

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Caracterização de *Staphylococcus* do grupo *sciuri* e análise fenogenotípica da resistência à oxacilina em isolados de roedores e equinos do Instituto de Biologia do Exército

Amanda Couto Calazans Silva

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* DO GRUPO *SCIURI* E ANÁLISE
FENOGENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA À OXACILINA EM ISOLADOS DE
ROEDORES E EQUINOS DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO**

AMANDA COUTO CALAZANS SILVA

Sob a Orientação da Professora

Miliane Moreira Soares de Souza

Coorientadora

Shana de Mattos de Oliveira Coelho

Tese submetida como
requisito parcial para
obtenção do grau de
Mestre em Ciências,
no Curso de Pós-
Graduação em
Ciências Veterinárias

Seropédica, RJ

Março de 2013

**“Todas as vitórias ocultam
uma abdicação.”
Simone de Beauvoir**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A minha família, em especial a minha mãe, VALÉRIA COUTO CALAZANS SILVA, que sempre me deu amor e força, valorizando meus potenciais.

Ao meu marido, THIAGO MACHADO SOUZA, pelo companheirismo, paciência, apoio e dedicação, sem o qual essa jornada teria sido muito mais árdua. Obrigada pelo carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA por toda sabedoria, empenho, compreensão e exigência. Obrigada por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro desse projeto, pela oportunidade de crescimento e pela confiança a mim depositada.

A minha coorientadora SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO, por me incentivar na busca do conhecimento, pelos ensinamentos e pelo apoio técnico excepcional.

A todos os amigos do LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA que me auxiliaram no desenvolvimento da minha dissertação.

Aos meus colegas DAYANE ARAÚJO DE MELO e PEDRO TRIVISOL que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos.

Ao INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO pela logística e infraestrutura disponibilizada para realização das coletas.

Ao LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO pelo apoio financeiro e técnico, e por tornarem factível a condução desta pesquisa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

LISTA DE ABREVIACOES

BHI = Infuso Cérebro Coração
Ccr = "Cassete Chromosome Recombinases"
CLSI: "Clinical and Laboratory Standards Institute"
DMSO= dimetilsulfoxido
DNA = cido desoxiribonucléico
DT104 = tipo definitivo 104
ECN = Estafilococos Coagulase Negativos
EDTA = cido etilenodiamino tetra-acético
FMG = Fazenda Modelo Gericino
H₂O₂ = peroxido de hidrogênio
HCl = cido clorídrico
IS43 =: ilha de patogenicidade 431
KOH = hidróxido de potássio
KCl = cloreto de potássio
MH = "Meller-Hinton"
MgCl₂ = cloreto de magnésio
mL = mililitros
mm = milímetros
mM = milimolar
MVF = Agar Manitol Vermelho de Fenol
MRSA = "Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*" - *Staphylococcus aureus* resistentes 
meticilina
NaCl = cloreto de sódio
NCCLS = "National Committee for Clinical Laboratory Standards"
nm = nanmetro
ng = nanograma
O₂ = oxignio
pb = pares de base
PBP = "Penicillin Binding Protein" - Proteína Ligadora de Penicilina
pH = potencial hidrogeniônico
PCR = "Polymerase Chain Reaction" - Reação em Cadeia de Polimerase
rpm = rotação por minuto
SIG = grupo de *Staphylococcus intermedius*
U = unidades
UI = unidade internacional
V = volts
VPN = valor preditivo negativo
VPP = valor preditivo positivo
VRE = *Enterococcus* spp. vancomicina-resistentes
µg = micrograma
µL= microlitro
C = graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas dos cassetes estafilocócicos <i>mec</i> tipos I, II, III, IV (subtipos IVa, IVb e IVc) e V.	07
Figura 2.	Sistema de regulação que controla a expressão da β -lactamase e da PBP2a.	08
Figura 3.	Complexo do gene <i>mec</i> .	08
Figura 4.	Teste de resistência à bacitracina.	14
Figura 5.	Gel de produto de PCR do gene <i>Staph</i> de <i>Staphylococcus</i> spp.(756 pb).	20
Figura 6.	Gel de produto de PCR do gene <i>16SrRNA</i> de <i>S. sciuri</i> (872 pb).	20
Figura 7.	Gel de produto de PCR do gene <i>16SrRNA</i> de <i>S. lentus</i> (872 pb).	21
Figura 8.	Gráfico do percentual de isolados bacterianos obtidos a partir do perfil bioquímico e da amplificação dos genes específicos de caracterização dos espécimes provenientes de camundongos e equinos.	23
Figura 9.	Gráfico do percentual de resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp. oxidase-positivos isolados.	24
Figura 10.	Gel de produto de PCR do gene <i>pbpD</i> (1120 pb).	26
Figura 11.	Gel de produto de PCR do fragmento do gene <i>mecA</i> (533 pb).	26
Figura 12.	Gel de produto de PCR do fragmento do gene <i>mecI</i> (639 pb).	26
Figura 13.	Gel de produto de PCR do fragmento do gene <i>mecRI</i> (234pb).	26
Figura 14.	Dendograma baseado na sequência do gene <i>mecA</i> de <i>Staphylococcus</i> spp. provenientes de diferentes espécies hospedeiras	31

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.	Perfis bioquímicos dos estafilococos oxidase-positivos	15
Quadro 2.	Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados.	15
Quadro 3.	Iniciador e ciclo empregado para amplificação dos genes de identificação espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. oxidase-positivos.	17
Quadro 4.	Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência à oxacilina de <i>Staphylococcus</i> spp. oxidase-positivos.	18

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição das amostras de equinos e camundongos no Instituto de Biologia do Exército.	12
Tabela 2.	Distribuição do Grupo <i>Staphylococcus sciuri</i> em isolados de camundongos e equinos.	19
Tabela 3.	Distribuição das espécies do Grupo <i>Staphylococcus sciuri</i> fenogenotipicamente identificadas de acordo com as diferentes coletas.	19
Tabela 4.	Caracterização fenotípica e genotípica das amostras coletadas.	21
Tabela 5.	Percentuais de resistência encontrados para os antimicrobianos testados.	24
Tabela 6.	Prevalência dos genes envolvidos na expressão da resistência à oxacilina.	25
Tabela 7.	Número de isolados <i>mecA</i> positivos nas diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. oxidase-positivos.	27
Tabela 8.	Perfil dos testes fenotípicos de detecção de resistência à oxacilina e cefoxitina e genes <i>pbpD</i> e do sistema regulatório <i>mec</i> em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. oxidase-positivos.	28
Tabela 9.	Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de difusão com disco de oxacilina e cefoxitina.	29
Tabela 10.	Sequências do gene <i>mecA</i> de <i>Staphylococcus</i> spp. provenientes de diferentes hospedeiros selecionados do NCBI	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i>	03
2.2 Resistência aos betalactâmicos	05
2.3 Origem do MRSA e do gene <i>mecA</i>	09
2.4 Uso indiscriminado de antimicrobianos na Medicina Veterinária	09
2.5 Aspectos epidemiológicos na interação Homem-Animal	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos:	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Origem da amostra	12
4.2 Identificação das espécies	12
4.2.1 Método de Gram, prova do hidróxido de potássio (KOH) a 3% e prova da catalase	13
4.2.2 Prova da coagulase	13
4.2.3 Resistência à bacitracina	13
4.2.4 Resistência à novobiocina	14
4.2.5 Teste da oxidase	14
4.2.6 Prova de fermentação de açúcares	14
4.3 Testes de suscetibilidade antimicrobiana	15
4.3.1 Difusão em disco simples	15
4.4 Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	16
4.4.1 Extração do DNA bacteriano	16
4.4.2 Amplificação dos genes através da técnica de PCR	16
4.4.2.1 Caracterização genotípica das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.	17
4.4.2.2 Genes de resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos	17
4.5 Análise estatística	18
4.6 Sequenciamento do gene e análise das sequências de DNA	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Caracterização fenogenotípica do Grupo <i>Staphylococcus sciuri</i>	19
5.2 Resistência à oxacilina e cefoxitina	24
5.3 Detecção do gene <i>pbpD</i> e sistema <i>mec</i> em isolados do Grupo <i>Staphylococcus sciuri</i>	25
5.3.1 Resistência fenotípica x Detecção genotípica	27
5.3.1.1 Resultados estatísticos: marcadores fenotípicos de resistência	27
5.3.1.2 Análise fenotípica de resistência	29
5.4 Análise de Sequências Gênicas e Considerações Finais	30
6 CONCLUSÕES	33

RESUMO

CALAZANS-SILVA, Amanda Couto. **Caracterização de *Staphylococcus* do grupo *sciuri* e análise fenogenética da resistência à oxacilina em isolados de roedores e equinos do Instituto Biológico do Exército**. 2013. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus* é decorrente da integração do SSCmec, onde está localizado o gene *mecA*, no cromossomo bacteriano. Este gene codifica uma variante da PBP2, a PBP2a, de baixa afinidade a penicilina. O complexo mec é também composto pelos genes *mecR1* e *mecI*, com atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA*. A origem do gene *mecA* é desconhecida, porém, estudos sugerem que sua fonte está relacionada com *Staphylococcus* coagulase-negativo, uma vez que a presença de *mecA* e um gene homólogo denominado *pbpD* foi detectada em isolados de *Staphylococcus sciuri*. O presente estudo avaliou 210 amostras de pele e conduto auditivo externo de camundongos e 60 swabs nasais de equinos saudáveis provenientes do Biotério e da Fazenda Modelo Gericinó, ambos do Instituto de Biologia do Exército, localizados no município do Rio de Janeiro. Resultados fenotípicos foram concordantes para 59,52% (25/42) e 78,57% (11/14) para *S. lentus* e *S. sciuri*, respectivamente. Foi analisado o fenótipo de resistência antimicrobiana e correlacionado com a detecção dos genes *mecA* e *pbpD*, em seguida, foi avaliada a similaridade entre as sequências do gene *mecA* detectado nas espécies do Grupo *sciuri* com o gene presente em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. Todos os isolados *S. sciuri* apresentaram o homólogo do gene *mecA*, sem qualquer expressão fenotípica de resistência à oxacilina. Por outro lado, os isolados que possuíam o gene *mecA* apresentaram resistência fenotípica em pelo menos um dos antibióticos testados. O alinhamento do gene *mecA* mostrou que as sequências de nucleótidos foram agrupados em dois grupos diferentes, um oriundo de amostras bovinas e outro de amostras humanas e equinas.

Palavras-chaves: *Staphylococcus sciuri*, gene *mecA*, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

CALAZANS-SILVA, Amanda Couto. **Phenogenotypic characterization of *Staphylococcus sciuri* group and oxacillin-resistance analysis in isolates from rodents and equines of Army Biologic Institute.** 53f. Dissertation (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Oxacillin/methicillin-resistance in *Staphylococcus* is related to the integration of *SSCmec*, containing the *mec* complex, in the bacterial chromosome. The *mecA* gene codifies a variant of PBP2, termed PBP2a or PBP2', whose affinity with the beta-lactamic antibiotics is very low. Complex *mec* contains *mecA* and its regulatory genes *mecR1* and *mecI*. Its origin is still unknown, although evidences support that it is related to coagulase-negative staphylococci, once *mecA* and a homologue gene, *pbpD*, were both detected in *Staphylococcus sciuri* species group. The present work evaluated 210 samples of skin and ear swabs from rodents and 60 nasal swabs from equines of Army Biologic Institute, Rio de Janeiro. Pheno- and genotypic results were concordant for 59,52% (25/42) and 78,57% (11/14) *S. lentus* and *S. sciuri* isolates, respectively. The phenotypic antimicrobial resistance pattern was evaluated and correlated to the detection of *mecA* and *pbpD* genes. Also, *mecA* sequences from *sciuri* group strains were compared to others species in order to evaluate the degree of similarity among them. Although all *S. sciuri* isolates tested positive for *pbpD*, no correlation was observed with antimicrobial resistance for isolates that presented only *mecA* homologue. On the other hand, isolates tested positive for *mecA* gene also presented phenotypic resistance in at least one assay. The alignment of the *mecA* gene showed that the nucleotide sequences were sorted into 2 different groups, one comprising the bovine strains and the other containing human and equine strains.

Key words: *Staphylococcus sciuri*, *mecA* gene, antimicrobial resistance.

1. INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos é um assunto de grande interesse no mundo, e diversos trabalhos têm sido publicados com enfoque nos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos micro-organismos. Por esse motivo, na tentativa da descoberta de novos fármacos que consigam sobrepujar as estratégias de sobrevivência bacteriana, as indústrias farmacêuticas investem quantias significativas na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, o que corrobora a relevância do tema.

A resistência antimicrobiana foi identificada quase que simultaneamente ao surgimento dos primeiros antibióticos. No início da década de 40, a penicilina foi o primeiro agente antimicrobiano comercializado. Entretanto, três anos após a sua comercialização, estafilococos resistentes à penicilina foram descritos. Alguns anos após a identificação, pouco menos de 50 % dos isolados hospitalares de *Staphylococcus aureus* eram suscetíveis à penicilina (GOTZ, 2002), devido a ampla utilização desse antimicrobiano no cenário hospitalar e comunitário e à disseminação do patógeno por pacientes previamente colonizados, ao final da década de 50 esse número chegou a 20 %. Essa alteração da suscetibilidade foi atribuída inicialmente a produção de enzimas β -lactamases, que tem como mecanismo de ação a hidrólise do anel β lactâmico (LOWY, 2003).

