida com argila, óxidos ferrosos, ilmenita, monazita, rutilo e zircônio, que possuem inclusive uma emissão natural de radiação, capaz de afetar a microbiota presente (GONÇALVES; BRAGA, 2019; ORLANDO et al, 2022).

Estudos têm mostrado que as areias de praia podem apresentar densidades elevadas de microrganismos (SMAC, 2000). Bactérias, inclusive aquelas de origem fecal (OBIRI;

JONES, 2000), podem sobreviver mais tempo na areia das praias e em sedimentos, ao contrário das bactérias livres na água, pois podem se aderir a partículas do sedimento. Por encontrarem condições favoráveis de nutrientes, devido a detritos orgânicos associados a essas partículas, a proteção contra a luz solar e contra a predação por protozoários, as bactérias podem sobreviver neste ambiente por longos períodos (WHITMAN; NEVERS, 2003). Além disso, as areias das praias sofrem a ação da lavagem pela água do mar e pela água de drenagem urbana durante as chuvas, as quais podem apresentar altas densidades de microrganismos. Em praias com elevada ocupação humana, essas areias também recebem lixo, fezes e urina de animais e secreções do corpo de humanos. Todos esses fatores podem contribuir para a proliferação e a disseminação de bactérias, fungos e parasitas patogênicos. Tendo em vista que os frequentadores das praias tendem a estar a maior parte de seu tempo em contato com a areia, as areias de praias contaminadas talvez apresentem mais risco à saúde das pessoas do que o contato com a própria água (PAPADAKIS, 1997).

Tradicionalmente, para avaliação do grau de contaminação de areia de praias é utilizado como microrganismos indicadores, a levedura *Candida albicans* e as bactérias da espécie *Escherichia coli* (VIEIRA et al, 2001), mas atualmente bactérias do gênero *Enterococcus* são considerados indicadores mais confiáveis (ELMANAMA et al, 2005; SATO et al, 2005; BONILLA et al, 2007; OLIVEIRA; PINHATA, 2007). O gênero *Enterococcus*, inclusive, parece acumular-se mais na areia do que as da espécie *Escherichia coli* (ALM et al, 2003). Além de serem fontes de contaminação de humanos por patógenos, as águas marinhas recreacionais que recebem esgotos domésticos, bem como suas areias, podem contribuir para o estabelecimento de rotas de disseminação de microrganismos carreadores de genes de resistência a antimicrobianos (MEIRELES et al, 2002).

Desde 1985, alguns estudos têm associado *S. aureus* a infecções entre banhistas (SEYFRIED et al, 1985; GABUTTI et al, 2000; DOMÉNECH-SÁNCHEZ et al, 2008; SHIBATA; SOLO-GABRIELE et al, 2012). Tais achados embasam a hipótese de que praias são fontes potenciais de infecção por esta bactéria (SOGÉ et al, 2009). Amostras de *S. aureus*, incluindo cepas MRSA, são encontrados na água do mar e areia da praia e podem ser disseminados pelos banhistas que frequentam a praia (GOODWIN et al, 2009; SOGÉ et al., 2009; SINIGALLIANO et al, 2010; ENNS et al, 2012; AKANBI et al, 2022). De fato, Elmir e colaboradores (2007), em estudo com 10 voluntários, determinaram que, em apenas 15 minutos, estes eram capazes de disseminar 6×10^6 células de *S. aureus* em uma coluna de água do mar. Embora não haja estudos semelhantes com areia das praias, sabe-se que a

concentração de *S. aureus* na areia seca é geralmente bem maior do que na água do mar e do que na areia molhada, algo que também ocorre com *E. coli* e *Enterococcus* (PINTO et al, 2012). A abundância desta bactéria tanto na água quanto na areia das praias parece estar relacionada à atividade e densidade de banhistas (PAPADAKIS et al, 1997; WHO, 2003; PLANO et al, 2013). De fato, a ocorrência de *S. aureus* em areias, incluindo, cepas MRSA, é significativamente maior no verão (THAPALIYA et al, 2017).

S. aureus, assim como outras espécies do gênero, são resistentes ao estresse osmótico causado pelo ambiente salino das praias (STEWART et al, 2005). Além disso, estudos mais recentes têm identificado a resposta transcricional do patógeno mediante à luz do sol. Cerca de 70 genes são ativados quando *S. aureus* é submetido aos raios solares, permitindo que a bactéria permaneça viável mesmo após seis horas de exposição direta à radiação solar, em um sistema semelhante ao que ocorre em *E. coli* e *Enterococcus* (MCCLARY; BOEHM, 2018). Apesar disso, poucos estudos na literatura pesquisaram a ocorrência de *S. aureus* em areias de praias, sendo a maioria conduzidos nos EUA. Além disso, não há, até o momento, nenhum estudo que tenha avaliado outras espécies de *Staphylococcus* exclusivamente nesses ambientes.

Um dos primeiros estudos a avaliar a presença de *S. aureus* em areia de praias foi conduzido por SOGE e colaboradores (2009) que analisaram amostras de água e areia de 10 praias do estado de Washington (EUA). Excluindo as estirpes idênticas, isoladas de um mesmo ponto e com a mesma identificação de espécie, eles detectaram 37 estirpes de *Staphylococcus*, sendo seis MRSA, quatro MSSA e 25 SCN. Dentre os SCN, foram isolados, em maior quantidade, *S. epidermidis* (10 estirpes), *S. saprophyticus* (5) e *S. capitis* (5). As espécies, *S. sciuri*, *S. xylosum*, *S. simulans*, *S. vitulinus*, *S. haemolyticus*, *S. saccharolyticus* e *S. warnerii* foram encontradas em apenas uma estirpe cada. Os genes da PVL não foram encontrados em nenhuma amostra. No entanto, os autores não informam quantas amostras de areia foram coletadas e nem fizeram distinção entre amostras de água e areia no momento de reportar os resultados, impossibilitando uma análise focada especificamente nas características da microbiota da areia. Posteriormente GOODWIN e colaboradores (2012) avaliaram 358 amostras de areia de três praias da Califórnia (EUA) e encontraram uma frequência de 53% de *S. aureus*. A taxa de MRSA foi bem menor (2,7%), indicando uma taxa reduzida de estirpes resistentes. No ano seguinte, uma outra investigação realizada em praias do sul da Flórida (EUA) identificou, em 36 amostras de areia, nove *S. aureus* (25%) e três

(8,3%) MRSA (PLANO et al, 2013). Nesse estudo, todas as três estirpes MRSA foram carreadoras dos genes da PVL.

Nos últimos cinco anos, novos estudos foram conduzidos para esclarecer melhor as características de *S. aureus* isoladas de areia de praia. Em Ohio (EUA), uma análise de 210 amostras de areia de 10 praias revelou a presença de *S. aureus* em 20,5% dessas amostras. Foram encontradas 15 estirpes MRSA e 28 MSSA. A taxa de prevalência foi de 7,1% e 13,3% respectivamente. Os genes da PVL foram mais frequentes nas estirpes MRSA (26,7%) do que nas MSSA (17,8%) (THAPALIYA *et al.*, 2017). Mais recentemente, em 2021, Gerken e colaboradores avaliaram amostras de areia e de água de praias do Havaí (EUA) e encontraram 7,2% de amostras de areia positivas para *S. aureus*. E, ao contrário dos estudos anteriores, detectaram uma prevalência maior de MRSA do que MSSA. Foram coletadas 35 amostras de areia de três praias diferentes. O percentual de amostras de areia positivas para MRSA e MSSA foi 8,6% e 5,7%, respectivamente, sendo o único caso reportado no qual a taxa de MRSA foi superior a de MSSA. As estirpes MRSA pertenciam à mesma linhagem genética, eram carreadoras dos genes da PVL e de múltiplos genes de resistência aos antimicrobianos. As estirpes MSSA pertenceram a linhagens variadas e não carregavam os genes da PVL. Em um dos poucos estudos realizados fora dos EUA, Akanbi e colaboradores (2017) realizaram uma pesquisa em 10 praias na África do Sul, com 67 amostras de areia, que identificou oito (11,9%) estirpes de *S. aureus*. Os autores também encontraram uma elevada taxa de resistência: 50% das estirpes de *S. aureus* foram resistentes à metilicina.

No Brasil, não há estudos que tenham avaliado a presença e as características de *Staphylococcus* em areia de praia. Também não encontramos, na literatura mundial, informações sobre as espécies de SCN mais associadas a este ambiente. Embora *Staphylococcus* seja uma bactéria relevante no contexto ambiental, sendo um marcador importante da qualidade das areias (PINTO et al, 2012), as praias continuam a ser monitoradas quanto à qualidade ambiental basicamente pela detecção de *Escherichia coli* e *Enterococcus* (PINTO et al, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Staphylococcus aureus são responsáveis por uma grande variedade de infecções com elevadas taxas de morbidade e mortalidade e que afetam tanto indivíduos da comunidade quanto pacientes hospitalizados (GALLI et al, 2019; DIEKEMA et al, 2019; COHEN et al, 2017). Os *Staphylococcus* coagulase negativos, por outro lado, costumam causar infecções em pacientes submetidos a procedimentos invasivos e/ou com um acentuado grau de imunossupressão (LEE et al, 2022) e são reservatórios de genes de resistência para *S. aureus* e para outras espécies (GUPTA et al, 2020). Considerando a tolerabilidade dessas bactérias ao estresse osmótico e a radiação solar e que estão associadas à circulação humana (STEWART et al, 2005; MCCLARY; BOEHM, 2018; WANG et al, 2020), alguns estudos vêm indicando que as praias podem ser locais importantes de disseminação de *S. aureus*, incluindo cepas resistentes. Não há, no entanto, estudos que tenham avaliado espécies de SCN.

Embora o Brasil tenha mais de 8.000 km de litoral (TESSLER; GOYA, 2011), inúmeras praias e clima favorável a utilização das mesmas para fins recreativos, atualmente para avaliação do grau de contaminação de areia de praias são usados como indicadores microbiológicos as bactérias da espécie *Escherichia coli* (VIEIRA et al, 2001) e bactérias do gênero *Enterococcus* (PINHATA, 2007). Nesse contexto, não existem estudos no país acerca da ocorrência e características de *Staphylococcus* nesses locais. Assim, torna-se relevante um estudo que avalie, de forma inédita, a diversidade de espécies e características de resistência de amostras estafilocócicas isoladas de areias de praias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar e identificar *Staphylococcus* spp. em amostras de areias coletadas de praias do litoral sul de Macaé, avaliando a resistência aos antimicrobianos destas estirpes.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo para isolamento de *Staphylococcus* spp. em amostras de areia seca de praias brasileiras;
- Identificar em nível de espécie as estirpes isoladas através de espectrometria de massas;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de disco-difusão, das estirpes estafilocócicas isoladas das areias das praias avaliadas;
- Detectar a presença dos genes de resistência à meticilina (*mecA* e *mecC*) nas amostras estafilocócicas recuperadas;
- Pesquisar a presença dos genes da Leucocidina Pantón Valentine (PVL) nas linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas nas amostras de areia

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

Para a realização do estudo, foram selecionadas praias do litoral sul de Macaé, comumente frequentadas pela população do município, que apresentam características geológicas semelhantes (praia dos Cavaleiros e do Pecado) (GUIMARÃES, 2005), mas perfil de visitação distinto. Foi incluída no estudo também a Praia das Pedrinhas, do município de Rio das Ostras, que é contígua à Praia do Pecado (Figura 1).



Figura 1 - Imagem de satélite dos pontos de coleta de amostras de areia deste estudo. Da esquerda para direita: Pedrinhas ($22^{\circ}25'30.0''S$ $41^{\circ}49'46.0''W$); Pecado ($22^{\circ}24'40.2''S$ $41^{\circ}48'30.6''W$); Cavaleiros ($22^{\circ}24'17.0''S$ $41^{\circ}47'46.9''W$). Fonte: <www.google.com.br/maps/@-22.4021022,-41.8054606,9750m/data=!3m1!1e3!5m1!1e4>. Acessado em 30 de Junho de 2022.

4.1.1 Praia dos Cavaleiros

Localizada a cerca de 5 km do centro de Macaé, possui aproximadamente 1,5 km de extensão e é cenário de esportes como *bodyboard*, frescobol, futevôlei e vôlei de praia. Sua orla abriga diversos empreendimentos imobiliários e os principais bares e restaurantes da cidade, atraindo turistas e moradores, inclusive à noite (MACAÉ, 2022). Todos esses fatores culminam em densidade alta de frequentadores.

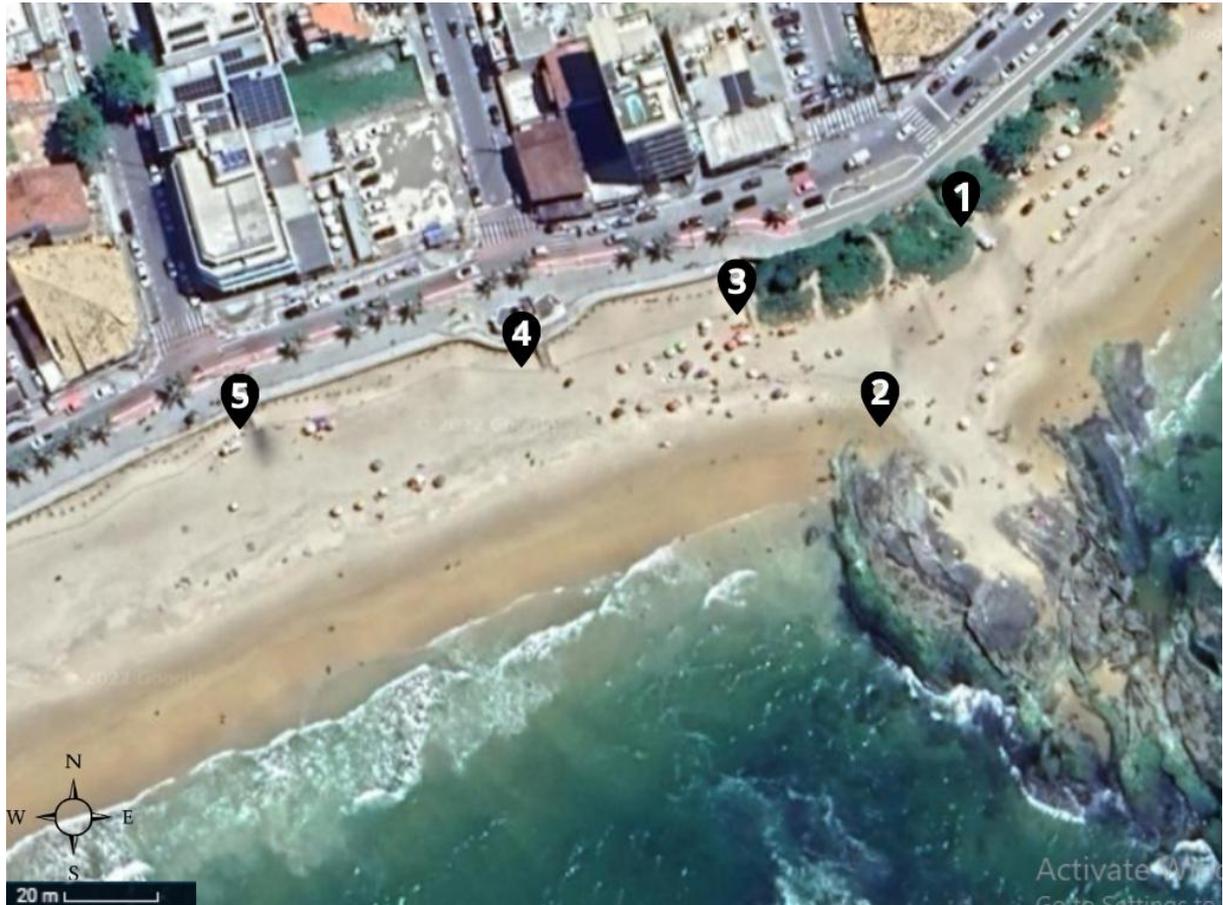


Figura 2 - Imagem de satélite, com indicação dos pontos de coleta de amostras de areia na Praia dos Cavaleiros. Da direita para a esquerda temos os cinco pontos de coletas marcados em preto (1-5), escolhidos de acordo com o fluxo de entrada, saída e permanência de banhistas.

