



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia e Saúde

Culminação de Estudos II

Trabalho de Investigação

Caracterização molecular de estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isoladas em amostras de pus e sangue de pacientes atendidos no Hospital Central de Maputo

Autora:

Andrea Ntanga Kenga

Maputo, Novembro de 2023



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia e Saúde

Culminação de Estudos II

Trabalho de Investigação

Caracterização molecular de estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina isoladas em amostras de pus e sangue de pacientes atendidos no Hospital Central de Maputo.

Autora:

Andrea Ntanga Kenga

Supervisores:

José Sumbana, PhD

Nashon Majaliwa, MSc

Maputo, Novembro de 2023

Agradecimentos

À Deus, por ser detentor de amor e misericórdia sem igual e porque Graças a Ele, consegui chegar até aqui.

Aos meus supervisores, Prof. Doutor José Sumbana e Mestre Nashon Majaliwa pelo apoio, acompanhamento, disponibilidade, paciência na orientação e ensinamentos práticos que me transmitiram durante a realização deste trabalho.

Às instituições que tornaram possível a realização deste trabalho, nomeadamente: Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências-UEM, Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina-UEM e Hospital Central de Maputo.

À toda equipe do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM, pela calorosa recepção, paciência e apoio ao longo da elaboração deste trabalho. De forma particular ao Dr. Alfeu Passanduca e aos Mestres: Darlenne Kenga, Alice Manjate, José Carlos, e as Licenciadas: Yara Munguambe, Esménia João, e especialmente à minha colega de estágio Yara Manjate por terem tornado possível a realização deste trabalho.

À Turma da Biologia e Saúde 2019 por proporcionar-me inúmeros momentos de alegria, onde conheci pessoas incríveis e que carregarei para sempre no meu coração, os meus amigos: Anabela Simão, Arcénio Machava, Lucas Chembene, Luís Muchanga, Manuel Naiene e Issufo Sumbana. O meu grupo de trabalho e todos colegas do DCB, agradeço imenso pela ajuda e companhia ao longo da minha formação académica.

E por fim à minha amada família por ser a força motriz que me faz correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir. De forma especial agradeço à minha mãe Maria Ntanga, meu pai Kenga Mbuyi (em memória), meus irmãos Arlette Kenga, Yanic Kenga, Fábio Kenga, Darlenne Kenga, Miranda Kenga e Davina Kenga, meus sobrinhos Nasser, Wesley, Lumir, Andrea, Betty e Mulekinha, e meus amigos Jenyfa Nhavoto, Nidália Mondlane e Joaquim Ucolore.

Muito obrigada a todos que directa ou indirectamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Declaração de Honra

Eu, Andrea Ntanga Kenga, declaro por minha honra, que este trabalho é fruto da minha investigação sob orientação dos meus supervisores, Prof. Doutor José Sumbana e Mestre Nashon Majaliwa. A informação contida neste trabalho reflecte a verdade e nunca foi apresentada em nenhuma instituição com vista a obter algum grau académico, e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Maputo, Novembro de 2023



(Andrea Ntanga Kenga)

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu Deus por ser tudo para mim e a minha família em especial à minha mãe Maria Ntanga, meu pai Kenga Mbuyi Jean Marie (em memória) e aos meus lindos e maravilhosos irmãos Arlette Kenga, Yanic Kenga, Fábio Kenga, Darlenne Kenga, Miranda Kenga e Davina Kenga, por serem o meu maior e mais precioso tesouro.

“The devout can always benefit from listening to nonbelievers. It is in hearing the voice of the devil that we can better appreciate the voice of God”

Dan Brown

Resumo

Introdução: As estirpes de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas e resistentes constituem uma ameaça a saúde pública, principalmente nos países de baixa e média renda, onde são escassos os antibióticos de segunda linha, são altas as taxas de automedicação e há falta de monitoria e regulamentos que vedam o acesso aos medicamentos sem prescrição, contribuindo para a ocorrência de elevadas taxas de morbi-mortalidade pela infecção por *S. aureus*. **Objectivo:** Analisar os factores de resistência e virulência em estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de pus e sangue de pacientes atendidos no Hospital Central de Maputo. **Metodologia:** Trata-se de um estudo descritivo transversal retrospectivo, realizado entre Fevereiro à Julho de 2023, em que, foram incluídas 53 estirpes de *S. aureus* (com o perfil de susceptibilidade aos antibióticos previamente conhecido) isoladas de amostras de pus e sangue de pacientes atendidos no Hospital Central de Maputo, e conservados no Biobanco da Faculdade de Medicina. Os genes de resistência (*mecA*, *femA*) e virulência (*spa*, *sei*) foram identificados usando a Reacção em Cadeia de Polimerase e os dados foram analisados através de frequências feitas pelo programa estatístico SPSS-21 e representados em tabelas feitas no programa *Microsoft Excel*. **Resultados:** Nos 53 isolados de *S. aureus* (22 sensíveis e 31 resistentes à meticilina) incluídos no estudo, os genes de resistência *mecA* e *femA* foram detectados em 20,8% (11/53) e 58,5% (31/53), respectivamente, e os genes de virulência, *spa* e *sei*, foram por sua vez, detectados em 92,5% (49/53) e em 11,3% (6/53), respectivamente. A coexistência dos genes de resistência e virulência foi observada em 64,2% (34/53) dos isolados, onde a combinação *femA+spa+* foi observada em 50,0%, a combinação *mecA+femA+spa+* foi observada em 32,0% e a combinação *femA+spa+sei+* e *spa+sei+* em 9,0% dos isolados. **Conclusão:** As estirpes de *S. aureus* isoladas de pacientes atendidos no Hospital Central de Maputo contêm genes *mecA* e *femA* associados à resistência à meticilina e os genes *sei* e *spa* associados à virulência. Dentre estas estirpes, algumas apresentam diferentes combinações de genes de resistência e virulência, o que sugere sua alta patogenicidade. O estudo propõe a contínua vigilância e caracterização molecular das infecções por *S. aureus*, incluindo a aplicação de medidas de prevenção e controlo.

Palavras-chave: *S. aureus*, resistência antimicrobiana, virulência bacteriana, genes.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AS	Ágar Sangue
CA-MRSA	<i>Community Acquired-Methicilin Resistant Staphylacoccus aureus</i> (<i>Staphylacoccus aureus</i> Resistente a Meticilina-Adquirido na Comunidade)
CC	Complexos Clonais
CNBS	Comité Nacional de Bioética em Saúde
DCB	Departamento de Ciências Biológicas
dNTP	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> (Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EGM	Elementos genéticos móveis
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium; Staphylacoccus aureus; Klebsiella pneumoniae;</i> <i>Acinetobacter baumannii; Pseudomonas aeruginosa; Enterobacter spp.</i>
Fc	<i>Fragment crystalline</i> (Fragmento cristalino)
HA-MRSA	<i>Hospital Acquired-Methicilin Resistant Staphylacoccus aureus</i> (<i>Staphylacoccus aureus</i> Resistente a Meticilina-Aquirido no Hospital)
HCB	Hospital Central da Beira
HCM	Hospital Central de Maputo
HDM	Hospital Distrital da Manhica
IgG	Imunoglobulina G
LB	Lúria Bertani
MDR	Multidroga Resistente
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MRSA	<i>Methicilin Resistant Staphylacoccus aureus</i> (<i>Staphylacoccus aureus</i> Resistente a Meticilina)
MSSA	<i>Methicilin Sensible Staphylacoccus aureus</i> (<i>Staphylacoccus aureus</i> Sensível a Meticilina)
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	<i>Penicillin-binding Protein</i> (Proteína de Ligação à Penicilina)

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
SCC _{mec}	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> (Cassete Cromossômico Estafilococócico <i>mec</i>)
SEs	<i>Staphylococcal enterotoxins</i> (Enteotoxinas estafilococócicas)
SUSAAR	<i>Surveillance of S. aureus Antimicrobial Resistance</i> (Vigilância de <i>S. aureus</i> Resistentes aos Antimicrobianos)
TAE	Tris-acetato-EDTA
TSA	Ágar tríptico de soja
UCI	Unidades de Cuidados Intensivos
UEM	Universidade Eduardo Mondlane
UV	Ultra Violeta

Lista de Símbolos e Unidades

≤	Menor ou igual
-	Negativo
+	Positivo
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μl	Micro litro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
g	gramas
Km	Quilômetros
ml	Mililitro
mm	Milímetros
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minutos
V	Volts

Lista de Figuras

Figura 1: Características morfológicas do <i>S. aureus</i> .	6
Figura 2: Algumas das principais classes de antimicrobianos utilizados no tratamento de <i>S. aureus</i> e seus locais de acção.	8
Figura 3: Principais factores de patogenicidade em <i>S. aureus</i> .	11
Figura 4: Localização geográfica do Hospital Central de Maputo.	13
Figura 5: Fluxograma das análises laboratoriais dos isolados de <i>S. aureus</i> .	22
Figura 6: Electroforese em gel de agarose a 1,5% para visualização dos genes <i>mecA</i> (310 pb) e <i>femA</i> (689 pb).	24
Figura 7: Electroforese em gel de agarose a 1% para visualização do gene <i>spa</i> (101 pb).	25
Figura 8: Electroforese em gel de agarose a 1% para visualização do gene <i>sei</i> (466 pb).	26

Lista de Tabelas

Tabela 1: Iniciadores usados na detecção dos genes de resistência <i>mecA</i> e <i>femA</i>	19
Tabela 2: Reagentes utilizados na Multiplex PCR dos genes <i>mecA</i> e <i>femA</i>	19
Tabela 3: Iniciadores usados na detecção dos genes de virulência <i>spa</i> e <i>sei</i>	21
Tabela 4: Reagentes utilizados na PCR de detecção dos genes <i>spa</i> e <i>sei</i>	21
Tabela 5: Características demográficas dos pacientes, base de dados SUSAAAR-HCM-2022.	23
Tabela 6: Frequência dos genes de resistência <i>mecA</i> e <i>femA</i> em isolados de <i>S. aureus</i>	24
Tabela 7: Frequência dos genes de virulência <i>spa</i> e <i>sei</i> em isolados de <i>S. aureus</i>	25
Tabela 8: Frequência da coexistência dos genes de resistência e virulência em isolados de <i>S. aureus</i>	26
Tabela 9: Associação entre as características demográficas dos pacientes, os isolados da base de dados SUSAAAR-HCM-2022 e a coexistência dos genes de resistência e virulência.	27

Índice geral

Agradecimentos	i
Declaração de Honra.....	ii
Dedicatória.....	iii
Resumo	v
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	vi
Lista de Símbolos e Unidades.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Problema.....	3
1.2. Justificativa.....	4
2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1. Características microbiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.2. Mecanismos de resistência antimicrobiana de <i>S. aureus</i>	6
2.3. Mecanismos de virulência de <i>S. aureus</i>	9
3. Objectivos.....	12
4. Área de estudo	13
5. Metodologia.....	14
5.1. Tipo de estudo.....	14
5.2. Período de estudo e aprovação ética	14
5.3. Tamanho amostral	14
5.4. Variáveis.....	14
5.5. Materiais e Métodos.....	15
5.5.1. Equipamentos do laboratório.....	15

5.5.2. Material de laboratório	15
5.5.3. Meios de cultura	16
5.5.4. Solução e Reagentes	16
5.5.5. Material biológico.....	16
5.5.6. Equipamento de protecção pessoal.....	17
5.5.7. Materiais e Consumíveis	17
5.6.1. Análise da base de dados-SUSAAR-HCM-2022	17
5.6.2. Subcultura de isolados de <i>S. aureus</i>	18
5.6.3. Extracção do ADN genómico de <i>S. aureus</i>	18
5.6.4. Detecção molecular dos genes de resistência <i>mecA</i> e <i>femA</i> em isolados de <i>S. aureus</i>	18
5.6.5. Preparação do gel de agarose.....	20
5.6.6. Detecção molecular dos genes de virulência <i>spa</i> e <i>sei</i> em isolados de <i>S. aureus</i>	20
5.6.7. Fluxograma de análise laboratorial.....	22
5.7. Análise dos dados.....	22
6. Resultados.....	23
6.1. Características demográficas e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de <i>S. aureus</i> -Base de dados SUSAAR-HCM-2022	23
6.2. Detecção dos genes de resistência e virulência de <i>S. aureus</i>	24
6.2.1. Genes de resistência <i>mecA</i> e <i>femA</i>	24
6.2.2. Genes de virulência <i>spa</i> e <i>sei</i>	25
6.3. Coexistência dos genes de resistência e virulência e características da base SUSAAR- HCM-2022	26
7. Discussão.....	28
7.1. Relação entre as características demográficas dos pacientes e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>S. aureus</i>	28

7.2. Detecção dos genes de resistência <i>mecA</i> e <i>femA</i> em isolados de <i>S. aureus</i>	29
7.3. Detecção dos genes de virulência <i>spa</i> e <i>sei</i> em isolados de <i>S. aureus</i>	30
7.4. Coexistência dos genes de resistência (<i>mecA</i> e <i>femA</i>) e virulência (<i>spa</i> e <i>sei</i>)	31
8. Limitações do estudo	32
9. Conclusão	33
10. Recomendações do estudo	34
11. Referências bibliográficas.....	35

1. Introdução

Staphylococcus aureus é um importante agente patogénico causador de diversas doenças infecciosas em humanos e animais apesar de normalmente compor a microbiota dos humanos (Dominski, 2018). Este agente constitui uma ameaça à saúde hospitalar e comunitária em geral, por estar implicada em muitas doenças infecciosas (Andrade, 2013). Estudos globais apontam *S. aureus* como a principal causa de morte associada a agentes patogénicos bacterianos em 2019 (Ikuta *et al.*, 2022; Murray *et al.*, 2022).