A resistência estafilocócica à penicilina, fez com que em 1961, na Inglaterra, fosse introduzido no mercado, a primeira penicilina semi-sintética. A comunidade médica e científica ficou então convencida que tinha armas suficientes para combater o surgimento de qualquer tipo de infecção. Porém, rapidamente *S.aureus* resistentes a então recém-sintetizada penicilina foram identificados. Essas cepas ficaram conhecidas como MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes) (BROWN, 2001).

A expressão fenotípica de resistência a oxacilina/meticilina limita a opção do tratamento, além de prolongar o curso da infecção. Tal resistência é decorrente de um mecanismo molecular, resultante da integração de um elemento genético denominado SSCmec (Staphylococcal cassette chromosome mec) no cromossoma bacteriano. Neste elemento está localizado o gene *mecA*, que codifica uma variante da proteína ligante de penicilina (PBP2), conhecida como PBP2a (KONEMAN, 2008). O complexo mec está localizado na parte central desse elemento genético, sendo também composto pelos genes *mecR1* e *mecI* que são responsáveis pela regulação do *mecA*. Os genes *mecI* e *mecR1*, tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA*.

A origem do gene *mecA* é desconhecida, porém, estudos sugerem que sua fonte está relacionada com *Staphylococcus* coagulase-negativo, uma vez que uma proteína identificada em *Staphylococcus sciuri* suscetível apresentou 80 % de semelhança com os aminoácidos que constituem a PBP2a. Couto et al.(2003) detectaram a presença de *mecA*, e um gene homólogo denominado *pbpD*, em isolados de *S. sciuri*. Segundo os mesmos autores, a resistência a oxacilina foi maior naqueles que apresentavam ambos os genes em comparação àqueles que possuíam apenas um dos genes em seu cromossomo.

Essa espécie, bem como outros *Staphylococcus* coagulase-negativos, é considerada saprófita e raramente patogênica, sendo a espécie-tipo do grupo *Staphylococcus sciuri*, aos quais pertencem também as espécies *S. vitulus*, *S. lentus* e, mais recentemente, *S. fleuretti*. Dados da literatura apontavam apenas a espécie *S. sciuri* como capaz de albergar o homólogo do gene *mecA* e possível transmissor desse gene à estafilococos resistentes à metilina de importância em Saúde Pública e Medicina

Veterinária. O presente estudo teve como o objetivo isolar e detectar os genes *mecA* e *pbpD*, e avaliar fenotipicamente os fatores de resistência antimicrobiana em todas as espécies do grupo *S. sciuri* isolados de roedores e equinos saudáveis provenientes do Biotério e da Fazenda Modelo Gericinó, ambos pertencentes ao Instituto de Biologia do Exército, localizados no município do Rio de Janeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* está amplamente difundido na natureza e faz parte da microbiota indígena da mucosa e da pele de aves e mamíferos. Atualmente abrange 47 espécies e 24 subespécies registradas no banco de dados *Taxonomy Browser*. Este gênero pertence à família Staphylococcaceae (LUDWIG, 2009), a qual é composta também pelos gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus* (NCBI, 2011).

Os estafilococos são classificados como cocos Gram-positivos em forma de cachos de uva ou agrupados aos pares, em tétrades ou em massas irregulares. São imóveis, não esporulados e produtores da enzima catalase. Os membros da família Staphylococcaceae são diferenciados da família Streptococcaceae pela prova da catalase, que detecta a presença de citocromo oxidase, exceto para *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*, que são espécies estritamente anaeróbias (KONEMAN et al., 2008).

Apresentam colônias grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro, opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie. São mesófilos, apresentando temperatura ótima de 35 °C a 37 °C e são tolerantes a concentrações de 10 % de cloreto de sódio (FRAZIER; WESHOF, 2000). Apresentam capacidade de crescer dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento compreendido entre 6,0 e 7,0 (KONEMAN et al., 2008).

Este gênero bacteriano foi observado pela primeira vez por Robert Koch, em 1878 (MORSE, 1984), e em 1881, Alexander Ogston observou a presença desta bactéria em abscessos agudos e crônicos, introduzindo a palavra “*Staphylococcus*” para designar os micro-organismos agrupados encontrados no pus. No entanto, foi Anton Julius Friedrich Rosenbach que, em 1884, obteve cultura pura de estafilococos, adotando, portanto o nome do gênero de *Staphylococcus* proposto inicialmente por Ogston. Esta foi a primeira descrição taxonômica, dividindo o gênero em duas espécies com base na presença de pigmento nas colônias: *Staphylococcus pyogenes aureus* (colônias amarelas) e *Staphylococcus pyogenes albus* (colônias brancas) (TOPLEY, 1976).

A habilidade de coagular o plasma é o critério de identificação mais usado e usualmente aceito para a identificação de estafilococos. Acredita-se que o papel da enzima coagulase na patogênese das doenças estafilocócicas está associada à formação de uma camada de fibrina formando o abscesso, restringindo assim a infecção e, provavelmente, protegendo o micro-organismo da fagocitose e da ação de agentes antimicrobianos (KONEMAN et al., 2008).

O gênero *Staphylococcus* está dividido em dois grupos com base na produção da enzima coagulase: *Staphylococcus* coagulase-positivos, este grupo inclui as principais espécies patogênicas de *Staphylococcus*, destacando-se *S. aureus*, que é capaz de se instalar e causar enfermidade em uma grande variedade de espécies animais e em humanos (SAKAI, 2004). Na medicina veterinária, outros estafilococos coagulase-positivos são descritos como patógenos importantes, como o *S. intermedius*, cuja reclassificação foi proposto por Devriese et al. (2005), criando o grupo de *S. intermedius* (SIG), incluindo *S. intermedius* e as espécies *S. pseudintermedius* e *S. delphini*. Outros significativos coagulase-positivos em animais são *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. aureus* subsp. *anaerobius* (SOUZA et al. 2012). O grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECNs) pode ser dividido em dois de acordo com a sensibilidade ou resistência a novobiocina. Os *Staphylococcus* sensíveis a novobiocina incluem os *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* e os resistentes a

novobiocina, as espécies de maior importância em medicina humana são *S. saprophyticus* e *S. xylosus* (HEILMANN; PETERS, 2000; vonEIFF et al., 2004). Em diversos laboratórios clínicos de rotina, a identificação presuntiva de *Staphylococcus saprophyticus* é baseada somente na resistência a novobiocina. Contudo, tem sido reconhecido que outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECNs), incluindo *S. cohnii*, *S. lentus*, *S. vitulus*, *S. fleuretti* e *S. sciuri*, são também resistentes a novobiocina à concentração de 5 µg (HUSSAIN et al., 1986). Atualmente, devido a elevada pressão de seleção positiva e a habilidade de transferência de genes de resistência interespecíficas, é possível observar resistência em cepas de espécies originalmente sensíveis. Por exemplo, Cunha (2002) observou que seis linhagens de *S. epidermidis* e uma de *S. haemolyticus* demonstraram resistência a novobiocina.

Entre 1950 e 1975, os *Staphylococcus* coagulase-negativos eram agrupados junto com a espécie *S. albus* e a espécie *S. epidermidis* era considerada distinta da espécie *S. aureus* por sua incapacidade de coagular o plasma.

Em geral, os *Staphylococcus* spp. desenvolvem uma relação benigna com o hospedeiro, no entanto adquirem potencial patogênico se tiverem acesso aos tecidos por meio de uma solução de continuidade, tais como traumatismos da barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implantação direta por próteses médicas como cateter, válvula cardíaca e marcapasso (HEIKENS, 2005).

Os ECNs fazem parte da microbiota normal da pele e de mucosas em humanos e animais, no entanto em condições apropriadas podem causar infecções oportunistas hospitalares e comunitárias. Estes micro-organismos podem ser isolados de várias áreas da superfície cutânea, incluindo canais foliculares, aberturas das glândulas sudoríparas e o lúmen dos folículos sebáceos. Além destas áreas, podem ser isolados das mucosas da faringe, conjuntivas, boca, glândulas mamárias e trato intestinal, geniturinário e respiratório, áreas nas quais estas bactérias são consideradas habitantes secundários (KLOOS, 1999). Apesar de reconhecidamente saprofíticos por um longo período, têm emergido como agentes etiológicos de bacteremias hospitalares. Alguns pesquisadores revelam que este grupo é responsável por 74 a 92 % das infecções adquiridas em ambientes hospitalares (HUDOME et al., 2001).

Dentre os ECNs, *S. epidermidis* tem sido isolado com mais frequência associado a infecções de caráter oportunista, seguido de *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* (von EIFF et al., 2004). O *S. saprophyticus* é um patógeno de grande relevância em infecções do trato urinário e em processos septicêmicos (GOLLEDGE, 1988), é a segunda espécie mais comumente associada a infecções, como endocardites, septicemias, peritonites, infecções do trato urinário, em feridas, nos ossos e nas articulações (KLOOS et al., 1994). Outras espécies como *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. xylosus* e *S. saccharolyticus* também têm sido associados a feridas infectadas, abscessos, endocardites, septicemias, osteomielites, pneumonias e infecções associadas a cateteres e próteses (KLOOS et al., 1994).

O avanço na classificação sistemática dos estafilococos e no incremento de técnicas para a identificação do gênero, espécies e subespécies, tem possibilitado aos clínicos conhecer a diversidade de ECNs presentes em isolados clínicos e, avaliar sua potencial participação na etiologia de uma infinidade de processos infecciosos, sendo reconhecidos como micro-organismos fundamentalmente oportunistas, que em circunstâncias ideais produzem graves infecções (SOARES, 2010). Assim como na medicina humana, na medicina veterinária esses micro-organismos ainda têm sido negligenciados quanto à sua relevância clínica (CUNHA et al., 2002), embora sua habilidade em causar infecções, tais como doenças supurativas, mastites, artrites e doenças do trato urinário já seja bem documentada (LEE, 2003).

Outro membro dos ECNs de menor importância clínica, mas que nos últimos anos tem recebido atenção de alguns pesquisadores como potencial transmissor de um importante gene de resistência é o *S. sciuri*. Essa espécie foi primeiramente descrita por Kloos e colaboradores em 1975. Relatada como uma espécie comensal de roedores, marsupiais, cetáceos, artiodátilos e perissodátilos, também tem sido isolados de animais domésticos e de criação, sadios e enfermos, que incluem cães, gatos, equinos, bovinos, suínos e ovinos (COUTO et al., 2000). Embora *S. sciuri* esteja raramente associado com a colonização ou infecção em humanos, tem sido isolado ocasionalmente de amostras clínicas humanas (ADEGOKE, 1986). Sua relevância, sem dúvida, está na similaridade entre gene *mecA* e o gene denominado *pbpD*, encontrado em seu cromossomo. Pesquisadores acreditam que este gene é o precursor evolutivo desse mecanismo de resistência amplamente difundido no ambiente hospitalar e na comunidade (STEPANOVIC et al., 2005). O grupo do *S. sciuri*, composto pelo próprio *S. sciuri*, e mais, *S. vitulus*, *S. lentus* e *S. fleuretti*, pode ser diferenciado de outros *Staphylococcus* coagulase-negativos através da reação positiva ao teste da oxidase. Stepanovic et al. (2005) através de métodos bioquímicos baseados na fermentação de açúcares (rafinose, arabinose, celobiose, galactose, lactose, salicina, maltose e manose), sugeriram um protocolo de identificação simplificado que possibilitasse a caracterização dos membros desse grupo.

2.2 Resistência aos betalactâmicos

A resistência à oxacilina constitui-se num marcador para avaliação da resistência cruzada com todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos.

Os beta-lactâmicos representam a classe mais variada e amplamente utilizada de antimicrobianos. Pertencem a este grupo todos os antimicrobianos que apresentam o anel beta-lactâmico em sua estrutura, sendo a penicilina, a principal família que se divide em, especialmente, três classificações: penicilinas naturais (ex. penicilinas G e V), aminopenicilinas (ex. ampicilina e amoxicilina) e penicilinas antiestafilocócicas, como a oxacilina e a meticilina, sendo esta última, ainda não utilizada no Brasil (BLACK, 2002; LOWY, 2003). Além das penicilinas, também pertencem a este grupo as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.

Estes agentes atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana através da ligação com proteínas específicas associadas à síntese de peptidoglicano (“PBP” – Proteína Ligante de Penicilina), assim denominadas por sua afinidade de ligação aos beta-lactâmicos. As “PBPs” são proteínas de membrana que estão envolvidas na biossíntese da parede celular e que possuem função de transpeptidase (WALKER et al., 1999; WITTE et al., 1999; BLACK, 2002; LOWY, 2003). Estas proteínas catalisam a reação de transpeptidação que promove a formação das pontes transversas de pentaglicinas do peptidoglicano, através da ligação da D-alanina de uma cadeia peptídica com a L-lisina da cadeia subsequente. As quatro principais “PBPs” são PBP 1, 2, 3 e 4, e são produzidas tanto por isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis como resistentes (CHAMBERS, 1997). Os antimicrobianos β -lactâmicos ao inibirem estas “PBPs”, impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular de forma correta, levando a formação de uma parede celular frágil que não suporta a diferença osmótica, levando a lise celular bacteriana (CHAMBERS, 1999; WEESE et al., 2005).

Os antimicrobianos β -lactâmicos são amplamente utilizados na clínica médica humana e veterinária, sua resistência tem sido relatada em bactérias de origem animal, incluindo as espécies *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. provenientes de animais de produção e

animais de companhia, que podem atuar como reservatórios dessa resistência para humanos (PEREIRA, 2010).

Os estafilococos resistentes à penicilina foram detectados a partir de 1950 e atualmente cerca de 90% das cepas são resistentes a este antibiótico (LOWY, 2003). Embora a maioria dos isolados de estafilococos coagulase-negativos clinicamente significativos apresente resistência à penicilina, esses fármacos oferecem vantagens devido ao baixo custo, sendo, portanto recomendados para o tratamento de isolados sensíveis (GRAHAN, 2000).

