



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA

Prevalência de estafilococos “interferentes” na cavidade nasal de estudantes da área da saúde e sua correlação com o estado de portador de *Staphylococcus aureus*.

GRUPO DE PESQUISA:

Imunofisiologia e Imunopatologia dos linfócitos T

PROFESSOR RESPONSÁVEL:

Renato Geraldo da Silva Filho

REGIME DE TRABALHO: 40h/DE

ÁREA DE CONHECIMENTO: Ciências Biológicas

EQUIPE:

Prof. Agostinho Alves de Lima e Silva

Dra. Carmen Soares de Meirelles Saramago

Prof. Marco Aurélio Peregrino da Silva

Rio de Janeiro – RJ
Dezembro / 2022



INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um importante patógeno humano, sendo um dos agentes mais frequentes de infecções da pele e tecidos moles adquiridas na comunidade. Do mesmo modo, esta bactéria é prevalente em infecções de sítio cirúrgico, corrente sanguínea, endocardite, pneumonia e osteomielite, que possuem uma alta mortalidade. ⁽¹⁾

Em aparente contraste com seu potencial infeccioso, *S. aureus* é encontrado frequentemente colonizando a pele e mucosa de humanos, em indivíduos denominados de portadores. As cavidades nasais anteriores são o local de colonização mais frequente, mas essa bactéria pode ser encontrada na pele, em particular das mãos, no períneo e na faringe, e menos frequentemente no intestino, vagina e axilas. ^(2, 3)

O vestíbulo nasal, área que vai da narina até o límen nasal, apresenta os percentuais de detecção de colonização por *S. aureus* mais elevados, sendo apontado como o sítio anatômico de eleição para rastreamento da colonização por *S. aureus*. Essa região é coberta por epitélio escamoso totalmente queratinizado contendo glândulas sebáceas e folículos pilosos, existindo a partir do límen nasal a transição para o epitélio respiratório típico. ^(3,4)

A detecção laboratorial do “estado de portador” nasal de *S. aureus* pode ser feita em estudos transversais e longitudinais. Nos estudos transversais a pesquisa é feita em uma única coleta de material do vestíbulo nasal e os resultados obtidos classificam os indivíduos em “portadores” e “não portadores”. Já nos estudos longitudinais, os materiais são coletados semanal ou mensalmente, por períodos de semanas a anos, e com base no percentual de culturas positivas obtidas os indivíduos são classificados em três categorias: “portador persistente”, “portador intermitente” e “não portador”. Contudo, o percentual de culturas positivas estabelecido nos estudos para classificar indivíduos nessas categorias difere consideravelmente, variando de $\geq 70\%$ a 100% para “portador persistente” e de $\geq 1\%$ a 99% para “portador intermitente”. ⁽⁵⁾

Em 2004, um extenso estudo longitudinal objetivando estabelecer protocolos padronizados para execução e interpretação dos resultados da pesquisa de portador nasal de *S. aureus* definiu uma regra para classificação preditiva (“*culture rule*”) dos indivíduos. ⁽⁶⁾ Foi observado que duas culturas qualitativas de swabs nasais de amostras obtidas em um intervalo de uma semana forneciam informações suficientes para prever adequadamente o estado de portador (duas culturas positivas= “persistente”;



uma cultura positiva e uma negativa= “intermitente”). Além disso, a combinação dos resultados qualitativos com a contagem de *S. aureus* na amostra aumentaria o valor preditivo da análise, pois contagens superiores a 10^3 unidades formadoras de colônias (ufc) se correlacionavam somente com “portadores persistentes”. Desse modo, essa associação de resultados, qualitativos e quantitativos, possibilitava uma melhor caracterização do “portador intermitente” como o indivíduo com uma das duas culturas positiva, ou quando ambas culturas eram positivas, mas com baixas contagens de *S. aureus*.⁽⁶⁾

Em um outro estudo, com base no resultado de 5-10 culturas qualitativas de material do vestíbulo nasal, um grupo de indivíduos foi previamente em “portadores persistentes” (≥ 80 % das amostras positivas), “não portadores” (nenhuma amostra positiva) e “portadores intermitentes” (outros resultados). Após o estabelecimento desses resultados, todos os indivíduos foram submetidos a “descolonização” da cavidade nasal pela aplicação de um antimicrobiano tópico (mupirocina), realizada então a colonização artificial da cavidade nasal dos indivíduos com uma mistura de amostras de *S. aureus*, que no caso de “portadores persistentes” sempre continha a amostra isolada do próprio indivíduo (genótipo autólogo). O período de sobrevivência das amostras na colonização dos indivíduos “portadores persistentes” foi superior a 154 dias e prevalentemente pela amostra autóloga, sendo que suas contagens se mantinham elevadas. Já em “portadores intermitentes” e “não portadores” a sobrevivência das amostras foi de 14 e 4 dias, respectivamente, e as contagens obtidas eram baixas. O nível sérico de anticorpos (IgG e IgA) contra 17 proteínas estafilocócicas não mostrou diferenças para maioria desses antígenos, exceto IgG contra TSST-1 e SasG que foi significativamente maior em portadores persistentes. Os autores concluíram que “portadores intermitentes” e “não portadores” compartilham características semelhantes e, portanto, sugeriram uma reclassificação de portadores nasais de *S. aureus* em “portadores persistentes” e “outros portadores”⁽⁷⁾