S. aureus assume relevância para a saúde pública por fazer parte do grupo ESPAKE, que comporta espécies de largo espectro de resistência antimicrobiana, altos índices de morbidade e mortalidade, sendo a causa de cerca de 13,6% das mortes globais, devido a sua fácil aquisição de factores de resistência e virulência, através de elementos genéticos móveis (EGM) (OMS, 2017; Moodley & Perovic 2018; Ikuta *et al.*, 2022).

As patologias causadas por *S. aureus* podem ser divididas em infecções cutâneas e de tecidos moles como furunculose, impetigo e foliculite; infecções sistêmicas como bacteriemias, sepses, pneumonias, osteomielites e endocardites; intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico e síndrome da pele escaldada (Dominski, 2018).

As opções de antimicrobianos para o seu controlo têm sido reduzidas devido a emergência de estirpes resistentes aos principais antibióticos penicilina, oxacilina, meticilina e vancomicina. Esta resistência estende-se a classe dos β -lactâmicos e está mundialmente disseminada (Asanin *et al.*, 2019), podendo ser desencadeada por mutações no genoma bacteriano ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie, ou de espécies diferentes (Cussolim *et al.*, 2021).

A resistência à meticilina é conferida pela aquisição do gene exógeno *mecA* localizado no cassete cromossômico estafilocócico-*mec* (SCC*mec*) que é um elemento genético móvel adquirido e integrado ao cromossoma do *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) causando mutação da proteína de ligação, e consequentemente permitindo a formação da parede celular bacteriana mesmo em presença de β -lactâmicos (Dominski, 2018; Asanin *et al.*, 2019). Adicionalmente ao *mecA*, o gene cromossomal *femA* é um factor essencial para este fenómeno pois codifica proteínas

que actuam como reguladoras de expressão da resistência à metilina (Kobayashj *et al.*, 1994; Meng *et al.*, 2020).

A variabilidade das infecções causadas por *S. aureus* deriva dos inúmeros factores de virulência codificados em seu genoma, incluindo às estratégias de evasão (Bride, 2015). Vários factores têm sido estudados como marcadores genéticos da virulência de *S. aureus*, incluindo os genes *spa* e *sei*. (Hommes e Surewaard, 2022).

O gene *spa*, codifica a proteína estafilocócica A que está presente na parede celular da bactéria e tem a função de ligar-se a porção Fc do anticorpo IgG no sítio de ligação complementar prevenindo a activação do sistema complemento (Haggag *et al.*, 2019). Para além disso, *S. aureus* é caracterizado por produzir mais de 20 toxinas (incluindo a enterotoxinas estafilocócicas I, SEI, codificada pelo gene *sei*) com alta actividade superantigénica e patogénica por estimular reposta inflamatória agravada em indivíduos infectados (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021).

Em Moçambique, existe informação limitada sobre padrões moleculares de resistência antimicrobiana e virulência de estirpes de *S. aureus*, o que impacta negativamente na seleção da melhor antibioterapia para pacientes infectados pelo *S. aureus*. Em função disso, é importante conhecer os factores de resistência antimicrobiana e virulência das espécies bacterianas que circulam entre os pacientes atendidos no Hospital Central de Maputo, por ser um passo essencial para que sejam tomadas medidas de prevenção e controlo direccionado, e deste modo contribuir para a vigilância epidemiológica fornecendo informações úteis para orientar a terapia antibiótica.

1.1. Problema

As infecções bacterianas são mundialmente reconhecidas como uma ameaça a saúde pública, especialmente nos países de baixa e média renda onde é comum a aglomeração de pessoas nas unidades sanitárias e a falta de saneamento básico, factores que propiciam um ambiente favorável para a sua disseminação (Aiken *et al.*, 2014; Mahaluça, 2019). Nestes países, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima um índice de mortalidade por *S. aureus* de cerca de 25% acima de 40,000 mortes a cada ano a nível global (Mirowska *et al.*, 2021).

Em 2019, a infecção por *S. aureus* esteve entre as principais causas de mortalidade global associada a patógenos bacterianos, onde foi apontada como a maior causa de mortes em 135 países tendo sido responsável por cerca de 1,1 milhão de mortes, e estimou-se que cerca de 80% das mortes reportadas na África Subsaariana foram causadas pelas estirpes MRSA, *S. aureus* também se destacou por ser a maior causa de infecção sanguínea fatal com mais de 200 mil mortes (Murray *et al.*, 2022). Em Moçambique, foi reportada como sendo a terceira maior causa de bacteriemia em crianças menores de 15 anos de idade, (Sigaúque *et al.*, 2009) e a principal causa de morte em recém-nascidos e crianças menores de 5 anos (Sigaúque *et al.*, 2018; Kenga *et al.*, 2021).

O tratamento das infecções hospitalares causadas por *S. aureus* é desafiado pela emergência de estirpes MRSA e multidroga resistentes (MDR) (Garrine *et al.*, 2023b), pelo que, o rastreio destas estirpes na admissão hospitalar do paciente é raramente considerado prioridade nos cuidados de saúde na África Subsaariana, incluindo Moçambique, criando deste modo uma lacuna nas reais prevalências da circulação destas estirpes nesta região (Aiken *et al.*, 2014).

Portanto, os estudos sobre *S. aureus* realizados no Hospital Central de Maputo abordam principalmente o perfil de sensibilidade de *S. aureus*, havendo necessidade de estudos sobre a epidemiologia molecular para melhor controlo e tratamento de infecções. Daí que se levantou a seguinte questão de pesquisa: **Quais são os determinantes de resistência à metilina e factores de virulência em estirpes de *S. aureus* isoladas em amostras de pacientes atendidos no Hospital Central de Maputo (HCM)?**

1.2. Justificativa

O tratamento eficaz e a prevenção das infecções bacterianas, especialmente as causadas por MRSA deve ser baseado na prevalência local e no diagnóstico laboratorial, e isto é possível através da epidemiologia molecular (Hommes e Surewaard, 2022). Em Moçambique, estudos de caracterização molecular são importantes para contribuir na compreensão da patogénese de infecção, estimar a frequência da infecção e os grupos de riscos principalmente em ambiente hospitalar.

A realização do presente estudo é fundamental para trazer o perfil molecular, principalmente os factores de virulência e resistência de *S. aureus* no HCM, orientar o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e auxiliar na definição das medidas preventivas e estratégias de controlo. Adicionalmente, trará uma evidência de base científica que poderá ser usada na elaboração de políticas de gestão de antimicrobianos e para os estudos vindouros.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

O género *Staphylococcus* pertence a família *Staphylococcaceae*, e é constituído por bactérias Gram-positivas que apresentam a forma de cocos com diâmetros que variam de 0,5 a 1,5 µm, dispostas em colónias que se assemelham à cachos-de-uva. *S. aureus* é a espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, por estar relacionada às diversas infecções em seres humanos (de Souza, 2012; Andrade, 2013). *S. aureus* é classificada como aeróbica facultativa, não dispendo de estruturas de locomoção e não formando esporos, em meio sólido, as colónias de *S. aureus* são relativamente grandes, opacas, convexas, cremosas, com coloração que varia de acinzentada à amarelo-dourado intenso (figura 1) (Brooks *et al.*, 2014; Batista, 2015).

A espécie *S. aureus*, tem a capacidade de produzir hemolisinas, que são enzimas responsáveis pela lise das hemácias e distingue-se das outras espécies pela produção da enzima coagulase, responsável por formar um complexo com a protrombina que por sua vez degrada o fibrinogénio em fibrina, formando um coágulo ao redor das células bacterianas e dificultando o acesso dos mecanismos de defesas do hospedeiro (figura 1), por essa razão, *S. aureus* é considerada à espécie mais virulenta do género *Staphylococcus* (Andrade, 2013; Rossi, 2016).

S. aureus caracteriza-se por sobreviver em uma ampla faixa de condições físicas e químicas, com temperatura óptima de multiplicação entre 30°C e 37°C, no entanto, conseguem crescer entre 7°C e 47,8°C, e em condições mais extremas de pH (4,2 – 9,3) e salinidade (até 15% de NaCl) (Rossi, 2016).

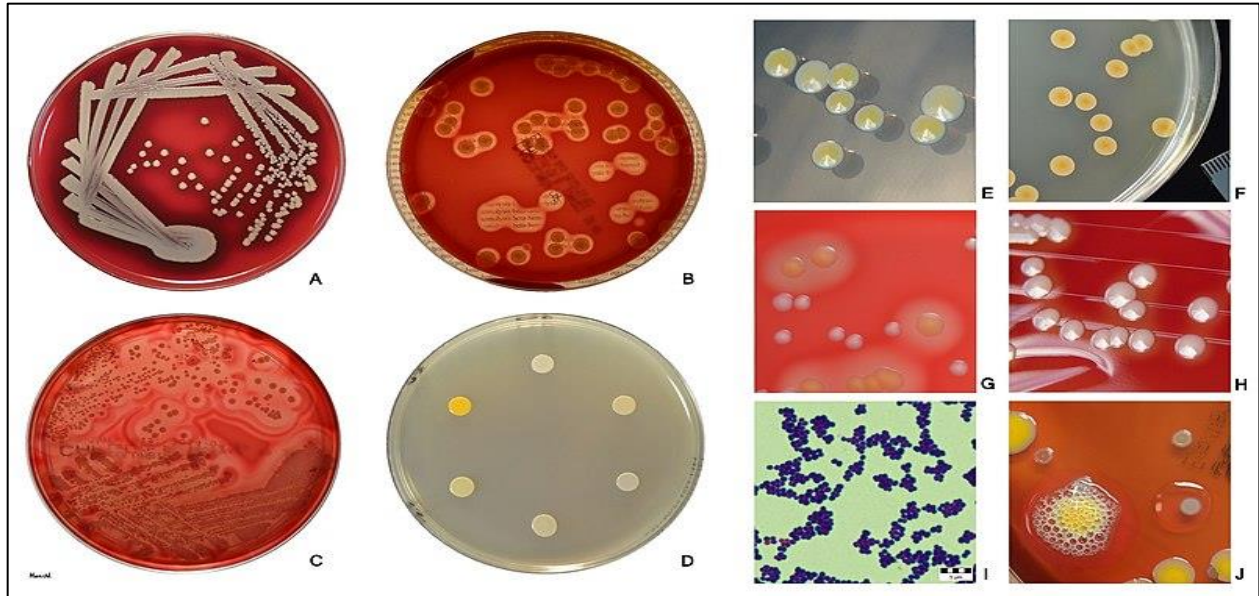


Figura 1: Características morfológicas do *S. aureus*. **A:** Colônias de *S. aureus* em placas de ágar sangue após 24 horas de incubação. **B:** Colônias de *S. aureus* com ampla zona de hemólise completa em meio ágar sangue; **C:** Colônias de *S. aureus* em ágar sangue com hemolisinas completas e incompletas; **D:** Produção de pigmentos em seis estirpes de *S. aureus* em ágar tríplico de soja (TSA); **E:** Colônias de duas estirpes de *S. aureus* em ágar TSA, colônias pouco convexas, lisas e opacas; **F:** Colônias de *S. aureus* em ágar TSA vistas com luz transmitida; **G:** Comparação de colônias de *S. aureus* e *S. epidermidis*, as de primeiras são pigmentadas de amarelo e circundadas por uma hemólise completa; **H:** Colônias de *S. aureus* em ágar sangue sem pigmentação amarela; **I:** Visualização microscópica de *S. aureus* em coloração de Gram; **J:** Bolhas à volta das colônias de *S. aureus* resultantes da degradação do peróxido de hidrogênio. **Fonte:** Bride, 2015.