A resistência estafilocócica aos antimicrobianos beta-lactâmicos deve-se a dois mecanismos distintos: a produção da enzima beta-lactamase codificada na maioria das vezes por plasmídeos e a produção de PBP2a. O mecanismo de resistência à penicilina associada à produção da beta-lactamase, uma enzima extracelular, é decorrente da hidrólise do anel beta-lactâmico após a exposição do micro-organismo ao antibiótico (STAPLETON; TAYLOR, 2002; LOWY, 2003). A síntese de beta-lactamase em *Staphylococcus* spp. é codificada pelo gene plasmidial ou cromossomal *blaZ* e pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaRI* (HACKBARTH; CHAMBERS, 1993; LOWY, 2003). O primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo, um anti-repressor. Quando não existe penicilina no meio, *BlaI* se liga ao promotor de *blaZ*, inibindo a transcrição do gene. Quando a penicilina está presente, a proteína se liga à enzima *BlaRI*, presente na membrana celular, que por sua vez cliva a enzima *BlaI*, ativando o promotor de *blaZ* e conseqüentemente iniciando a produção de beta-lactamase (CLARKE; DYKE, 2001). A ativação de *blaZ* inicia-se com a acilação irreversível concomitante à abertura do anel betalactâmico. A acilação é o primeiro evento na transdução do sinal (WILKE et al., 2005; GOLEMI-KOTRA et al., 2003). O antimicrobiano liga-se à parte extracelular (terminal carboxil) de *BlaRI* e causa uma mudança conformacional que leva à ativação proteolítica intracelular de *BlaRI*. O segundo evento na transdução de sinal é uma discreta clivagem proteolítica do domínio intracitoplasmático de *BlaRI*. A autoclivagem é seguida pela propagação citoplasmática do sinal e posteriormente pela proteólise da proteína repressora. O repressor *BlaI* após clivado pela protease *BlaRI* libera *blaZ* do controle transcricional negativo, permitindo a transcrição de *blaZ* e síntese da beta-lactamase (FUDA et al., 2005).

O segundo mecanismo de resistência, alvo deste estudo, está associado à alteração do sítio de ação do antibiótico pela produção de uma proteína ligante de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), de baixa afinidade, que está ausente em isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis a meticilina. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA* (KATAYAMA et al., 2001; KURODA et al., 2001). Este gene está localizado em um elemento genético móvel, denominado "cassete cromossômico de *mec* estafilocócico" (*SCCmec*), que pode ser transferido via plasmídeos, transposons, elementos genéticos móveis, e se integrarem a ilhas de patogenicidade no genoma bacteriano. (KATAYAMA, ITO; HIRAMATSU, 2000). A literatura relata a prevalência de diferentes tipos de *SCCmec* em isolados estafilocócicos de origem humana, mas a prevalência deste sistema cromossômico em isolados provenientes de animais já tem sido relatada em trabalhos recentes (JANSEN et al., 2009).

O *SCCmec* é composto por diversos elementos genéticos essenciais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecRI*, e o complexo *ccr* (*Cassete Chromossome Recombinases*), caracterizado pela presença de genes que codificam recombinases. Esses complexos genéticos possuem terminais invertidos que podem ser reconhecidos pelas recombinases tanto do complexo *ccr* quanto pelo gene *mec*. Com base na classe do complexo dos genes *mec* e

ccr presentes e em suas combinações, os cassetes *SCCmec* são classificados em seis tipos, I, II, III, IV, V e VI (ITO et al., 2004; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO; DE LENCASTRE, 2006) (Figura 1).

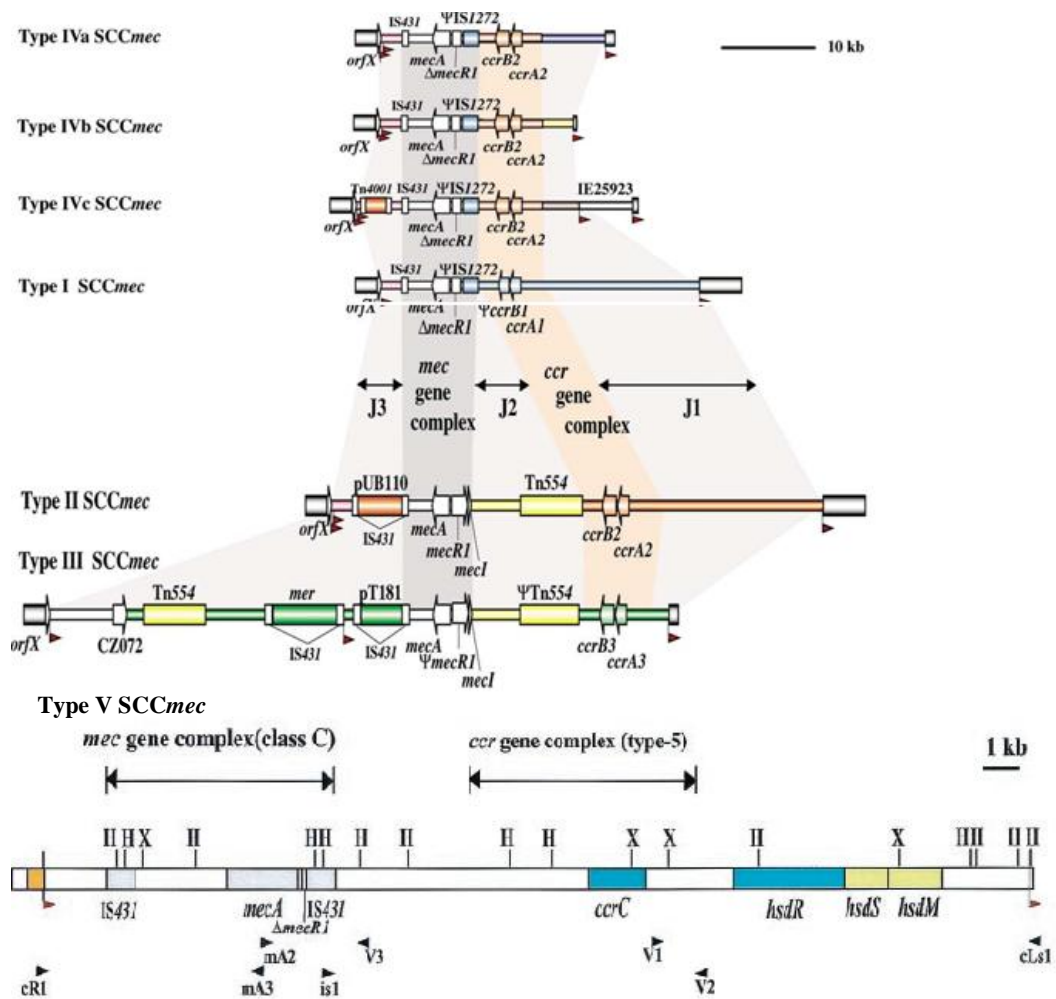


Figura 1. Estruturas dos cassetes estafilocócicos *mec* tipos I, II, III, IV (subtipos IVa, IVb e IVc) e V. (ITO et al., 2004).

A parte central desse segmento é composta pelo gene *mecA* e pelos genes *mecRI* e *mecI* que são os genes responsáveis pela regulação do *mecA*. Os genes *mecI* e *mecRI*, tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA* (MA et al., 2002). A regulação da expressão de resistência ocorre por ligação de um betalactâmico com a proteína *mecRI* (produto de *mecI* = anti-repressor de *mecA*), que ativada, cliva a *mecI* (produto do gene repressor *mecI*) e permite a transcrição de *mecA* com produção de PBP2a (figura 2).

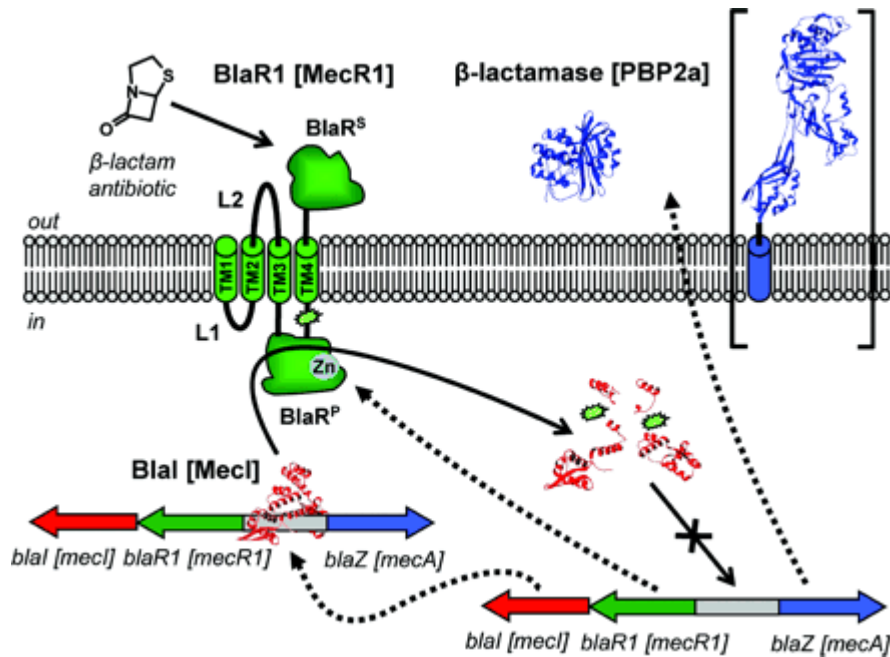


Figura 2: Sistema de regulação que controla a expressão da β-lactamase e da PBP2a.
 Fonte: WILKE et al, 2005, com adaptações.

A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibiótico betalactâmico, como a oxacilina e meticilina (BOYLE-VAVRA et al., 2008; LOWY, 2003) (figura 3). O gene *mecA* é amplamente distribuído entre espécies de estafilococos, incluindo *Staphylococcus* coagulase-negativos, e pode ser transferido horizontalmente entre estafilococos. Essa transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. resultou na disseminação mundial de clones oxacilina e multidroga-resistentes, tornando-se uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por este agente (ITO et al., 2001).

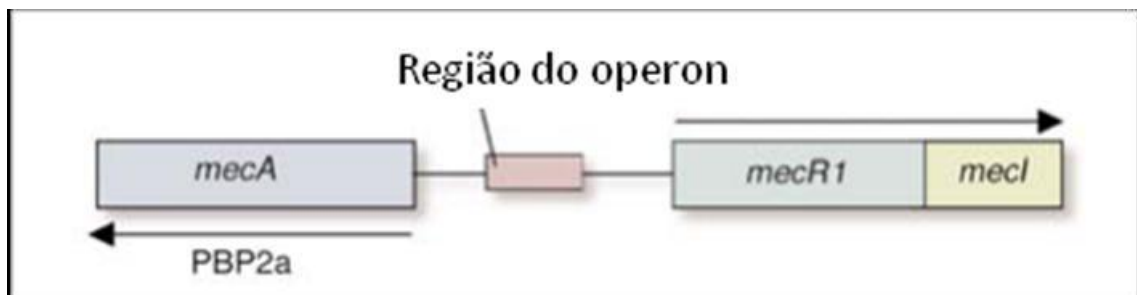


Figura 3. Complexo do gene *mec*.
 Fonte: Lowy et al. (2003), com adaptações.

A produção de PBP2a com baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos, substitui as funções das PBPs de alta afinidade, permitindo que a célula se desenvolva em concentrações do antibiótico que em outras condições seriam letais. E é, sem dúvida, o principal mecanismo responsável pela resistência à oxacilina, embora outros mecanismos tenham sido descritos, como alteração de outras “PBPs” e a hiperprodução de beta-lactamases (SWENSON et al., 2005).

Atualmente, o CLSI padronizou o uso do disco de cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração, para detecção do gene *mecA* por ser um forte indutor de seu sistema regulatório. Estudos têm relatado maior eficácia em testes de difusão em disco

com cefoxitina correlacionado com a presença do gene *mecA*, em relação ao uso da oxacilina (SWENSON et al., 2005). A cefoxitina induz a produção de PBP2a e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica (DANCER, 2001).

2.3. Origem do MRSA e do gene *mecA*

Registros fósseis já sugerem a presença dos estafilococos no planeta cerca de 1 bilhão de anos atrás, embora somente no século XIX tenham sido identificados e relacionados como patógenos bacterianos. Ao longo da História da Civilização, existem relatos da presença desses agentes em quadros infecciosos que acarretaram a morte de milhares de pessoas em todo mundo. Somente com a descoberta da penicilina por Alexandre Fleming, em 1928, e a sua utilização, anos mais tarde, como agente terapêutico, tornou-se possível o controle efetivo das infecções estafilocócicas. Contudo, *S. aureus*, espécie de maior importância clínica em humanos, rapidamente expressou resistência à penicilina, devido à aquisição de genes capazes de produzir beta-lactamases, levando a diversas pesquisas a fim de descobrir agentes resistentes a essas enzimas. Essa pesquisa resultou na síntese de um grupo de penicilinas semi-sintéticas, começando com a meticilina e incluindo outros derivados, tais como, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina e nafcilina. A meticilina foi a primeira, em 1959, utilizada clinicamente e apenas dois anos depois, o primeiro MRSA já havia sido isolado (MOELLERING, 2010).