4.1.2 Praia do Pecado

A Praia do Pecado é também uma das mais movimentadas de Macaé, principalmente por ser bastante adequada para as práticas esportivas. Conta com as aulas de surf e *bodyboard*, oferecidas no próprio local, e é visitada para a pesca de linha e para mergulho. A praia do Pecado dista 6 km do Centro do município e apesar de ser adjacente à Praia dos Cavaleiros, é menos frequentada pela população devido à distância do acesso pela areia e por possuir apenas uma linha de ônibus que chega ao bairro. A praia separa-se da Lagoa de Imboassica por uma faixa de areia.

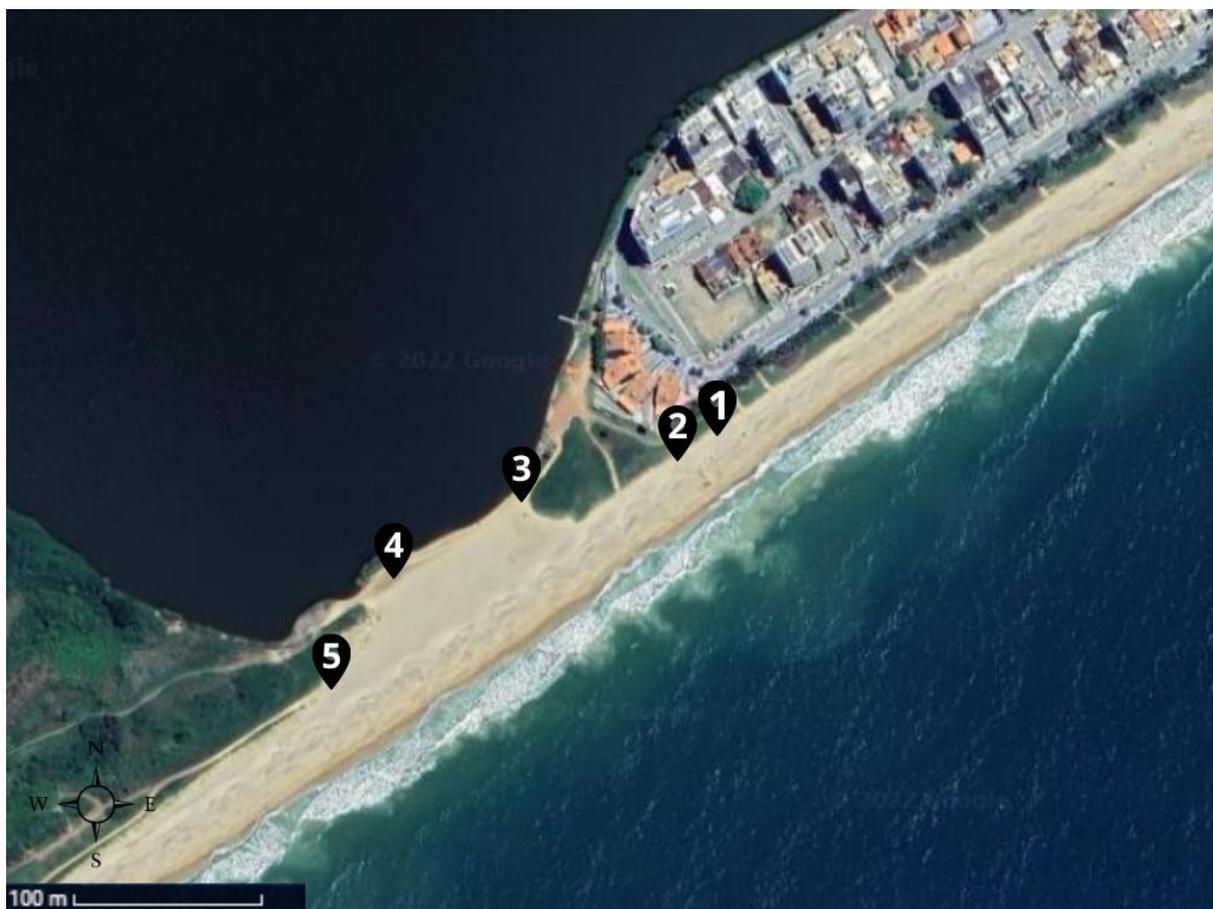


Figura 3 - Imagem de drone, com indicação dos pontos de coleta de amostras de areia na Praia do Pecado. Da direita para a esquerda temos os cinco pontos de coletas marcados em preto (1-5), escolhidos de acordo com o fluxo de entrada, saída e permanência de banhistas.

4.1.3 Praia das Pedrinhas

Praia de difícil acesso, localizada em Rio das Ostras, é a última praia deste município antes de Macaé. Dista aproximadamente 21 km do centro de Macaé. Geograficamente adjacente à Praia do Pecado, mas não há ruas de acesso. Para visitá-la, são necessárias algumas estratégias: caminhada pelas faixas de areia ou por trilhas a partir de Macaé no sentido Rio das Ostras após a praia do Pecado. Apesar de ser uma prática ilegal, muitos frequentadores acessam a praia de carro, a partir de Rio das Ostras em sentido a Macaé, principalmente finais de semana, quando a praia recebe grande número de banhistas, com a presença de veículos movidos a diesel.

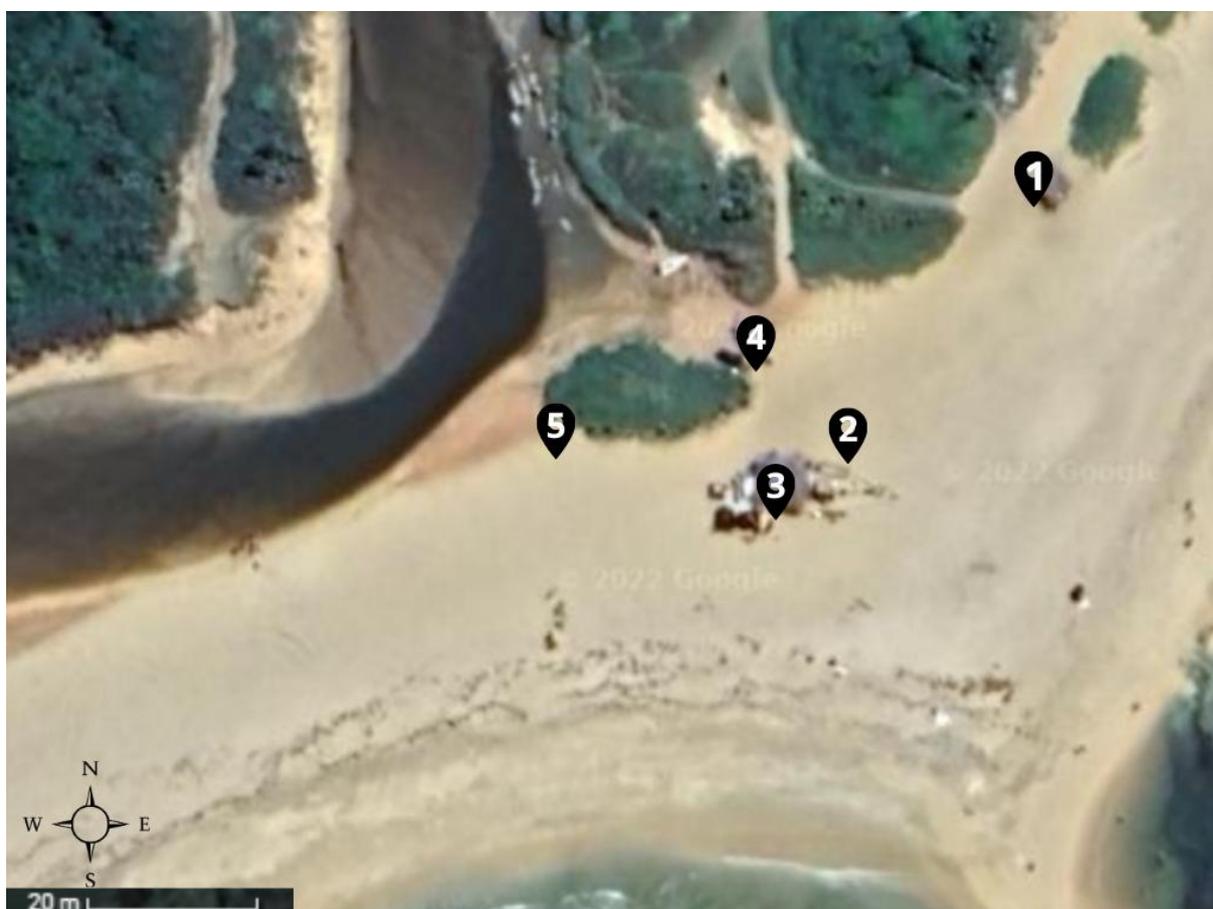


Figura 4 -Imagem de drone, com indicação dos pontos de coleta de amostras de areia na Praia das Pedrinhas. Da direita para a esquerda temos os cinco pontos de coletas marcados em preto (1-5), escolhidos de acordo com o fluxo de entrada, saída e permanência de banhistas.

Tabela 1 - Condições meteorológicas do município de Macaé nas datas em que as amostras de areia foram coletadas

Datas de coleta das amostras de areia*				
Parâmetros meteorológicos	30/09/2020	27/10/2020	01/12/2020	05/01/2021
Temperatura ¹ (°C)	21,6 - 26,4	20,1 - 25,2	21,8 - 27,9	22,2 - 26
Data da última chuva (índice pluviométrico)	24/09/2020 (2,4 mm)	26/10/2020 (4,6mm)	26/11/2020 (11,6 mm)	04/01/2021 (1,6 mm)
Radiação global máxima (kJ/m ²)	1297,8	1862,4	1839	995,4
Umidade relativa do ar (%)	80 - 96	73 - 96	70 - 94	86 - 96
Velocidade do vento ¹ (m/s)	0,5 - 4,4	0,3 - 1,9	0,3 - 1	0,4 - 0,9

*Coletas de areia realizadas entre 10h e 11h. ¹Parâmetros mínimos e máximos observados entre 6h e 11h; ²em. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia.

4.2 Coleta das amostras, enriquecimento e isolamento bacteriano

As amostras de areia foram coletadas e processadas com base nos protocolos estabelecidos por Goodwin e colaboradores (2012) e Pinto (2012), com adaptações para o tipo de areia e para a obtenção de espécies de *Staphylococcus* (Figura 5). As coletas de areia foram realizadas em quatro momentos diferentes (30/09/2020; 27/10/2020; 01/12/2020 e 05/01/2021). Foram selecionadas três praias com alta densidade de banhistas no litoral sul de Macaé e entorno, sendo elas: Praia de Cavaleiros, Praia do Pecado e Praia das Pedrinhas. Em cada praia, foram coletadas amostras de areia seca em cinco pontos distintos, escolhidos de acordo com as áreas de maior fluxo de entrada, saída e permanência de banhistas. Todas as coletas foram realizadas em dias de semana, após sábados e domingos ensolarados. Nos pontos selecionados, aproximadamente 50g de areia seca foram coletados da parte mais superficial do solo, sem revolver a areia. As amostras foram acondicionadas em frascos de plástico estéreis com tampa, e enviados imediatamente para o Laboratório de Microbiologia do Pólo Ajuda – Campus UFRJ/Macaé, Estrada do Imbuuro s/nº, Bairro Ajuda, Macaé/RJ, sem refrigeração. Após pesagem em balança analítica (Sartorius®), 2g de cada amostra foram transferidos para novos frascos estéreis, contendo 30 ml de solução salina 0,85%. Após breve homogeneização em agitador do tipo vórtex (Kasvi®), 1mL da suspensão foi transferido para um tubo do tipo “Falcon” contendo 10mL de Caldo Triptona Soja - TSB (Kasvi®) contendo 10% de NaCl (Isifar®). O material foi, então, incubado a 35° C, em aerobiose, por 24h, sem agitação. Após este período, uma alíquota de 10µl do crescimento em TSB-NaCl 10% foi semeado, por esgotamento, com auxílio de alça microbiológica estéril, em placas de Petri contendo Ágar Manitol Salgado (Kasvi®). As placas foram incubadas a 35°C, em aerobiose, por 24h. O crescimento obtido foi avaliado quanto à morfologia colonial e aspecto morfotintorial das células após coloração pelo método de Gram e observação ao microscópio óptico. De cada grupo de colônias com características sugestivas de *Staphylococcus spp.* (colônias lisas, de diferentes tamanhos, tonalidade branca, acinzentada ou amarelada e células com forma de coco Gram positivo), foi selecionada uma colônia representativa, que foi transferida, com alça bacteriológica estéril, para placas contendo Ágar Nutriente (Kasvi®) para isolamento. Todos os isolados foram preservados em criotubos contendo caldo TSB (Kasvi®) contendo 20% de glicerol, a -20°C.

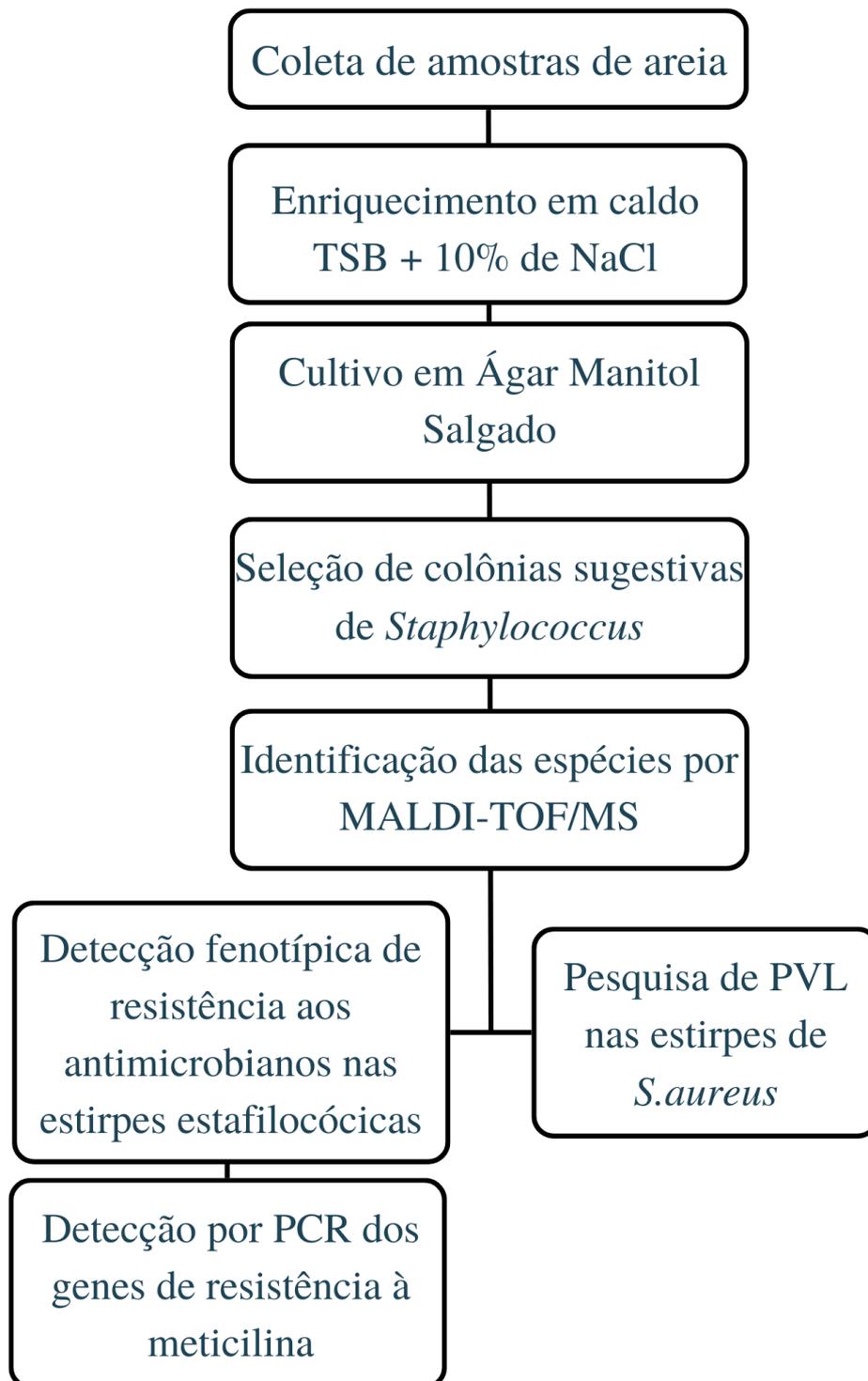


Figura 5 – Modelo resumido do protocolo proposto para isolamento e identificação de espécies de *Staphylococcus*. Adaptado de GOODWIN et al; PINTO et al, 2012.