2.2. Mecanismos de resistência antimicrobiana de *S. aureus*

A resistência antimicrobiana é uma ameaça para a efectiva prevenção e tratamento das infecções. A tendência do aumento de resistência antimicrobiana reportada nos últimos tempos, constitui uma preocupação global por favorecer o surgimento de estirpes resistentes às várias linhas usadas para tratar e controlo infecções (OMS, 2017).

A descoberta do antibiótico penicilina, em 1928, e conseqüente introdução na prática clínica teve um grande impacto no tratamento de infecções, incluindo as causadas por *S. aureus*, no entanto, no início da década de 1940 foram reportados os primeiros casos de resistência à penicilina mediada pelo gene *blaZ*, que codifica a enzima beta-lactamase *BlaZ*, capaz de hidrolisar o anel beta-lactâmico da penicilina, daí foi introduzida a penicilina semi-sintética (metecilina) na prática clínica, no entanto foram registados relatos de estirpes resistentes à metecilina, as estirpes MRSA

(Oliveira, 2021), e estas estirpes resistentes tornam-se cada vez mais prevalentes tanto no ambiente hospitalar (HA-MRSA) como na comunidade (CA-MRSA) (Deyno *et al.*, 2017; Mahaluça, 2019).

A espécie *S. aureus* tornou-se também conhecida pela sua habilidade de desenvolver resistência frente ao tratamento com quaisquer antimicrobianos. Esta bactéria está inserida no grupo “ESKAPE”, um grupo que integra seis espécies patogénicas consideradas uma grande ameaça à saúde global, por apresentar mecanismos que os permitem resistir aos antimicrobianos, sobretudo os isolados no ambiente hospitalar (OMS, 2017). Portanto, o tratamento de infeções causadas por *S. aureus* pode ser feito com base em uso de várias classes de antimicrobianos, entre os quais se destacam: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina, glicopeptídeos, sulfonamidas e afenicóis (Provenzi, 2022).

No entanto, a resistência antimicrobiana já foi reportada em pelo menos um antimicrobiano de cada classe mencionada (Provenzi, 2022), esta resistência pode se dar de forma intrínseca, onde a bactéria pode apresentar características estruturais e funcionais únicas, que conferem resistência a certos antimicrobianos ou de forma adquirida, herdada através do código genético de outras bactérias através de mecanismos de transferência horizontal de genes entre as bactérias (Oliveira, 2021).

Os antimicrobianos actuam em diversos sítios alvo, como: na síntese da parede celular, desestabilizadores da membrana plasmática e celular, na síntese proteica e de ADN, assim como na interrupção do metabolismo bacteriano de moléculas importantes (figura 2). Algumas das estratégias de resistência antimicrobiana envolvem alterações dos sítios alvo de ligação do fármaco, inativação dos antimicrobianos por enzimas e outros agentes e a redução do acúmulo intracelular dos antimicrobianos (Provenzi, 2022). As proteínas normais de ligação à penicilina (PBP) são o alvo dos antibióticos beta-lactâmicos, por serem responsáveis pela transglicosilação e transpeptidação do peptidoglicano da parede celular bacteriana e pela hidrólise do anel β -lactâmico (Batista, 2015).

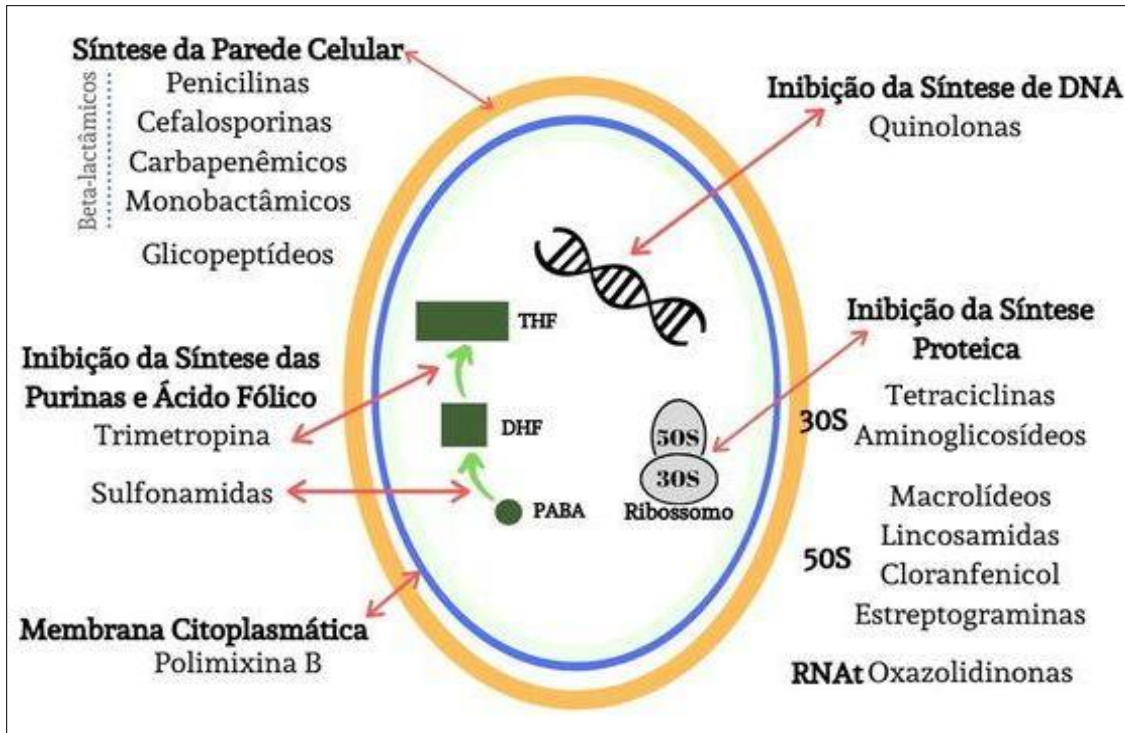


Figura 2: Algumas das principais classes de antimicrobianos utilizados no tratamento de *S. aureus* e seus locais de acção. **Fonte:** Provenzi, 2022.

A resistência de *S. aureus* à meticilina é induzida pela aquisição do gene *mecA* que por sua vez origina uma mutação na proteína (proteína de ligação à penicilina ou simplesmente PBP-2a) codificada por este gene, causando sua considerável redução na afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos (de Souza, 2012), permitindo que a síntese da parede celular bacteriana continue sendo realizada mesmo na presença de beta-lactâmicos (que bloqueiam as PBPs normais) (Dominski, 2018).

Para além do gene *mecA*, alguns genes auxiliares ou factores essenciais *fem* (*factor essential for methicilin resistance*) auxiliam na indução e regulação da expressão da PBP que consequentemente intensifica a resistência antimicrobiana de *S. aureus* (Gunawardena *et al.*, 2012). O gene *femA* também é caracterizado como factor específico cromossomal, envolvido na codificação de uma proteína preponderante na biossíntese de peptidoglicanos na estrutura da parede celular da espécie *S. aureus*, não tendo sido observado em qualquer outra espécie deste género (Oliveira *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2020).

Os genes *mecA* e *femA* têm sido detectados em amostras de MRSA por meio de técnicas moleculares como a reação de polimerase em cadeia (PCR), que consiste na amplificação de regiões específicas do ADN. Esta técnica apresenta vantagens em relação às demais, pois oferece elevada eficácia e segurança, além de ser um método rápido e sensível (Meng *et al.*, 2020).

2.3. Mecanismos de virulência de *S. aureus*

S. aureus tem o genoma mais complexo que as outras espécies não patogênicas do género *Staphylococcus* e seus factores de virulência variam em sua presença ou expressão, visto que, em grande parte são codificados nos elementos genéticos móveis que podem modular mecanismo de virulência nas estirpes *S. aureus*, e isso pode ser refletido na gravidade da infecção causada por cada estirpe (Oliveira, 2021; Provenzi, 2022).

Os inúmeros genes de virulência presentes nesta espécie, actuam desde a colonização (com genes que codificam para adesinas e invasinas, como proteínas de superfície e glicopolímeros), evasão do sistema imunológico (como genes que codificam para evasinas, factores de coagulação, inibidores do sistema complemento, inibidores de opsonização, formação de biofilme) e patogenicidade (genes que codificam para toxinas, como toxinas formadoras de poros na membrana do hospedeiro e toxinas superantígenos) (Hommes e Surewaard, 2022).

Colonização é um importante processo na patogenicidade de infecção por *S. aureus*, pois é através dela que a bactéria consegue se instalar principalmente nas membranas mucosas e na pele de forma assintomática, ao ponto de favorecer a sua disseminação pois o indivíduo infectado é capaz de contaminar outros indivíduos, incluindo o ambiente em que se encontra (Lee *et al.*, 2015), após a colonização segue-se a o processo de infecção que tem início quando as células bacterianas se ligam às moléculas da superfície da célula hospedeira ou da matriz extracelular, e a partir da expressão de proteínas de adesão, que por sua vez, dependem do tecido alvo a ser colonizado durante a infecção (Rossi, 2016).

Algumas adesinas expressas pela bactéria são as proteínas *bap* (proteína associada ao biofilme), *clfA*, *clfB* (factores de aglutinação A e B), *fnbpA*, *fnbpB* (proteínas de ligação à fibronectina A e B), *cna* (proteína de ligação ao colágeno), *bbp* (proteína de ligação à sialoproteína

óssea), *isdA*, *isdB* (determinantes de superfície regulados por ferro A e B), *SdrD*, *SdrE* (proteínas de repetição serina-aspartato D e E) e *spa* (proteína A estafilocócica que inibe a opsonização para o processo fagocitário), sendo a última e mais importante na patogénese de infecção (Dominski, 2018; Provenzi, 2022).

Após a invasão do microorganismo no hospedeiro, pode ocorrer a formação do biofilme microbiano que consiste em múltiplas camadas de bactérias embebidas em uma matriz polisacarídica ligadas a uma superfície, que é um importante factor de virulência pois essa estrutura protege as bactérias das defesas do organismo hospedeiro e dificulta a penetração e acção dos antimicrobianos utilizados rotineiramente para terapia (Pajohesh *et al.*, 2022).

A virulência do *S. aureus* é multifactorial pois para além da colonização e evasão também envolve um grande número de toxinas extracelulares, como a produção de citotoxinas, enterotoxinas e exoenzimas (coagulase, hialuronidase e catálase) (Andrade, 2013). Classicamente as toxinas são agrupadas de acordo com seu modo de acção, as citotoxinas destroem as células do hospedeiro ou afectam suas funções e as enterotoxinas atingem as células que revestem o sistema entérico (digestivo) (Tortora *et al.*, 2012), estas últimas estão associadas aos quadros de intoxicação alimentar causados por *S. aureus*, cujos principais sintomas no hospedeiro incluem: disfunção intestinal, vômitos e dores abdominais (Cheung *et al.*, 2021).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são proteínas pequenas denominadas alfabeticamente (A-U) e apresentam duas funções, como toxinas gastrointestinais altamente patogénicas e superantígenos que activam células T não específicas, resultando numa resposta imune inflamatória excessiva e secreção massiva de citosinas, estas duas funções encontram-se localizadas em domínios separados das proteínas, embora sejam correlacionadas, daí que a perda de uma das funções (que pode ser causada por mutações) também determina a perda da outra pois ambas funções são codificadas pelos mesmos genes cromossomômicos (Acosta *et al.*, 2017).

Em decorrência desta rica variedade de factores de virulência, torna-se muito difícil determinar um factor de virulência dominante nas estirpes de *S. aureus*, todavia, o conjunto dos diferentes mecanismos de virulência confere ao *S. aureus* uma versatilidade particular de gerar diferentes doenças (Andrade, 2013). Em suma, dentre os mecanismos de virulência presentes em *S. aureus* estão: a cápsula com acção anti fagocitária; a parede celular composta por peptidoglicanos, ácidos

teicóicos e proteínas; adesinas de superfície como a coagulase e fibrinogênio; produção de exotoxinas como a enterotoxinas estafilocócica I (codificada pelo gene *sei* e que faz parte dos superantígenos dependentes de zinco), a toxina do choque tóxico e as exoenzimas (figura 3) (Batista, 2015).