A interação com o epitélio nasal é um evento chave para a colonização pelo *S. aureus*. Especificamente na cavidade nasal anterior, a bactéria adere na superfície do epitélio estratificado cuja camada mais externa é composta por queratinócitos descamados da superfície epitelial. Essas células sofreram um processo de cornificação sendo a membrana celular substituída por um envelope cornificado (CE= Cornified Envelope) composto por proteínas reticuladas revestidas com lipídeos. A proteína mais abundante do CE é a loricrina (≈ 85 %), existindo também a citoqueratina 10 (K10), a involucrina, a



filagrina e pequenas proteínas ricas em prolina, formando uma camada impermeável a água. A loricrina é a principal molécula alvo da ligação de proteínas de superfície do *S. aureus* como o CfB (*Clumping factor B*) e a IsdA (*Iron-regulated surface determinant protein A*).^(8,9)

Apesar de menos estudada, a cavidade nasal posterior também pode ser colonizada por *S. aureus*. Sua importância foi evidenciada através da coleta de material durante procedimentos cirúrgicos onde a detecção da bactéria na cavidade posterior em indivíduos com e sem processos inflamatórios na mucosa nasal foi de 55,6% e 62,5%, respectivamente, superior a encontrada na cavidade anterior (44,4% e 43,7%, respectivamente).⁽⁴⁾ Como cavidade nasal posterior é revestida por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, a molécula alvo para aderência de *S. aureus* é o receptor *scavenger* SREC-I, sendo essa ligação mediada pelos ácidos teicóicos da parede celular (WTA= Wall Teichoic Acid).⁽¹¹⁾ Deste modo, a cavidade nasal posterior pode servir de reservatório permanente para colonização da porção anterior, podendo comprometer o tratamento para erradicação do estado de portador nasal pela aplicação de medicamentos tópicos na cavidade nasal anterior.^(4,10,11)

Um estudo do culturoma nasal de indivíduos adultos identificou os gêneros *Corynebacterium*, *Propionibacterium* e *Staphylococcus* como prevalentes na microbiota desse sítio anatômico. Um total de 141 espécies foram identificadas, sendo *S. epidermidis* e *P. acnes* (atualmente *Cutibacterium acnes*) encontrados em 97,1% dos indivíduos estudados. Dentro do gênero *Corynebacterium*, as espécies prevalentes (64,7%) foram *C. accolens* e *C. tuberculostearicum*. No gênero *Staphylococcus*, também foi observada uma frequência de isolamento elevada, as espécies *S. haemolyticus* (44.1%), *S. capitis* (41.2%), *S. hominis* (41.2%), *S. warneri* (32.4%) e *S. lugdunensis* (26.5%).⁽⁴⁾

A diversidade microbiana observada na microbiota nasal permite que inúmeros mecanismos de interferência e antagonismo interespecies ocorram, sendo de particular importância os que se interpõem a colonização por *S. aureus*. Dentre os gêneros prevalentes neste sítio anatômico já existem estudos demonstrando a interferência a colonização por *S. aureus* no gênero *Corynebacterium* por uma maior capacidade de aderência as células do epitélio nasal⁽¹²⁾, e no gênero *Staphylococcus* pelas espécies *S. epidermidis*⁽¹³⁾ e *S. lugdunensis*⁽¹⁴⁾.



S. epidermidis denominados do “tipo inibitório” foram descritos por sua capacidade de, quando em co-cultivo, inibir a formação de biofilme de *S. aureus*, bem como o sobrenadante de suas culturas degradava biofilmes pré-formados. Essas amostras foram correlacionadas com uma ocorrência significativamente menor do estado de portador de *S. aureus*. No sobrenadante de culturas dessas amostras foi isolada uma proteína de 27 kDa identificada como uma serina protease extracelular (Esp= *Extracellular serine protease*).⁽¹³⁾ A Esp era capaz de degradar inúmeras proteínas do *S. aureus*, como as envolvidas na formação do biofilme proteico e na aderência ao hospedeiro (Atl, Eap, Emp), assim como adesinas típicas (Efb, IsdA, SdrD). Além dessa ação, a Esp degradava também proteínas da matriz extracelular e plasmáticas do hospedeiro (fibronectina, fibrinogênio, vitronectina) que atuam como receptores de adesinas de *S. aureus*. Essa ação era observada inclusive amostras resistentes a meticilina (MRSA) e com sensibilidade intermediária a vancomicina (VISA).⁽¹⁴⁾

Essa interferência entre as espécies de *S. epidermidis* Esp+ do “tipo inibitório”, bem como de Esp purificada, no estado de portador de *S. aureus* também foi observada “in vivo”. A introdução da amostra de *S. epidermidis* Esp+ (JK16) nas cavidades nasais de voluntários previamente caracterizados como portadores persistentes de *S. aureus* determinou a eliminação da colonização nasal por *S. aureus*, resultado também observado com a aplicação local da Esp purificada. Já experimentos semelhantes realizados com uma mutante Esp-deficiente derivada da amostra JK16 não determinava essa alteração.⁽¹³⁾