4.3 Caracterização das linhagens bacterianas isoladas

4.3.1 Identificação das espécies estafilocócicas por MALDI-TOF/MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry*)

A técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*) foi utilizada para identificação de espécies das estirpes bacterianas isoladas da areia. Após cultivo em Ágar Nutriente (Kasvi[®]) a 35°C, em aerobiose, por 24 h, as estirpes foram retiradas da placa com um auxílio de alça bacteriológica estéril e depositadas, em duplicata, na placa metálica do equipamento MALDI-TOF Microflex LT (BrukerDaltonics) de modo a conter ao menos 10⁵ UFC em cada alvo. Em seguida, uma alíquota de 1µl de ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma[®]) foi depositada sobre a amostra. Após secagem a temperatura ambiente, 1µl de matriz, composta por ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico (HCCA - Sigma, USA) preparado em acetonitrila 50%, foi também depositada sobre a amostra. Após nova secagem, a placa de metal foi inserida no aparelho para a leitura das amostras. Os espectros de massa das amostras foram obtidos no modo linear, observando os seguintes parâmetros: frequência do laser 20 Hz; voltagem das fontes iônicas 1 e 2, 20 kV e 18,6 kV, respectivamente; faixa de peso molecular 2.000 a 20.000 Da e foram coletados através da somatória de 240 disparos do laser, adquiridos através de 4 grupos de 60 disparos lançados em regiões distintas, aleatoriamente selecionadas, em um poço amostral na placa metálica. Como calibrante foi utilizada a estirpe de *E. coli* DH5 α , e os espectros obtidos foram processados pelo software de bioinformática MALDI Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics), o qual realiza a pesquisa em sua biblioteca de espectros de referência de maneira a encontrar aquele que mais se assemelhe ao obtido para as estirpes. O *score* da identificação, definido como confiável, se localiza entre 2.000 – 3.000 (Tabela 2). No presente estudo, a identificação por espectrometria também foi associada às características fenotípicas das estirpes.

Tabela 2: Identificação das amostras através dos scores, após a leitura no MALDI-TOF/MS. (Adaptado de Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results)

Range	Descrição	Símbolo	Cor
2,300 - 3,000	Identificação altamente provável da espécie	(+++)	Verde
2,000 - 2,299	Identificação do gênero, identificação provável da espécie	(++)	Verde
1,700 - 1,999	Identificação provável do gênero	(+)	Amarelo
0,000 - 1,699	Identificação não confiável	(-)	Vermelho

4.3.2 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos através da técnica de difusão a partir do disco

A detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos foi realizada através do teste de difusão do disco a fim de se identificar o perfil de susceptibilidade de todas as estirpes de *Staphylococcus* frente a 11 antimicrobianos de diferentes classes. O teste foi realizado de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2022). Os antimicrobianos utilizados foram: ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), mupirocina (5µg), oxacilina(1µg), sulfametoxazol/trimetoprima (25µg), linezolida (10µg), tigeciclina (15µg), penicilina (10µg), cefoxitina (30µg). Foi preparada uma suspensão bacteriana, com turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), padronizada visualmente. Em seguida, um *swab* foi embebido na suspensão bacteriana e então semeado confluentemente em ágar Müeller-Hinton (BD, Difco Laboratories). Após semeadura, um disco de cada um dos antimicrobianos citados anteriormente foi depositado na placa. A amostra padrão *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle para este teste. A leitura dos testes foi realizada após 18h de incubação, segundo os critérios estabelecidos pelo CLSI (2022) e BRCAS (2022) (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3: Descrição das categorias de susceptibilidade e seus respectivos pontos de corte para interpretação dos valores de halo de inibição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute (2022)* e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2022)* para amostras de *Staphylococcus aureus*. Categorias de susceptibilidade de acordo com o halo de inibição em mm

Antimicrobiano	CLSI ^a			BrCAST ^b		
	Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Cefoxitina	≥ 22	-	≤ 21	≥ 22	-	≤ 21
Ciprofloxacina	≥ 21	16 - 20	≤ 15	≥ 50	21 - 49	≤ 20
Clindamicina	≥ 21	15 - 20	≤ 14	≥ 22	-	≤ 21
Eritromicina	≥ 23	14 - 22	≤ 13	≥ 21	-	≤ 20
Gentamicina	≥ 15	13 - 14	≤ 12	≥ 18	-	≤ 17
Linezolida	≥ 21	-	≤ 20	≥ 21	-	≤ 20
Tetraciclina	≥ 19	15 - 18	≤ 14	≥ 22	-	≤ 18
Mupirocina	Presença de halo	-	Ausência de halo	≥ 30	-	≤ 18
Sulfametoxazol-trimetoprim	≥ 16	11 - 15	≤ 10	≥ 17	14 - 16	≤ 13

^aCLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; ^bBrCAST: *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Tabela 4: Descrição das categorias de susceptibilidade e seus respectivos pontos de corte para interpretação dos valores de halo de inibição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute (2022)* e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2022)* para amostras de *Staphylococcus epidermidis*.

Antimicrobiano	CLSI ^a			BrCAST ^b		
	Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Cefoxitina	≥ 25	-	≤ 24	≥ 27	-	≤ 26
Ciprofloxacina	≥ 21	16 - 20	≤ 15	≥ 50	24 - 49	≤ 23
Clindamicina	≥ 21	15 - 20	≤ 14	≥ 22	-	≤ 21
Eritromicina	≥ 23	14 - 22	≤ 13	≥ 21	-	≤ 20
Gentamicina	≥ 15	13 - 14	≤ 12	≥ 22	-	≤ 21
Linezolida	≥ 21	-	≤ 20	≥ 21	-	≤ 20
Tetraciclina	≥ 19	15 - 18	≤ 14	≥ 22	-	≤ 18
Mupirocina	Presença de halo	-	Ausência de halo	-	-	-
Oxacilina	≤ 18	-	≥ 17	-	-	-
Sulfametoxazol-trimetoprim	≥ 16	11 - 15	≤ 10	≥ 17	14 - 16	≤ 13

^aCLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; ^bBrCAST: *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Tabela 5: Descrição das categorias de susceptibilidade e seus respectivos pontos de corte para interpretação dos valores de halo de inibição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2022) e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (2022) para amostras de *Staphylococcus* spp. (exceto *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*).

Antimicrobiano	CLSI ^a			BrCAST ^b		
	Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Cefoxitina	≥ 25	-	≤ 24	≥ 22	-	≤ 21
Ciprofloxacina	≥ 21	16 - 20	≤ 15	≥ 50	24 - 49	≤ 23
Clindamicina	≥ 21	15 - 20	≤ 14	≥ 22	-	≤ 21
Eritromicina	≥ 23	14 - 22	≤ 13	≥ 21	-	≤ 20
Gentamicina	≥ 15	13 - 14	≤ 12	≥ 22	-	≤ 21
Linezolida	≥ 21	-	≤ 20	≥ 21	-	≤ 20
Tetraciclina	≥ 19	15 - 18	≤ 14	≥ 22	-	≤ 18
Mupirocina	Presença de halo	-	Ausência de halo	-	-	-
Sulfametoxazol-trimetoprim	≥ 16	11 - 15	≤ 10	≥ 17	14 - 16	≤ 13

^aCLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; ^bBrCAST: *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Em conjunto com o teste de disco-difusão em ágar, foi realizado o teste de indução de resistência a clindamicina por eritromicina (teste D), conforme as recomendações do CLSI (2022). O disco de clindamicina foi depositado a uma distância de 20 mm (borda a borda) do disco de eritromicina, seguido de incubação a 35 °C ± 2 por 16-18 h. Nesse protocolo, caso a amostra apresente o fenótipo de resistência a clindamicina induzida pela eritromicina, este último antimicrobiano ao ser difundido no meio de cultura induzirá a resistência à clindamicina, resultando em um achatamento do halo de inibição, com formato da letra D.

4.3.3 Extração do DNA

A extração do DNA de todas as amostras estafilocócicas foi realizada pelo uso de kit de extração QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e seguiu as instruções disponibilizadas pelo fabricante. A concentração e a qualidade do DNA extraído foram determinadas utilizando-se o espectrofotômetro GE Nanovus Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O DNA foi armazenado a -20 °C.

4.3.4 Detecção dos genes associados à resistência à meticilina (*mecA* e *mecC*)

A pesquisa dos genes *mecA* e *mecC*, associados a resistência à meticilina, foi realizada em todas as estirpes de *Staphylococcus* identificadas no estudo, independentemente do fenótipo de susceptibilidade ou resistência avaliado no teste de difusão do disco. As reações para detecção e amplificação dos genes *mecA* (DEL VECCHIO et al, 1995) e *mecC* (STEGGER et al, 2012) foram realizadas em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Gradient*, Hamburgo, Alemanha), em reações distintas. Ambas foram constituídas de um volume total de 25 µL, com 3µL de DNA (cerca de 50ng), 5 µL de tampão 10x da enzima (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA) e 1U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha).

Para detecção do gene *mecA* foi adicionado à reação 2µM de cada um dos oligonucleotídeos MRS1 (5'-TAGATA CTG ACG TCCG-3') e MRS2 (5'-TTGCGATCAATGTTACCGTAG-3'). A reação seguiu uma desnaturação inicial de 94 °C por 1 min, com 30 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por 5 s, gerando um amplicon de 154 pb. Como controle, utilizamos a estirpe clínica 1013a (CABOCLO0 *et al.*, 2013).

Na reação de detecção do gene *mecC*, foi adicionado à solução 0,4µM dos oligonucleotídeos *mecA*_{LGA251}MultiRP (5'-GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3') e *mecA*_{LGA251}MultiFP (5'-GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC-3'). Após uma desnaturação inicial de 94 °C por 15 s, foram realizados 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 59 °C por 1 min e 72

°C por 1 min, com extensão final de 72 °C por 10 min, para amplificação de um fragmento de 138 pb.

O produto das reações foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2%, adicionado do intercalante de bases UniSafe Dye® (Uniscience, Miami Lakes, FL, EUA) em TBE (0,89M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,2) 1X, a 90 V por 90 min. A imagem do gel foi capturada sob luz ultravioleta. Como padrão de tamanho de DNA, utilizamos um marcador de 100pb (Biotools®).

4.3.5 PCR para detecção dos genes que codificam a Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)

A PCR para detecção dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, que codificam a leucocidina de Panton-Valentine, foi realizada em todas as amostras de *S. aureus*, segundo o protocolo estabelecido por Lina e colaboradores (1999). Na concentração de 1µM, os oligonucleotídeos LUKS-PV (5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3') e LUKF-PV (5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC-3') foram adicionados a uma reação contendo cerca de 3µL (50ng) de DNA, 5µL de tampão da enzima (10mM Tris HCL, 25Mm KCL), 1,5mM de MagCl₂, 200µM de cada deoxinucleotídeotrisfosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Life Technologies Inc.), 1U de Taq DNA polimerase (Biotools). Como amostra controle positiva para os genes da PVL foi utilizada a amostra clínica 1013a (CABOCLO et al, 2013).

A reação constituiu-se em uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min e 30 ciclos de 94 °C por 1min, 55 °C por 1min e 72 °C por 1 min, além da extensão final de 72 °C a 5 min, para amplificação de um fragmento de 433pb. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE (0,89 M Tris, 0,9M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2) adicionado do intercalante de bases UniSafe Dye® (Uniscience). Após corrida a 90V, a imagem foi obtida através de fotodocumentador (VilberLourmat). Como padrão de DNA, foi utilizado o marcador de 100pb DNA ladder (Biotools®).

5. RESULTADOS

5.1 Espécies bacterianas identificadas e correlação com o local de coleta.

Foram coletadas um total de 60 amostras de areia, oriundas de cinco pontos de coleta, de três praias, em quatro momentos diferentes (30/09/2020; 27/10/2020; 01/12/2020 e 05/01/2021). As 60 amostras de areia foram submetidas ao protocolo previamente descrito, havendo isolamento de 71 estirpes bacterianas sugestivas de cocos Gram positivo halotolerantes, que foram submetidas à identificação por espectrometria de massas. Dessas estirpes, 16 (22,5%) não pertenciam ao gênero *Staphylococcus*, tendo sido caracterizadas como *Exiguobacterium* spp. (5), *Enterococcus faecium* (3), *E. faecalis* (2), *E. casseliflavus* (1), *E. hirae* (1), *E. gallinarum* (1), *Bacillus* spp. (2) e *Corynebacteriumvariable* (1). Além disso, seis (8,4%) não foram passíveis de identificação segura pelo MALDI-TOF (Quadro 3). Assim, das 71 estirpes isoladas no presente estudo, 49 (69,0%) foram identificadas como *Staphylococcus* spp.

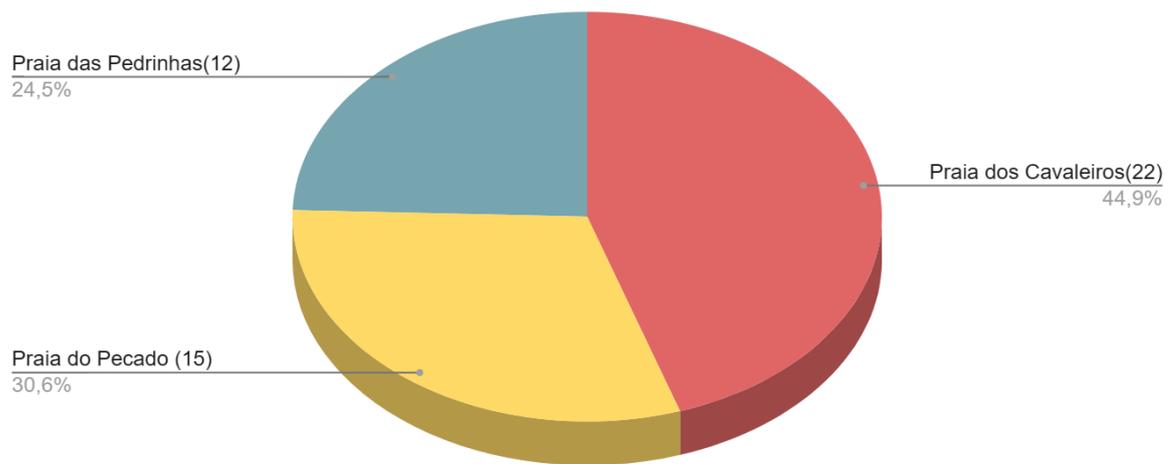
Tabela 6 - Perfil microbiológico detectado em cada ponto das praias avaliadas, de acordo com a data de coleta da amostra de areia.