Staphylococcus aureus meticilina-resistente é gerado quando *S. aureus* sensíveis à meticilina adquirem o gene *mecA*, que é carregado em um elemento móvel conhecido como *SCCmec*. Esse mecanismo de resistência conferido pelo *mecA* tem sido estudado extensivamente não somente pela importância das cepas resistentes em isolados clínicos, mas também pelas características intrigantes do mecanismo em si (COUTO et al., 2000), que ainda hoje acendem questionamentos que permanecem sem resposta. Uma questão desta natureza é a origem do *mecA*, um gene exógeno em *S. aureus* e em outros estafilococos de relevância clínica (FIRTH; SKURRAY, 2000). Estudos sugerem considerável homologia com um gene encontrado em *S. sciuri*, que parece ser nativo nessa espécie (COUTO et al., 2010). O homólogo do *mecA* identificado em *S. sciuri*, espécie mais estudada, mostrou 79,5% de similaridade com o gene *mecA* de MRSA, demonstrando uma relação evolutiva próxima entre esses determinantes genéticos (FUDA et al., 2005).

2.4. Uso indiscriminado de antimicrobianos na Medicina Veterinária

Apesar da introdução dos agentes antimicrobianos e das melhoras nas condições higiênicas de manejo, que vêm sendo fundamentais na redução da mortalidade por infecções estafilocócicas, os estafilococos persistem como importantes patógenos humanos e animais. Um fator importante desta persistência é a capacidade que possuem para desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizados no seu controle (LOWY, 2003). A descoberta dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária, sendo essencial a redução da morbidade e mortalidade de doenças infecciosas. No entanto, logo após sua introdução terapêutica em 1940, os antimicrobianos foram introduzidos em criações animais como profiláticos e promotores de crescimento para melhorar a eficiência ou utilização alimentar, sincronizar ou controlar o ciclo reprodutivo, o desempenho no cruzamento e aumentar a aceitação do consumidor ao produto final (OLIVEIRA, 2008). Uma das possíveis razões para explicar os efeitos de agentes antimicrobianos sobre o desempenho animal seria a redução dos efeitos de infecções subclínicas sobre o crescimento. Outra possibilidade é que os promotores de crescimento tenham um

impacto positivo sobre o sistema imune do hospedeiro, afetando hormônios, citocinas e outros fatores relacionados à resposta imune (McEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002).

O uso de antimicrobianos na produção animal é considerado pela Organização Mundial de Saúde um risco crescente para a saúde humana, devido o aumento da resistência antimicrobiana. No entanto, o segmento agroindustrial argumenta que a restrição do uso de antimicrobianos pode resultar em um aumento do aparecimento de doenças infecciosas nos rebanhos, e como consequência, produtos de qualidade sanitária inferior (MARTINS; MARQUES; NETO, 2006).

Na avicultura, a administração de certos antimicrobianos em pequenas concentrações e de forma contínua à ração, proporciona aumento significativo do ganho de peso e melhor conversão alimentar (MOTA et al., 2005). Segundo Young (1994), a adoção desse manejo é relatada como subterapêutico, pois a quantidade utilizada destes fármacos é inferior àquela usada no tratamento de doenças específicas, favorecendo o aparecimento de resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas e diminuindo assim a capacidade destes fármacos no tratamento de infecções em humanos e animais.

A resistência bacteriana pode ser transferida por diversos mecanismos, podendo estabelecer-se entre micro-organismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (BROWN, 2001). O uso de agentes antimicrobianos tanto em animais quanto no homem, determina o aumento da resistência antimicrobiana nos micro-organismos de sua microbiota normal e bactérias patogênicas. Segundo Hardy (2002) existem três rotas possíveis para o desenvolvimento da resistência a antimicrobianos: as bactérias se tornam resistentes no animal e são transferidas a humanos que consomem alimentos crus ou parcialmente cozidos ou por meio de manipulação e preparo inadequado dos alimentos; a resistência antimicrobiana se desenvolve na população bacteriana animal, que pode não ser patogênica ao homem, mas pode transferir essa resistência a bactérias comensais ou patogênicas para humanos; e resíduos de antimicrobiano no alimento dão oportunidade para bactérias da microbiota humana desenvolverem resistência.

2.5. Aspectos epidemiológicos na interação Homem-Animal

A domesticação dos primeiros animais está presente nos relatos pré-históricos. O convívio com animais, como animais de companhia (cães e gatos), em atividades de criação (equinos, aves e bovinos), ou até mesmo em centros de pesquisas (roedores e cobaias) tem motivado diversos pesquisadores a estudarem sobre a extensão dessa associação e determinar a importância dos animais na transmissão de doenças zoonóticas e como reservatórios potenciais de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos (SNARY et al., 2004).

Bactérias resistentes podem ser adquiridas por humanos pela transferência entre indivíduos, exposição direta aos animais, exposição ao meio ambiente, e através dos alimentos. Animais podem albergar espécies bacterianas e/ou genes de resistência, tais como, *Staphylococcus* coagulase-negativo *mecA*-positivos, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Enterococcus* spp. vancomicina-resistentes (VRE) e *Salmonella Typhimurium* DT104 (GUARDABASSI et al., 2004). Uma pequena quantidade de células bacterianas é suficiente para que a resistência antimicrobiana seja transferida de um hospedeiro para outro. Na verdade, uma única célula bacteriana pode transmitir genes de resistência para a microbiota do hospedeiro, fazendo com que esses animais desempenhem um papel como reservatório potencial de infecções em humanos (PEREIRA, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Detectar genes de resistência à oxacilina em espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos resistentes à novobiocina e oxidase-positiva (Grupo *sciuri*) e comparar suas sequências com as de *S. aureus* meticilina-resistentes de importância em Saúde Pública e Medicina Veterinária.

3.2. Objetivos específicos:

Isolar e identificar amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativos a partir de amostras do conduto nasal de equinos saudáveis, e do conduto auditivo e pele de camundongos (*Mus musculus*), ambos do Instituto de Biologia do Exército;

- Caracterizar genotipicamente as espécies *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus lentus*;

- Detectar a presença dos genes *mecA* e *pbpD* através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR);

- Avaliar a similaridade entre as sequências do gene *mecA* das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos do Grupo *sciuri* com o de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem das amostras

Foram utilizadas 270 amostras, sendo 210 amostras de camundongos e 60 amostras de equinos, pertencentes ao Biotério e à Fazenda Modelo Gericinó (FMG), respectivamente, ambos do Instituto de Biologia do Exército (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de amostras provenientes de equinos e camundongos situadas na Fazenda Modelo Gericinó e Biotério, ambos pertencentes ao Instituto de Biologia do Exército, localizados no município do Rio de Janeiro.

Coletas	Local	Número de amostras	Região Coletada/Animal
1	Biotério	30	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo
2	Biotério	30	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo
3	Biotério	30	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo
4	Biotério	30	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo
5	Biotério	30	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo
6	Biotério	30	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo
7	Biotério	30	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo
8	FMG	30	Swab Nasal/Equino
9	FMG	30	Swab Nasal/Equino
Total		270	

Os animais selecionados eram clinicamente saudáveis e não faziam uso de antimicrobianos. Para a coleta dos equinos, um *swab* estéril foi introduzido em ambas as narinas para cada animal, após limpeza prévia para remoção de sujidades na área externa com água e sabão neutro. Para os camundongos, a coleta foi realizada após limpeza da caixa onde os animais eram mantidos, para evitar possível risco de contaminação pelas fezes, um *swab* estéril foi passado na região dorsal, orelha e conduto auditivo externo desses animais.

Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária, situado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As amostras foram imediatamente transportadas sob condições adequadas de refrigeração, e posteriormente incubadas em Caldo Müller Hinton (MH) por 24 hs a 37 °C.

4.2. Identificação das espécies

As amostras foram submetidas à rotina de identificação que consistiu no isolamento em ágar seletivo Manitol Vermelho de Fenol (Britania), incubadas a 37 °C por 24 horas, para observação das características das colônias e fermentação, ou não, do manitol (KONEMAN et al., 2008).

4.2.1 Método de Gram, prova do hidróxido de potássio (KOH) a 3% e prova da catalase

Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintoriais. O teste da catalase foi realizado através de teste em lâmina, onde um fragmento de colônia bacteriana foi adicionada a solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de bolhas de O₂ indicou teste positivo. A prova do hidróxido de potássio foi efetuada através da adição de uma gota de KOH (3%) a um fragmento de colônia bacteriana. A não formação de um gel viscoso indicou um resultado negativo confirmando a prova do Gram, uma vez que todas as bactérias Gram positivas são negativas na prova do KOH a 3% (KONEMAN et al., 2008).

4.2.2 Prova da coagulase

O teste para a detecção da presença da coagulase foi realizado utilizando o crescimento bacteriano obtido em caldo BHI (infuso de cérebro e coração - Britania), incubado a 35 °C, por 24 horas. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada a 0,5 mL de plasma de coelho (Larboclin) e, incubados a 37 °C por 6 horas a fim de obter a visualização do coágulo. As amostras coagulase-negativas foram avaliadas quanto ao seu perfil de resistência à bacitracina (KONEMAN et al., 2008).

4.2.3 Resistência à bacitracina (0,04 U)

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos apresentam as mesmas características que o gênero *Micrococcus* spp. em relação a morfologia, coloração de Gram e às provas da catalase, KOH (3%) e coagulase, o que torna necessário a utilização de provas adicionais para sua diferenciação. Neste trabalho foi utilizada a prova da bacitracina para a separação destes dois gêneros bacterianos. Uma suspensão bacteriana (0,1 mL) crescida por 24 horas em Caldo BHI (Britania) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido Müller Hinton com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos de bacitracina (0,04 U – SENSIFAR-CEFAR®) foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37 °C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito do fármaco, foram observados e medidos, em milímetros. Os estafilococos são resistentes à bacitracina (Figura 4) e crescem até a borda do disco, enquanto que os micrococos são sensíveis e apresentam halo de 10 mm ou maiores (FORBES, 2002; KONEMAN et al., 2008).



Figura 4. Resistência à bacitracina - o crescimento bacteriano ao redor do disco de antibiótico indica resistência.

4.2.4 Resistência à novobiocina

Existem quatro espécies de estafilococos de seres humanos e sete espécies de animais, que inclui o grupo do *S. sciuri*, que são resistentes à novobiocina, em concentrações inibitórias mínimas de $\geq 16\mu\text{L/mL}$ (KONEMAN et al., 2008). Neste trabalho foi utilizada a prova da novobiocina para selecionar o grupo de estafilococos resistentes a esse antibiótico. Uma suspensão bacteriana (0,1 mL) crescida por 24 horas em Caldo BHI (Britania) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido Müller Hinton com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos de novobiocina (5 μg – SENSIFAR-CEFAR®) foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37 °C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito do fármaco, foram observados e medidos, em milímetros. Os estafilococos são considerados resistentes à novobiocina se formarem halos de 6 a 12 mm (KONEMAN et al., 2008).

4.2.5 Teste da oxidase

Os membros do grupo *S. sciuri* podem ser diferenciados de outros estafilococos pelo teste da oxidase. A omissão deste teste no esquema de identificação é a causa mais comum de erros na identificação desta bactéria (STEPANOVIC et al., 2005). Foram utilizados tiras de papel de filtro (Newprov) impregnados com dicloridrato de tetrametil-*p*-fenilenodiamina (reagente para oxidase) em dimetil sulfóxido (DMSO). O DMSO torna as células permeáveis ao reagente. Com um aplicador, foi retirada uma colônia do meio de crescimento (ágar Müller Hinton), friccionada sobre a tira de oxidase. O surgimento de uma cor azul-púrpura em 30 segundos confirma o resultado positivo (KONEMAN et al., 2008).

4.2.6 Prova de fermentação de açúcares

A fermentação de açúcares foi testada utilizando o caldo Vermelho de Fenol (Micromed) acrescido de 1% do açúcar. A produção de ácido, indicado pela diminuição do pH e conseqüente mudança de cor, foi avaliada após 24 horas na temperatura de 37 °C. Os açúcares avaliados foram: rafinose, arabinose, celobiose, galactose, lactose, salicina, maltose e manose (KONEMAN et al., 2008; STEPANOVIC et al., 2005) (Quadro 1).

Quadro 1. Perfis bioquímicos dos estafilococos oxidase-positivos

<i>Staphylococcus</i> spp. oxidase positivo Grupo <i>S. sciuri</i>				
Teste	<i>S. sciuri</i>	<i>S.lentus</i>	<i>S. vitulus</i>	<i>S.fleuretti</i>
Oxidase	+	+	+	+
Novobiocina	R	R	R	R
Produção de ácido a partir:				
Rafinose	-	+	-	-
Manose	+/-	+	-	+
Arabinose	-/+	+/-	-	+/-
Maltose	+/-	+/-	-	+
Celobiose	+/-	+	-/+	-
Galactose	+/-	+/-	-	-
Lactose	-/+	+/-	-	-
Salicina	+/-	+/-	-/+	-

+: positivo; +/-: variável, mas principalmente +; -/+ : variável, mas principalmente - ;
-: negativo.

Fonte: STEPANOVIC et al. (2005) com adaptações.

4.3. Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Os isolados foram suspensos em caldo BHI, incubados durante 24 horas a uma temperatura de 35 °C e diluídos na concentração do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL. Tal concentração foi ajustada através do espectrofotômetro, onde a densidade correta de turbidez variou de 0,08 a 0,1 utilizando comprimento de onda de 625 nm.

4.3.1. Difusão em disco simples

A suspensão bacteriana (0,1mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo ágar Mueller Hinton (Merck) com o auxílio de *swabs*. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 35 °C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (KOHNER et al., 1999).

No quadro abaixo estão listados os antimicrobianos testados nesse estudo e suas respectivas zonas de inibição de acordo com o CLSI, 2011.