A pesquisa de atividade antimicrobiana de amostras do gênero *Staphylococcus* isoladas das cavidades nasais identificou uma amostra de *S. lugdunensis* (IVK28) com capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus*. A substância envolvida nessa ação foi denominada de lugdunina, sendo produzida somente na superfície de ágar sólido em condições limitantes de ferro. É codificada pelo gene *lug* presente em um operon de 30kpb responsável pela síntese de várias sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS). Esse operon NRPS foi encontrado somente no genoma de amostras da espécie *S. lugdunensis*. A lugdunina possui uma potente ação antimicrobiana, atuando em amostras de *S. aureus*, inclusive os MRSA e os com resistência intermediária a glicopeptídeos (GISA), *Enterococcus*, inclusive os resistentes à vancomicina (VRE), *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus pneumoniae*.⁽¹⁵⁾

Evidências dessa forte interferência entre as espécies também foram observadas “in vivo”. Em um modelo de colonização nasal de ratos, a co-inoculação de *S. lugdunensis*



e *S. aureus* determinava uma recuperação significativamente menor de *S. aureus* quando comparada com a co-inoculação de um mutante não produtor de lugdunina (“knockout” do gene *lugD*). Já em pacientes hospitalizados foi observado que o estado de portador nasal de *S. aureus* na presença de *S. lugdunensis* era 5,9 vezes menor que em indivíduos onde está espécie não foi detectada. ⁽¹⁵⁾

OBJETIVO GERAL

Esse projeto tem por objetivo estudar a presença de amostras de *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* e *S. aureus* na microbiota das cavidades nasais de estudantes da área da saúde. Nas amostras de *S. epidermidis* e *S. lugdunensis* isoladas será estudada a produção da enzima serina-protease (Esp) e da lugdunina, respectivamente, bem como a presença dos genes codificadores dessas substâncias. A ocorrência dessas amostras será correlacionada com a colonização por *S. aureus* afim de se verificar se a presença de amostras “interferentes” impede o desenvolvimento do estado de portador de *S. aureus*. Complementarmente, as amostras de *S. aureus* isoladas serão estudadas quanto a susceptibilidade à mupirocina, em função da sua relevância na eficácia do procedimento de descolonização de portadores, e da susceptibilidade à metilina, em função da sua relevância epidemiológica e como marcador de multirresistência da bactéria.

RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

Evidências na literatura indicam a existência de interferência na colonização da cavidade nasal por *S. aureus* exercida por amostras de *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*. O estudo proposto tem como objetivo a análise conjunta da presença dessas amostras em uma população (estudantes da área da saúde), que sabidamente apresenta uma prevalência elevada de indivíduos portadores nasais de *S. aureus*, inserindo neste contexto o estudo da resistência a mupirocina e metilina nas amostras isoladas de *S. aureus*.



MATERIAL E MÉTODOS:

1- População do Estudo:

A pesquisa abrangerá estudantes dos cursos de bacharelado da área da saúde (Biomedicina, Enfermagem, Medicina e Nutrição) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO. A amostra a ser estudada será de 100 estudantes, independente do seu curso de filiação, que aceitarem participar do estudo concordando em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que se encontra no Apêndice 1.

2- Coleta de Material das Cavidades Nasais:

O material das cavidades nasais será coletado em dois momentos, com um intervalo aproximado de uma semana. Um “swab” de nylon flocado estéril, levemente umedecido com água destilada estéril, será introduzido nas cavidades nasais por cerca de 2 cm, até o “*limen nasi*”, e rotacionado sem interrupção por pelo menos 5 vezes em cada narina. ^(16, 17) Após a coleta o swab será colocado em um tubo de ensaio contendo 1 mL de salina estéril (empregado para umedecer o “swab”) sendo semeado nos meios de isolamento em no máximo 1 hora.

3- Semeadura do material coletado nos meios de isolamento:

O tubo de ensaio contendo o “swab” e a salina será agitado por 15 s, sendo “swab” então pressionado firmemente contra as paredes do tubo e descartado. A suspensão bacteriana obtida será diluída 10^{-1} , em salina estéril, sendo os meios de isolamento semeados.

Uma alíquota de 500 μ L da suspensão bacteriana será semeada pela técnica de espalhamento na superfície em uma placa de 140 mm de diâmetro de Ágar Salgado Manitol (MSA). Uma outra placa de MSA, com 90 mm de diâmetro e dividida em 3 setores, será semeada com 10 μ L da suspensão original, 10 μ L e 1 μ L da diluição 10^{-1} . Após a semeadura das placas estas serão incubadas a 35°C por 48 h. ⁽⁶⁾

4- Isolamento e Identificação Fenotípica de Amostras com Características sugestivas das espécies *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*:

Após a incubação, a placa de MAS-140mm será examinada e 3 a 6 colônias com reação negativa para utilização do manitol (meio de cultura permanece vermelho) serão



repicadas para placas de Agar Soja Tripticaseína (TSA). Dentre as espécies de *Staphylococcus* manitol-negativa estão *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*. A partir do crescimento obtido em TSA serão realizados os testes para confirmação presuntiva do gênero *Staphylococcus* (Coloração de Gram e Teste da Catalase) e testes de triagem fenotípica para as espécies (teste do PYR e da utilização da trealose).⁽¹⁸⁾ Amostras com um perfil de resultados compatíveis com as espécies de interesse serão submetidas a confirmação molecular da sua identificação (item 6), sendo conservadas por toda duração do estudo a -20 °C em Caldo Cérebro e Coração (BHI) acrescido de 20 % de glicerol (BHI-glicerol).⁽¹⁹⁾

5- Isolamento e Identificação Fenotípica de Amostras com Características sugestivas de *S. aureus*:

Após a incubação, as placas de MAS serão examinadas quanto a presença de colônias com reação positiva para utilização do manitol (meio de cultura amarelo). Dentre as espécies de *Staphylococcus* manitol-positivo está *S. aureus*. De cada placa de MAS de 140 mm e/ou de cada setor(es) da placa de 90 mm apresentando colônias manitol-positivo, 4 a 6 colônias dessas colônias serão repicadas para placas de Ágar Sangue (BA). A partir do crescimento obtido em BA serão realizados os testes de confirmação presuntiva do gênero *Staphylococcus* (Coloração de Gram e Teste da Catalase), testes de identificação fenotípica da espécie (coagulase em tubo, fator de agregação, PYR e utilização da trealose).⁽¹⁸⁾ Amostras com um perfil de resultados compatíveis com a espécie *S. aureus* serão submetidas a confirmação molecular da sua identificação (item 6), sendo conservadas por toda duração do estudo a -20 °C em BHI-glicerol.⁽¹⁹⁾ Com a confirmação da identificação, o resultado quantitativo da presença de *S. aureus* será expresso com base nas contagens de colônias obtidas nas placas de ASM da suspensão bacteriana obtida a partir do material coletado no “swab”, e sua diluição 10^{-1} .⁽⁶⁾

Os resultados do isolamento de *S. aureus* nas duas coletas de material das cavidades nasais serão empregados na caracterização do estado de portador pela “regra da classificação preditiva”. Quando nas duas coletas realizadas existir o isolamento de contagens superiores a 10^3 unidades formadoras de colônias (ufc) de *S. aureus* o indivíduo será considerado “Portador Persistente”. Do mesmo modo, se nas duas coletas não existir o isolamento do *S. aureus* o indivíduo será considerado “Não Portador”. Quando ocorre isolamento de *S. aureus* em somente uma das coletas ou quando existe isolamento em ambas as coletas, mas com contagens inferiores a 10^3 ufc, o indivíduo será considerado “Portador Intermitente”.⁽⁶⁾



6- Testes Moleculares com as Amostras Isoladas de *Staphylococcus*:

6.1- Extração do DNA Bacteriano e Reação de PCR Simples:

As amostras que apresentarem uma identificação fenotípica correspondente as espécies pesquisadas serão repicadas em placas de TSA e, a partir do crescimento obtido, serão preparadas suspensões em água ultrapura, sendo o seu DNA genômico extraído pela técnica do choque térmico e utilizado nas reações de PCR simples para caracterização dos genes de interesse. ⁽²⁰⁾

Os oligonucleotídios iniciadores, as temperaturas de anelamento e o tamanho esperado dos produtos amplificados para os genes de interesse são descritos no Apêndice 2, A análise dos produtos amplificados obtidos nas reações de PCR será realizada através de eletroforese em gel de agarose com emprego de corante não mutagênico e visualização dos produtos amplificados por meio de um transiluminador de luz azul de LED, sendo o tamanho dos produtos amplificados estimados por comparação com marcador de tamanho de DNA (100 a 1.000 pb).

6.2- Identificação Molecular dos Isolados e Pesquisa de Outros Genes de Interesse das Amostras Isoladas:

A confirmação do gênero *Staphylococcus* será realizada pela reação de PCR simples para o gene 16S RNAr ⁽²¹⁾. A confirmação da espécie da amostra como *S. aureus* será feita pelo gene *nuc* ⁽²¹⁾, *S. epidermidis* pelo gene *epi* ⁽²²⁾ e *S. lugdunensis* pelo gene *lug*. ⁽²²⁾ A identificação molecular da capacidade de produção de Esp por amostras de *S. epidermidis* será feita pela pesquisa do gene *esp* ⁽¹³⁾ e de lugdunina por amostras de *S. lugdunensis* pelos genes *lugA*, *lugB*, *lugC* e *lugD* do operon NRPS ⁽¹⁵⁾. A presença do gene *mecA* ⁽²¹⁾ será empregada para caracterização da resistência a meticilina em amostras de *S. aureus* (Apêndice 2).