Praia	Ponto	Datas de coleta			
		30/09/20	27/10/20	01/12/2020	05/01/20
Cavaleiros	1	<i>Bacillus</i> spp. <i>S. aureus</i>	-	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. sciuri</i> <i>E. hirae</i>
	2	<i>S. warnerii</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. epidermidis</i> NI	<i>E. casseliflavus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. warnerii</i>	-
	3	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. simulans</i> <i>Exiguobacterium</i> spp.
	4	-	<i>S. sciuri</i> <i>S. warnerii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>S. sciuri</i>
	5	<i>S. aureus</i> NI	<i>S. epidermidis</i> <i>S. warnerii</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S.</i> <i>saprophyticus</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. sciuri</i>
Pecado	1	-	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. warnerii</i>	<i>S. aureus</i> .	NI
	2	NI	<i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i>	<i>Bacillus</i> spp. <i>S. aureus</i>	<i>E. faecium</i> <i>Exiguobacterium</i> spp.
	3	-	<i>S. epidermidis</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>E. faecium</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. sciuri</i>
	4	-	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. simulans</i>
	5	-	<i>S. epidermidis</i> NI	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>
Pedrinhas	1	-	<i>S. warnerii</i>	<i>S. sciuri</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>E. faecalis</i> <i>S. sciuri</i> <i>Corynebacterium</i> variable
	2	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. warnerii</i>	-	<i>E. gallinarum</i> <i>S. sciuri</i>
	3	-	<i>Exiguobacterium</i> spp.	NI	<i>S. sciuri</i>
	4	-	<i>S. warnerii</i> <i>Exiguobacterium</i> spp.	-	<i>S. sciuri</i>
	5	-	<i>Exiguobacterium</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>S. sciuri</i>

Das 60 amostras de areia coletadas, 36 (60%) foram positivas para pelo menos uma espécie de *Staphylococcus*. O percentual de amostras de areia positivas para o gênero foi de 75% (15/20) na Praia dos Cavaleiros, 55% (11/20) entre amostras da Praia do Pecado e 50%

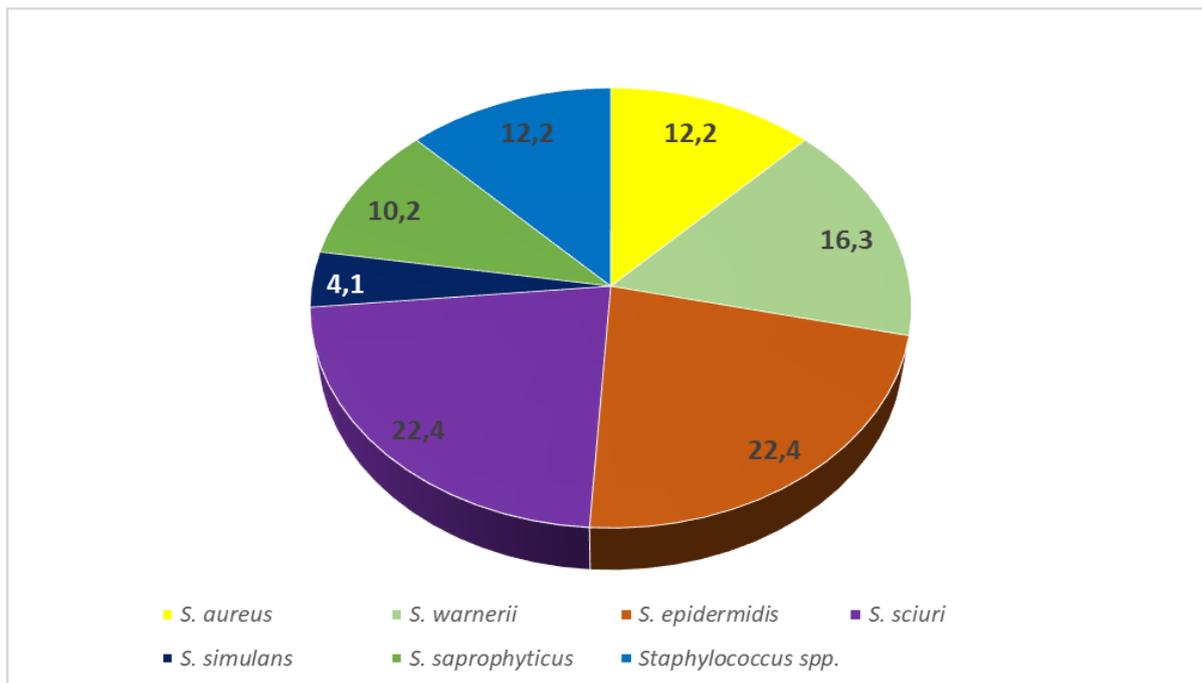
(10/20) na praia das Pedrinhas. A praia com maior ocorrência de isolados identificados como *Staphylococcus* spp. foi Cavaleiros (44,9%, n=22), seguida do Pecado (30,6%, n=15) e Pedrinhas (24,5%, n=12) (Gráfico 1).

Gráfico 1- Distribuição das 49 estirpes isoladas das amostras de areia das praias avaliadas neste estudo.



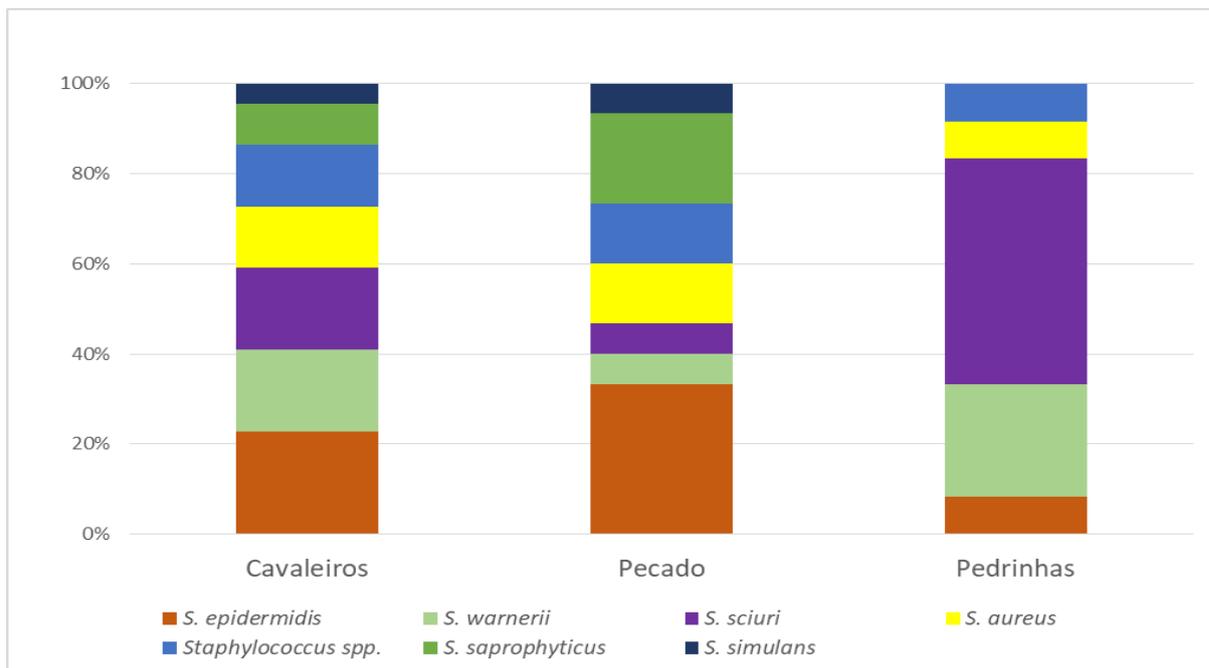
Dentre as estirpes estafilocócicas, *S. sciuri* e *S. epidermidis* foram as mais frequentes (22,4%, n=11 cada), representando quase metade (44,9%, n=22) das espécies de *Staphylococcus* identificadas. A seguir, as espécies mais frequentes foram *S. warnerii* (16,3%, n=8), *S. aureus* (12,2%, n=6), *S. saprophyticus* (10,2%, n=5) e *S. simulans* (4,1%, n=2). Seis (12,2%) linhagens de *Staphylococcus* não foram identificadas, de forma segura, em nível de espécies, pela espectrometria de massas - MALDI-TOF (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Identificação em nível de espécie das 49 estirpes isoladas neste estudo em %.



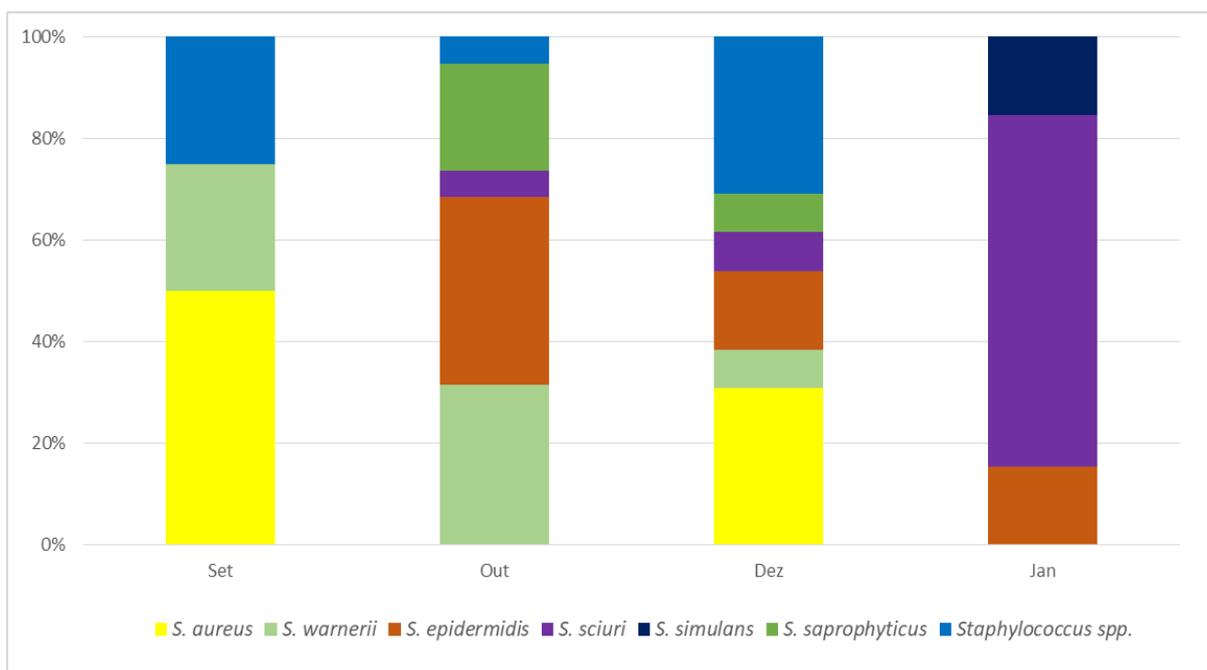
A distribuição de espécies em relação ao local de coleta está representada no gráfico 3. Estirpes de *S. epidermidis* foram mais frequentemente isoladas na praia dos Cavaleiros (22,7%, n=5) e do Pecado (33,3%, n=5), e em menor frequência na praia das Pedrinhas (8,3%, n=1). Por outro lado, *S. sciuri* foi mais frequente nas areias da praia das Pedrinhas (50%, n=6)

Gráfico 3 - Distribuição das espécies de *Staphylococcus* em relação ao local de coleta - Macaé/RJ.



Analisando as estirpes estafilocócicas pela data de coleta, é possível verificar que houve variação no padrão de espécies isoladas ao longo do tempo. A primeira coleta de amostras de areia, realizada em 30/09/20, resultou no menor número de estirpes isoladas, com isolamento de *S. aureus* (50%, n=2), *S. warnerii* (25%, n=1) e de uma estirpe de *Staphylococcus* cuja espécie não foi identificada (25%, n=1). No dia 27/10/20, foi isolado o maior número de estirpes, com destaque para *S. epidermidis* (36,8%, n=7), *S. saprophyticus* (21%, n=4) e *S. warnerii* (31,6%, n=6). No dia 01/12/20, o isolamento dessas três espécies reduziu, havendo um aumento nas estirpes de *S. aureus* (30,7%, n=4), que foram majoritariamente detectadas neste dia. No dia 05/01/21, isolamos apenas *S. sciuri* (69,2%, n=9), *S. epidermidis* (15,4%, n=2) e *S. simulans* (15,4%, n=2). O maior número de estirpes de *S. sciuri* (n=9) e as duas estirpes de *S. simulans* foram isoladas neste dia (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Distribuição das espécies de *Staphylococcus* em relação à data de coleta.



5.2 Susceptibilidade antimicrobiana e correlação com o local de coleta

O teste de difusão a partir do disco foi empregado para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana das estirpes estafilocócicas frente a 11 antimicrobianos de classes selecionadas, dentre as recomendadas pelo CLSI e BrCAST. A tabela 6 mostra as taxas de resistência verificadas entre as estirpes de *Staphylococcus* isoladas no presente estudo.

Os maiores índices de resistência foram encontrados para penicilina, para a qual mais da metade (55,1%, n=27) das estirpes isoladas apresentou resistência, sendo que todos os *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. simulans* foram resistentes a este antimicrobiano. Dezenove (38,8%) linhagens foram resistentes a oxacilina (outro beta-lactâmico), incluindo todos os *S. saprophyticus* (n=5), 90% (n=9) dos *S. sciuri* e mais de 20% (n=3) dos *S. epidermidis*. Somente um (2%) isolado, cuja espécie não foi determinada, foi resistente à cefoxitina.

A eritromicina foi o terceiro antimicrobiano para o qual mais amostras apresentaram resistência (36,7%). Pelo menos uma estirpe de cada uma das espécies de *Staphylococcus*

identificadas foram resistentes a este antimicrobiano. Todas as 11 linhagens de *S. epidermidis* e mais de 30% (n=2) dos *S. aureus* apresentaram esse perfil. Para sulfametoxazol-trimetoprima (STX), clindamicina e ciprofloxacina as taxas de resistência foram de, respectivamente, 26,5% (n=13), 24,5% (n=12) e 20,4% (n=10). A resistência a STX foi mais marcante entre *S. saprophyticus* (80%, n=4) e *S. epidermidis* (72,7%, n=8). *S. epidermidis* também foi a espécie com mais estirpes resistentes à ciprofloxacina (63,6%, n=7). Para clindamicina, foi verificada uma elevada taxa de resistência especificamente entre *S. sciuri* (81,8%, n=9). Por outro lado, nenhuma linhagem foi resistente à gentamicina, linezolid, mupirocina e tigeciclina.

Tabela 7 - Perfil de resistência aos antimicrobianos das estirpes de *Staphylococcus spp.* isoladas de amostras de areia de praias do litoral sul de Macaé/RJ.

Espécie (n)	Antimicrobiano						
	CEF	CIP	CLI	ERI	PEN	OXA	STX
<i>S. epidermidis</i> (11)	0	7 (63,6%)	0	11 (100%)	11 (100%)	3 (23,2%)	8 (72,7%)
<i>S. sciuri</i> (11)	0	1 (9,1%)	9 (81,8%)	1 (9,1%)	4 (36,7%)	10 (90%)	1 (9,1%)
<i>S. warnerii</i> (8)	0	1 (12,5%)	0	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0	0
<i>S. aureus</i> (6)	0	0	0	2 (33,3%)	6 (100%)	1 (9,1%)	0
<i>S. saprophyticus</i> (5)	0	1 (20%)	0	1 (20%)	3 (60%)	5 (100%)	4 (80%)
<i>S. simulans</i> (2)	0	0	0	1 (50%)	2 (100%)	0	0
<i>Staphylococcus spp.</i> (6)	1 (16,7%)	0	3 (50,0%)	1 (16,7%)	0	0	0
Total (49)	1 (2,0%)	10 (20,4%)	12 (24,5%)	18 (36,7)	27 (55,1%)	19 (38,8%)	13 (26,5%)

Dez (23,3%) das estirpes estafilocócicas isoladas no presente estudo foram resistentes a pelo menos três diferentes classes de antimicrobianos, e foram, portanto, consideradas resistentes a múltiplas drogas (MDR) (Tabela 8). Considerando apenas *S. epidermidis*, o percentual de MDR foi ainda maior, correspondendo a 72,7%, (n=8). Além disso, todas as estirpes de *S. epidermidis* apresentaram resistência a pelo menos duas classes de

antimicrobianos. Entre *S. sciuri* e *S. saprophyticus* foi detectada uma estirpe MDR de cada espécie, correspondendo a um percentual de 9,1% entre *S. sciuri* e 20% entre *S. saprophyticus*. Nessas duas espécies, não detectamos nenhuma estirpe que fosse sensível a todos os antimicrobianos. Considerando todas as espécies estafilocócicas encontradas, o maior número de espécies MDR foi encontrado nas praias do Pecado e Cavaleiros, que abrigaram 50% (n=5) e 40% (n=4) das estirpes MDR, respectivamente, que pertenceram principalmente à espécie *S. epidermidis*. Somente uma (10%) amostra com este fenótipo foi detectada na praia de Pedrinhas.

Tabela 8 - Perfis de resistência aos antimicrobianos identificados entre 49 espécies de *Staphylococcus* isoladas de amostras de areia coletadas em praias do litoral sul de Macaé/RJ.