Quadro 2. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados

Antimicrobianos	Zonas de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Oxacilina (1 µg)	≤17	-	≥18
Cefoxitina (30 µg)	≤24	-	≥25

4.4. Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Os ensaios de reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação dos genes foram realizados no Laboratório de Genética de Micro-organismos, situado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.4.1. Extração do DNA bacteriano

A parede celular de bactérias Gram-positivas é formada por uma espessa camada de peptidoglicano que dificulta a extração do gene bacteriano (PRESCOTT et al., 1996), fazendo-se necessária a utilização de enzimas específicas. Porém, a fim de otimizar e simplificar a técnica de PCR foi utilizado um protocolo de extração magnética (Sistema NucliSens® mini MAG™ - BioMérieux), onde cada colônia crescida em ágar manitol vermelho de fenol foi repicada em 5 mL de caldo BHI (MERK). Após 18 hs a 37 °C, uma alíquota de 1000 µL do caldo contendo o inóculo foi transferida para o tubo de Tampão de Lise NucliSens® (Tiocianato de Guanidina 50%; Triton X-100 2% e EDTA 1%) e centrifugados a 3.000 rpm por 2 min. Após incubação à temperatura ambiente por 10 min, foi iniciada a etapa de adição dos Reagentes de Extração NucliSens® (Sílica; Tampão de Lavagem I – Tiocianato de Guanidina; Tampão de Lavagem II-Tampão Orgânico e Solução Biocida; Tampão de Lavagem III-Tampão Inorgânico e Tampão de Eluição-Tampão Inorgânico), no próprio tampão de lise foi adicionado 50 µL de sílica, agitado brevemente o tubo imediatamente após a adição e incubado 1 min à temperatura ambiente. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por 2 min e o sobrenadante descartado. O sedimento de sílica contido nos tubos foram lavados com 400 µL do Tampão de Lavagem I, 450µL foram transferidos para microtubos de 1,5 mL colocados no aparelho de extração magnética (NucliSens® miniMAG - BioMérieux), lavados durante 30 seg à velocidade do STEP1 e removidos todo o sobrenadante. As etapas de lavagem foram repetidas de cinco vezes, da seguinte maneira:

- Lavagem 2: 400 µL de Tampão de Lavagem I, lavados durante 30 seg no STEP 1;
- Lavagem 3: 500 µL de Tampão de Lavagem II, lavados durante 30 seg no STEP 1;
- Lavagem 4: 500 µL de Tampão de Lavagem II, lavados durante 30 seg no STEP 1;
- Lavagem 5: 500 µL de Tampão de Lavagem III, lavados durante 15 seg no STEP 1;

Após as lavagens, os tubos foram retirados do aparelho, adicionado 100 µl de Tampão de Eluição no sedimento de sílica nos microtubos, colocados no agitador térmico (Eppendorf) e incubados durante 5 min a 60 °C a 1.400 rpm. Em seguida, os microtubos foram colocados novamente no aparelho de extração magnética e transferido o sobrenadante, com o DNA extraído, para um tubo novo.

O DNA de cada isolado extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose (UNISCIENCE) 0,8% para quantificação do material genético, a partir da comparação deste com o DNA lambda nas concentrações de 25 e 50 ng/ µL. Assim, o material genético de todos os isolados foi padronizado na concentração de 10 ng/µL para realização das etapas de amplificação dos genes de caracterização e resistência.

4.4.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 1X (10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl, e 0,1% Triton X-100, 2,0 mM de MgCl₂; pH 9,0), 0,5 µ M de cada iniciador (BIONEER), 0,2 mM de dNTP (FERMENTAS), 1 U de Dream Taq™ Green DNA Polimerase (FERMENTAS) e água mili-Q para completar um volume total de reação de 20µL, contendo 2µL do DNA extraído (SAMBROOK et al., 2002).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo SYBR Green (INVITROGEN®). Posteriormente, os géis foram visualizados em transiluminador ultra-violeta e documentados pela câmera fotográfica (SONY -

Modelo DSC-HX1). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o marcador de peso molecular de 100 pb (FERMENTAS®).

4.4.2.1. Caracterização genotípica das espécies de *Staphylococcus* spp.

Os isolados negativos para a prova da coagulase, resistentes à novobiocina e positivos para o Teste da Oxidase (Quadro 3) foram submetidos à técnica de PCR para confirmação do gênero *Staphylococcus* (ZHANG et al., 2004). Após essa etapa, foram realizadas amplificações para confirmação das espécies *S. sciuri* e *S. lentus* (YASUDA et al., 2002).

Quadro 3. Iniciadores e ciclos na identificação espécies de *Staphylococcus* spp. oxidase-positivos.

Gene (fragmento)	Espécies	Iniciadores (5' - 3')	Ciclo
<i>16S rRNA</i> (756 pb)	<i>Staphylococcus</i> spp.	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	1*
<i>16S rRNA</i> (872 pb)	<i>S. sciuri</i>	GAACCGCATGGTTCAATAG GACTCTATCTCTAGAGCGG	2
<i>16S rRNA</i> (872 pb)	<i>S.lentus</i>	GAACCGCATGGTTCAATGT AACTCTATCTCTAGAGCGA	3

*1. (94 °C 40 s., 64 °C 1 min., 72 °C 1 min 12 s.) x 30; 2. (94 °C 1 min, 55 °C 1 min., 72 °C 2 min) x 25 e 72 °C 5 min; 3.(94 °C 1min, 55 °C 1 min., 72 °C 2 min) x 25 e 72 °C 5 min.

4.4.2.2. Genes de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

Foi realizada a técnica de PCR para a possível amplificação dos genes *pbpD* (COUTO et al., 2010), *mecA* (COELHO et al., 2007), *mecI* e *mecRI* (ROSATO et al., 2003) em todos os *Staphylococcus* spp. oxidase-positivos. Os iniciadores e ciclos utilizados estão expostos no quadro 4.

Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* spp. oxidase-positivos.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclo
<i>pbpD</i> (1120 pb)	ATCCATCAATATTGAACCA TATATCTTCACCAACACC	1*
<i>mecA</i> (533pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	2
<i>mecI</i> (639pb)	CCG GAA TTC GCA TAT GGA TTT CAC GAT GGT TCG TAG GTT ATG TTG	3
<i>mecRI</i> (234pb)	CCA AAC CCG ACA ACT AC CGT GTC AGA TAC ATT TCG	4

*1. (95 °C 1 min, 55 °C 1 min., 72 °C 1 min) x 25 e 72 °C 4 min; 94 °C 5 min; 2. (94 °C 1 min, 55 °C 1 min., 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min; 3. 94 °C 4 min. 3.(94 °C 1 min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min; 4. 95°C 2min. (95°C 1min, 53°C 1 min., 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 7 min.

4.5. Análise estatística

Os perfis de suscetibilidade aos fármacos testados foram expressos em porcentagens que foram analisadas de forma descritiva.

Os percentuais de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) dos testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina foram calculados considerando a presença do gene *mecA* como predição para a resistência à oxacilina, seguindo as fórmulas abaixo:

% Sensibilidade = verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos negativos

% Especificidade = verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos positivos

% VPP = verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos positivos

% VPN = verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos negativos

A associação entre os testes fenotípicos e genotípicos foi avaliada através do Teste de Qui-quadrado (X^2).

4.6. Sequenciamento do gene e análise das seqüências de DNA

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e enviado para o sequenciamento pela empresa Helixxa Bases for Life (Campinas/SP).

As seqüências foram editadas no programa Bioedit (HALL, 1999) e submetidas ao algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), possibilitando a seleção de seqüências de nucleotídicas armazenadas no banco de dados do NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com identidade com as seqüências dos micro-organismos isolados. As seqüências foram importadas para o programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007), e alinhadas utilizando o programa Clustal W (HIGGINS et al., 1994).

O dendograma foi construído utilizando o método algorítmico Neighbor Joining (NJ), utilizando o modelo de distância p no programa MEGA versão 4.0. A robusteza de cada ramo foi determinada usando o teste não paramétrico de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização fenogenotípica do Grupo *Staphylococcus sciuri*

Após a semeadura de 270 amostras, foi possível isolar um total de 56 amostras do Grupo *Staphylococcus sciuri* (*S. sciuri*, *S. vitulus*, *S. lentus* e *S. fleuretti*) expostos na tabela 2 e 3.

Tabela 2. Distribuição do Grupo *Staphylococcus sciuri* em isolados de camundongos e equinos no Instituto de Biologia do Exército

Coletas	Local	Região Coletada/Animal	Número de isolados
1	Biotério	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo	05
2	Biotério	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo	08
3	Biotério	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo	06
4	Biotério	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo	04
5	Biotério	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo	06
6	Biotério	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo	03
7	Biotério	Swab Conduto Auditivo e Pele/Camundongo	03
8	FMG	Swab Nasal/Equino	10
9	FMG	Swab Nasal/Equino	11
Total			56

Tabela 3. Distribuição das espécies do Grupo *Staphylococcus sciuri* fenogenotipicamente identificadas de acordo com as diferentes coletas

Coleta (local)	Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. oxidase-positivos		
	<i>S. sciuri</i>	<i>S. lentus</i>	Outros do grupo <i>S. sciuri</i>
1. Biotério	-	5	-
2. Biotério	-	8	-
3. Biotério	-	6	-
4. Biotério	-	4	-
5. Biotério	1	1	4
6. Biotério	-	-	3
7. Biotério	2	-	1
8. FMG (equino)	4	-	6
9. FMG (equino)	4	1	6

Em um primeiro momento, foi adotado o protocolo de identificação fenotípico estabelecido segundo Stepanovic et al. (2005), sendo os isolados identificados como sendo 42 *S. lentus* e 14 *S. sciuri*. O micro-organismo que apresentou maior frequência com base na avaliação fenotípica foi *S. lentus* (75%). Nenhum isolado foi identificado como *S. vitulus* e *S. fleuretti*. A literatura aponta a prevalência de *S. sciuri* com base na identificação fenotípica, o que não ocorreu no presente estudo. Stepanovic et al. (2005) identificaram 93% *S. sciuri*, 5% *S. lentus*, 1,15% *S. vitulus* e 0,85% *S. fleuretti*, do total dos isolados provenientes da mucosa e pele de uma variedade de animais. Cabe apontar a ocorrência de perfis bioquímicos atípicos nas espécies do grupo, o que pode acarretar falhas na identificação. Yasuda et al. (2002) observaram em alguns isolados da espécie *S. sciuri* a produção de ácido a partir da rafinose, enquanto Behme et al. (1996) estabeleceram que 8% dos isolados de *S. lentus* testados não produziram ácido a partir da rafinose.

Em muitos laboratórios, a identificação dos estafilococos é baseada em métodos fenotípicos. O advento das técnicas de caracterização genotípica trouxe maior confiabilidade e precisão ao diagnóstico. No entanto, o custo ainda elevado, a exigência de equipamentos e mão de obra especializada dificulta sua adoção em laboratórios clínicos de rotina (VELASCO, 2005; FERNANDES et al., 2005).

Os isolados foram submetidos à PCR utilizando primers específicos a região 16S do rDNA de *Staphylococcus spp.*, de *S. sciuri* e de *S. lentus*, a fim de possibilitar comparação entre os resultados fenotípicos obtidos. Estes produziram fragmentos únicos de 756, 872 e 872 pb, respectivamente, demonstrados nas figuras 5, 6 e 7.

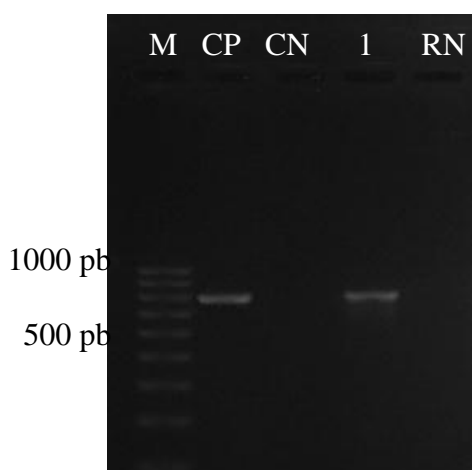


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR do gene *Staph* de *Staphylococcus spp.* (756 pb). M: marcador de peso molecular (100 pb), CP: controle positivo, CN: controle negativo, 1: Isolado positivo e RN: reação negativa.

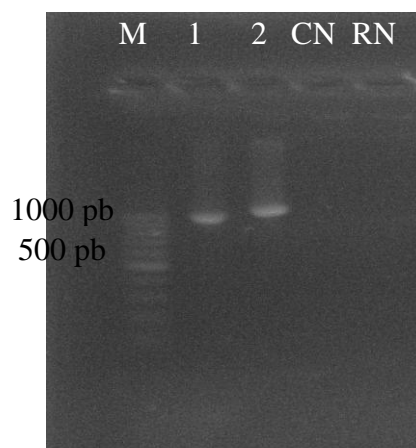


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR do gene *16SrRNA* de *S. sciuri* (872 pb). M: marcador de peso molecular (100 pb), 1: Isolado positivo. 2: Isolado positivo, CN: controle negativo e RN: reação negativa.

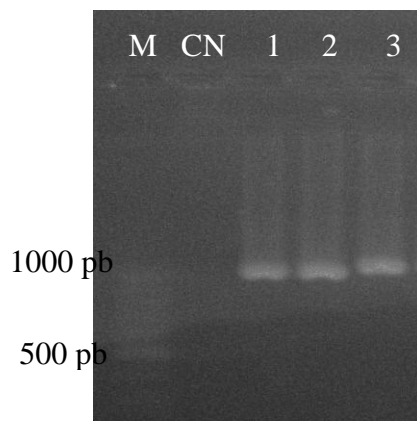


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR do gene *16SrRNA* de *S. lentus* (872 pb). M: marcador de peso molecular (100pb), CN: controle negativo, 1: Isolado positivo. 2: Isolado positivo e 3: Isolado positivo.