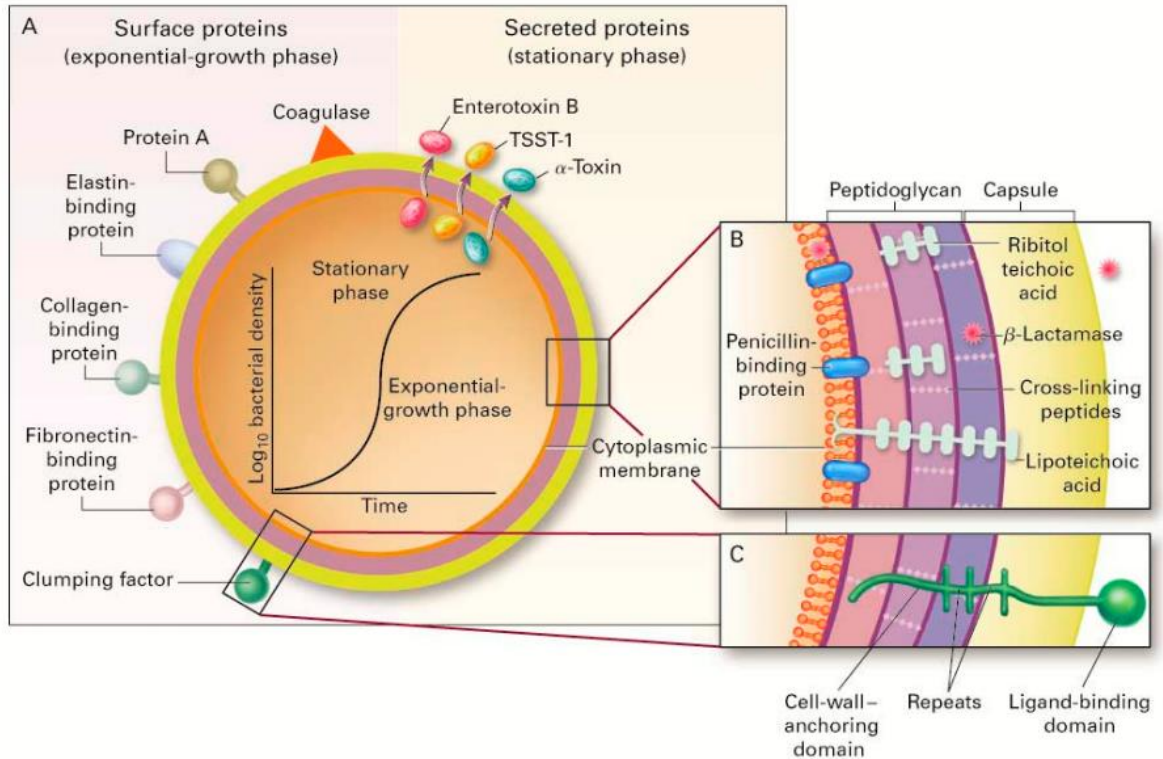


Figura 3: Principais factores de patogenicidade em *S. aureus*. **Fonte:** Lowy, 1998.

3. Objectivos

a) Geral

Analisar os factores de resistência e virulência em estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de pus e sangue de pacientes atendidos no Hospital Central de Maputo.

b) Específicos

- Descrever as características demográficas dos pacientes e perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *S. aureus* da base de dados SUSAAR-HCM-2022;
- Detectar os genes de resistência (*mecA* e *femA*) em isolados de *S. aureus*;
- Detectar os genes de virulência (*spa* e *sei*) em isolados de *S. aureus*;
- Identificar a coexistência dos factores de resistência e virulência em estirpes de *S. aureus*.

4. Área de estudo

Os isolados de *S. aureus* da base de dados de Vigilância de *S. aureus* Resistentes aos Antimicrobianos (SUSAAR-HCM-2022) incluídos no presente estudo foram colhidos no Hospital Central de Maputo (HCM), localizado no centro da cidade de Maputo (Figura 1), no Distrito Urbano número 1. Ao Sul faz limite com a Av. Eduardo Mondlane, e a Norte com a Av. Agostinho Neto, a Este com a Av. Tomas Ndunda e a Oeste com a Av. Salvador Allende; o HCM é um hospital quaternário de referência nacional com mais de 100 anos de existência, que assiste directamente cerca de 1 24 988 habitantes na Província de Maputo (INE, 2020), e oferece no total 48 serviços médicos com cerca de 1454 camas (Mahaluça, 2018).

A análise laboratorial decorreu concretamente no laboratório do Departamento de Microbiologia, Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane (UEM). O Departamento de Microbiologia recebe e processa amostras provenientes de diversos serviços do HCM e outras unidades sanitárias, e suas actividade envolvem diagnóstico e confirmação de doenças infecciosas, ensino e investigação.

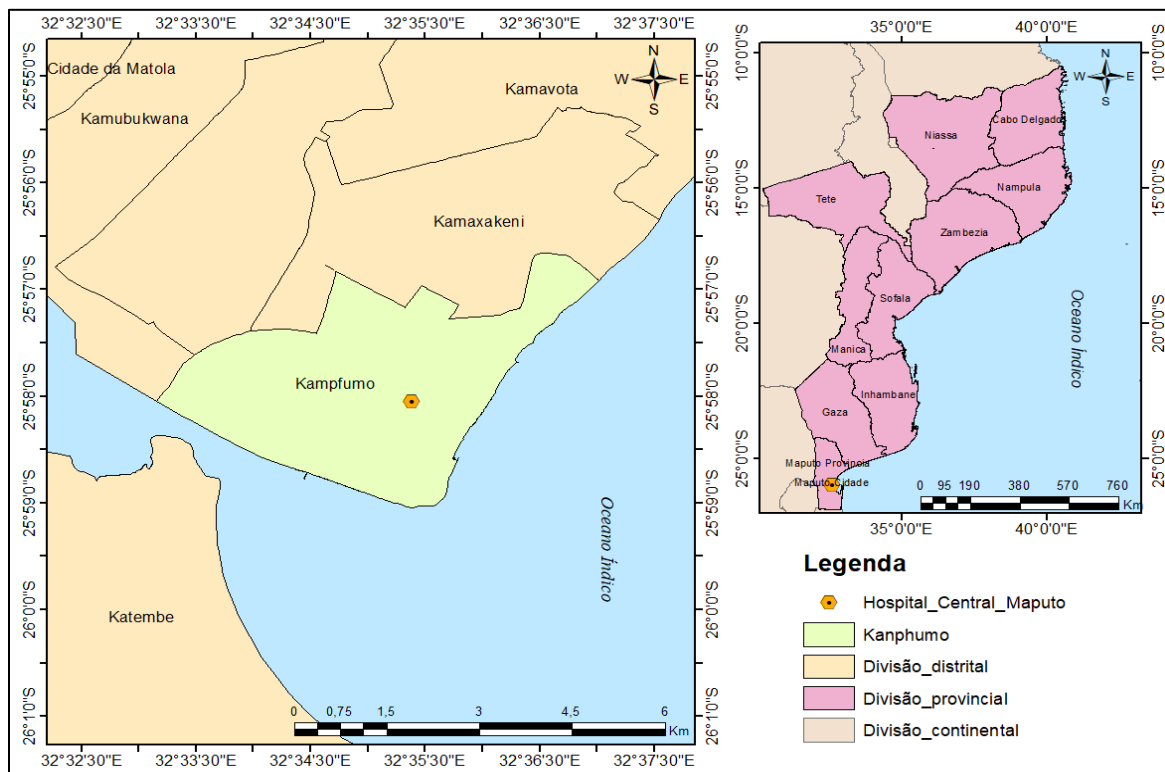


Figura 4: Localização geográfica do Hospital Central de Maputo. **Fonte:** Autora.

5. Metodologia

5.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo transversal, de abordagem quantitativa com análise retrospectiva, em que foram usados dados da base SUSAAR-HCM-2022 existente no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM.

5.2. Período de estudo e aprovação ética

O presente estudo faz parte de um estudo-mãe cujo título é “Vigilância Laboratorial da Resistência aos Antibióticos no Hospital Central de Maputo, Moçambique”, aprovado pelo Comité Nacional de Bioética em Saúde de Moçambique (CNBS) com o seguinte registo: referência 95/CNBS/2014 de 10 de Outubro de 2014. O estudo teve duração de 6 meses (Fevereiro à Julho de 2023), e iniciou após a aprovação do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Faculdade de Ciências e do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM.

5.3. Tamanho amostral

Foram constituídas amostras deste estudo todos os isolados de *S. aureus* (de amostras de pus e sangue de pacientes atendidos no HCM, colhidos de Setembro de 2020 à Abril de 2021), conservados no Biobanco do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM.

5.4. Variáveis

Foram consideradas variáveis a presença ou ausência dos genes de resistência e de virulência, quer seja singularmente ou simultaneamente tendo em conta as características demográficas de pacientes de que os isolados foram obtidos.

5.5. Materiais e Métodos

5.5.1. Equipamentos do laboratório

- Bico de Busen;
- Centrífuga;
- Vortex;
- Termociclador (GeneAmp PCR System 9700);
- Termobloco/ Banho-maria;
- Balança analítica;
- Pentes para preparação do gel;
- Estufas bacteriológicas;
- Transiluminador Ultravioleta;
- Tina de corrida Electroforética;
- Geleira;
- Congelador;
- Microondas;
- Cabine de biossegurança;
- Máquina fotográfica (Cannon 4000d).

5.5.2. Material de laboratório

- Ansa de inoculação bacteriológica;
- Placa de petri;
- Zaragatoa;
- Micropipetas *Eppendorfs*;
- Pontas de pipetas;
- Tubos *Eppendorfs*;
- Tubos de falcons;
- Papel toalha;
- Suporte;

- Parafilme;
- Pinça.

5.5.3. Meios de cultura

- Ágar Manitol Salgado
- Ágar Skin Milk
- Ágar Müller Hinton;
- Ágar Sangue (AS);
- Ágar Luria Bertani (LB).

5.5.4. Solução e Reagentes

- Kit de extração (*QIAmp DNA minikit®*-Qiagen);
- *Supermix* [2x] (contendo Taq da polimerase, dNTPs, MgCl₂, Tampão Buffer);
- Iniciadores *Forward* e *Reverse* (*mecA*, *femA*, *spa* e *sei*);
- Agarose;
- TAE (tris-acetato-EDTA);
- Gel red;
- Marcador (100 pb);
- *Loading dye*;
- Água destilada;
- Água diionizada;
- Álcool a 70% e 90%;
- Hipoclorito de sódio.

5.5.5. Material biológico

- Isolados de *S. aureus*.

5.5.6. Equipamento de protecção pessoal

- Luvas de látex;
- Bata de mangas cumpridas;
- Máscaras descartáveis;
- Óculos de protecção.

5.5.7. Materiais e Consumíveis

- Marcadores;
- Folhas A4;
- Agrafador;
- Borracha;
- Lápis;
- Caderno.

5.6. Procedimentos laboratoriais

Todo procedimento laboratorial decorreu no laboratório do Departamento de Microbiologia concretamente na secção de Biologia Molecular, seguindo três etapas, nomeadamente:

- Análise das características demográficas e do perfil de susceptibilidade descrito na base SUSAAR-HCM-2022;
- Detecção dos genes de resistência e virulência nos isolados de *S. aureus*;
- Análise dos resultados obtidos.

5.6.1. Análise da base de dados-SUSAAR-HCM-2022

Foram analisadas diferentes variáveis sociodemográficas e clínicas de pacientes consoante o registo da base SUSAAR-HCM-2022. Entre essas variáveis as tomadas em consideração foram: sexo, idade, departamento de atendimento, proveniência situação de atendimento do paciente

(internado ou ambulatório), tipo de amostra colhida para análise microbiológica e o perfil de sensibilidade do microorganismo isolado destas amostras.

5.6.2. Subcultura de isolados de *S. aureus*

Os isolados de *S. aureus* conservados a -80° C em Ágar Skin Milk, foram subcultivados no meio Ágar Manitol ou Ágar Sangue e incubados a 37°C por 24 horas, para obter-se colónias frescas que posteriormente foram subcultivadas no meio líquido e enriquecido em Ágar Luria Bertani e incubadas a 37°C durante 24 horas para realizar a extracção do ADN genómico bacteriano.

5.6.3. Extracção do ADN genómico de *S. aureus*

O ADN genómico bacteriano foi extraído a partir de colónias frescas usando Kit de Extração *QIAamp DNA minikit*®-Qiagen seguindo o protocolo de Olsen *et al.*, (2005). Foram feitas algumas modificações às condições do *S. aureus*, onde aliquotou-se 1000 µl do meio enriquecido LB para o tubo de eppendorf e centrifugou-se a 7500 rpm por 10 minutos, para sedimentar o *pellet* e descartar o sobrenadante, adicionou-se 20µl de lizozima e incubou-se a 37°C por 8 horas para possibilitar a quebra da parede celular bacteriana. Após esse período adicionou-se 25µl da proteinase K e 200µl de Buffer AL (fornecido pelo fabricante) e incubou-se em termobloco ou banho-maria a 56°C, durante 30 minutos e adicionou-se 200µl de etanol, agitando-se durante 15 segundos no vortex. A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna *QIAamp ADN minikit* e centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos e removeu-se a membrana filtrante e a coluna foi recolocada em um tubo limpo, em que foram seguidas as sequências de lavagens orientadas pelo Kit de Extração *QIAamp DNA minikit*®-Qiagen As amostras de ADN foram conservadas à -20°C até o seu uso, e de cada amostra foram extraídos 2µl de ADN molde para detecção molecular dos genes em estudo.