Espécie	Perfil de resistência	n (%)	MDR n (%)
<i>S. epidermidis</i> (11)	ERI-PEN	3 (27,3%)	8 (72,7%)
	ERI-PEN-STX	1 (9,1%)	
	CIP-ERI-PEN-STX	4 (36,3%)	
	CIP-ERI-PEN-STX-OXA	3 (27,3%)	
<i>S. sciuri</i> (11)	CIP-CLI-ERI-PEN-OXA-STX	1 (9,1%)	1 (9,1%)
	CLI-PEN-OXA	3 (27,3%)	
	CLI-OXA	4 (36,3%)	
	CLI	1 (9,1%)	
	OXA	2 (18,1%)	
<i>S. warnerii</i> (8)	CIP-ERI	1 (12,5%)	0
	PEN	1 (12,5%)	
	-	6 (75,0%)	
<i>S. aureus</i> (6)	ERI-PEN	2(33,3%)	0
	PEN-OXA	1 (16,6%)	
	PEN	3 (50,0%)	
<i>S. saprophyticus</i> (5)	OXA-STX	2 (40,0%)	1 (20%)
	PEN-OXA	1 (20,0%)	
	PEN-OXA-STX	1 (20,0%)	
	CIP-ERI-PEN-OXA-STX	1 (20,0%)	
<i>S. simulans</i> (2)	PEN	2 (100,0%)	0
<i>Staphylococcus spp.</i> (6)	CEF	1(16,6%)	0
	CLI	3(50,0%)	
	ERI	1(16,6%)	

Os menores percentuais de estirpes resistentes aos antimicrobianos foram detectados na praia das Pedrinhas, exceto com relação à clindamicinas, para a qual 58,3% dos isolados apresentaram fenótipo de resistência (Tabela 9). Nas praias do Pecado e Cavaleiros foram

observados percentuais bastantes semelhantes de estirpes resistentes a penicilina (40,7% e 44,3%, respectivamente), ciprofloxacina (40% em ambas as praias) e oxacilina (36,7% em ambas as praias). Na praia de Cavaleiros houve maior concentração das linhagens resistentes a eritromicina (50%, n=9), enquanto mais da metade das amostras resistentes a STX (53,8%, n=7) foi identificada na praia do Pecado.

Tabela 9 - Resistência aos antimicrobianos em estirpes estafilocócicas isoladas de areia coletadas de praias do litoral sul de Macaé/RJ, de acordo com a espécie identificada.

Praia	Espécie isolada	CIP (n=10)	CLI (n=12)	ERI (n=18)	OXA (n=19)	PEN (n=27)	STX (n=13)	MDR (n=10)
Cavaleiros	<i>S. epidermidis</i>	3	-	5	1	5	3	3
	<i>S. sciuri</i>	1	2	1	4	1	1	1
	<i>S. warnerii</i>	-	-	-	-	1	-	0
	<i>S. aureus</i>	-	-	1	-	3	-	0
	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	2	1	1	0
	<i>S. simulans</i>	-	-	1	-	1	-	0
	<i>Staphylococcus spp</i>	-	1	1	-	-	-	0
	Total	4 (40%)	3 (25%)	9 (50%)	7 (36,8%)	12 (44,4%)	5 (38,4)	4 (40%)
	Pecado	<i>S. epidermidis</i>	3	-	5	2	5	4
<i>S. sciuri</i>		-	1	-	1	1	-	0
<i>S. warnerii</i>		-	-	-	-	-	-	0
<i>S. aureus</i>		-	-	-	1	2	-	-
<i>S. saprophyticus</i>		1	-	1	3	2	3	1
<i>S. simulans</i>		-	-	-	-	1	-	0
<i>Staphylococcus spp</i>		-	1	-	-	-	-	0
Total		4 (40%)	2 (16,6%)	6 (33,3%)	7 (36,8%)	11 (40,7%)	7 (53,8%)	5 (50%)
Pedrinhas		<i>S. epidermidis</i>	1	-	1	-	1	1
	<i>S. sciuri</i>	-	6	-	5	2	-	0
	<i>S. warnerii</i>	1	-	1	-	-	-	0
	<i>S. aureus</i>	-	-	1	-	1	-	0
	<i>S. simulans</i>	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Staphylococcus spp</i>	-	1	-	-	-	-	0
	Total	2 (20%)	7 (58,3)	3 (16,6%)	5 (26,3%)	4 (14,8%)	1 (7,7%)	1 (10%)

5.3 Presença dos genes *mecA*, *mecC* *epvl* e correlação com data e local da coleta.

A pesquisa dos genes *mecA* e *mecC*, associados à resistência à meticilina foi realizada em todas as linhagens identificadas como gênero *Staphylococcus*. O gene *mecC* não foi encontrado em nenhuma delas. No entanto, o gene *mecA* foi encontrado em 11 estirpes, as quais estão descritas no Quadro 2. Este gene foi encontrado em sete (63,6%) das 11 amostras de *S. epidermidis* isoladas no estudo. As demais estirpes *mecA*⁺ foram *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans* e *Staphylococcus* spp. Nenhuma linhagem *mecA*⁺ foi isolada na primeira coleta (30/09/2020). Oito (72,7%) das estirpes carreadoras do gene *mecA*, incluindo os *S. epidermidis* *mecA*⁺ (n=7), foram isoladas na coleta seguinte, realizada no dia 27/10/2020. Além disso, todas as estirpes carreadoras do gene *mecA* isoladas nesta data apresentaram fenótipo MDR. Com exceção de uma amostra de *S. epidermidis*, isolada na praia das Pedrinhas, todas as demais estirpes *mecA*⁺ isoladas em 27/10/2020 foram oriundas das praias de Cavaleiros e Pecado. É importante frisar que as estirpes foram isoladas na mesma data, porém em pontos diferentes das praias.

Na coleta do dia 01/12/2020, foram isoladas somente duas estirpes *mecA*⁺, de espécies diferentes, mas ambas oriundas de um mesmo ponto na praia de Pedrinhas. Nenhuma das duas foi caracterizada como MDR. Finalmente, apenas uma estirpe carregando o gene *mecA* foi identificada no dia 05/01/2021. Esta estirpe foi caracterizada como *S. simulans* resistente somente à penicilina.

Nenhuma linhagem positiva para o gene *mecA* foi resistente à cefoxitina e somente cinco (45,5%) foram resistentes à oxacilina. Todas as estirpes de *S. epidermidis* *mecA*⁺ isoladas neste estudo foram resistentes à ciprofloxacina, eritromicina, penicilina e STX, mas somente três delas foram resistentes à oxacilina. Essas três estirpes resistentes à oxacilina apresentaram também um fenótipo de resistência simultânea à eritromicina, ciprofloxacina, penicilina, e STX, e foram detectadas nas praias de Cavaleiros e Pecado. Este mesmo fenótipo foi detectado em um *S. saprophyticus* *mecA*⁺ isolado na praia do Pecado no mesmo dia (27/10/20) e no mesmo ponto que uma estirpe de *S. epidermidis* que apresentou este fenótipo, sendo, portanto, provenientes da mesma amostra de areia. Das 60 amostras de areia coletadas, foram isoladas 11 estirpes de *Staphylococcus* portadores do gene *mecA* sendo que duas foram

detectadas em uma mesma amostra de areia. Assim, consideramos que estirpes positivas para este gene foram encontradas em 15% (9) das amostras de areia. O local com maior número de amostras de areia na qual isolamos estirpes *mecA*+ foi a praia do Pecado (20%, n=4 amostras), seguido de Cavaleiros (15%, n=3 amostras) e Pedrinhas (10%, n=2 amostras). O gene *pvl*, que codifica a leucocidina de Pantón-Valentine, foi pesquisado em todas as estirpes de *S. aureus* isoladas no presente estudo, mas não foi detectado em nenhuma delas.

Tabela 10 - Identificação, data, local de coleta e perfil de resistência de estirpes de *Staphylococcus mecA*+ isoladas de amostras de areia coletadas de praias do litoral sul de Macaé/RJ.

Identificação da estirpe	Data da Coleta	Praia	Ponto de Coleta	Espécie	Perfil de resistência
5	27/10/2020	Cavaleiros	2	<i>S.epidermidis</i>	CIP-ERI-PEN-STX
19	27/10/2020	Cavaleiros	3	<i>S.epidermidis</i>	CIP-ERI-PEN-STX
33	27/10/2020	Cavaleiros	5	<i>S.epidermidis</i>	CIP-ERI-PEN-OXA-STX
25	27/10/2020	Pecado	2	<i>S.epidermidis</i>	CIP-ERI-PEN-OXA-STX
27	27/10/2020	Pecado	3	<i>S.epidermidis</i>	CIP-ERI-PEN-STX
11	27/10/2020	Pecado	5	<i>S.epidermidis</i>	CIP-ERI-PEN-OXA-STX
22	27/10/2020	Pedrinhas	2	<i>S.epidermidis</i>	CIP-ERI-PEN-STX
24	27/10/2020	Pecado	2	<i>S.saprophyticus</i>	CIP-ERI-PEN-OXA-STX
63	01/12/2020	Pedrinhas	1	<i>S. sciuri</i>	CLI-PEN-OXA
66	05/01/2021	Pecado	4	<i>S. simulans</i>	PEN
62	01/12/2020	Pedrinhas	1	Staphylococcus spp.	CLI

6. DISCUSSÃO

As amostras de areia foram coletadas uma vez por mês, das praias do Pecado, Cavaleiros e Pedrinhas, que se localizam no litoral sul de Macaé/RJ. Buscando compreender o papel da areia de praia como reservatório de espécies de *Staphylococcus*, inclusive aquelas mais associadas à colonização e infecções em humanos, as coletas foram realizadas em dias posteriores a finais de semana quentes e ensolarados, nos quais as praias tradicionalmente recebem grande fluxo de banhistas. Além disso, embora o presente estudo tenha sido realizado durante a pandemia da COVID-19, as coletas foram somente iniciadas quando os indicadores de mobilidade (GOOGLE, 2020) passaram a apontar queda nos índices de isolamento social no município, período que coincidiu com o final do inverno.

Para isolamento das estirpes de *Staphylococcus*, foi utilizado um protocolo baseado nos estudos de Goodwin e colaboradores (2012) e Pinto (2012). Há poucos estudos na literatura mundial sobre a presença *Staphylococcus* em areias de praia, sendo a maioria deles fora do Brasil e destinados quase totalmente ao isolamento de MRSA (SOGÉ et al, 2009; GOODWIN et al, 2012; THAPALIYA et al, 2017, GERKEN et al, 2021). Portanto, as características da areia das praias de Macaé demandaram mudanças no protocolo de Goodwin e colaboradores, que foi realizado em praias da Califórnia (EUA). A principal alteração foi a exclusão da etapa de filtragem, que se mostrou mais adequada para areias pedregosas. Utilizamos também etapas do protocolo de Pinto (2012), que avaliou areias do litoral de São Paulo, porém trocando o ágar Baird-Parker por ágar Manitol, para selecionar tanto estirpes de *S. aureus* quanto de *Staphylococcus* coagulase negativo. Em um estudo piloto, incluímos o uso do ágar cromogênico para detecção de estirpes resistentes à meticilina. O uso deste último meio para determinação de MRSA em água e areia de praia já havia sido avaliado com sucesso por Goodwin e Pobuda (2009). No entanto, em nosso estudo, este meio não se mostrou eficaz, pois indicou resultados falso positivos, indicando seis estirpes como *S. aureus* resistentes à meticilina. Destas, cinco amostras eram de *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina e uma foi caracterizada como *Corynebacterium variabile* também resistente ao beta-lactâmico. Devido a baixa especificidade, o uso do ágar cromogênico não foi incorporado no protocolo final. Acreditamos que a quantidade de falsos positivos obtidas nessa fase inicial do nosso estudo se deve ao fato de utilizarmos amostras ambientais. Umas maiores especificidades dos métodos fenotípicos são identificadas em isolados clínicos (VEENEMANS, 2013).

Os membros da família Staphylococaceae suportam bem o estresse osmótico. Estudos indicam que *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* e outras espécies incluindo *S. aureus* crescem sob concentrações de 10% de sal (NaCl) (SCHLEIFER; KLOOS, 1975). *S. condimentii*, *S. carnosus* e *S. piscifermentans* podem se multiplicar a 15% de NaCl (CHOI et al, 2014) e *S. agnetis* suporta até 19% de salinidade (TAPONEN et al 2012). No entanto, a tolerância ao estresse osmótico em *Staphylococcus* isolados de águas marinhas é ainda maior, sendo possível encontrar linhagens que sobrevivem em até 20% de sal (NaCl) (DAS et al, 2019). Assim, os *Staphylococcus* podem estar adaptados ao habitat da areia de praias. O protocolo proposto no presente estudo contou com uma etapa de incubação em meio TSB contendo 10% de NaCl, sem agitação, para o favorecimento do crescimento de bactérias deste gênero e inibição de outros microrganismos. Espécies do gênero *Enterococcus* podem suportar uma taxa elevada de NaCl (6,5%). Sabe-se, que em águas costeiras, podem ser encontrados *Enterococcus* que sobrevivem em até 9,0% de sal (DAS et al, 2019). Portanto, o isolamento de oito estirpes (12,1%) de *Enterococcus*, no presente estudo, já era esperado.

Em areia de praia também é comum o isolamento de outras bactérias halotolerantes, como *Bacillus* spp. (STABNIKOV et al, 2013). Nosso estudo detectou cinco (7,6%) estirpes de *Exiguobacterium*, das quais não foi obtida uma identificação segura a nível de espécie usando a espectrometria de massas. Bactérias deste gênero são halotolerantes e, embora a maioria relatada resista a menos de 10% de NaCl (PATEL et al, 2018; RAMONSELLEZ et al, 2018), algumas, como *E. aurantiacum*, podem se multiplicar concentrações superiores a 12% ou 13% (SU et al, 2022). Além disso, López colaboradores (2021) recentemente relataram que este gênero possui elevada xerotolerância, o que pode torná-la adaptável à areia seca e exposta ao sol. Assim, o isolamento dessas espécies através do protocolo também não foi surpreendente. Do total de 60 amostras de areia coletadas, 36 (60%) apresentaram crescimento de *Staphylococcus*. Dessas 36 amostras, foram isoladas 71 estirpes, sendo que 49 (69%) foram identificadas como *Staphylococcus* e 22 (31%) pertenceram a outros gêneros. Como o protocolo foi capaz de detectar bactérias com menor tolerância ao sal, entendemos que, apesar do isolamento de um alto número de estirpes não-estafilocócicas, o protocolo teve sucesso em recuperar o maior número possível de *Staphylococcus* presente nas amostras de areia avaliadas.

A maior parte das estirpes estafilocócicas foi isolada da praia de Cavaleiros, seguido da Praia do Pecado e por último, a Praia de Pedrinhas. A Praia de Cavaleiros é a mais frequentada pela população, representando um polo de entretenimento e que apresenta maior

número de estabelecimentos comerciais em sua orla. Por outro lado, a praia das Pedrinhas é a mais afastada do centro, sem acesso para carros. Isto sugere que a circulação humana possa influenciar fortemente a ocorrência das estirpes de *Staphylococcus* nessas praias.

Quando observamos a data em que as amostras foram coletadas, verificamos que o menor número de estirpes estafilocócicas foi isolado no dia 30/09. Esta data sucedeu o primeiro final de semana após o início da primavera e foi coincidente com a detecção do aumento de circulação de pessoas após o isolamento social imposto pelos órgãos municipais. É possível que, nesta data, a frequência de banhistas na praia ainda estivesse reduzida. Na segunda coleta (dia 27/10) foi isolado o maior número de *Staphylococcus*, sendo a maioria *S. epidermidis*. A ocorrência de um final de semana antes (dias 24 e 25/10) e um feriado depois (dia do servidor público - 28/10) em relação à data de coleta, pode ter contribuído para maior circulação de pessoas nas praias nesta época. Já a coleta do dia 05/01 resultou em menos estirpes do que no dia 27/10, sendo a maioria pertencente às espécies *S. sciuri* e *S. simulans*, que são, usualmente, bactérias de origem animal e ambiental (SHIMIZU, 1992; STEPIEŃ-PYŚNIAK et al, 2017). A análise dos dados meteorológicos permitiu verificar que embora no final de semana anterior ao dia 05/01 não tenha histórico de chuvas, os dias 31/12 e 01/12 foram chuvosos na cidade de Macaé. Vale lembrar que as festas de *reveillon* de 2020/2021, que tradicionalmente ocorrem nas praias, foram canceladas pela prefeitura, em função da pandemia. Tais fatos podem ter afastado a população das praias no final de 2020 e início de 2021.