Os resultados da análise genotípica corroboram a dificuldade encontrada por outros pesquisadores na obtenção de protocolos de identificação fenotípicos confiáveis para esse grupo em particular. Como exposto na tabela 4, foram encontrados 78,57% (11/14) e 59,52% (25/42) de concordância entre os resultados fenotípicos e genotípicos, para as espécies *S. sciuri* e *S. lentus*, respectivamente.

Tabela 4. Caracterização fenotípica e genotípica das amostras coletadas.

Amostras	Caracterização Fenotípica	Caracterização Genotípica		Animal coletado
		<i>16S rRNA</i> de <i>S. sciuri</i>	<i>16S rRNA</i> de <i>S. lentus</i>	
1	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
2	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
3	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
4	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
5	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
6	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
7	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
8	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
9	<i>S. sciuri</i>	-	+	camundongo
10	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
11	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
12	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
13	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
14	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
15	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
16	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
17	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
18	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
19	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
20	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo

21	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
22	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
23	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
24	<i>S. lentus</i>	-	-	camundongo
25	<i>S. lentus</i>	-	-	camundongo
26	<i>S. lentus</i>	-	-	camundongo
27	<i>S. sciuri</i>	+	-	camundongo
28	<i>S. lentus</i>	-	+	camundongo
29	<i>S. lentus</i>	-	-	camundongo
30	<i>S. lentus</i>	-	-	camundongo
31	<i>S. lentus</i>	-	-	camundongo
32	<i>S. lentus</i>	-	-	camundongo
33	<i>S. lentus</i>	-	-	camundongo
34	<i>S. sciuri</i>	+	-	camundongo
35	<i>S. sciuri</i>	+	-	camundongo
36	<i>S. sciuri</i>	+	-	equino
37	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
38	<i>S. sciuri</i>	+	-	equino
39	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
40	<i>S. sciuri</i>	+	-	equino
41	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
42	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
43	<i>S. sciuri</i>	+	-	equino
44	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
45	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
46	<i>S. sciuri</i>	+	-	equino
47	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
48	<i>S. sciuri</i>	+	-	equino
49	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
50	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
51	<i>S. lentus</i>	-	-	equino
52	<i>S. sciuri</i>	-	-	equino
53	<i>S. sciuri</i>	-	-	equino
54	<i>S. sciuri</i>	+	-	equino
55	<i>S. sciuri</i>	+	-	equino
56	<i>S. lentus</i>	-	+	equino

Após confirmação genotípica, dentre as espécies oxidase-positivas identificadas obteve-se 44,64% de *S. lentus* (25/56), 19,64% (11/56) de *S. sciuri* e 35,71% (20/56) de outros membros do grupo *Staphylococcus sciuri* (*S. vitulus* e *S. fleuretti*), de acordo com o perfil bioquímico e a amplificação dos genes específicos de caracterização (Figura 8).

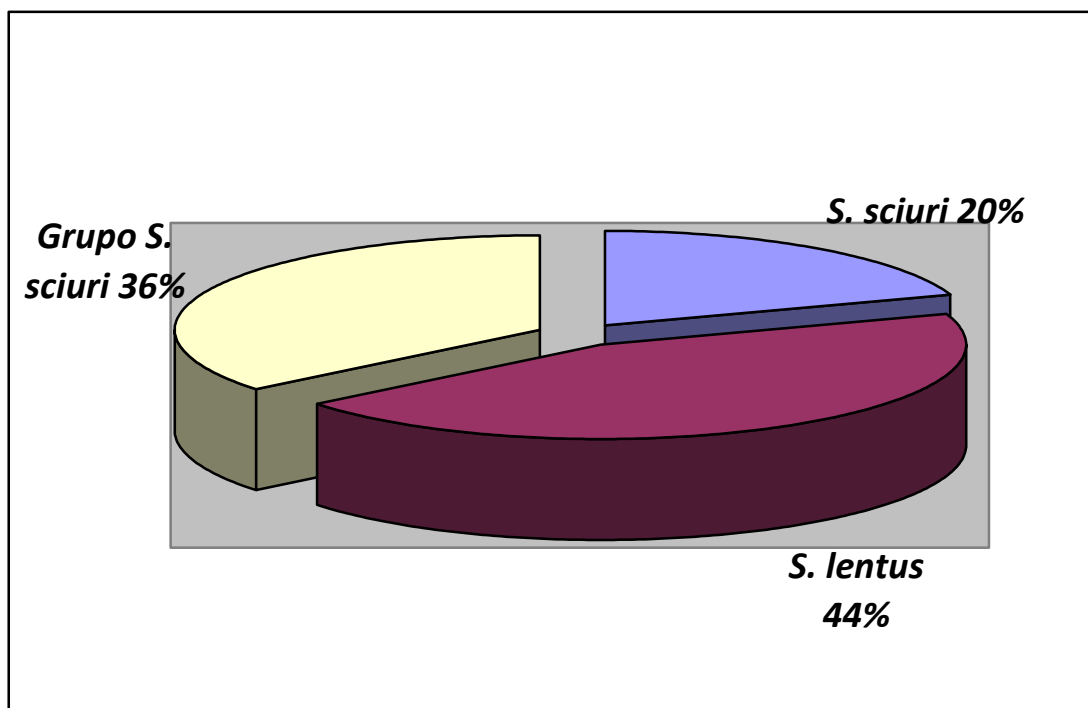


Figura 8. Gráfico apresentando o percentual de isolados bacterianos obtidos a partir da caracterização fenogenotípica dos isolados provenientes de camundongos e equinos.

Foi detectado um isolado que foi caracterizado fenotipicamente como *S. sciuri*, entretanto foi positivo quando *primers* específicos para a região *16SrRNA* de *S. lentus* foi utilizado. Os demais isolados, sendo 18 (32,1%; 18/56) caracterizados fenotipicamente como *S. lentus* e 2 (3,5%; 2/56) como *S. sciuri*, não amplificaram quando foi utilizado *primers* específicos para a região *16SrRNA* de *S. sciuri* e *16SrRNA* de *S. lentus*. Desse modo, não tendo sido possível a caracterização genotípica desses isolados, apesar das outras espécies que apresentam o referido perfil bioquímico serem *S. vitulus* e *S. fleuretti*, devido a dificuldade de diferenciação por marcadores fenotípicos para ambas as espécies, consideraremos pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* oxidase-positivos, e, portanto, serão referenciados como grupo *Staphylococcus sciuri* daqui por diante.

Ao analisarmos os 35 isolados provenientes de camundongos, foi observado que dos 27 isolados caracterizados genotipicamente (77,14%; 27/35), 24 foram confirmados como *S. lentus* (88,88%; 24/27) e apenas 3 isolados foram *S. sciuri* (11,12%, 3/27). Diferentemente do encontrado no presente estudo, a literatura vem reportando, desde Kloos et al. (1975), a prevalência da espécie *S. sciuri*. Estes pesquisadores, ao caracterizar fenotipicamente ambas as espécies pela primeira vez, citaram em seu estudo a dificuldade de se obter isolados de *S. lentus*, naquela época considerada uma subespécie de *S. sciuri*. Eles reportaram que dos 44 isolados analisados provenientes da pele de roedores, foram detectados 20,5% (9/44) e 79,5% (35/44) de *S. lentus* e *S. sciuri*, respectivamente. Stepanovic (2005) ao analisar 173 isolados provenientes da pele e mucosa de animais e humanos, detectou, por métodos fenotípicos e genotípicos, 93%, 5,2%, 1,2% e 0,57% como sendo *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. vitulus* e *S. fleuretti*, respectivamente.

As amostras provenientes de equinos forneceram 8 isolados confirmados genotipicamente como pertencentes a *S. sciuri*, uma elevada prevalência frente aos 11 isolados (72,7%; 8/11) dessa espécie. Devriese et al. (1985) relataram *S. sciuri* como sendo uma espécie comumente isolada de pele e mucosa de equinos saudáveis e Yasuda

et al. (2002) verificaram *S. sciuri* como sendo o segundo micro-organismo mais facilmente isolado da mucosa nasal de equinos saudáveis.

As divergências entre o presente trabalho e outros relatos, especialmente os mais antigos, podem estar associadas a dificuldades na reprodutibilidade das técnicas de diagnóstico, já que a identificação exata e completa dessas bactérias é dificultada por suas características bioquímicas similares e, pelos numerosos isolados que apresentam perfis intermediários levando a vários relatos de erros de identificação dos membros do grupo *Staphylococcus sciuri* por métodos bioquímicos (STEPANOVIC et al., 2005).

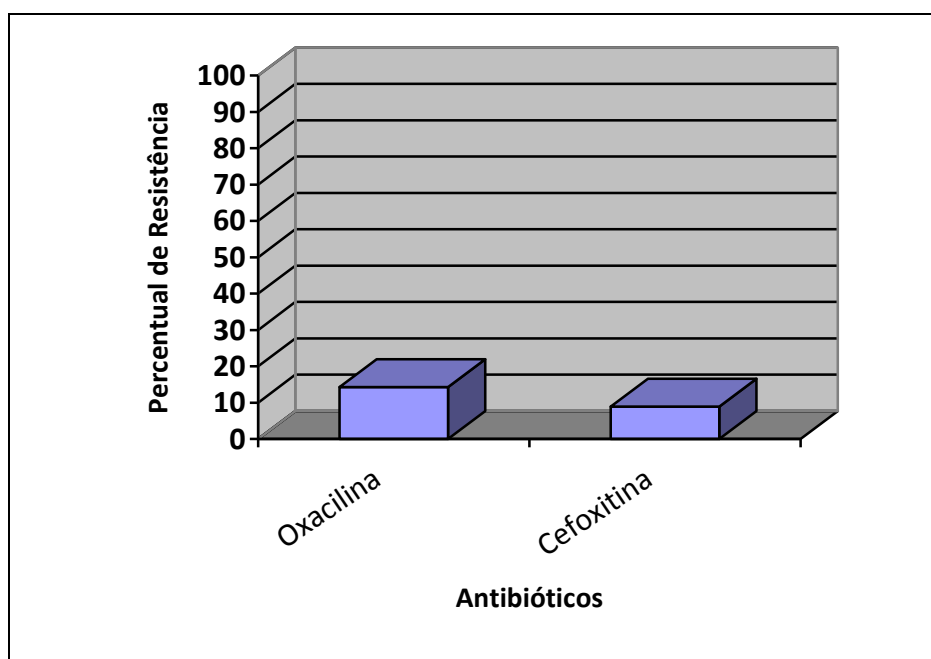
5.2. Resistência à oxacilina e cefoxitina

Os resultados dos percentuais de resistência de *Staphylococcus* spp oxidase-positivos obtidos através do ensaio de difusão em disco estão dispostos na Tabela 5 e Figura 9.

Tabela 5. Percentuais de resistência encontrados para os antimicrobianos beta-lactâmicos testados.

Antimicrobianos	Percentual (%)	
	Sensibilidade	Resistência
Oxacilina (1µg)	85,71	14,29
Cefoxitina (30 µg)	91,07	8,93

Figura 9. Percentual de resistência dos *Staphylococcus* spp. oxidase-positivos isolados



Foi detectado um total de 14,28 % de resistência a oxacilina (8/56), sendo distribuído em 18,18 % (2/11), 8 % (2/25) e 20 % (4/20) para *S. sciuri*, *S. lentus* e grupo *S. sciuri*, respectivamente. Couto et al., em relato do ano de 2002, não verificaram qualquer

resistência à oxacilina, apesar da presença do homólogo do gene *mecA* em todos os seus isolados. Por outro lado, Stepanovic et al. (2005) encontraram isolados de *S. sciuri* resistentes á oxacilina em amostras clínicas humanas.

A resistência total a cefoxitina entre os isolados testados foi de 8,92 % (5/56), sendo distribuída em 18,18 % (2/11), 4 % (1/25) e 10 % (2/20) para *S. sciuri*, *S. lentus* e grupo *S. sciuri*, respectivamente. Karakulska et al. (2012) observaram 5,57 % de resistência a esse fármaco nos isolados do grupo *S. sciuri* a partir da cavidade nasal de equinos saudáveis.

No presente trabalho, os isolados foram obtidos a partir de animais saudáveis, não expostos aos antimicrobianos, o que sugere que a observada suscetibilidade esteja relacionada a ausência da pressão seletiva exercida pelo uso intensivo desses fármacos. Uma vez que, relatos da literatura correlacionam o frequente uso de β -lactâmicos em animais, em particular para tratar infecções estafilocócicas, e expressão fenotípica de resistência em uma variedade de espécies de estafilococos, incluindo o grupo *S. sciuri*. Bagcigil *et al.* (2007) isolaram *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes a meticilina a partir da cavidade nasal de equinos que foram tratados com antimicrobianos, bem como foi detectada resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos usados no tratamento de infecções estafilocócicas, incluindo os β -lactâmicos.

5.3. Detecção do gene *pbpD* e sistema *mec* em isolados do Grupo *Staphylococcus sciuri*

Após a realização do teste fenotípico, os isolados foram avaliados quanto à presença dos genes *pbpD*, *mecA*, *mecI* e *mecRI* (Tabela 6; Figuras 10, 11, 12 e 13) através da técnica de PCR.

Tabela 6. Prevalência dos genes envolvidos na expressão da resistência à oxacilina.