7- Inibição da Formação de Biofilme por *S. aureus* por sobrenadantes de Amostras de *S. epidermidis* Esp+:

A identificação da produção de Esp por amostras de *S. epidermidis* será realizada pela inibição da formação de biofilme por *S. aureus* pelo sobrenadante de culturas das amostras de *S. epidermidis*. Neste ensaio, em um poço de uma microplaca de poliestireno de fundo chato de 96 poços serão colocados 180 µL de uma cultura em Caldo Soja Trypticaseína (TSB) de uma amostra produtora de biofilme de *S. aureus* ATCC 25923 ($\approx 10^5$ ufc mL⁻¹) e 20 µL do sobrenadante de uma cultura de *S. epidermidis*.



Após incubação, em condição estática, a cultura será removida, o poço lavado com água purificada, será feita fixação do biofilme eventualmente aderido nas paredes do poço com metanol e em seguida será realizada sua coloração com solução de cristal violeta de Hucker a 2%. O poço será então lavado com água purificada e o corante ligado ao material na parede do poço extraído com álcool etílico. A absorbância a 620 nm (ABS_{620nm}) do extrato do poço será determinada em leitor de Elisa e comparada com as de poços controle, onde no lugar do sobrenadante da cultura de *S. epidermidis* será colocado TSB estéril. Este experimento será realizado em triplicata e será indicativo da produção de Esp pela amostra de *S. epidermidis* quando o resultado da média das ABS_{620nm} dos poços teste for $\leq 50\%$ a média das ABS_{620nm} dos poços controle. ^(13, 23)

8- Teste de Bioatividade para Detecção da Produção de Lugdunina:

A produção de lugdunina será avaliada em Agar BM (peptona de soja 1,0%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,5%; glicose 0,1%, K_2HPO_4 0,1%, ágar 1,5%, pH 7,2), suplementado com 200 μM de 2, 2'-bipiridina, isto porque esse suplemento visa gerar uma condição de limitação de ferro necessária a produção de lugdunina. O Agar BM, fundido e resfriado a 45°C, será semeado com uma cultura overnight de *S. aureus* ATCC 25923 (“amostra indicadora”) e distribuído em placas. Após a solidificação do meio, um *spot* com 10 μL da cultura de *S. lugdunensis* será feito na sua superfície. As placas serão incubadas e o desenvolvimento de um halo de inibição da “amostra indicadora” ao redor do *spot* de crescimento da amostra de *S. lugdunensis* será indicativa da produção de lugdunina. ⁽¹⁴⁾

9- Susceptibilidade das Amostras de *S. aureus* a Mupirocina e a Meticilina:

A susceptibilidade a mupirocina será realizada pelo método de disco difusão ⁽²⁴⁾. Para metilicina será empregada a técnica preditiva com discos de cefoxitina ⁽²⁴⁾ e confirmação dos resultados com a pesquisa do gene *mecA* por PCR simples (descrita anteriormente).

10- Análise Estatística:

As análises estatísticas dos resultados obtidos, quando aplicável, serão realizadas com o emprego do software *GraphPad Prism*.



11-Cronograma de Execução:

A previsão inicial para desenvolvimento das atividades previstas para realização desse Projeto de Pesquisa é do seu início em agosto de 2023 e conclusão em dezembro de 2024.

Ressaltamos, contudo, que independentemente do cronograma apresentado abaixo as atividades do projeto serão iniciadas somente a partir da sua aprovação pelo Sistema CEP-CONEP.

Ano de 2023												
Atividades Previstas	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Bloco 1												
Bloco 2												
Bloco 3												
Ano de 2024												
Atividades Previstas	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Bloco 3												
Bloco 4												
Bloco 5												
Bloco 6												
Bloco 7												
Bloco 8												
Bloco 9												

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 1 (08/2023):

- “**Culture Rule**” dos participantes: serão realizadas 2 coletas de material da cavidade nasal, com um intervalo de 1 semana (de 50 estudantes dos cursos da área de saúde da UNIRIO);
- Processamento do material coletado (cultura qualitativa e quantitativa em Ágar Salgado Manitol);
- Identificação nas culturas realizadas de amostras de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. lugdunensis* com testes fenotípicos (coloração de Gram, catalase, coagulase, PYR, utilização da trealose);
- Nas amostras identificadas como *S. epidermidis* realização do Teste de Inibição da Formação de Biofilme para caracterização da produção de serina protease extracelular (Esp);
- Nas amostras identificadas como *S. lugdunensis* realização do Teste de Bioatividade em Ágar BM adicionado de 2,2'-bipiridina para caracterização da produção de lugdunina;
- Preparo de culturas estoques em BHI-glicerol para armazenamento a -20°C;



- Com base no isolamento das espécies de estafilococos de interesse os participantes do estudo serão divididos nos grupos:
 - **Grupo 1:** Portadores Persistentes de *S. aureus* (isolamento em contagens significativas ($>10^3$ ufc) de *S. aureus* nas duas coletas);
 - **Grupo 2:** Portadores Intermitentes de *S. aureus* (isolamento de *S. aureus* em somente uma das coletas ou isolamento em ambas as coletas, mas em contagens inferiores a contagem significativa de $>10^3$ ufc);
 - **Grupo 3:** Presença de Estafilococos Interferentes (isolamento de *S. epidermidis* Esp+ e *S. lugdunensis* lugdunina+);
 - **Grupo 4:** não foram isoladas espécies de estafilococos de interesse.