Os estudos existentes na literatura que avaliam espécies estafilocócicas em areias buscam identificar, de forma prioritária, a espécie *S. aureus*. Quando abordam SCN, não identificam as espécies encontradas, o que impede uma comparação de nossos resultados com a literatura. Em nosso estudo, as principais espécies identificadas foram *S. sciuri* e *S. epidermidis*, correspondendo a 11 (22,4%) estirpes cada. *S. sciuri* é uma bactéria com elevada tolerância ao sal, (NAZIPI et al, 2021; TAJ et al, 2021) e amplamente disseminada em diversos nichos ambientais. É frequentemente encontrada na mucosa nasal de animais selvagens, no solo e raramente encontrada em infecções humanas (KUMAR et al, 2018; MESERVEY et al, 2019; NEYAZ et al, 2020; REY PÉREZ et al, 2021; SARAIVA et al, 2021). A detecção de mais de 22% de estirpes pertencentes a esta espécie nas amostras de areia é, portanto, condizente com a característica ambiental e ubíqua de *S. sciuri*. Ela foi encontrada em maior proporção na praia de Pedrinhas, considerada mais pristina em relação a

Cavaleiros e Pecado, podendo indicar menor contaminação humana, sobretudo pela dificuldade de acesso à localidade.

No entanto, é importante destacar que, apesar de somente uma amostra (9,1%) de *S. sciuri* apresentar o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), nove (81,8%) estirpes desta espécie foram resistentes à clindamicina. *S. sciuri* são bactérias bastante associadas a animais e, nesses grupos, as maiores taxas de resistência parecem ser encontradas para beta-lactâmicos e clindamicina (RUIZ-RIPA et al, 2020; DHAOUADI et al, 2022; EGYIR et al, 2022). Em um estudo na África que avaliou a colonização nasal em 311 animais de rebanho (bovinos, ovinos, caprinos e suínos), *S. sciuri* foi a espécie de *Staphylococcus* mais comum (85,8%), sendo que a taxa de resistência a clindamicina foi de 80%, similar ao nosso estudo. Neste mesmo estudo, os autores selecionaram as estirpes resistentes à metilicina para uma avaliação genotípica mais aprofundada e verificaram que todas as MR-*S. sciuri* carregavam os genes *sal(A)*, que conferem resistência às lincosaminas, classe da qual faz parte a clindamicina. *S. sciuri* também foi a espécie mais encontrada (68,2%) entre 173 estirpes estafilocócicas isoladas de pássaros selvagens e aves migratórias na Espanha (RUIZ-RIPA et al., 2020). Curiosamente, essas estirpes foram todas resistentes à clindamicina e positivas para o gene *sal(A)*. É importante reforçar que em nosso estudo, *S. sciuri* foi encontrado majoritariamente na praia das Pedrinhas, mais especificamente na coleta do dia 05/01. Das nove amostras de *S. sciuri* resistentes à clindamicina, cinco foram isoladas de areias coletadas neste dia e nesta praia. Tal fato nos sugere que essas estirpes possam ser oriundas da fauna presente na praia nesta época do ano, e alerta para a possibilidade do carreamento de estirpes resistentes por animais selvagens. Além disso, esta espécie é considerada um reservatório de genes de virulência e de resistência (NEMEGHAIRE et al, 2014; SARAIVA et al, 2021), podendo ser um vetor de transmissão para outras espécies de *Staphylococcus* (ZEMAN et al, 2017).

Já *S. epidermidis*, que similarmente a *S. sciuri* correspondeu a 22,4% da diversidade estafilocócicas encontrada, é uma das bactérias mais comuns na pele humana (BYRD et al, 2018) e também uma das bactérias mais pesquisadas no mundo. Ainda assim, há poucos relatos da ocorrência de *S. epidermidis* em solo, especialmente areias de praia. Um estudo antigo, realizado em 1994 no Chile encontrou 31% de *S. epidermidis* entre 85 amostras de água do mar e areia das praias de Viña del Mar, indicando que pode ser comum a ocorrência desta espécie em praias com alta densidade de banhistas. A elevada frequência desta espécie entre nossos isolados provavelmente pode estar relacionada à contaminação humana podendo

ser um indicativo de como a população bacteriana nas areias das praias sofre a influência da circulação de pessoas naqueles ambientes, tendo em vista que esta espécie foi encontrada com maior frequência nas duas praias de maior densidade de banhistas e mais fácil acessibilidade. A coexistência de *S. sciuri* e *S. epidermidis* nas areias chama atenção para a possibilidade de um fluxo gênico entre essas amostras. Enquanto *S. sciuri* pode ser um transmissor de genes de resistência e virulência entre as espécies, *S. epidermidis*, por sua vez, incorpora facilmente em seu genoma, especialmente em seu cassete cromossômico estafilocócico, fragmentos gênicos de outras bactérias através de um sistema de restrição-modificação denominado hsdS, e devido à ausência de um sistema CRISP-R (XUE et al, 2017).

Nesse contexto, é importante ressaltar que 72,7% (n=8) das estirpes de *S. epidermidis* apresentaram o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR). A maioria dessas estirpes foi isolada na praia dos Cavaleiros e Pecado (n=3 e 4, respectivamente), com menor ocorrência na praia de Pedrinhas (n=1). O fato dessas duas primeiras praias apresentarem o maior fluxo de banhistas e visitantes em geral sugere que a ocorrência de estirpes resistentes aos antimicrobianos está associada à contaminação humana. É possível que o perfil bacteriano encontrado na areia das praias com grande movimento de banhistas reflita um padrão de multirresistência verificado em bactérias da microbiota humana. Embora não existam dados publicados no Brasil, alguns estudos conduzidos em outros países como China (WANG et al, 2021), Bélgica (ARGUDÍN et al, 2015) e Arábia Saudita (ELADLI et al, 2019) indicam que a taxa de *S. epidermidis* MDR em indivíduos da comunidade é superior a 60%, sendo portanto compatível com o perfil detectado em nossas estirpes. Além disso, todas as 11 estirpes de *S. epidermidis* foram resistentes à penicilina e eritromicina. Estudos realizados em outros países (GUO et al, 2019) indicam que são esses antimicrobianos para os quais amostras de *S. epidermidis* de colonização e infecção apresentam as maiores taxas de resistência. No Brasil, taxas de resistência mais altas para penicilina e eritromicina também foram encontradas em *S. epidermidis* isolados de colonização em funcionários de um banco de sangue na cidade de Manaus. Tais fatos reforçam a nossa hipótese de que *S. epidermidis* isolados de areias de praia refletem o padrão encontrado na comunidade.

Em nosso estudo, a espécie *S. aureus* foi encontrada em 10% das 60 amostras de areia. Nenhuma estirpe foi resistente à metilina e nem carregou os genes da PVL. Esses dados são bem diferentes do que reporta a literatura. A maioria dos trabalhos realizados em praias dos EUA encontrou uma prevalência bem maior de amostras de areias positivas para *S. aureus*, entre 20,5% e 53% (GOODWIN et al, 2012; PLANO et al, 2013; THAPALIYA et al, 2017).

Os nossos achados são mais próximos aos de Gerken e colaboradores (2021), no Havaí (EUA) e Akanbi e colaboradores (2017), na África do Sul que encontraram taxas de 7,2% e 11,9%, respectivamente. Com relação à ocorrência de MRSA, os nossos dados destoam de todos os outros autores, que encontraram de 2,7% a 20% de resistência à meticilina entre as amostras de *S. aureus* isoladas em praias. Ainda, enquanto não detectamos nenhuma amostra PVL positiva, os demais estudos ao redor do mundo que avaliaram *S. aureus* oriundos de areia de praias encontram frequências variadas desses genes. Todas as estirpes MRSA detectadas por Plano e colaboradores (2013), na Flórida (EUA), e por Gerken e colaboradores (2021), no Havaí, eram PVL positivas e pertenciam a uma linhagem genética denominada ST8. Já Thapaliya e colaboradores (2017), em Ohio (EUA) encontraram estes genes em cerca de 26% de estirpes MRSA e 18% de estirpes MSSA. Também nesse estudo houve um grande número de estirpes associadas à linhagem ST8. Esses dados permitem elaborar algumas hipóteses. Primeiramente, acreditamos que a ocorrência de *S. aureus* na areia de praias esteja relacionada a diversos fatores, como características sanitárias da região, dinâmica de circulação de pessoas nas praias, aspectos meteorológicos e climáticos, e características geológicas da areia. Em segundo lugar, tudo indica que a areia das praias reflita a epidemiologia de *S. aureus* encontrados na comunidade. Sabe-se que a linhagem conhecida como ST8, fortemente associada à presença de múltiplos genes de virulência, incluindo os da PVL, tem sido predominante nos Estados Unidos na última década (PLANET, 2017), tanto nos hospitais quanto na comunidade. No Brasil, porém, esta cepa é muito pouco encontrada (ARIAS et al, 2017). Sabe-se que a linhagem ST8 tem uma alta capacidade de sobrevivência em fômites, permanecendo viável em superfícies por até oito semanas, sendo significativamente mais transmissível do que as cepas hospitalares e as sensíveis à meticilina (DESAI et al, 2011). Não há estudos que tenham comparado a permanência das diferentes linhagens de *S. aureus* em areias de praias. Contudo, não foi investigada a clonalidade das estirpes identificadas em nosso estudo. Entretanto, é possível que as estirpes predominantes no Brasil não sejam capazes de sobreviver no ambiente hostil proporcionado pela exposição ao sol, salinidade e competição com a microbiota da areia. São necessários mais estudos que possam esclarecer essas questões.

As espécies *S. warnerii*, *S. saprophyticus* e *S. simulans* foram encontradas em 16,3%, 10,2% e 4,1%, respectivamente, das 49 estirpes estafilocócicas encontradas onde 12,2% não foram passíveis de identificação precisa das espécies. A espécie *S.warnerii* é citada principalmente em estudos que avaliam isolados clínicos (KINI et al, 2010; AZIMI et at,

2020). Porém, no estudo de De Souza e colaboradores (2021), no qual foram isoladas 15 cepas de *Staphylococcus* spp. de 100 amostras de águas de consumo na comunidade “Lago do Limão”, localizada a 30 km de Manaus, os autores verificaram que 33,3% eram da espécie *S. warnerii*. Da mesma forma, Sousa e colaboradores (2017) isolaram *S. saprophyticus* a partir da água de praias da cidade do Rio de Janeiro e correlacionaram esses achados ao fato de haver despejo de esgoto nesses locais. Apesar dos estudos citados terem avaliado amostras de água, tais resultados em conjunto aos nossos podem indicar a possibilidade de *S. warnerii* e *S. saprophyticus* serem patógenos de veiculação hídrica relevantes. O fato de que essas duas espécies foram detectadas principalmente na Praia do Pecado e Cavaleiros, que se estão próximas a regiões com maior densidade populacional, e em duas (*S. saprophyticus*) e três (*S. warnerii*) datas de coleta diferentes, reforça a hipótese de que essas estirpes estejam acessando às praias através de um contínuo fluxo de esgoto. É necessária uma avaliação de como se dá o despejo de matéria orgânica sem tratamento nas praias macaenses para esclarecer esta hipótese.

S. saprophyticus são uropatógenos que em geral ocupam o terceiro lugar em frequência em infecções urinárias, atrás de *E. coli* e *Klebsiella* spp., sendo as principais bactérias Gram positivas envolvidas nestes quadros clínicos (HAYAMI et al, 2019; KARIKARI et al, 2022). Vários estudos apontam que a resistência ao STX em estirpes de *S. saprophyticus* varia bastante dependendo da região avaliada, podendo apresentar taxas de 0% (HAYAMI et al, 2019) a 80% (KARIKARI et al, 2022). O STX, assim como os beta-lactâmicos, são os principais antimicrobianos prescritos para terapêutica dessas infecções em crianças e adultos, pois essas drogas apresentam baixo custo e efeitos adversos conhecidos (KANG et al, 2018; SIMÕES E SILVA et al, 2020). Dessa forma, a emergência de uropatógenos resistentes, especialmente ao SXT é preocupante, uma vez que é recomendável que este antimicrobiano só seja prescrito empiricamente para o tratamento de infecções urinárias comunitárias quando a taxa de resistência naquela região seja inferior a 20% (KIM et al, 2018). As cinco estirpes de *S. saprophyticus* isoladas neste estudo apresentaram resistência a pelo menos um beta-lactâmico (penicilina ou oxacilina) e quatro delas (80%) ao STX, o que pode estar refletindo um cenário no qual estirpes resistentes aos antimicrobianos de primeira escolha estejam disseminadas na comunidade, o que pode comprometer o tratamento dessas infecções. Todas as quatro estirpes de *S. saprophyticus* resistentes ao STX também foram resistentes à oxacilina e foram coletadas no dia 27/10, nas praias do Pecado e Cavaleiros, o que indica que possam ter sido oriundas de alguma fonte de contaminação

(possivelmente esgoto) que atingiu as praias naquele período. Além disso, alertamos para a possibilidade das areias de praias serem fonte de contaminação por patógenos resistentes com potencial de causar infecções urinárias.

Considerando as 49 estirpes estafilocócicas isoladas no presente estudo, 10 (20,4%) apresentaram perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR) e 87% demonstraram resistência fenotípica a pelo menos um dos antimicrobianos testados. A ausência de estudos que tenham avaliado as características de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* isoladas de areia de praia limita a comparação de nossos dados com a literatura. Vários estudos indicam a presença de múltiplos genes de resistência em amostras de solo dedicados à agricultura, parques urbanos e até mesmo areias de praia, no Brasil e no mundo (WALSH; DUFFY, 2013; PITONDO-FILHO et al, 2016; FURLAN et al, 2021; MAFIZ et al, 2021; IZMALKOVA et al, 2022). Mafiz e colaboradores (2021) selecionaram oito estirpes bacterianas (nenhum *Staphylococcus*) com diferentes perfis de susceptibilidade a partir de 54 obtidas de solo coletadas de parques urbanos na região de Detroit (EUA). Os autores verificaram que todas as oito estirpes selecionadas eram MDR. Akanbi e colaboradores, que avaliaram a susceptibilidade apenas de *S. aureus* isolados de 10 praias da Cidade do Cabo, na África do Sul, verificaram que todas as 30 estirpes identificadas apresentavam fenótipo MDR. Os achados do nosso estudo, portanto, indicam uma taxa de estirpes com fenótipo MDR inferior ao detectado na literatura em estirpes isoladas de solo, inclusive areia de praia, o que pode ser uma característica da areia das praias no Brasil.

Apenas um grupo avaliou a presença de genes de resistência em amostra de areias de praias do Brasil; mesmo assim, foi utilizada a técnica de sequenciamento e não foram descritas quais as espécies bacterianas carregam estes genes. Em 2020, Furlan e colaboradores detectaram a presença de genes de resistência à polimixina em uma praia do Guarujá/SP. No ano seguinte, os mesmos autores publicaram um estudo no qual avaliaram a presença de 51 genes de resistência em amostras de água e areia de praias nas cidades do Rio de Janeiro, Guarujá e Santos. Eles detectaram nas amostras de areia a presença de genes de resistência a polimixinas, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, glicopeptídeos, macrolídeos lincosaminas e estreptogramina B. Nas praias cariocas, porém, as amostras de areia tendem a apresentar menos genes, e em nenhuma delas foram detectados genes de resistência à polimixina. Os autores também verificaram que o gene *mefA*, que confere resistência aos macrolídeos em *Streptococcus* e os genes *bla*, de resistência aos beta-lactâmicos, foram os mais encontrados (junto ao gene *tet*, de resistência à tetraciclina).

Embora utilizando metodologia diferentes, os achados deste estudo podem ser compatíveis com os nossos, à medida que a resistência a beta-lactâmicos e a eritromicina foram as mais frequentes entre nossos isolados, estando distribuídas em várias espécies e praias.

Curiosamente, Furlan e colaboradores (2021) não incluíram a pesquisa pelo gene *mecA* em seu estudo. Aqui, nós investigamos a presença dos genes *mecA* e *mecC* em todas as amostras estafilocócicas, independente do seu perfil fenotípico de susceptibilidade. Para amostras clínicas, o CLSI (2022) e o BRCast (2022) recomendam utilizar o disco de cefoxitina e oxacilina para predição da resistência à meticilina em *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), e o disco de cefoxitina para detecção dessa resistência em *S. aureus*. Em nosso estudo, não encontramos correlação entre a presença dos genes *mecA* ou *mecC* e a resistência fenotípica a oxacilina e/ou cefoxitina. Das 11 amostras estafilocócicas positivas para o gene *mecA*, todas foram SCN e apenas cinco (45.4%) apresentaram resistência à oxacilina. Isto significa que das 19 amostras resistentes à oxacilina, apenas (26.3%) possuíam o gene *mecA*. A única amostra resistente a cefoxitina, e que pertenceu a uma espécie de *Staphylococcus* não identificada, não possuía o gene *mecA* e também não era resistente à oxacilina. Nossos resultados indicam, portanto, que em amostras ambientais, os parâmetros utilizados para amostras clínicas não são adequados.