Genes	Percentual (N=56)
<i>pbpD</i>	21,42% (12/56)
<i>mecA</i>	10,71% (6/56)
<i>mecI</i>	5,35% (3/56)
<i>mecRI</i>	5,35% (3/56)

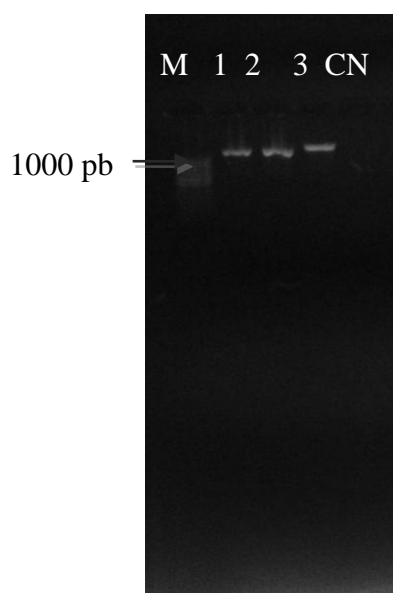


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR do gene *pbpD* (1120 pb). M: marcador, 1: Isolado positivo, 2: Isolado positivo, 3: Isolado positivo e RN: reação negativa

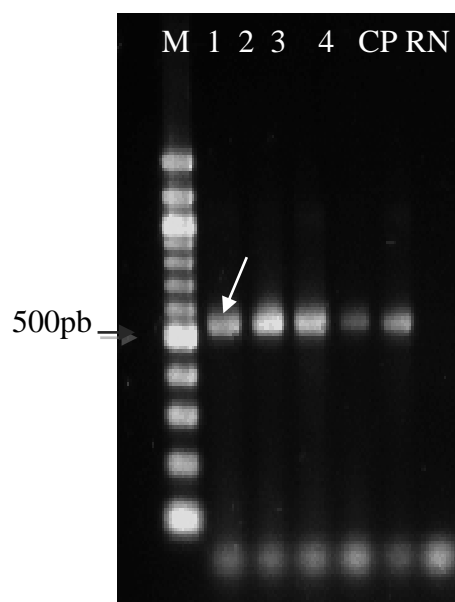


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR do gene *mecA* (533 pb). M: marcador, 1: Isolado positivo, 2: Isolado positivo, 3: Isolado positivo, 4: Isolado positivo, CP: Controle positivo e RN: reação negativa

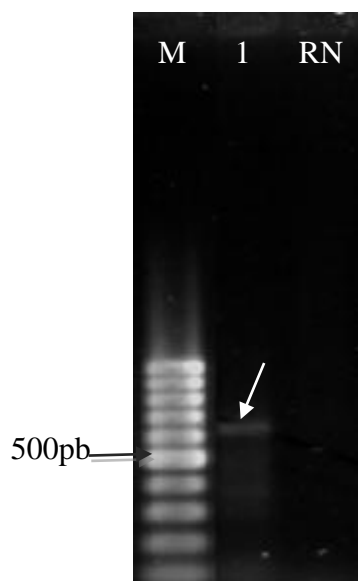


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR do fragmento do gene *mecI* (639 pb). M: marcador, 1: Isolado positivo e RN: reação negativa

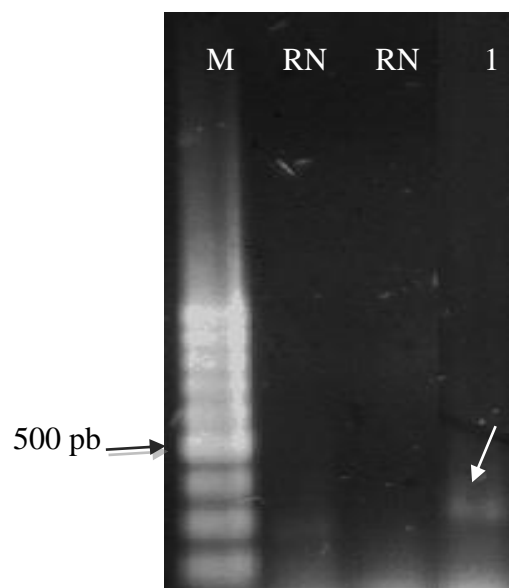


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR do gene *mecRI* (234pb). M: marcador, 1: Isolado positivo e RN: reação negativa

5.3.1. Avaliação genotípica x Perfil fenotípico da resistência

5.3.1.1. Detecção gênica da resistência

O gene *mecA* foi detectado em 10,71 % (6/56) dos isolados, sendo representados na tabela 7.

Tabela 7. Número de isolados *mecA* positivos nas diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. oxidase-positivos

Espécie	Nº de Isolados
<i>S. sciuri</i>	02
<i>S. lentus</i>	01
Outros do grupo <i>S. sciuri</i>	03

Estudos apontam que isolados resistentes à oxacilina em testes fenotípicos podem não apresentar o gene *mecA*, podendo este fato ser explicado por outros mecanismos de resistência como a hiperprodução de beta-lactamases (MARTINEAU et al., 2000; BROWN, 2001; McKINNEY et al., 2001) e modificação da afinidade de outras “PBPs”. Segundo Petinaki et al. (2001), a PBP3 é a principal proteína envolvida neste caso de resistência. Zhou et al. (2008) em um estudo para determinar os padrões das proteínas ligantes de penicilina (PBP's) e as composições do peptidoglicano de parede celular das amostras de *S. sciuri* com o objetivo de explorar as funções do homólogo do gene *mecA* presente nessas espécies, estabeleceram um perfil heterogêneo de suscetibilidade à oxacilina, atribuído ao tipo de gene de resistência carregado em seu material genético e a pressão do próprio antibiótico no meio. Os pesquisadores sugeriram que o homólogo do gene *mecA* presente em *S. sciuri*, denominado gene *pbpD*, associado ao *mecA*, ambos contidos no mesmo material genético, faria com que o segundo gene potencializasse a expressão fenotípica do primeiro. Estudos anteriores corroboram a importância que a seleção do antibiótico exerce sobre a bactéria e suas progênes, e ainda, atribuem que o fenótipo de resistência à oxacilina está associado com a presença de cópias de *SCCmec* tipo III carregado pelo *S. sciuri* (COUTO et al., 2003).

Gruthuysen et al. (2005) relataram a perda do gene *mecA* em amostras mantidas em armazenamento sob congelamento, com maior probabilidade quanto maior o tempo de estocagem. Tal fato indica que embora a detecção do gene *mecA* seja considerado a técnica “padrão ouro” para predição da resistência aos beta-lactâmicos, sua sensibilidade pode variar conforme a conservação das amostras. Segundo este autor, o gene não foi mais detectado em 91,43% (32/35) dos isolados avaliados após a estocagem sob congelamento. Segundo Silva (2008), nestes casos é aconselhável o uso de antimicrobiano em baixa concentração no meio visando à manutenção de determinantes genéticos, tais como plasmídeos que são facilmente perdidos durante o cultivo sem pressão seletiva. Possivelmente, eventos de deleção e inserção também podem ocorrer durante a estocagem, e segundo Suyama; Bork (2001), ser um fator importante que influencia diretamente a organização do genoma. Estes fatores podem estar envolvidos com a detecção variável do gene *mecA* levando a resultados contrastantes quando comparados com os testes fenotípicos de resistência à oxacilina.

A tabela 8 apresenta os diferentes perfis encontrados nos isolados de estafilococos oxidase-positivos quando avaliados em relação a resistência à oxacilina e cefoxitina pela difusão em disco simples e a presença do gene *pbpD* e dos genes regulatórios do sistema *mec*.

Tabela 8. Perfil dos testes fenotípicos de detecção de resistência à oxacilina e cefoxitina e genes *pbpD* e do sistema regulatório *mec* em isolados de *Staphylococcus* spp. oxidase-positivos

Perfis (nº de isolados)	Difusão em Disco		Genes				Espécies
	Oxacilina	Cefoxitina	<i>pbpD</i>	<i>mecA</i>	<i>mecI</i>	<i>mecRI</i>	
1 (2)	R*	R	+	+	+	+	<i>S. sciuri</i>
2 (1)	R	R	-	+	+	+	<i>S. lentus</i>
3 (1)	S*	S	+	-	-	-	Grupo <i>S. sciuri</i>
4 (2)	R	R	-	+	-	-	Grupo <i>S. sciuri</i>
5(1)	R	S	-	+	-	-	Grupo <i>S. sciuri</i>
6(1)	R	S	-	-	-	-	<i>S. lentus</i>
7 (9)	S	S	+	-	-	-	<i>S. sciuri</i>

*S: sensível; R: resistente.

O gene *pbpD*, homólogo do gene *mecA*, foi detectado 12 isolados, sendo em 100% dos 11 isolados de *S. sciuri*, além de um isolado não caracterizado genotipicamente, cujo perfil bioquímico apontava para *S. lentus*. Resultados semelhantes foram demonstrados por Couto et al. (2000), onde o gene *pbpD* foi detectado em todos os isolados de *S. sciuri*. A presença deste gene, relatado na literatura como característico da espécie *S. sciuri*, em um isolado não pertencente a essa espécie pode estar relacionada a uma possível transferência horizontal desse gene.

A resistência a oxacilina não foi detectada fenotipicamente em nenhum dos isolados de *S. sciuri* que apresentaram somente o gene *pbpD*, sendo detectada, porém, nos 2 isolados que também apresentavam o complexo *mec*. Não foi avaliado se houve sinergismo ou alguma associação entre esses genes na regulação desta expressão fenotípica. De modo similar, Couto et al. (2000) verificaram que a resistência fenotípica só pôde ser observada em isolados que apresentaram as duas cópias, tanto do gene *mecA*, quanto do *pbpD*.

Estudos sugerem considerável homologia com um gene encontrado em *S. sciuri*, que parece ser nativo nessa espécie (COUTO et al., 2010). O homólogo do *mecA* identificado em *S. sciuri*, espécie mais estudada, mostrou 79,5% de similaridade com o gene *mecA* de MRSA, demonstrando uma relação evolutiva próxima entre esses determinantes genéticos (FUDA et al., 2007). Contudo, esse homólogo (gene *pbpD*) encontrado no cromossomo dessas espécies está relacionado a genes essenciais envolvidos no crescimento e síntese de parede celular, determinante genético da PBP4, uma das quatro principais proteínas ligantes de penicilina identificadas nessas espécies; que diferentemente dos MRSA, não está contido no elemento móvel *SCCmec* (ANTIGNAC; TOMASZ, 2008), e que não confere qualquer resistência antimicrobiana (COUTO et al., 2002). Severin et al. (2005) verificaram através de um estudo no qual o gene *pbpD* foi introduzido em MSSA, que os mesmos foram capazes de sintetizar proteínas com propriedades bioquímicas semelhantes a PBP2a de MRSA, que levou ao aumento da resistência aos beta-lactâmicos testados, essas evidências corroboram a ideia de que esse homólogo seja o precursor evolutivo do gene *mecA* em *S. aureus*.

O complexo *mec* apresenta dois operons, os quais são responsáveis pela regulação do gene *mecA*. O *mecRI* possui atividade antirepressora, enquanto que o *mecI* codifica um repressor da transcrição *mecA*. Na ausência de indução através do *mecRI* por um beta-lactâmico a transcrição do *mecA* está fortemente reprimida pelo *mecI* (LOWY,

2003). No trabalho desenvolvido por Rosato et al. (2003), todos os isolados positivos para a presença do gene *mecI* apresentaram também os genes *mecA* e *mecRI*.

A literatura reporta que isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina podem não apresentar o gene *mecA* e que isolados *mecA*-positivos podem não expressar resistência à oxacilina devido à inibição do gene *mecA* pelo gene *mecI* (SUZUKI et al., 1993; WELLER et al., 1999; ROSATO et al., 2003). No presente estudo a resistência a oxacilina foi associada a presença do sistema *mec*. Dos 3 isolados que apresentaram apenas o gene *mecA*, 2 isolados apresentaram resistência a oxacilina e cefoxitina, e 1 isolado apresentou resistência somente a oxacilina. A cefoxitina é uma cefalosporina de segunda geração que apresenta alta afinidade com a PBP2, PBP4, apresentando grande especificidade na indução da expressão do gene *mecA* (CAUWELIER et al., 2004), sendo considerada um marcador fenotípico de resistência de maior acurácia.

5.3.1.2 Análise fenotípica de resistência

A detecção da resistência à oxacilina através de métodos fenotípicos em isolados de *Staphylococcus* spp. tem sido dificultada devido ao fenômeno da heteroresistência, onde duas populações, sensível e resistente, coexistem em uma mesma cultura. Caracteriza-se pelo fato de que de toda população bacteriana heterogeneamente resistente, assim como todas as células, carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma. Cada cepa de *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina apresenta um perfil característico da proporção de células que crescem na presença de concentrações específica de oxacilina e de diferentes condições ambientais (LOWY, 2003). A literatura relata que o fenótipo da heteroresistência pode estar relacionado com a temperatura e tempo de incubação, tamanho do inóculo e presença de NaCl, assim como é induzida pelos próprios antimicrobianos beta-lactâmicos. Para a detecção rotineira da resistência à oxacilina o teste de disco-difusão é o mais utilizado (HUSSAIN et al., 2001).

O teste fenotípico de difusão em disco simples para detecção de resistência à oxacilina e cefoxitina foi avaliado quanto à sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativos e positivos, considerando o fato de que uma vez positivo ou negativo para o gene de resistência *mecA*, o isolado deveria apresentar-se resistente ou sensível, respectivamente, no teste fenotípico. A tabela 9 apresenta os valores encontrados após a análise estatística considerando todos os isolados de *Staphylococcus* spp. oxidase-positivos.

Tabela 9. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de difusão com disco de oxacilina e cefoxitina.