5.6.4. Detecção molecular dos genes de resistência *mecA* e *femA* em isolados de *S. aureus*

Para a detecção dos genes que conferem resistência ao *S. aureus*, foram feitas várias análises através da Multiplex PCR, que consistiram na amplificação de dois genes de forma simultânea.

Para amplificação dos genes de resistência, foram usados dois Iniciadores (descritos na tabela 1) que têm como alvo os genes cromossômicos, *mecA* e *femA*.

Tabela 1: Iniciadores usados na detecção dos genes de resistência *mecA* e *femA*.

Gene Alvo	Iniciadores	Sequência 5' - 3' (<i>Forward e Reverse</i>)	Tamanho de Amplificação	Referência
<i>mecA</i>	MecA	<i>Forward:</i> TGGCTATCGTGTCACAATCG <i>Reverse:</i> CTGGAACTTGTTGAGCAGAG	310 pb	Vannuffel <i>et al.</i>
<i>femA</i>	FemA	<i>Forward:</i> CTTACTTACTGGCTGTACCTG <i>Reverse:</i> ATGTCGCTTGTTATGTGC	686 pb	(1995).

Para a amplificação destes genes alvo foi preparada uma mistura (*master-mix*) com um volume total de 25µl usando os reagentes descritos na tabela 2.

Tabela 2: Reagentes utilizados na Multiplex PCR dos genes *mecA* e *femA*.

Reagentes	Concentração final	1X
Supermix [2X]	Supermix [1X]	12,5µl
FemA <i>Primer forward</i> [10µM]	0,2µM	0,5µl
FemA <i>Primer reverse</i> [10µM]	0,2µM	0,5µl
MecA <i>Primer forward</i> [10µM]	0,2µM	0,5µl
MecA <i>Primer reverse</i> [10µM]	0,2µM	0,5µl
H ₂ O diionizada	-	7,5µl
ADN molde	-	2,0µl
Volume Total	-	25,0µl

A amplificação da mistura de PCR foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR System 9700) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e por fim o arrefecimento a 4°C e conservação até a visualização.

5.6.5. Preparação do gel de agarose

Para preparar o gel pesou-se para cada reação 1g, 1,5g, 2,5g de agarose e dissolveu-se em 100 ml de TAE no microondas por cerca de 3 minutos (que correspondem a concentração de 1%, 1,5% e 2,5% respectivamente), em seguida adicionou-se 1µl de *Gel Red* e colocou-se na base contendo os pentes que dão forma de pocinhos após a solidificação do gel por cerca de 30 minutos.

Os produtos da PCR (amplicons) dos genes de resistência foram analisados através da corrida electroforética em um gel de agarose a 1,5% e os resultados foram visualizados no transiluminador UV. Antes de aplicar amostras amplificadas no gel, preparou-se uma mistura de 2µl de *Loading dye* e 10µl do amplicon para cada amostra, que foi posteriormente depositada em cada pocinho do gel solidificado.

A corrida electroforética ocorreu nas seguintes condições: 100 Volts e 400 miliamperes durante 60 minutos, e depois seguiu a visualização do gel num transiluminador UV, a identificação das bandas foi estabelecida por comparação do marcador (*DNA ladder*) de 100 pb, o resultado foi considerado positivo ou negativo consoante a presença ou ausência das bandas correspondentes a este marcador e suas imagens capturadas por uma máquina fotográfica (Cannon 4000d).

5.6.6. Detecção molecular dos genes de virulência *spa* e *sei* em isolados de *S. aureus*

A detecção dos genes que conferem a virulência ao *S. aureus* foi feita através da PCR convencional, que consistiu na amplificação de apenas um gene alvo de cada vez. A reação foi realizada mediante o uso, dos iniciadores descritos na tabela 3.

Tabela 3: Iniciadores usados na detecção dos genes de virulência *spa* e *sei*.

Gene Alvo	Iniciadores	Sequência 5' 3' (<i>Forward e Reverse</i>)	Tamanho de Amplificação	Referência
<i>spa</i>	Spa	<i>Forward:</i> CAGCAAACCATGCAGATGCTA <i>Reverse:</i> GTCGTTTGGTACGTCTACGAT	101 pb	Araj <i>et al.</i> , (1998).
<i>sei</i>	SEI	<i>Forward:</i> CTTACTTACTGGCTGTACCTG <i>Reverse:</i> ATGTCGCTTGTTATGTGC	466 pb	Andrade (2013).

Para a amplificação destes genes foram preparadas *master-mixes* separadas para cada um dos genes e cada *master-mix* continha um volume total de 25µl como descreve a tabela 4.

Tabela 4: Reagentes utilizados na PCR de detecção dos genes *spa* e *sei*.

Reagentes	Concentração final	1X
<i>Supermix</i> [2X]	<i>Supermix</i> [1X]	12,5µl
Spa <i>Primer forward</i> [10µM]	0,2µM	0,5µl
Spa <i>Primer reverse</i> [10µM]	0,2µM	0,5µl
SEI <i>Primer forward</i> [10µM]	0,2µM	0,5µl
SEI <i>Primer reverse</i> [10µM]	0,2µM	0,5µl
H₂O diionizada	-	9,5µl
ADN molde	-	2,0µl
Volume Total	-	25,0µl

A amplificação da mistura de PCR do gene *spa* foi realizada em termociclador (*GeneAmp* PCR *System* 9700) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 15 segundos seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 5 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e por fim o arrefecimento a 4°C e conservação até a visualização.

A amplificação da mistura de PCR do gene *sei* foi realizada em termociclador (*GeneAmp* PCR *System* 9700) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e por fim o arrefecimento a 4°C e conservação até a visualização.

Após a PCR de cada gene em estudo, os produtos amplificados foram analisados pela corrida electroforética em gel de agarose à 1% e (para o gene *spa*) e a 2,5% (para o gene *sei*). As condições em que a corrida electroforética decorreu e a visualização dos resultados através do transiluminador equiparam-se ao que foi descrito para os genes de resistência. Abaixo apresenta-se o esquema de todo o procedimento laboratorial (figura 5).

5.6.7. Fluxograma de análise laboratorial

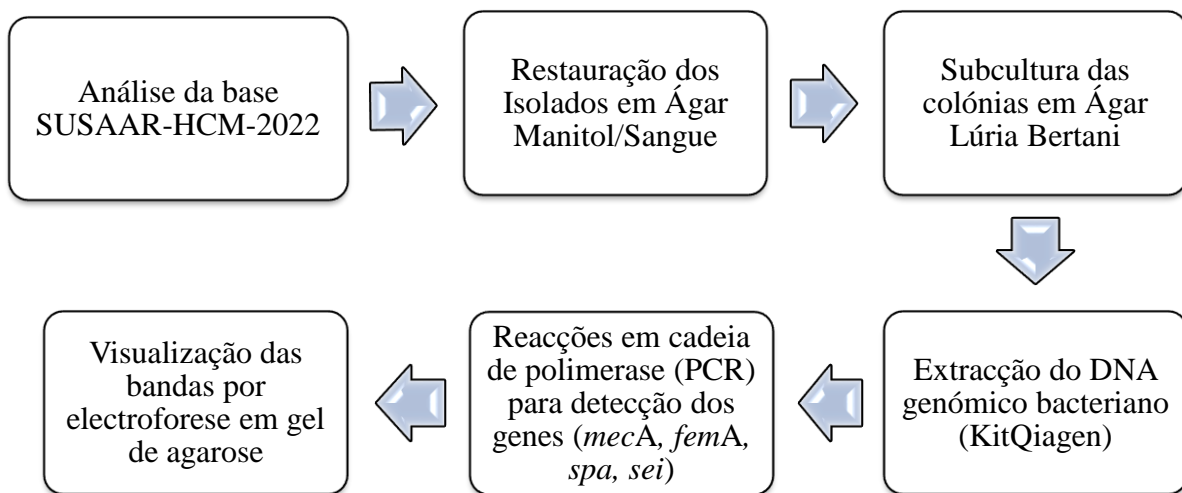


Figura 5: Fluxograma das análises laboratoriais dos isolados de *S. aureus*.

5.7. Análise dos dados

A análise estatística foi realizada no programa estatístico SPSS versão-21 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os resultados foram expressos em frequências absolutas (n) e relativas (%) e apresentados em forma de tabelas criadas no programa *Microsoft® Excel* versão-2019.

6. Resultados

6.1. Características demográficas e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *S. aureus* Base de dados SUSAAR-HCM-2022

Foi analisada a base de dados da “Vigilância de *S. aureus* Resistentes aos Antimicrobianos no Hospital Central de Maputo” (SUSAAR-HCM), e observou-se que as 53 estirpes de *S. aureus* foram isoladas principalmente em amostras de pus, de indivíduos do sexo masculino, com idade inferior a 15 anos, no departamento de pediatria e em situação de internamento. O perfil de susceptibilidade aos antibióticos destes isolados mostrou uma prevalência de 58,5% (31/53) de estirpes de MRSA, como descreve a tabela 5.

Tabela 5: Características demográficas dos pacientes, base de dados SUSAAR-HCM-2022.

Variáveis	N = 53
Sexo	n (%)
Feminino	21 (40)
Masculino	32 (60)
Idade	
<15	31 (58,5)
≥15	22 (41,5)
Departamento	
Medicina	22 (41,5)
Pediatria	31 (58,5)
Situação do paciente	
Ambulatório	24 (45,3)
Internado	29 (54,7)
Amostra	
Pus	38 (71,6)
Sangue	15 (28,3)
Perfil de sensibilidade antimicrobiana	
MRSA	31 (58,5)
MSSA	22 (41,5)

6.2. Detecção dos genes de resistência e virulência de *S. aureus*

6.2.1. Genes de resistência *mecA* e *femA*

Nos isolados em estudo, os genes de resistência *mecA* e *femA* foram detectados em 20,8% (11/53) e 58,5% (31/53), respectivamente (Tabela 6). A figura 7 mostra o resultado de amplificação de bandas correspondentes aos genes *mecA* e *femA*.

Tabela 6: Frequência dos genes de resistência *mecA* e *femA* em isolados de *S. aureus*.

N de isolados de <i>S. aureus</i> (53)	n	Frequência (%)
<i>mecA</i>	11	20,8
<i>femA</i>	31	58,5

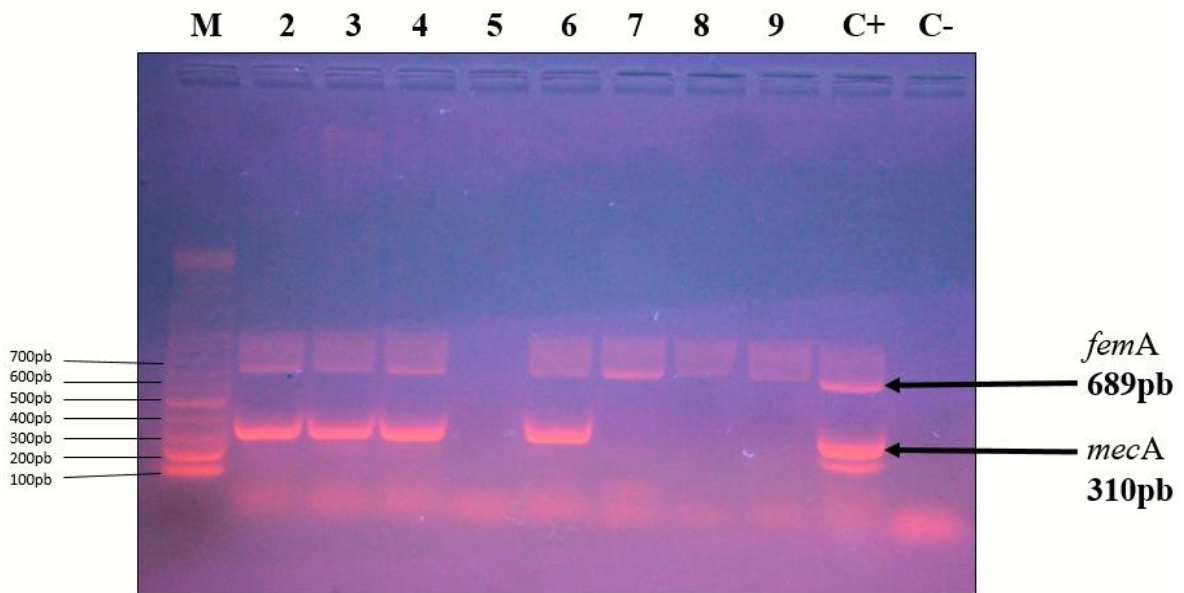


Figura 6: Electroforese em gel de agarose a 1,5% para visualização dos genes *mecA* (310 pb) e *femA* (689 pb). **Legenda:** M (marcador de peso molecular 100 pb); 2, 3, 4, 6 (amostras positivas para *femA* e *mecA*); 5 (amostra negativa para *femA* e *mecA*); 7, 8, 9 (amostras positivas para *femA* e negativas para *mecA*); C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo).