Aproximadamente 70% das amostras *mecA* positivas pertenciam à espécie *S. epidermidis*, sendo que, com exceção de uma, todas as demais foram isoladas das praias do Pecado e Cavaleiros. De fato, em outros estudos que avaliam a resistência de *Staphylococcus* isolados de colonização, a espécie *S. epidermidis* é a mais associada ao carreamento do gene *mecA* (MELO COSTA et al, 2014) Considerando todos os 11 *S. epidermidis*, o gene foi detectado em seis (54,5%) das estirpes. Não há estudos na literatura que tenham avaliado amostras de *Staphylococcus* de várias espécies, isoladas de areia de praia, quanto à presença do gene *mecA*. Em *S. aureus*, Akabi e colaboradores detectaram 5% de prevalência deste gene em amostras isoladas das areias de praias da África do Sul. No entanto, os autores não avaliaram outras espécies. Alguns estudos indicam que cerca de 30% dos *S. epidermidis* isolados da população da comunidade (ABDELMALEK et al, 2022) carregam este gene. Em profissionais de saúde essa taxa é maior que 70% (XU et al, 2020). No Brasil, um estudo com profissionais de saúde de um banco de sangue de Manaus identificou que 100% dos funcionários colonizados por *S. epidermidis* carregam cepas *mecA*+

Por outro lado, é possível perceber que todas as amostras de *S. epidermidis mecA*+ foram isoladas na coleta do dia 27/10, de três pontos diferentes da praia dos Cavaleiros, três

pontos da praia do Pecado, e de um ponto da praia das Pedrinhas. A análise do perfil de susceptibilidade permite verificar que todas essas estirpes tinham bastante similaridade. Portanto, é possível que estirpes tão similares tenham acessado vários pontos dessas praias em um mesmo momento do ano a partir do esgoto. Vale lembrar que foi exatamente nesta data e nestas praias (Pecado e Pedrinhas), que a maior parte dos *S. saprophyticus* resistentes ao STX foi isolada. *S. epidermidis* não é uma bactéria comumente encontrada em esgoto. Raros estudos na literatura investigaram e encontraram *Staphylococcus* nestes locais. Gómez e colaboradores (2016) realizaram essa pesquisa em 16 amostras de esgoto de La Rioja, na Espanha. Eles identificaram 32 estirpes de SCN, mas somente uma estirpe de *S. epidermidis*. Assim, nossa primeira hipótese é, novamente, que as cepas *mecA*+ encontradas na praia sejam oriundas de contaminação causada pela circulação humana e que a taxa de amostras *mecA*+ detectada em nosso estudo reflita o padrão de disseminação deste gene em *S. epidermidis* na população comunitária de Macaé. Porém, a concentração das estirpes similares em um único dia, em conjunto a *S. saprophyticus* pode indicar que a origem seja de fato despejo de esgoto em um momento específico. Mais estudos são necessários para avaliar melhor essas duas possibilidades.

Outro fato interessante é que no dia 01/12 foram encontradas duas estirpes *mecA*+, de espécies distintas, em um mesmo ponto da praia das Pedrinhas. O mesmo aconteceu no dia 27/10, quando foram isoladas duas estirpes, de *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* com mesmo perfil de susceptibilidade e positivas para o gene *mecA* no ponto 2 da praia do Pecado. Esses dados sugerem a possibilidade de transmissão de genes entre esses isolados. Em 2012, Forsberg e colaboradores publicaram um estudo onde demonstraram que estirpes bacterianas MDR isoladas do solo podem compartilhar genes de resistência com patógenos humanos.

A inexistência de dados na literatura acerca da ocorrência de *Staphylococcus* em areias de praias assim como a falta de informações de órgãos oficiais sobre a qualidade da areia limita a nossa compreensão dos dados. Apenas um estudo, realizado no Havaí (EUA) verificou a prevalência de *Staphylococcus* em amostras de areia de praia, tendo encontrado essas estirpes em 100% dessas amostras. É possível concluir que as praias avaliadas apresentaram também menor taxa de *S. aureus* (incluindo cepas resistentes e virulentas) e de estirpes MDR que outras praias do mundo. Além dos aspectos moleculares de linhagens estafilocócicas disseminadas no Brasil, que podem não ser adaptadas ao ambiente marinho, outro fator que pode explicar essa baixa ocorrência é a característica das areias na região avaliada. As praias do Espírito Santo e do Norte Fluminense, possuem aspectos geológicas

particulares, apresentando uma alta concentração de minerais como a ilmenita, monazita, rutilo e zircônio, que conferem a areia uma coloração mais escurecida (GONÇALVES; BRAGA, 2019). Um estudo recente conduzido por Orlando e colaboradores (2022) verificou que areias ricas em monozita possuem uma radiação natural que é capaz de inibir em aproximadamente 20% células de *E. coli* e *S. aureus*.

Nosso estudo tem algumas limitações. Primeiramente, não conseguimos correlacionar o perfil microbiológico da areia das praias macaenses com a qualidade da água e da areia, pois o município não disponibiliza um boletim diário com essas informações. Os dados divulgados pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA) para Macaé contemplam os anos de 2012 até Março de 2020. Em segundo lugar, não realizamos análises genômicas mais aprofundadas, que permitiriam avaliar a similaridade genética das amostras e investigar a presença de outros genes de resistência. No entanto, esse é o primeiro estudo no Brasil e no mundo que investigou a diversidade de *Staphylococcus* isolados de praias, com foco no perfil de susceptibilidade dessas amostras. Encontramos uma taxa reduzida de *S. aureus* e nenhum deles resistente à metilina ou portador dos genes da PVL. O número de estirpes MDR também foi relativamente baixo, indicando que as areias das praias de Macaé/RJ apresentam menos contaminação e menor índice de microrganismos resistentes que o verificado em outros países. Isto pode estar relacionado às características da areia da região do Norte Fluminense. Há possibilidade, no entanto, de estirpes resistentes estarem acessando as praias através de despejo de esgoto. Além disso, o maior número de estirpes isoladas pertencentes às espécies *S. epidermidis* e *S. sciuri*, bem como o padrão de distribuição de espécies pelas praias e pelas datas de coleta indica que a areia provavelmente reflete a microbiota de humanos e animais que circulam nesse ambiente. Nesse contexto, alertamos para uma silenciosa disseminação de resistência antimicrobiana nessas populações.

7. CONCLUSÕES

Espécies de *Staphylococcus* foram detectadas em 60% das amostras de areia. Um total de 49 estirpes estafilocócicas foram isoladas, sendo que as espécies mais frequentes foram *S. epidermidis* e *S. sciuri* (22,4% cada). *S. aureus* foi detectado em 10% das amostras de areia e em 12,2% dos *Staphylococcus*.

Os maiores percentuais de resistência foram verificados para penicilina (55,1%), oxacilina (38,8%) e eritromicina (36,7%). O fenótipo MDR foi detectado em 23,3% das estirpes estafilocócicas e em 72,7 de *S. epidermidis*.

Todas as estirpes de *S. epidermidis* foram resistentes à penicilina e à eritromicina, e 72,7% ao STX. Entre *S. sciuri*, 90% foi resistente à oxacilina e 81,8% à clindamicina. Com relação a *S. aureus*, 100% das estirpes foi resistente à penicilina e 30% à eritromicina. As estirpes de *Saprophyticus* foram notavelmente resistentes à oxacilina (100%) e STX (80%).

O gene *mecA* foi encontrado em 11 (22,4%) estirpes, sendo que 70% dessas estirpes eram de *S. epidermidis*. Por outro lado, os genes da PVL e o gene *mecC* não foram encontrados no presente estudo.

A maior parte dos *Staphylococcus* foi oriunda da praia de Cavaleiros, seguido da praia do Pecado, nas coletas de outubro e dezembro. Por outro lado, o menor número de estirpes foi isolado em setembro. Estirpes de *S. epidermidis mecA+* foram mais encontradas nas praias de Cavaleiros e Pecado, em outubro, enquanto *S. sciuri* resistente à clindamicina foi mais isolado na praia de Pedrinhas em janeiro. *S. saprophyticus* resistente ao STX foi predominantemente achado na praia do Pecado em outubro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES DE SOUSA, Marta et al. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2197-2205, 2001.

AI, Xiaolan et al. Prevalence, characterization, and drug resistance of *Staphylococcus aureus* in feces from pediatric patients in Guangzhou, China. **Frontiers in medicine**, v. 7, p. 127, 2020.

ALM, Elizabeth Wheeler; BURKE, Janice; SPAIN, Anne. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. **Water research**, v. 37, n. 16, p. 3978-3982, 2003.

ALONZO III, Francis; TORRES, Victor J. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 199-230, 2014.

AMIRSOLEIMANI, A.; BRION, G.; FRANCOIS, P. Co-Carriage of Metal and Antibiotic Resistance Genes in Sewage Associated *Staphylococci*. **Genes** **2021**, *12*, 1473. <https://doi.org/10.3390/genes12101473>

ANJOS, R. M. et al. Radiometric analysis of Quaternary deposits from the southeastern Brazilian coast. **Marine Geology**, v. 229, n. 1-2, p. 29-43, 2006.

ARVANITIDOU, M.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; TSAKRIS, A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 1001-1005, 2001.

AZIMI T, MIRZADEH M, SABOUR S, NASSER A, FALLAH F, POURMAND MR. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) meningitis: a narrative review of the literature from 2000 to 2020. *New Microbes New Infect.* 2020 Sep 7;37:100755. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100755. PMID: 33014383; PMCID: PMC7522803.

BAIG, Sharmin et al. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 74-76, 2018.

BANNERMAN, Tammy L. et al. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. **Manual of clinical microbiology: Volume 1**, n. Ed. 9, p. 390-411, 2006.

BASTOS, A C.; SILVA, CG. Coastal morphodynamic and geomorphological compartments along the northeast littoral of Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Coastal Research**, p. 309-317, 2003.

BOUROTTE, Christine Laure Marie et al. Kit didático “da rocha ao grão”... de areia. **Terrae Didactica**, v. 10, n. 3, p. 298-304, 2014.

CABOCLO, RMF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. **American journal of infection control**, v. 41, n. 3, p. e21-e26, 2013.

CARTWRIGHT, E JP et al. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify *mecC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2732-2734, 2013.

CHAMBERS, HF. Detection of methicillin-resistant staphylococci. **Infectious disease clinics of North America**, v. 7, n. 2, p. 425-433, 1993.

CHAROENCA, N.; FUJIOKA, R. S. Association of staphylococcal skin infections and swimming. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 5-6, p. 11-17, 1995.

CHESSA, D; GANAU, G; MAZZARELLO, Vittorio. An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. **The journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 06, p. 547-550, 2015.

CHOI, SUNGJONG et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses of NaCl-tolerant *Staphylococcus* sp. OJ82 isolated from fermented seafood. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 807-822, 2014.

CHUN J, OREN A, VENTOSA A, CHRISTENSEN H, ARAHAL DR et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:461–466.

CORSO, A. et al. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. **Microbial drug resistance**, v. 4, n. 4, p. 277-288, 1998.

CRUM, Nancy F. et al. Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 11, p. 943-951, 2006.

DAN, MICHAEL; MARIEN, G. J.; GOLDSAND, G. Endocarditis caused by *Staphylococcus warneri* on a normal aortic valve following vasectomy. **Canadian Medical Association Journal**, v. 131, n. 3, p. 211, 1984.

DARAKAS, Efthymios. *E. coli* kinetics-effect of temperature on the maintenance and respectively the decay phase. **Environmental monitoring and assessment**, v. 78, n. 2, p. 101-110, 2002.

DAVIES, C. M.; BAVOR, H. J. The fate of stormwater- associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 349-360, 2000.

DEGTYAREVA, IRINA A. ET AL. FULL-GENOME SEQUENCING OF THE STAPHYLOCOCCUS WARNERI STRAIN ISOLATED FROM OIL-CONTAMINATED SOIL. **ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ. ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**, V. 10, N. 1 (32), P. 48-55, 2020.

DEPLANO, Ariane et al. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 5, p. 239-245, 2000.

DESAI, Rishi et al. Survival and transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from fomites. **American journal of infection control**, v. 39, n. 3, p. 219-225, 2011.

DÉSIDÉRI-VAILLANT, C. et al. *Staphylococcus simulans* osteitis in a diabetic patient. **Diabetes & metabolism**, v. 37, n. 6, p. 560-562, 2011.

DE SOUZA, Lirna Salvioni Silva et al. Perfil de virulência dos *Staphylococcus* spp. provenientes da orofaringe e da água de consumo da Comunidade Lago do Limão/Itanduba-AM/Virulence profile of *Staphylococcus* spp. from the oropharynx and drinking water samples in the community Lago do Limão in Itanduba-Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 82439-82452, 2021.

DIEKEMA, Daniel J. et al. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 7, p. e00355-19, 2019.

DODOU, H.V. **Atividade antimicrobiana da violaceína sobre *Staphylococcus epidermidis***. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

DOMINGUEZ, M. Angeles et al. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2081-2087, 1994.

DUCHICELA, Jessica et al. Soil aggregate stability increase is strongly related to fungal community succession along an abandoned agricultural field chronosequence in the B olivian A Itiplano. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 5, p. 1266-1273, 2013

EHLERS S, MERRILL SA. **Staphylococcus Saprophyticus**. [Updated 2022 Jun 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482367/>

El-Baghdady KZ, El-Borhamy MI, Abd El-Ghafar HA. Prevalence of resistance and toxin genes in community-acquired and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Iran J Basic Med Sci*. 2020 Oct;23(10):1251-1260. doi: 10.22038/ijbms.2020.40260.9534. PMID: 33149856; PMCID: PMC7585533.

ENNS, Amber A. et al. Spatial and temporal variation in indicator microbe sampling is influential in beach management decisions. **Water research**, v. 46, n. 7, p. 2237-2246, 2012.

ENRIGHT, Mark C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1008-1015, 2000.

FOGLIA, Elizabeth E.; FRASER, Victoria J.; ELWARD, Alexis M. Effect of nosocomial infections due to antibiotic-resistant organisms on length of stay and mortality in the pediatric intensive care unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 3, p. 299-306, 2007.

FURLAN, João Pedro Rueda et al. Presence of colistin resistance *mcr-4* gene and clinically relevant antimicrobial resistance genes in sand samples from a public beach. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, p. 1-6, 2020.

GALLI, Luisa et al. Common community-acquired bacterial skin and soft-tissue infections in children: an intersociety consensus on impetigo, abscess, and cellulitis treatment. **Clinical therapeutics**, v. 41, n. 3, p. 532-551. e17, 2019.

GARCÍA-ÁLVAREZ, Laura et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 595-603, 2011.

GELATTI, Luciane Cristina et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 34-38, 2013.

GHINSBERG, R. C. et al. Monitoring of selected bacteria and fungi in sand and sea water along the Tel Aviv coast. **Microbios**, v. 77, n. 310, p. 29-40, 1994.

GIORMEZIS, Nikolaos et al. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream and prosthetic-device-associated infections: the role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n. 11, p. 1500-1508, 2014.

GOMES, A. R. et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 1, p. 23-32, 2001.

Gómez, P., Lozano, C., Benito, D., Estepa, V., Tenorio, C., Zarazaga, M., & Torres, C. (2016). Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Environmental pollution*, 212, 71-76.

GOODWIN, Kelly D. et al. A multi-beach study of *Staphylococcus aureus*, MRSA, and enterococci in seawater and beach sand. **Water research**, v. 46, n. 13, p. 4195-4207, 2012.

GOOGLE. COVID-19 Community Mobility Reports, 2022. Disponível em: <[google.com/covid19/mobility](https://www.google.com/covid19/mobility)>. Acesso em: 05 de Ago. de 2022.

GORDON, Rachel J.; LOWY, Franklin D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement_5, p. S350-S359, 2008.