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 2 (09 a 11/2023):

- Nova coleta mensal de material dos participantes pertencentes aos **Grupos 1, 2 e 3** por três meses consecutivos;
- Processamento do material coletado (cultura qualitativa e quantitativa);
- Identificação de amostras de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. lugdunensis* pelos testes fenotípicos;
- Nas amostras identificadas como *S. epidermidis*, realização do Teste de Inibição da Formação de Biofilme;
- Nas amostras identificadas como *S. lugdunensis*, Realização do Teste de Bioatividade em Ágar BM adicionado de 2,2'-bipiridina;
- Preparo de culturas estoques das amostras de estafilococos de interesse em BHI-glicerol para armazenamento a -20°C ;

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 3 (12/23 a 02/2024):

- Realização de testes moleculares (PCR) para confirmação da identificação de gênero e espécie das amostras de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*;
- Determinação da susceptibilidade das amostras de *S. aureus* a metilina pelo teste preditivo com cefoxitina e a mupirocina pelo método de disco difusão;
- Confirmação da resistência das amostras de *S. aureus* a metilina pela pesquisa por PCR do gene *mecA*;
- Tabulação de resultados obtidos até o momento, preparo de relatórios e redação de manuscritos referentes ao projeto.

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 4 (01/2024):

- Apresentação de Relatório de Pesquisa Parcial ao CEP-HUGG.

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 5 (03/2024):



- Atividade idênticas às previstas no Bloco 1, sendo realizadas com um novo grupo de 50 estudantes dos cursos da área de saúde da UNIRIO.

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 6 (04 a 06/2024):

- Atividade idênticas às previstas no Bloco 2.

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 7 (07/2024):

- Apresentação de Relatório de Pesquisa Parcial ao CEP-HUGG.

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 8 (07 a 12/2024):

- Atividade idênticas às previstas no Bloco 3.

Detalhamento das Atividades Previstas no Bloco 9 (12/2024):

- Apresentação de Relatório de Pesquisa Final ao CEP-HUGG.

REFERÊNCIAS:

1. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clin Microbiol Rev [Internet]**. 2018 Oct;31(4):1–103. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00020-18>
2. van BELKUM A, MELLES D, NOUWEN J, VANLEEuwEN W, VANWAMEL W, VOS M, et al. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet Evol [Internet]**. 2009 Jan;9(1):32–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134808001779>
3. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect Dis [Internet]**. 2005 Dec;5(12):751–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09074>
4. Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, et al. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. **Environ Microbiol [Internet]**. 2016 Jul;18(7):2130–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.12891>
5. VandenBergh MFQ, Yzerman EPF, van Belkum A, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-Up of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage after



- 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. **J Clin Microbiol [Internet]**. 1999 Oct;37(10):3133–40. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.37.10.3133-3140.1999>
6. Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MFQ, Boelens HAM, Hofman A, van Belkum A, et al. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a “culture rule”. **Clin Infect Dis [Internet]**. 2004 Sep 15;39(6):806–11. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/423376>
 7. van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, et al. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. **J Infect Dis [Internet]**. 2009 Jun 15;199(12):1820–6. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/599119>
 8. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O’Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, et al. Nasal Colonisation by *Staphylococcus aureus* Depends upon Clumping Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin. Peschel A, editor. **PLoS Pathog [Internet]**. 2012 Dec 27;8(12):e1003092. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003092>
 9. Clarke SR, Andre G, Walsh EJ, Dufrêne YF, Foster TJ, Foster SJ. Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of *Staphylococcus aureus* to human corneocyte envelope proteins. **Infect Immun [Internet]**. 2009 Jun;77(6):2408–16. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.01304-08>
 10. Mulcahy ME, McLoughlin RM. Host-Bacterial Crosstalk Determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. **Trends Microbiol [Internet]**. 2016 Nov;24(11):872–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.012>
 11. Baur S, Rautenberg M, Faulstich M, Faulstich M, Grau T, Severin Y, et al. A nasal epithelial receptor for *Staphylococcus aureus* WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization. Gilmore MS, editor. **PLoS Pathog [Internet]**. 2014 May 1;10(5):e1004089. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004089>
 12. Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah ASM, et al. Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. **J Hosp Infect [Internet]**. 2000 Feb;44(2):127–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670199906801>
 13. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. **Nature [Internet]**. 2010 May;465(7296):346–9. Available from:



<http://www.nature.com/articles/nature09074>

14. Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. **J Bacteriol [Internet]**. 2013 Apr 15;195(8):1645–55. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.01672-12>
15. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. **Nature [Internet]**. 2016 Jul 28;535(7613):511–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature18634>
16. Verhoeven P, Grattard F, Carricajo A, Pozzetto B, Berthelot P. Better Detection of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage by Use of Nylon Flocked Swabs. **J Clin Microbiol [Internet]**. 2010 Nov;48(11):4242–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844232>
17. Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, et al. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. **Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]**. 2014 Jan 26;12(1):75–89. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84893089204&partnerID=40&md5=0ec1f1eaf09a9be121e6def3685025cb%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2014075374>
18. Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. **GMS Hyg Infect Control [Internet]**. 2014;9(3):Doc23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25285267%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4184040>
19. Saeki EK, Farhat LP, Pontes ÉA. Eficiência dos crioprotetores glicérol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. **Acta Vet Bras**. 2015;9(2):195–8.
20. Riyaz-UI-Hassan S, Verma V, Qazi GN. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Food Microbiol**. 2008;25(3):452–9.
21. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. **J Clin Microbiol [Internet]**. 2004 Nov;42(11):4947–55. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.42.11.4947-4955.2004>
22. Hirotaki S, Sasaki T, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. Rapid and accurate



identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. **J Clin Microbiol [Internet]**. 2011 Oct;49(10):3627–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21832022>

23. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS [Internet]**. 2007 Aug;115(8):891–9. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. Vol. 25. 2020. 177 p.



Apêndice 1:



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Código de Controle:

Você, estudante de um dos Cursos da Área de Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado “Prevalência de estafilococos interferentes na cavidade nasal de estudantes da área de saúde e sua correlação com o estado de portador de *Staphylococcus aureus*”, sob a responsabilidade do professor da Disciplina de Microbiologia *Renato Geraldo da Silva Filho*.

Nesse projeto será analisado o material coletado da cavidade nasal de estudantes da nossa Universidade. O objetivo dessa pesquisa é detectar a presença de bactérias das cavidades nasais capazes de interferir na colonização por *S. aureus*, uma bactéria relacionada a diferentes doenças e que pode se instalar na cavidade nasal sem causar qualquer problema. Nessa condição, chamada de Estado de Portador, o risco está no indivíduo transmitir essa bactéria a outros indivíduos, o que pode em determinadas condições causar infecções, e também a alimentos por ele manipulados, o que pode levar esse alimento a causar intoxicações alimentares.

Você receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa. Nós lhe asseguramos que o seu nome não aparecerá em qualquer publicação dos resultados dessa pesquisa, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam sua identificação.

A sua participação se dará por meio da coleta de material da sua cavidade nasal. Essa será feita pela introdução nas suas narinas de um “swab” estéril descartável umedecido em solução salina estéril. Essa coleta de material será feita no Laboratório de Aulas Práticas da Disciplina de Microbiologia (Bloco D – Sala: 409) por duas vezes com intervalo de uma semana, em um horário previamente combinado. Inicialmente você fará a leitura desse TCLE e, se concordar com as condições descritas, fará sua assinatura e receberá uma cópia. Depois, preencherá uma ficha com algumas perguntas pessoais e sobre sua saúde. Em seguida será realizada a coletas de material da cavidade nasal. No máximo, isso demorará cerca de 10 minutos. Dependendo do resultado obtido nessas coletas iniciais serão agendadas novas coletas no 1º, 2º e 3º mês para acompanhamento dos resultados.

Rubrica do Participante:	Rubrica do Pesquisador:	Página: 1/3
--------------------------	-------------------------	-------------



Apêndice 1 (continuação):



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA

O procedimento de coleta de material da cavidade nasal implica em um risco mínimo à sua saúde, ou seja, no máximo você sentirá um desconforto local momentâneo que cessa ao final da coleta, ou caso você solicite, com sua interrupção.

Se você aceitar participar, estará contribuindo para desenvolvimento desse projeto de pesquisa da Disciplina de Microbiologia, e com a ampliação do conhecimento de como os estafilococos interferentes podem proteger o indivíduo da colonização nasal por *S. aureus*.

Você pode se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para você. Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação nessa pesquisa, você receberá assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, obedecendo os dispositivos legais vigentes no Brasil.

Sentindo qualquer desconforto relacionado aos procedimentos adotados durante a pesquisa, você pode procurar o pesquisador responsável para que ele possa ajudá-lo.

Os resultados da pesquisa serão divulgados no âmbito nossa Universidade em trabalhos acadêmicos, podendo ser publicados em artigos científicos posteriormente. Os dados dos participantes da pesquisa ficarão sob a guarda do Pesquisador Responsável por um período de no mínimo 5 anos após o final do projeto, podendo ser armazenados em formato digital, sendo preservados o anonimato e a indisponibilidade de qualquer informação que permita a sua identificação em qualquer pesquisa que os utilize. Conforme as Resoluções do CNS nº 466/12 e nº 510/16, ao final desse prazo esse material será descartado.

Se você tiver qualquer incômodo local persistente após a coleta do material da cavidade nasal ou tiver dúvidas em relação à pesquisa a seus resultados, por favor entre em contato com o Prof. *Renato Geraldo da Silva Filho*, por mensagem: renato.geraldo.silva@unirio.br ou pelo telefone da Disciplina de Microbiologia: 2531-7890. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle -UNIRIO/EBSERH, que têm por objetivo defender os interesses dos participantes das pesquisas em sua integridade e dignidade, contribuindo para que sejam seguidos padrões éticos na realização de pesquisas.