6.2.2. Genes de virulência *spa* e *sei*

Os genes de virulência *spa* e *sei* foram detectados em 92,5% (49/53) e 11,3% (6/53) respectivamente, em isolados analisados (Tabela 7). As figuras 7 e 8 mostram os resultados de amplificação dos genes *spa* e *sei*.

Tabela 7: Frequência dos genes de virulência *spa* e *sei* em isolados de *S. aureus*.

N de isolados de <i>S. aureus</i> (53)	n	Frequência (%)
<i>spa</i>	49	92,5
<i>sei</i>	6	11,3

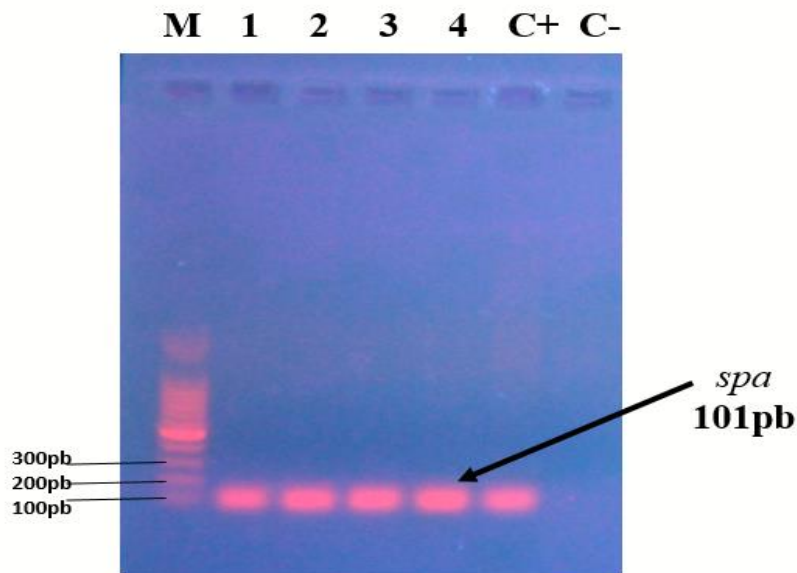


Figura 7: Electroforese em gel de agarose a 1% para visualização do gene *spa* (101 pb). **Legenda:** M (marcador de peso molecular 100 pb); 1, 2, 3, 4, (amostras positivas para o gene *spa*); C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo).

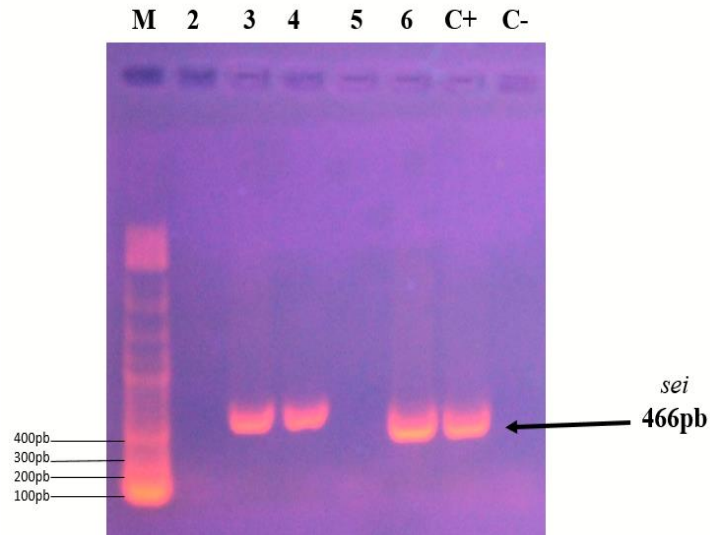


Figura 8: Electroforese em gel de agarose a 1% para visualização do gene *sei* (466 pb). **Legenda:** M (marcador de peso molecular 100 pb); 3, 4, 6 (amostras positivas para o gene *sei*); 2, 5 (amostras negativas para o gene *sei*); C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo).

6.3. Coexistência dos genes de resistência e virulência e características da base SUSAR-HCM-2022

A coexistência de genes de resistência e virulência foi identificada em 64,2% (34/53) dos isolados analisados, destacando-se a presença de pelo menos um dos genes de resistência e virulência em cada uma das combinações, onde a combinação *femA+spa+* foi observada em 50% e *femA+mecA+spa+* em 32% de isolados de *S. aureus* (Tabela 8). O gene de resistência *spa* foi singularmente amplificado em 35,8% (19/53) dos isolados.

Tabela 8: Frequência da coexistência dos genes de resistência e virulência em isolados de *S. aureus*.

Isolados com coexistência de genes de resistência virulência (n= 34)	Frequência n (%)
<i>femA+spa+</i>	17 (50)
<i>femA+mecA+spa+</i>	11 (32)
<i>femA+spa+sei+</i>	3 (9)
<i>spa+sei+</i>	3 (9)

A considerar: Dos 53 isolados de *S. aureus*, 19 (35,8%) não apresentaram coexistência entre os genes de resistência e de virulência.

Nos 64,2% (34/53) dos isolados de *S. aureus* que apresentaram diferentes combinações de genes de resistência e virulência, destacam-se as estirpes MRSA isoladas de indivíduos maioritariamente do sexo masculino, com idade inferior a 15 anos, atendidos na pediatria tanto em situação de internamento quanto na situação de ambulatorios (Tabela 9).

Tabela 9: Associação entre as características demográficas dos pacientes, os isolados da base de dados SUSAAAR-HCM-2022 e a coexistência dos genes de resistência e virulência.

Combinações dos genes <i>mecA, femA, spa, sei</i>	Sexo		Idade (anos)		Proveniência		Situação do Paciente		Perfil de Sensibilidade	
	Masculino n (%)	Feminino n (%)	<15 n (%)	≥ 15 n (%)	Pediatria n (%)	Medicina n (%)	Internado n (%)	Ambulatório n (%)	MRSA n (%)	MSSA n (%)
<i>femA+spa+</i> (n=17)	9 (53)	8 (47)	11 (65)	6 (35)	11 (65)	6 (35)	7 (41)	10 (59)	16 (94)	1 (6)
<i>femA+mecA+spa+</i> (n=11)	6 (55)	5 (45)	7 (64)	4 (36)	7 (64)	4 (36)	6 (55)	5 (45)	11 (100)	-
<i>femA+spa+sei+</i> (n=3)	1 (33)	2 (67)	-	3 (100)	-	3 (100)	1 (33)	2 (67)	3 (100)	-
<i>spa+sei+</i> (n=3)	1 (33)	2 (67)	2 (67)	1 (33)	-	3 (100)	1 (33)	2 (67)	-	3 (100)

7. Discussão

7.1. Relação entre as características demográficas dos pacientes e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *S. aureus*

No presente estudo foram incluídos 53 isolados de *S. aureus*, obtidos principalmente em indivíduos do sexo masculino, internados no Departamento de Pediatria (características demográficas descritas na base SUSAAAR-HCM-2022). Estes achados sugerem que a idade, o sexo e o internamento podem ser factores de risco para a ocorrência de infecções por *S. aureus*, alinhando-se ao estudo realizado por Walana *et al.* (2020) no Hospital Universitário de Gana, em que se reportou maior prevalência de colonização (42%) em indivíduos do sexo masculino, hospitalizados nos departamentos de pediatria e cuidados intensivos de neonatos. Sugerindo que características como a colonização por *S. aureus*, o internamento hospitalar, a baixa imunidade e total dependência das crianças aos seus cuidadores e profissionais de saúde, podem constituir factores de risco para infecções clínicas e subsequente disseminação na comunidade (Kaur *et al.*, 2022).

No entanto, dos resultados reportados por Aiken *et al.* (2014) em Quênia, a frequência de isolados de *S. aureus* foi maioritariamente observada em mulheres adultas internadas em enfermarias cirúrgicas (8,9% - 85/950), mostrando que *S. aureus* é também comum em pacientes do sexo feminino, e que a ocorrência da sua infecção pode ser observada em adultos. Não obstante destes achados, o estudo realizado por Zhao *et al.* (2021) na China, reportou que isolados de *S. aureus* foram mais frequentes no grupo dos pediátricos (30,7%) e a frequência decrescia com a idade, jovens (9,2%) e idosos (8,2%). Estes resultados mostram que as infecções por *S. aureus* variam com base na idade e sexo em vários países, despertando a necessidade de mais estudos para a compreensão de outros factores determinantes.

A frequência de estirpes de MRSA (58,5%) reportada neste estudo é alta em comparação a frequência de 8% e \leq 5% reportada por Vubil *et al.* (2017) e Garrine *et al.* (2023b), no distrito da Manhica localizado 70 Km ao norte da cidade de Maputo. Esta grande divergência pode estar relacionada a diferença de metodologias entre os estudos, aumento de infecções por MRSA e a défice de adopção e cumprimento de medidas preventivas e de controlo das infecções nosocomiais principalmente no HCM.

Portanto, em estudos realizados em outros países africanos como em Uganda (Kateete *et al.*, 2019) e Camarões (Kengne *et al.*, 2019), reportaram-se altas prevalências de estirpes MRSA (30% e 80%), em hospitais da zona suburbana comparativamente aos hospitais de referência da zona urbana. Sugerindo que a exposição prévia aos antibióticos, as fontes de água precárias e os largos agregados familiares, podem constituir factores contribuintes para estas altas prevalências de estirpes MRSA (Kateete *et al.*, 2019).

Por outro lado, num estudo realizado por Schaumburg *et al.* (2011) no Gabão, constatou-se que cerca de 33% dos participantes eram colonizados por estirpes de *S. aureus* e destas nenhuma pertencia ao grupo dos MRSA, contrariamente aos 58,5% reportados no presente estudo. Esta menor taxa de resistência aos beta-lactâmicos, pode estar ligada ao ano de realização do estudo, população do estudo (indígena), espaço geográfico e o nível de gestão de antibióticos, que se difere do observado nas zonas urbanas dos países de baixa e média renda, onde o uso de antibióticos é indiscriminado e raramente monitorado (Garrine *et al.*, 2023a).

Contudo, são necessários estudos de vigilância epidemiológica nos países de baixa e média renda, como Moçambique para melhor compreender os factores de risco para resistência antimicrobiana, bem como o controlo e tratamento de infecções por estirpes MRSA sobretudo no ambiente hospitalar.

7.2. Detecção dos genes de resistência *mecA* e *femA* em isolados de *S. aureus*

A resistência antimicrobiana de *S. aureus* associa-se à presença de vários mecanismos de resistência, incluindo os genes *mecA* e *femA* (Pimenta *et al.*, 2023). Dos isolados caracterizados como MRSA no presente estudo, 58,5% continham o gene *femA* e 20,8% o gene *mecA*, e ambos genes são considerados marcadores da resistência à metilina (Meng *et al.*, 2020; Sogut *et al.*, 2020).

Embora em menor frequência, a presença dos genes *mecA* e *femA* já foi reportada em estirpes MRSA de pacientes internados em diferentes departamentos clínicos em muitos países do Ocidente, como Holanda (0,13%) (Weterings *et al.*, 2019), Alemanha (2,1%) (Heckel *et al.*, 2017), Irlanda (2,7%) (Crawford *et al.*, 2020) e Polónia (12,9%) (Gajewska *et al.*, 2022). Os estudos realizados nos países de baixa e média renda, reportaram frequências relativamente maiores como

Nigéria (22,2%) (Terry-Alli *et al.*, 2011), Uganda (37,5%) (Seni *et al.*, 2013) e Paquistão (40%) (Tasneem *et al.*, 2022), mostrando a importância destes factores na resistência de *S. aureus*.

No presente estudo, marcador de resistência *femA* foi detectado em todos os isolados MRSA, ao passo que o marcador *mecA* foi detectado em frequência relativamente baixa (20,8%). Este resultado, mostra a necessidade da realização de mais estudos para melhor compreender os factores intrínsecos responsáveis por este fenómeno. Em concordância com estes achados, Anie *et al.* (2022), reportou na Nigéria baixa frequência do gene *mecA* (5%) em estirpes MRSA, sugerindo que este fenómeno pode ser explicado pelo facto do elemento genético móvel SCC*mec* ser constituído por outros genes que são responsáveis por conferir resistência aos beta-lactâmicos, e o gene *mecA* é só mais um componente deste cassete cromossómico.