Gordon Y. C. Cheung, Justin S. Bae & Michael Otto (2021) Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*, *Virulence*, 12:1, 547-569, DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688

GORIS J, KONSTANTINIDIS KT, KLAPPENBACH JA, COENYE T, VANDAMME P et al. DNA–DNA hybridization values and their relationship to wholegenome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:81–91.

GUPTA RS, LO B, SON J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Front Microbiol* 2018;9:67.

Harch SAJ, MacMorran E, Tong SYC, Holt DC, Wilson J, Athan E, Hewagama S. High burden of complicated skin and soft tissue infections in the Indigenous population of Central Australia due to dominant Panton Valentine leucocidin clones ST93-MRSA and CC121-MSSA. *BMC Infect Dis.* 2017 Jun 7;17(1):405. doi: 10.1186/s12879-017-2460-3. PMID: 28592231; PMCID: PMC5463332.

HEDMAN P, RINGERTZ O, LINDSTROM M, OLSSON K. 1993. The origin of *Staphylococcus saprophyticus* from cattle and pigs. *Scand. J. Infect. Dis.*25:57–60.

HUYCKE, Mark M.; SAHM, Daniel F.; GILMORE, Michael S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 2, p. 239, 1998.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC et al. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 4961, 2009.

ITO, T., HIRAMATSU, K., OLIVEIRA, DC, DE LENCASTRE, H., ZHANG, K., WESTH, H., O'BRIEN, F., GIFFARD, PM, COLEMAN, D., TENOVER, FC, BOYLE-VAVRA, S., SKOV, RL, ENRIGHT, MC, KREISWIRTH, B., KWAN, SK, GRUNDMANN, H., LAURENT, F., SOLLID, JE, KEARNS, AM, GOERING, R., JOHN, JF , DAUM, R., SODERQUIST, B., 2009. Classificação do cromossomo mec da casete estafilocócica (SCCmec): diretrizes para relatar novos elementos SCCmec. *Antimicrobiano. Agentes Chemother.* 53, 4961-4967. [http:// dx.doi.org/10.1128/AAC.01692-15](http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01692-15). S. Baig et ai. *Antimicrobiano. Agentes Chemother.* 59, 7597-7601. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00579-09>.

Jauneikaite E, Ferguson T, Mosavie M, Fallowfield JL, Davey T, Thorpe N, Allsopp A, Shaw AM, Fudge D, O'Shea MK, Wilson D, Morgan M, Pichon B, Kearns AM, Sriskandan S, Lamb LE. Staphylococcus aureus colonization and acquisition of skin and soft tissue infection among Royal Marines recruits: a prospective cohort study. Clin Microbiol Infect. 2020 Mar;26(3):381.e1-381.e6. doi: 10.1016/j.cmi.2019.07.014. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31357012.

JERASSY, Z. et al. Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. **Journal of Hospital Infection**, v. 62, n. 2, p. 230-236, 2006.

KAMATH, U.; SINGER, C.; ISENBERG, H. D. Clinical significance of Staphylococcus warneri bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 261-264, 1992.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549-1555, 2000.

KEARNS, A. M.; PITT, T. L.; COOKSON, B. D. Environmental sampling for MRSA: a note of caution. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, n. 4, p. 350-351, 2005.

KINI GD, PATEL K, PARRIS AR, TANG JS. An Unusual Presentation of Endocarditis Caused by Staphylococcus warneri. Open Microbiol J. 2010 Oct 21;4:103-5. doi: 10.2174/1874285801004010103. PMID: 21258573; PMCID: PMC3024586.

KLOOS, Wesley E.; SCHLEIFER, Karl H.; SMITH, Rodney F. Characterization of Staphylococcus sciuri sp. nov. and its Subspecies 1. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 22-37, 1976.

KLOOS, WESLEY E. Staphylococcus and micrococcus. **Manual of clinical microbiology**, p. 264-282, 1999.

KOURTIS, Athena P. et al. Vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections—United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 9, p. 214, 2019.

KRESKEN M, Klare I, Wichelhaus TA, Wohlfarth E, Layer-Nicolaou F, Neumann B, Werner G; Study Group ‘Antimicrobial Resistance’ of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. Glycopeptide resistance in *Enterococcus* spp. and coagulase-negative staphylococci from hospitalised patients in Germany: occurrence, characteristics and dalbavancin susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Mar;28:102-107. doi: 10.1016/j.jgar.2021.12.016. Epub 2021 Dec 25. PMID: 34958996.

LEE, Andie S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

LESKI, T. et al. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3532-3539, 1998.

LINA, Gerard et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin—producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clinical infectious diseases**, v. 29, n. 5, p. 1128-1132, 1999.

LUO C, RODRIGUEZ-R LM, KONSTANTINIDIS KT. MyTaxa: an advanced taxonomic classifier for genomic and metagenomic sequences. *Nucleic Acids Res* 2014;42:e73.

PANT, Neeraj Chandra et al. Contraceptive sperm agglutinating proteins identified in *Staphylococcus warneri*, natural microflora of an infertile woman. **Indian journal of microbiology**, v. 59, n. 1, p. 51-57, 2019.

PARTE, Aidan C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D613-D616, 2014.

MANNING, N.; WILSON, A. P. R.; RIDGWAY, G. L. Isolation of MRSA from communal areas in a teaching hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, n. 3, p. 250-251, 2004.

MARINCOLA G, LIONG O, SCHOEN C, ABOUELFETOUH A, HAMDY A, WENCKER FDR, MARCINIAK T, BECKER K, KÖCK R, ZIEBUHR W. Antimicrobial Resistance Profiles of Coagulase-Negative Staphylococci in Community-Based Healthy Individuals in Germany. *Front Public Health*. 2021 Jun 17;9:684456. doi: 10.3389/fpubh.2021.684456. PMID: 34222184; PMCID: PMC8247762.

MATHEMA, Barun et al. Evolution and taxonomy of Staphylococci. **Staphylococci in human disease**, v. 2, 2009.

MCCARTHY, Hannah et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 1, 2015.

MCCLARY, Jill S.; BOEHM, Alexandria B. Transcriptional response of *Staphylococcus aureus* to sunlight in oxic and anoxic conditions. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 249, 2018.

MCDUGAL, Linda K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113-5120, 2003.

MCCAIG, Linda F. et al. *Staphylococcus aureus*–associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 11, p. 1715, 2006.

MEIRELLES-PEREIRA, Frederico de et al. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 287-293, 2002.

MENDES, B.; NASCIMENTO, M. J.; OLIVEIRA, J. S. Preliminary characterisation and proposal of microbiological quality standard of sand beaches. **Water Science and Technology**, v. 27, n. 3-4, p. 453-456, 1993.

MIREYA, Urrea Ayala et al. Nosocomial infections in paediatric and neonatal intensive care units. **Journal of infection**, v. 54, n. 3, p. 212-220, 2007.

MONTÚFAR ANDRADE, Franco E. et al. Bacteremia por *Staphylococcus coagulasa* negativo con concentración inhibitoria mínima para vancomicina ≥ 2 . **Infectio**, v. 20, n. 1, p. 3-8, 2016.

MOREIRA, RV de S., et al. "Análise de estabilidade de agregados de fragmentos de mata com diferentes usos no seu entorno." In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 32., 2009, Fortaleza. O solo e a produção de bioenergia: perspectivas e desafios.[Viçosa, MG]: SBCS; Fortaleza: UFC, 2009. 1 CD-ROM., 2009

NAKULESHWAR, Dut Jasuja et al. Isolation and identification of microorganism from polyhouse agriculture soil of Rajasthan. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, n. 41, p. 4886-4891, 2013.

NAMVAR, Amirmorteza Ebrahimzadeh et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. **GMS hygiene and infection control**, v. 9, n. 3, 2014.

NOSHAK, M. A., REZAEI, M. A., HASANI, A., & MIRZAI, M. (2020). The role of the coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS) in infective endocarditis; a narrative review from 2000 to 2020. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 21(12), 1140-1153.

OSHIRO, Robin; FUJIOKA, Roger. Sand, soil, and pigeon droppings: sources of indicator bacteria in the waters of Hanauma Bay, Oahu, Hawaii. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 5-6, p. 251-254, 1995.

OTTER, J. A.; FRENCH, G. L. Bacterial contamination on touch surfaces in the public transport system and in public areas of a hospital in London. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 6, p. 803-805, 2009.

OTTO, Michael. MRSA virulence and spread. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 10, p. 1513-1521, 2012.

PAPADAKIS, J. A. et al. Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater. **Water Research**, v. 31, n. 4, p. 799-804, 1997.

PATERSON, Gavin K.; HARRISON, Ewan M.; HOLMES, Mark A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42-47, 2014.

PEACOCK, Sharon J.; PATERSON, Gavin K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annu Rev Biochem**, v. 84, n. 1, p. 577-601, 2015.

PLANET PJ. Life After USA300: The Rise and Fall of a Superbug. *J Infect Dis*. 2017 Feb 15;215(suppl_1):S71-S77. doi: 10.1093/infdis/jiw444. PMID: 28375517; PMCID: PMC5853207.

PINTO, K. C. et al. Microbiological quality assessment of sand and water from three selected beaches of South Coast, Sao Paulo State, Brazil. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 11, p. 2475-2482, 2012.

REY PÉREZ J, Zálama Rosa L, García Sánchez A, Hermoso de Mendoza Salcedo J, Alonso Rodríguez JM, Cerrato Horrillo R, Zurita SG, Gil Molino M. Multiple Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus sciuri* Group Isolates from Wild Ungulates in Spain. *Antibiotics*. 2021; 10(8):920. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080920>

RIBEIRO, Apoena et al. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community-and hospital-associated diseases. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 59, n. 3, p. 339-345, 2007.

ROBERTS, RICHARD B. et al. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. **Microbial Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 245-251, 2000.

ROBERTS, Richard B. et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 1, p. 164-171, 1998.

ROBERTS, Richard B. et al. Outbreak in a New York City teaching hospital burn center caused by the Iberian epidemic clone of MRSA. **Microbial Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 175-183, 1998.

ROSENTHAL, Victor D. et al. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **American journal of infection control**, v. 38, n. 2, p. 95-104. e2, 2010.

ROLINE, Chad E.; CRUMPECKER, Christina; DUNN, Thomas M. Can methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* be found in an ambulance fleet?. **Prehospital emergency care**, v. 11, n. 2, p. 241-244, 2007.

RYAN, K.J & DREW, W.L. **Staphylococci**. In: Sherris Medical Microbiology – 5th edition, pg. 429. Edited by: Ryan, K.J. & Ray, C.G. McGraw Hill, New York, NY, USA, 2010

SÁ-LEÃO, Raquel et al. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain?. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1913-1920, 1999.

SANCHES, Ilda Santos et al. Extensive intra-hospital spread of a methicillin-resistant staphylococcal clone. **International journal of infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. 26-31, 1998.

SANTOS, Kátia RN et al. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. **Journal of medical microbiology**, v. 48, n. 1, p. 17-23, 1999.

SANTOSANINGSIH, Dewi et al. Prevalence and characterisation of *Staphylococcus aureus* causing community- acquired skin and soft tissue infections on Java and Bali, Indonesia. **Tropical Medicine & International Health**, v. 23, n. 1, p. 34-44, 2018.

SARAIVA, Mauro de Mesquita Souza et al. *Staphylococcus sciuri* as a Reservoir of mec A to *Staphylococcus aureus* in Non-Migratory Seabirds from a Remote Oceanic Island. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 4, p. 553-561, 2021.

SINIGALLIANO, Christopher D. et al. Traditional and molecular analyses for fecal indicator bacteria in non-point source subtropical recreational marine waters. **Water research**, v. 44, n. 13, p. 3763-3772, 2010.

SCHLEIFER, KH.; KLOOS, Wesley E. Isolation and characterization of *Staphylococci* from human skin I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 50-61, 1975.

SCHIERZ, Oliver; BABA, Kazuyoshi; FUEKI, Kenji. Functional oral health- related quality of life impact: A systematic review in populations with tooth loss. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 48, n. 3, p. 256-270, 2021.

SCHLEIFER KH, GEYER U, KILPPER-BÄLZ R, DEVRIESE LA. Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos et al.) to species status: *Staphylococcus lentus* (Kloos et al.) comb. nov. *Syst Appl Microbiol* 1983;4:382–387

SHETTIGAR, K., MURALI, T.S. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39, 2235–2246 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03984-8>

SMAC. SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO. Resolução SMAC nº 468 de 28 de dezembro de 2000. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias do Município do Rio de Janeiro. 2000

SOGE, Olusegun O. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1148-1155, 2009.

SOUSA M, Silva V, Silva A, Silva N, Ribeiro J, Tejedor-Junco MT, Capita R, Chenouf NS, Alonso-Calleja C, Rodrigues TM, Leitão M, Gonçalves D, Caniça M, Torres C, Igrejas G, Poeta P. Staphylococci among Wild European Rabbits from the Azores: A Potential Zoonotic Issue? *J Food Prot.* 2020 Jul 1;83(7):1110-1114. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-19-423. PMID: 32572496.

SOUSA, Viviane Santos de et al. *Staphylococcus saprophyticus* recovered from humans, food, and recreational waters in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, 2017

STABNIKOV, Viktor et al. Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1453-1460, 2013.

STEPANOVIĆ, S. et al. Public transport as a reservoir of methicillin- resistant staphylococci. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 4, p. 339-341, 2008.

STEPHENSON, R. E., GUTIERREZ, D., PETERS, C., NICHOLS, M., & BOLES, B. R. (2014). Elucidation of bacteria found in car interiors and strategies to reduce the presence of potential pathogens. *Biofouling*, 30(3), 337-346.

STEWART, C., COLE, M., LEGAN, J., SLADE, L. AND SCHAFFNER, D. (2005), Solute-specific effects of osmotic stress on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 193-202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02445.x>

SZEMRAJ, Magdalena et al. Staphylococcal species less frequently isolated from human clinical specimens-are they a threat for hospital patients?. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2020.

TAPONEN, Suvi et al. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 1, p. 61-65, 2012.

TEIXEIRA, LENISE A.; LOURENÇO, MARIA CRISTINA S.; FIGUEIREDO, AGNES MS. Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III:: B: A causing invasive disease among AIDS patients in a Brazilian hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 2, n. 4, p. 393-399, 1996.

THOMPSON CC, CHIMETTO L, EDWARDS RA, SWINGS J, STACKEBRANDT E et al. Microbial genomic taxonomy. **BMC Genomics** 2013;14:913

TORRE, Donato et al. Ventriculoatrial shunt infection caused by *Staphylococcus warneri*: case report and review. **Clinical infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 49-52, 1992.

TONG, Steven YC et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TYLER, K. D. et al. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 339-346, 1997.

UEHARA, Yuki. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec). **Antibiotics**, v. 11, n. 1, p. 86, 2022.

URUSHIBARA, Noriko et al. Novel staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) type XIV (5A) and a truncated SCC mec element in SCC composite islands carrying speG in ST5 MRSA in Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 1, p. 46-50, 2020.

ÜNAL, Nilgün; ÇINAR, Oya Doğu. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 2, p. 369-375, 2012.

VEENEMANS, J. et al. Evaluation of brilliance MRSA 2 agar for detection of methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1026-1027, 2013.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; MENEZES, E. A; EVANGELISTA, N. S. S.; REIS, E. M. F.; BARRETO, L. M.; GONÇALVES, F. A. Microbial contamination of sand from major beaches in Fortaleza, Ceará State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 77-80. 2001.

WANG, Yingying et al. Environmental contamination prevalence, antimicrobial resistance and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from secondary schools in Guangzhou, China. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 2, p. 623, 2020.

WHITMAN, R. L. & NEVERS, M. B. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a lake Michigan Beach. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 9, p. 5555-5562. 2003.

WHO. Coastal and fresh waters. **Guidelines for safe recreational water environments**, v. 1, 2003.

WU, ZHAOWEI et al. Novel type XII staphylococcal cassette chromosome mec harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7597-7601, 2015.

WULANDARI, N. F. et al. Preliminary study on bacterial diversity causing human foot odor. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2020. p. 012064.

Zheng, L. *et al.* Inducible resistance to β -lactams in oxacillin-susceptible mecA1-positive *Staphylococcus sciuri* isolated from retail pork. **Frontiers in microbiology**, p. 3151, 2021.