Rubrica do Participante:	Rubrica do Pesquisador:	Página: 2/3
--------------------------	-------------------------	-------------



Apêndice 1 (continuação):



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle - UNIRIO/EBSERH. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidas pelo telefone (21) 2264-5177, whatsapp (21) 97138-5971 ou e-mail cephugg@gmail.com, sendo o horário de atendimento das 08:00 às 17:00 h, de segunda à sexta-feira. O CEP-HUGG se localiza no quarto andar do HUGG, pavilhão hospitalar, acesso pela escada ou elevador ao final do corredor que leva à enfermaria de Ortopedia – Rua Mariz e Barros 775, Tijuca, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 20270-004.

Caso você voluntariamente concorde em participar, pedimos que rubrique todas as folhas desse documento e o assine abaixo. Esclarecemos que sua participação é voluntária e a recusa em participar do projeto poderá ser feita a qualquer tempo, mesmo após a assinatura do TCLE, bastando nos comunicar. Este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra será entregue a você.

Rio de Janeiro, ___ de _____ de _____.

Nome do Participante (em letra de forma)

Assinatura do Participante

Renato Geraldo da Silva Filho

Nome do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Rubrica do Participante:

Rubrica do Pesquisador:

Página: 3/4



Apêndice 1 (continuação):



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA

Ficha de Coleta de Dados Pessoais do Projeto "Prevalência de estafilococos interferentes na cavidade nasal de estudantes da área de saúde e sua correlação com o estado de portador de *Staphylococcus aureus*"

Por favor, use letra de forma:	e-mail institucional: _____@edu.unirio.br
Celular: (____) _____	e-mail pessoal: _____
Código de Controle: _____	Data: ____/____/____

Faixa etária:	<input type="checkbox"/> 18 a 23 anos	<input type="checkbox"/> 24 a 29 anos	<input type="checkbox"/> 30 a 35 anos	<input type="checkbox"/> 36 ou mais	
Sexo Biológico	<input type="checkbox"/> Feminino	<input type="checkbox"/> Masculino			
Cor da pele (IBGE):	<input type="checkbox"/> Amarelo	<input type="checkbox"/> Branco	<input type="checkbox"/> Indígena	<input type="checkbox"/> Pardo	<input type="checkbox"/> Preto
Meio de Transporte:	<input type="checkbox"/> Ônibus	<input type="checkbox"/> Trem	<input type="checkbox"/> Metrô	<input type="checkbox"/> Outros:	
Curso: <input type="checkbox"/> Biomedicina <input type="checkbox"/> Enfermagem <input type="checkbox"/> Medicina <input type="checkbox"/> Nutrição	Período atual:				
Teve infecção com pus na pele no último mês?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Teve alguma infecção de garganta no último mês?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Teve sinusite no último mês?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Teve otite no último mês?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Possui rinite alérgica?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Possui alguma doença autoimune?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Se sim, qual?					
Ficou hospitalizado nos últimos meses?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Se sim, qual motivo?					
Possui piercing no nariz?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Fez uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim			
Se fez uso, qual antimicrobiano foi usado?					
Frequenta o ambiente hospitalar:	<input type="checkbox"/> Estágio	<input type="checkbox"/> Trabalho	<input type="checkbox"/> Paciente	<input type="checkbox"/> Acompanhante	
Tendo frequentado o ambiente hospitalar responda:					
<input type="checkbox"/> Teve contato direto com pacientes	<input type="checkbox"/> Não teve contato direto com pacientes				
Última vez que esteve no hospital:	<input type="checkbox"/> De 1-10 dias	<input type="checkbox"/> De 11-30 dias	<input type="checkbox"/> Mais de 30-60 dias		

Rubrica do Participante:	Rubrica do Pesquisador:	Página: 4/4
--------------------------	-------------------------	-------------



Apêndice 2:

Genes alvo, oligonucleotídeos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos amplificados através da técnica de PCR simples

Gene Alvo*	Oligonucleotídeo Iniciador (5'→3')	Temperatura de Anelamento	Produto Amplificado	Referência
16S rRNA-F	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA	55°C	124 pb	21
16S rRNA-R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCAACC			
<i>nuc</i> -F	GCGATTGATGGTGATACGGTT	50°C	279 pb	21
<i>nuc</i> -R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC			
<i>epi</i> -F	TTGTAAACCATTCTGGACCG	58°C	251 pb	22
<i>epi</i> -R	ATGCGTGAGATACTTCTTCG			
<i>lug</i> -F	TCCAATGATGGTAACGAGGC	58°C	695 pb	22
<i>lug</i> -R	TTTTGCGCCTCGTTTTGTGC			
<i>esp</i> -F	TTTGGAGGTTATCATATGAAAAAGAG	57°C	861 pb	13
<i>esp</i> -R	CTGAATATTTATATCAGGTATATTGTTTC			
<i>lugD</i> -F	ATACTGCAGGCTTAGCTAGAAGGAGAG	49°C	625 pb	15
<i>lugD</i> -R	AATGGTACCCATCAGCATTATAGT			
<i>mecA</i> -F	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	58°C	310 pb	21
<i>mecA</i> -R	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA			

*Gene alvo: *nuc*, *epi* e *lug*= proteínas da família termonuclease; *esp*= serina protease Esp; *mecA*= marcador molecular de resistência a metilina; 16S rRNA= *Staphylococcus* gênero específico.