Portanto, estes factores de resistência desempenham um papel importante para a ocorrência de infecções causadas por estirpes MRSA na África Subsaariana, principalmente em ambientes hospitalares. Desta forma, há uma necessidade de implementação efectiva do plano de controlo e prevenção de infecções nosocomiais (Chaudhary, 2016).

7.3. Detecção dos genes de virulência *spa* e *sei* em isolados de *S. aureus*

S. aureus possui uma variedade de factores de virulência, que contribuem para a patogenicidade desta espécie bacteriana (Lee *et al.*, 2018). Neste estudo, foi detectada a alta frequência do gene *spa* (92,5%), em relação ao gene *sei* (11,3%), sugerindo alta patogenicidade destas estirpes pelo papel destes genes na infecção por *S. aureus* (van Hal *et al.*, 2012).

As frequências dos genes *spa* e *sei* em isolados de *S. aureus* reportadas no presente estudo são elevadas quando comparadas com as obtidas no estudo realizado na África do Sul (52% *spa*+) (Mkize *et al.*, 2017) e em Nigéria (6,4% *sei*+) (Adeyanju *et al.*, 2022), onde foram adicionalmente testados outros factores de virulência como gene hemolisina-gama (*hlg*) e enterotoxinas A (*sea*) que perfizeram frequências que variam de 90 a 100%.

Portanto, outros países de baixa e média renda reportaram variadas frequências dos genes de virulência como Etiópia (21,1% *spa*+) (Baz *et al.*, 2021), Paquistão (30,6% *sei*+) (Tasneem *et al.*, 2022), Gana (47% *spa*+) (Walana *et al.*, 2020) e Índia (68,4% *sei*+) (Kaur *et al.*, 2022). As frequências variam de acordo com o país, sugerindo um perfil de virulência específico para cada país e a necessidade de mais estudos que incluam outros factores de virulência.

7.4. Coexistência dos genes de resistência (*mecA* e *femA*) e virulência (*spa* e *sei*)

Os isolados de *S. aureus* do nosso estudo apresentaram diferentes combinações, corroborando com os achados de Rossato *et al.* (2018), que sublinhou que estes factores são co-expressos em situações específicas de infecção. Adicionalmente, os resultados indicam que a coexistência dos factores de resistência e virulência são comuns em estirpes MRSA, à semelhança dos achados de Puaah *et al.* (2016) e Votintseva *et al.* (2014).

O perfil molecular das estirpes de *S. aureus* observado no presente estudo sugere a circulação de estirpes virulentas e resistentes no Hospital Central de Maputo, constituindo assim, uma preocupação devido à sua associação com elevadas taxas de internamento e mortalidade (Preziosi *et al.*, 2017; Kenga *et al.*, 2021).

A coexistência de genes de resistência e virulência, com destaque para os genes (*femA+* *spa+*) e (*femA+* *mecA+* *spa+*) foi detectada em 65% e 64%, respectivamente, em estirpes isoladas de pacientes pediátricos. Este dado corrobora com o estudo de van Hal *et al.* (2012), que defende que a taxa de mortalidade por infecções causadas por *S. aureus* atribui-se às estirpes virulentas, e ocorre frequentemente em indivíduos menores de 15 anos. Os padrões de coexistência menos comuns foram observados entre os genes (*femA+* *spa+* *sei+*) e (*spa+* *sei+*), tendo sido igualmente reportados no estudo realizado por Tasneem *et al.* (2022), no Paquistão.

Os resultados deste estudo estão em concordância com a diversidade molecular das estirpes de *S. aureus* reportadas nos estudos conduzidos por Vubil *et al.* (2017) e Garrine *et al.* (2023) no distrito da Manhica, o que pode indicar a circulação de estirpes similares em outros hospitais do País. Estudos realizados em outros países africanos, por exemplo em Quénia (Aiken *et al.*, 2014), Africa do Sul (Perovic *et al.*, 2020) e Nigéria (Adeyanju *et al.*, 2022) revelam também a circulação de estirpes com o perfil semelhante ao reportado no presente estudo. O perfil molecular de resistência e virulência dos isolados de *S. aureus* reportados no presente estudo mostra a sua perigosidade sobretudo em ambientes hospitalares devido a presença de pacientes com baixa imunidade. Assim, o presente estudo reforça a necessidade da implementação efectiva dos planos de controlo e prevenção de infecções no Hospital Central de Maputo.

8. Limitações do estudo

O presente estudo teve as seguintes limitações:

- Reduzido tamanho amostral.
- Limitada informação existente relativa aos padrões genéticos das estirpes de *S. aureus* isoladas no HCM.
- Impossibilidade de relacionar as características demográficas e moleculares ao desfecho clínico dos pacientes.
- Interpretação cautelosa dos resultados, devido a natureza do estudo e ao possível viés de selecção da amostra.

9. Conclusão

A resistência à meticilina é comum em estirpes de *S. aureus* isoladas de pacientes atendidos no HCM. As estirpes de *S. aureus* meticilina-resistentes isoladas nos pacientes em estudo, contém genes *mecA* e *femA* que conferem resistência e os genes *sei* e *spa* que conferem virulência. Nos isolados de *S. aureus* analisados, existem estirpes que apresentam diferentes combinações dos genes de resistência e virulência, e isso sugere uma alta patogenicidade dessas estirpes.

10. Recomendações do estudo

O estudo sugere:

- A Faculdade de Medicina-UEM, a contínua vigilância e caracterização molecular das infecções por *S. aureus*, tomando como base o tipo de infecção (hospitalar ou comunitária), sexo, a idade dos pacientes, o perfil de sensibilidade das estirpes de *S. aureus*, e o desfecho clínico dos pacientes;
- Ao Hospital Central de Maputo, a intensificação de medidas de higiene hospitalar e comunitária, incluindo a higienização das mãos, desinfecção de superfícies e esterilização dos equipamentos hospitalares, como forma de prevenir e controlar a infecção por *S. aureus*.
- Aos Clínicos e prescritores de antimicrobianos e a população, uso racional dos antimicrobianos, evitar o tratamento empírico da infecção por *S. aureus*, mas sim optar por um tratamento baseado no resultado laboratorial.
- Ao Ministério da Saúde, a contínua vigilância e caracterização fenotípica e molecular dos isolados de *S. aureus* no Hospital Central de Maputo, incluindo o sequenciamento dos isolados.

11. Referências bibliográficas

1. Acosta, A. C., Costa, M. M., Junior, J. W. P., Mota, R. A. (2017). *Staphylococcus aureus* virulence factors. *Medicina Veterinária (UFRPE)*. 11 (4):252-269.
2. Adeyanju, A., Schaumburg, F., Onayade, A., Akinyoola, A., Adeyemi, T., Ugbo, O., Köck, R., Amusa, Y., Lawal, O., Adeyanju, T., *et al.* (2022). Local Epidemiology of Nosocomial *Staphylococcus aureus* Infection in a Nigerian University Teaching Hospital. *Antibiotics*.11, 1372.
3. Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J.-P., Molle, V. (2021). *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*. 13, 677.
4. Aiken, A. M., Mutuku, I. M., Sabat, A. J., Akkerboom, V., Mwangi, J., Scott, J. A. G., Morpeth, S. C., Friedrich, A. W., Grundmann, H. (2014). Carriage of *Staphylococcus aureus* in Thika Level 5 Hospital, Kenya: a cross-sectional study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 3:22
5. Andrade, M. A. (2013). *Caracterização Molecular de Staphylococcus aureus Meticilina Sensíveis e Meticilina Resistentes Isolados de Amostras Clínicas*. Tese de Doutorado. Recife, Universidade Federal de Pernambuco.
6. Anie, C. O., Ibezim, E. C., Esimone, C., O., Arhewoh, M. I. (2022). Molecular characterization of selected nasal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from healthy students of a tertiary institution. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 21 (4): 825-831.
7. Araj, G. F., Talhouk, R. S., Simaan, C. J., Maasad, M. J. (1998). Discrepancies between mecA PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11 (1999):47–52.
8. Asanin, J., Misic, D., Aksentijevic, K., Tambur, Z., Rakonjac, B., Kovacevic, I., Spersger, J., Loncaric, I. (2019). Genetic Profiling and Comparison of Human and Animal Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Serbia. *Journal Antibiotics*. 8(26):114.
9. Batista, B. G. (2015). *Caracterização Molecular de Isolados Clínicos de Staphylococcus aureus Resistentes à Meticilina (MRSA) Isolados em um Hospital do Sul do Brasil*. Tese de Mestrado. 60pp. Porto Alegre, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

10. Baz, A. A., Elsayed, K. B., Abdul-Raouf, U., Abdelkhalek, A. (2021). Prevalence of enterotoxin genes (SEA to SEE) and antibacterial resistant pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in Assiut city of Egypt. *Egypt J Med Hum Genet.* 22:84.
11. Bride, L. L. (2015). Epidemiologia molecular e caracterização da resistência e virulência de amostras de *Staphylococcus aureus* provenientes de hospitais da Grande Vitória – ES. Tese de Mestrado. Vitória, Universidade Federal do Espírito Santo.
12. Brooks, G. F., Carrol, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T. A. (2014). *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg.* 26ª Edição. 874pp. Porto Alegre, AMGH Editora.
13. Chaudhary, A. S. (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics discovery. *Acta Pharm. Sin.* 6: 552–556.
14. Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence.* 12(1): 547–569.
15. Cho, J. I., Jung, H. J., Kim, Y. J., Park, S. H., Ha, S. D., Kim, K. S. (2006). Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates Using Two-Step Triplex PCR and Conventional Methods. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 16.
16. Crawford, A. R., Vallande, N., Lonks, J. R. (2020). MRSA Prevalence in preoperative *S. aureus* nasal culture isolates is significantly different from a traditional hospital-wide antibiogram. *R I Med J.* 103(2):18–20.
17. Cussolim, P. A., Junior, A. S., Melo, A. L., Melo, A. (2021). Mecanismos De Resistência do *Staphylococcus aureus* a Antibióticos. *Revista Faculdades do Saber.* 06 (12):831-843.
18. de Oliveira D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 33:00181-19.
19. de Souza, A. N. G. (2012). *Efeito da beta-lapachona na inibição de fatores de virulência de Staphylococcus aureus meticilina-resistentes (MRSA).* Tese de Mestrado. Recife, Universidade Federal de Pernambuco.
20. Deyno, S., Toma, A., Worku, M., & Bekele, M. (2017). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates isolated from ear discharges of patients at University of Hawassa comprehensive specialized hospital. *BMC Pharmacology and Toxicology.* 18(1):17.

21. Dominski, B. H. (2018). *Caracterização Molecular de Amostras de Staphylococcus aureus Resistentes à Meticilina (MRSA) Isolados no Estado de Santa Catarina*. Tese de Licenciatura. 42pp. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina.
22. Duffy, C., Kenga, D. B., Gebretsadik, T., Maússe, F. E., Manjate, A., Zaqueu, E., *et al.* (2020). Multiple Concurrent Illnesses Associated with Anemia in HIV-Infected and HIV-Exposed Uninfected Children Aged 6–59 Months, Hospitalized in Mozambique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 102(3).
23. Gajewska, J., Chajeczka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland. *Molecules.* 27:6569.
24. Garrine, M., Costa, S. S., Messa, A. Jr., Massora, S., Vubil, D., Ácacio. S., Nhampossa, T., Bassat, Q., Mandomando, I., Couto, I. (2023b). Antimicrobial resistance and clonality of *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia in children admitted to the Manhiça District Hospital, Mozambique, over two decades. *Front. Microbiol.* 14:1208131.
25. Garrine, M., Quintó, L., Costa, S. S., Massora, A. Jr., Massinga, A. J., Vubil, D., Nhampossa, T., Massora, S., Ácacio, S., Cossa, A., Sigauque, B., Bassat, Q., Couto, I., Mandomando, I. (2023a). Epidemiology and clinical presentation of community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteraemia in children under 5 years of age admitted to the Manhiça District Hospital, Mozambique, 2001–2019. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 42:653–659.
26. Griethuysen, L. I, Belkum, V. B. G., Wannet, W., Keulen, P. *et al.* (2005). Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 43(3):1361-5.
27. Gunawardena, N.D., Thevanesam, V., Kanakarathne, N., Abeysekera, D., Ekanayake, A., Perera, N. (2012). Molecular identification of methicillin resistance and virulence marker in *Staphylococcus aureus*. *Sri Lanka Journal of Infectious Diseases.* 2(2):18-29.
28. Haggag, M. G., Aboelnour, A. E., Al-Kaffas, M. (2019). MRSA screening and spa gene detection in isolates from healthcare workers, at ophthalmology hospital in Egypt. *Bulletin of the National Research Centre.* 43(207):1-7.

29. Heckel, M., Geibdorfer, W., Herbst, F. A., Stiel, S., Ostgathe, C., Bogdan, C. (2017). Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at a palliative care unit: a prospective single service analysis. *PLoS ONE*. 12(12).
30. Hommes, J.W., Surewaard, B.G.J. (2022). Intracellular Habitation of *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Prospects for Antimicrobial Therapy. *Biomedicine*. 10 (1804):119.
31. Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Aguilar, G. R., Sharara, F., Mestrovic, To., Gray, A. P., Weaver, N. D., *et al.* (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 400: 2221–48.
32. Instituto Nacional de Estatística (INE). (2020). *Anuário Estatístico-Maputo Cidade*.
33. Kateete, D. P., Bwanga, F., Seni, J., Mayanja, R., Kigozi, E., Mujuni, B., Ashaba, F. K., *et al.* (2019). CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 8:94.
34. Kaur, K., Khalil, S., Singh, N. P., Dewan, P., Gupta, P., Shah, D. (2022). Antibiotic Susceptibility, Carrier State and Predictors of Outcome of *Staphylococcus aureus* Infections in Hospitalized Children. *Indian Pediatrics*. 60:49-53.
35. Kenga, D. B., Gebretsadik, T., Simbine, S., Maússe, F. E., Charles, P., Zaqueud, E., Fernando, H. F., Manjate, A., Sacarlal, J., Moon, T. D. (2021). Community-acquired bacteremia among HIV-infected and HIV-exposed uninfected children hospitalized with fever in Mozambique. *International Journal of Infectious Diseases*. 109: 99–107.
36. Kengne, M., Fotsing, O., Ndomgue, T., Nwobegahay, J. M. (2019). Antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated at the Yaounde Central Hospital, Cameroon: a retro prospective study. *Pan African Medical Journal*. 32:103.
37. Kobayashj, N., Wu, H., Kojima, K., Taniguchp, S. Urasawa, K., Uehara, N., Omizu, Y., Kish, Y., Yagihash, A., Kurokawa, I. (1994). Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.* 113: 259-266.
38. Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmas, J., Malhorta-Kumar, S., Peschel, A., Harbath, S. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Review Disease Iniciadores*. 4:18033.
39. Lowy, F. D. (1998). *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* INFECTIONS. *The New England Journal of Medicine*. 339:8.

40. Mahaluça, F. (2019). *Perfil da Resistência Antibacteriana na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos e Cuidados Intermédios dos Adultos do Hospital Central de Maputo. Tese de Mestrado*. Maputo, Instituto Superior de Ciências de Saúde.
41. Mandomando, I., Sigauque, B., Morais, L., Espasa, M., Vallès, X., Sacarlal, J., Macete, E., Aide, P., Quintò, L., Nhampossa, T., Machevo, S., Bassat, Q., Menéndez, C., Ruiz, J., Roca, A., Alonso, P. L. (2010). Antimicrobial Drug Resistance Trends of Bacteremia Isolates in a Rural Hospital in Southern Mozambique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(1):152–157.
42. Meng, X., Zhang, G., Sun, B., Liu, S., Wang, Y., Gao, M., Fan, Y., Zhang, G., Shi, G., Kang, X. (2020). Rapid Detection of *mecA* and *femA* Genes by Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Microfluidic System for Discrimination of Different Staphylococcal Species and Prediction of Methicillin Resistance. *Front. Microbiol.* 11:1487.
43. Mirowska L. E., Kiersnowska, Z. M., Michałkiewicz, M., Depta, A., Marczak, M. (2021). Nosocomial infections as one of the most important problems of the healthcare system. *Ann Agric Environ Med.* 28(3): 361–366.
44. Mkize, N., Zishiri, O. T., Mukaratirwa, S. (2017). Genetic characterisation of antimicrobial resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from commercial broiler chickens in the Durban metropolitan area, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association.* 88(0), a1416
45. Moodley, S. A., Perovic, O. (2018). Characterization of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Isolates from Gauteng and Western Cape Provinces, South Africa, 2016 and 2017. *PLoS One.* 16:100-109.
46. Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R. Gray, A., et al. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* (400): 2221–48.
47. Nandhini, P., Kumar, P., Mickymaray, S., Alothaim, A.S., Somasundaram, J., Rajan, M. (2022). Recent Developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Treatment: A Review. *Antibiotics.* 11, 606.
48. Oliveira, L. M. (2021). *Detecção e Caracterização molecular de Staphylococcus aureus Meticilina Resistente em Amostras de Pacientes Hepatopatas*. Tese de Mestrado. São Paulo, Unversidade de São Paulo.

49. Oliveira, S. P., Xavier, A. R. E. de O., de Souza, C. N., Cunha, Júnior, G. S. P., A. F. de M., Xavier, M. A. de S., Sanglard, D. A., Almeida, A. C. (2016). Identificação genotípica de *Staphylococcus aureus* multiresistentes a drogas isolados de animais de produção. *Cad. Ciênc. Agrá.* 8(3):45-51.
50. Olsen, J. E., Christensen, H., Aarestrup, F- M. (2005). Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (57): 450–460.
51. Organização Mundial da Saúde. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Acessado aos 2 Novembro 2022.
52. Pajohesh, R., Tajbakhsh, E., Momtaz, H., Rahimi, E. (2022). Relationship between Biofilm Formation and Antibiotic Resistance and Adherence Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Raw Cow Milk in Shahrekord, Iran. *Hindawi International Journal of Microbiology*.
53. Perovic O., Iyaloo S., Kularatne R., Lowman W., Bosman N., Wadula J, Seetharam, S., Duse, A., Mbele, N., Bamford, C., Dawood, H., Mahabeer, Y., Bhola, P., Abrahams, S., Moodley, A. S. (2020). Prevalence and Trends of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Hospitalized Patients in South Africa, 2010 to 2012: Laboratory-Based Surveillance Mapping of Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology. *PLoS ONE*. 10(12):1-14.
54. Pietrzak, J. R. T., Maharaj, Z., Mokete L. (2020). Prevalence of *Staphylococcus aureus* colonization in patients for total joint arthroplasty in South Africa. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 15(123):1-8.
55. Pimenta, L.K.L., Rodrigues, C.A., Filho, A.R.G., Coelho, C.J., Goes, V., Estrela, M., de Souza, P., Avelino, M.A.G., Vieira, J.D.G., Carneiro, L. (2023). *Staphylococcus spp.* Causatives of Infections and Carrier of blaZ, femA, and mecA Genes Associated with Resistance. *Antibiotics*. 12: 671.
56. Preziosi, M., Zimba, T. F., Lee, K., Tomas, M., Kinlin, S., Paiva, C. N., Bene, R., Paunde, T., et al. (2017). A prospective observational study of bacteremia in adults admitted to an urban Mozambican hospital. *S Afr Med J*. 105(5): 370–374.

57. Provenzi, M. A. (2022). *Caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência de amostras clínicas de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA) isoladas no Estado de Santa Catarina*. Tese de Licenciatura. UFSC. Florianópolis.
58. Puah, S. M., Chua, K. H., Tan, J. A. M. A. (2016). Virulence Factors and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates in Ready-to-Eat Foods: Detection of *S. aureus* Contamination and a High Prevalence of Virulence Genes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 13, 199.
59. Rossato, A.M., Reiter, K. C., d’Azevedo, P. A. (2018). Coexistence of virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Rev Soc Bras Med Trop*. 51(3):361-363.
60. Rossi, B. F. (2016). *Caracterização Molecular e Fenotípica de Staphylococcus aureus na Mastite Bovina Subclínica*. Tese de Mestrado. São Paulo, Unversidade Estadual de São Paulo.
61. Rusenova, N., Vasilev, N., Rusenov, A., Milanova, A., Sirakov, I. (2022). Comparison between Some Phenotypic and Genotypic Methods for Assessment of Antimicrobial Resistance Trend of Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates from Bulgaria. *Vet. Sci*. 9:401.
62. Schaumburg, F., Kock, R., Friedrich, A. W., Soulanoudjingar, S., Ngoa, U. A., *et al.* (2011). Population Structure of *Staphylococcus aureus* from Remote African Babongo Pygmies. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(5): e1150.
63. Seni J., Bwanga, F., Najjuka, C. F., Makobore, P., Okee, M., *et al.* (2013) Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* from Patients with Surgical Site Infections at Mulago Hospital in Kampala, Uganda. *PLoS ONE* 8 (6): e66153.
64. Shukla, S. K., Karow, M. E., Brady, J. M., Stemper, M. E., Kislow, J., Moore, N., *et al.* (2010). Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3582–3592.
65. Sigaúque B., Kobayashi, M., Vubil, D., Nhacolo, A., Chaúque, A., Moaine, B., *et al.* (2018) Invasive bacterial disease trends and characterization of group B streptococcal isolates among young infants in southern Mozambique, 2001–2015. *PLoS ONE* 13 (1): e0191193.

66. Sigaúque, B., Roca, A., Mandomando, I., Morais, L., Quintó, L., Sacarlal, J., *et al.* (2009). Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in Mozambique. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 108–113.
67. Sogut, M. U., B. Bas., Bilgin, M., Sezener, M. G., Findik, A. (2022). Molecular analysis and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nigerian Journal of Clinical Practice.* 23:912-8.
68. Tasneem, U., Majid, M., Mehmood, K., Redaina, R. F. U., Andleeb, S., *et al.* (2022). Co-occurrence of antibiotic resistance and virulence Genes in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Pakistan. *Afri Health Sci.* 22(1):486-95.
69. Terry-Alli, O. A., Ogbolu, D. O., Akorede, E., Onemu, O. M., Okanlawon, B. M. (2011). Distribution of *mecA* gene amongst *Staphylococcus aureus* isolates from Southwestern Nigeria. *Afr. J. Biomed. Res.* 14:9 -16.
70. Thwala, T., Madoroba, E., Basson, A., Butaye, P. (2021). Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Associated with Meat and Meat Products in African Countries: A Review. *Antibiotics.* 10:1108.
71. Tortora, G. J., Case, C. L., Funke, B. R. (2012). *Microbiologia.* 10^a Edição. 967pp. Porto Alegre, Editora Artmed.
72. van der Meeren, B. T., Millard, P. S., Scacchetti, M., Hermans, M. H., Hilbink, M., Concelho, T. B., Ferro, J. J., Wever, P. C. (2014). Emergence of methicillin resistance and Pantone-Valentine leukocidin positivity in hospital- and community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Beira, Mozambique. *Tropical Medicine and International Health.* 19(2):169-176.
73. van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. A., Paterson, D. L., Gosbell, I. B. (2012). Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Journals.ASM.org.* 25:2.
74. Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., Vandercam, B., Delmee, M., Wauters, G., Gala, J. (1995). Specific Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Species by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 33(11): 2864–2867.
75. Votintseva, A. A., Fung, R., Miller, R. R., Knox, K., Godwin, H., Wyllie, D. H., Bowden, R., Crook, D. W. A., Walker, S. (2014). Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiology.* 14:63.
76. Vubil D., Garrine M., Ruffing U., Acácio S., Sigaúque B., Alonso P. L., von Müller L., Herrmann M., Mandomando I. (2017). Molecular Characterization of Community Acquired

Staphylococcus aureus Bacteremia in Young Children in Southern Mozambique, 2001–2009. *Front. Microbiol.* 8:730.

77. Walana, Bobzah, W. B.P., Kuugbee, E.D., Acqua, S., Ezekiel, V. K., Yabasin, I. B. *et al.* (2020). *Staphylococcus aureus* nasal carriage among healthcare workers, inpatients and caretakers in the Tamale Teaching Hospital, Ghana. *Scientific African.* 8 (2020) e00325.
78. Weterings, V., Veenemans, J., Rijen, V. M., Kluytmans, J. (2019). Prevalence of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients at hospital admission in The Netherlands, 2010–2017. *Clinical Microbiology and Infection.* 25:1428.
79. World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.
80. World Health Organization. (2017). WHO Health, Geneve: Site do WHO, <http://www.who.int/en> acessado 19 de Janeiro de 2023.
81. Wozniak, J. M., Mills, R. H., Olson, J., Sakoulas, G., Rose, W., Gonzalez, D. J., *et al.* (2020). Mortality Risk Profiling of *Staphylococcus aureus* Bacteremia by Multi-omic Serum Analysis Reveals Early Predictive and Pathogenic Signatures. *Cell* 182, 1311–1327.
82. Zhao, N., Cheng, D., Jian, Y., Yao, L., Liu, J., Huang, Q., Hei, L., Wang, H., Miao, F., *et al.* (2021). Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates colonizing human nares and skin. *Medicine in Microecology.* 7:100031.