Testes	Sensibilidade	Especificidade	VPP*	VPN*
Oxacilina	100	96	75	100
Cefoxitina	83	100	100	98

* VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo.

Os testes de difusão em disco com oxacilina e cefoxitina apresentaram 100% e 83% de sensibilidade, respectivamente, na predição do gene *mecA*. No entanto, a cefoxitina foi mais específica (100%) que o teste de difusão em disco que a oxacilina (96%). Ainda de acordo com o CLSI (2011), a detecção fenotípica da resistência a cefoxitina e oxacilina em ensaios de difusão em disco representam métodos confiáveis

para predição da presença do gene *mecA* em estafilococos coagulase-negativos. No entanto, a cefoxitina por apresentar maior especificidade tem sido preferencialmente recomendada.

O reduzido número de isolados *mecA* positivos, correspondendo a apenas 10,7% (n=6) do total de isolados avaliados não permitiu estabelecer o grau de correlação entre a cefoxitina e a oxacilina como método de predição do gene.

5.4. Análise de Sequências Gênicas e Considerações Finais

Os *primers* utilizados para a detecção do gene de resistência *mecA* foram descritos por MURAKAMI et al. (1991), baseado em análises de sequências do gene presente em isolados humanos. Em estudos anteriores desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Bacteriologia Veterinária da UFRRJ não tem sido verificada boa correlação entre os resultados fenotípicos e a detecção do gene *mecA* em isolados estafilocócicos de diferentes espécies animais, em especial bovinos. No presente estudo, foi possível detectar o gene *mecA* em 6 isolados, e correlacionar sua presença com um perfil típico de resistência fenotípica a oxacilina e cefoxitina.

Para aprofundar nosso conhecimento em relação a detecção do gene *mecA* em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de diferentes hospedeiros, 3 isolados de ECN, provenientes de equinos, caracterizados genotipicamente como *S. sciuri* e *S. lentus*, que amplificaram o gene *mecA* utilizando os *primers* descritos por MURAKAMI et al. (1991), foram amplificados com *primers* descritos nos estudos de mestrado da discente Dayanne Araujo de Melo.

O estudo constou de uma etapa de elaboração de novos pares de *primers* baseados em sequências do gene *mecA* disponíveis no banco de dados do NCBI, com o objetivo de gerar fragmentos sobrepostos, visando a cobertura total do gene *mecA*. Dessa forma, seria possível a comparação da sequência completa do gene *mecA* dos isolados oriundos de diferentes hospedeiros e detectar possíveis diferenças entre as sequências que poderiam justificar a falha da detecção do gene *mecA* em algumas amostras bovinas quando o *primer* descrito por MURAKAMI e colaboradores (1991) foi utilizado.

Os produtos positivos da amplificação foram sequenciados, e após a edição das sequências foram montados os *contigs* do gene *mecA*. Foi observada a similaridade do gene *mecA* oriundo dos isolados de equino com os isolados oriundos de amostras humanas, e também foram observadas diferenças quando comparados com os de origem bovina.

Visando acrescentar nossos resultados e responder as indagações levantadas acerca da diferença do gene *mecA* em *Staphylococcus* provenientes de diferentes hospedeiros, foram selecionadas várias sequências do gene *mecA* de *Staphylococcus* oriundos de diferentes hospedeiros disponíveis no banco de dados do NCBI (Tabela 10), e estas foram alinhadas e comparadas com as sequências previamente estudadas. Os alinhamentos foram utilizados para construção do dendograma que permite uma melhor visualização das diferenças e similaridades do gene *mecA* de *Staphylococcus* provenientes de diferentes espécies hospedeiras (Figura 14).

Tabela 10. Sequências do gene *mecA* de *Staphylococcus* spp. provenientes de diferentes hospedeiros selecionados do NCBI

Identificação da sequência	Espécies	Hospedeiro	Acesso NCBI
S. pseudo (1)	<i>S. pseudointermedius</i>	Cão	AM904731
S. sciuri (2)	<i>S. sciuri</i>	Roedor	Y13096
S. pseudo (3)	<i>S. pseudointermedius</i>	Cão	AM904732
S. sciuri (4)	<i>S. sciuri</i>	Roedor	Y13095
S. kloosii (5)	<i>S. kloosii</i>	Equino	AM048803
s. vitulinus (6)	<i>S. vitulinus</i>	Equino	AM048802
S. pseudo (7)	<i>S. pseudointermedius</i>	Cão e Gato	EU929082
S. pseudo (8)	<i>S.pseudointermedius</i>	Cão e Gato	EU929081
S. capitis (9)	<i>S. capitis</i>	Equino	AM048805
S. kloosii (10)	<i>S.kloosii</i>	Equino	AM048804
S. sciuri (11)	<i>S.sciuri</i>	Bovina	AY820253
S. aureus (12)	<i>S. aureus</i>	Humana	HE681097

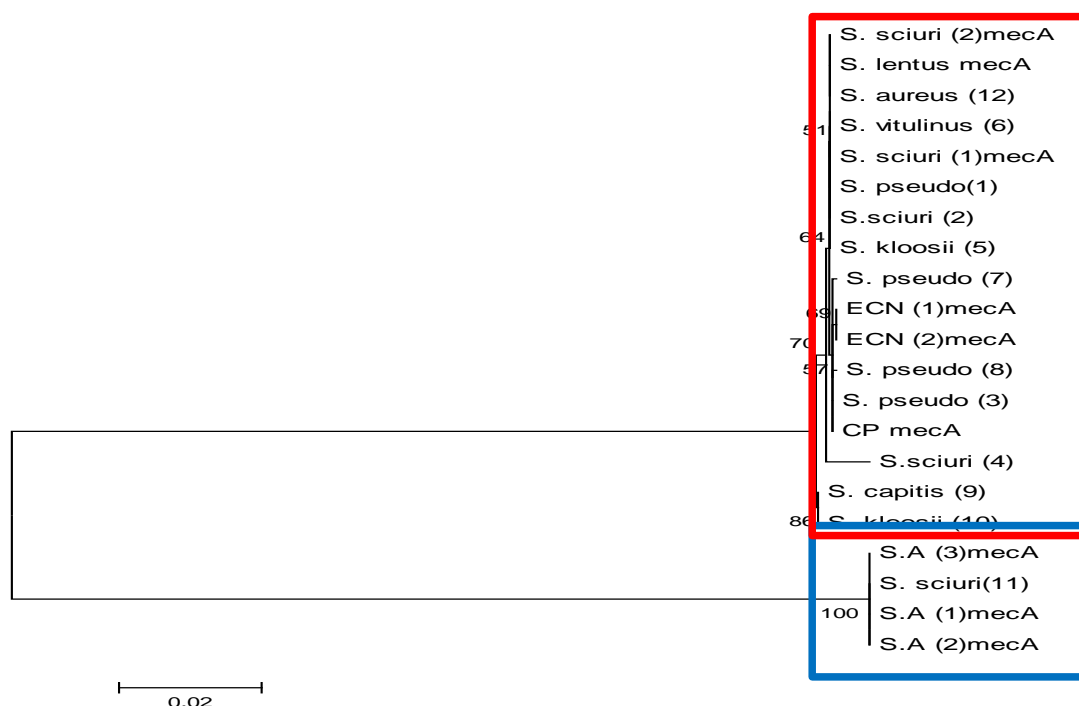


Figura 14. Dendrograma baseado na sequência do gene *mecA* de *Staphylococcus* spp. provenientes de diferentes espécies hospedeiras. Em destaque azul, os isolados oriundos de bovino, e em vermelho, os isolados oriundos das demais espécies (cão, gato, roedores, equino e humano).

Através da análise do dendograma ficou evidente a similaridade do gene *mecA* de diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. provenientes de hospedeiros como cão, gato, roedor, equino e humano, e da divergência nítida do gene *mecA* de origem bovina com os demais.

Estes dados corroboram com questões levantadas na literatura que considera que a origem do gene *mecA*, um gene exógeno em *S. aureus* e em outros estafilococos de relevância clínica (FIRTH; SKURRAY, 2000), estaria relacionada com um homólogo encontrado em *S. sciuri*, que parece ser nativo nessa espécie (COUTO, 2010). No presente trabalho, esse homólogo (gene *pbpD*) foi detectado em 12 isolados, sendo em 100% dos 11 isolados de *S. sciuri*, contudo, não relacionado a um perfil fenotípico de resistência, corroborando a ideia que está relacionado a genes essenciais envolvidos no crescimento e síntese de parede celular, determinante genético da PBP4, uma das quatro principais proteínas ligantes de penicilina identificadas nessas espécies; e que diferentemente dos MRSA, não está contido no elemento móvel *SCCmec* (ANTIGNAC; TOMASZ, 2008), e não confere qualquer resistência antimicrobiana (COUTO et al. 2003). Uma possível ancestralidade comum explica a similaridade entre os genes *mecA* provenientes de isolados de *Staphylococcus* spp. de diferentes hospedeiros, e confirma a possibilidade de detecção desse gene com primers baseados em sequências humanas. A intrigante questão posta é com relação ao traçado evolutivo desse gene em isolados de origem bovina, uma vez que nenhum dos pares de primers analisados que anelaram no gene *mecA* de *Staphylococcus* provenientes de humano, cão, gato, roedor e equino, foi capaz de anelar no gene *mecA* de origem bovina. Tal fato inviabiliza a detecção do gene *mecA* nos isolados de origem bovina com o emprego destes primers e aponta para relatos muito recentes da literatura que tratam do surgimento de uma cepa MRSA colonizadora de populações animais, possivelmente favorecido pela ampla utilização de antibióticos, denominada “livestock-associated MRSA” (LA-MRSA). Este tipo de MRSA surgiu primeiramente em porcos, mas também têm sido descrito em outros animais como: cães, cavalos, aves, gado, inclusive humanos (CUNY et al., 2011)

Esta cepa é reportada como de usual resistência a tetraciclinas, o que pode estar relacionado ao uso indiscriminado desta classe de antimicrobianos na indústria suína favorecendo sua emergência. O surgimento de cepas como a LA-MRSA pode ser resultante da adaptação dos *S. aureus* a diferentes hospedeiros animais por mecanismos genéticos ainda desconhecidos. Estudos filogenéticos revelaram que algumas linhagens de *S. aureus* isoladas de animais derivam de linhagens humanas e que nesta mudança de hospedeiros, estes microorganismos sofreram adaptações genéticas, perdendo fatores de virulência desnecessários no novo hospedeiro além de adquirirem características necessárias a colonização desse novo ambiente (HERRON-OLSON et al., 2007). Nesse contexto, cabe pensar no artigo de Tenover (2008) intitulado: “Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a Perfect but Geographically Limited Storm?” que nos desafia a refletir que algumas etapas evolucionárias são mais bem-sucedidas que outras, e que isso torna o estudo da resistência antimicrobiana, bem como sua detecção laboratorial, questões não tão previsíveis. O principal desafio é manter a pesquisa de modo a ampliar a compreensão dos caminhos evolucionários e dos fatores de pressão seletiva que contribuem para a transferência e expressão dos genes envolvidos.

6. CONCLUSÕES

- A espécie *S. lentus* foi prevalente dentre as espécies oxidase-positivas identificadas (44,6%; 25/56);
- A espécie *S. lentus* foi mais facilmente isolada em camundongos (68,57%; 24/35), enquanto que *S. sciuri* foi predominante em equinos (40%; 8/20);
- A difusão em disco com a cefoxitina foi mais específica que a oxacilina na predição do gene *mecA*;
- Todos os isolados *S. sciuri* apresentaram o homólogo do gene *mecA*, sem no entanto ser evidenciado qualquer expressão fenotípica de resistência a oxacilina;
- Um isolado não pertencente a espécie *S. sciuri* amplificou o gene *pbpD*, gene, até então, considerado específico desta espécie;
- Um total de 10,71%, 5,35% e 5,35% dos isolados do Grupo *Staphylococcus sciuri* obtidos amplificaram os genes *mecA*, *mecI* e *mecRI*, respectivamente;
- A análise das sequências do gene *mecA* oriundo dos isolados de equino demonstrou similaridade com os isolados oriundos de amostras humanas, de cães e roedores, no entanto, há nítida divergência entre estes e o de origem bovina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGOKE, G.O. Comparative characteristics of *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus* and *Staphylococcus gallinarum* isolated from healthy and sick hosts. **Vet. Microbiol.** v. 11, p.185–189, 1986.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v.25, p.3389–3402, 1997.
- ANTIGNAC, A.; TOMASZ, A. Reconstruction of the Phenotypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Replacement of the Staphylococcal Cassette Chromosome mec with a Plasmid-Borne Copy of the *Staphylococcus sciuri pbpD* Gene. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.53, n.2, p.435–441, 2008.
- BAGCIGIL, F.A., MOODLEY, A., BAPTISTE, K.E., JENSEN, V.F., GUARDABASSI, L. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. **Veterinary Microbiology.** v.121, p.307–315, 2007.
- BEHME, R.J.; SHUTTLEWORTH, R.; MCNABB, A.; COLBY, W.D. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. **J. Clin. Microbiol.** v.34, p.3075–3084, 1996.
- BLACK, J.G. Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas. 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.370–419, 2002.
- BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R. S. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. **Lab Invest.** v.87, p. 3–9, 2008.
- BROWN, D.F.J. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.65–70, 2001.
- CAUWELIER, B.; GORDTS, B.; DESCHEEMAECCKER, P. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal Microbiology Infections Disease**, v.23, p.389–392, 2004.
- CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Revist.** v.10, n.4, p.781–791, 1997.
- CLARKE, S.R.; DYKE, K.G.H. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus* β -lactamase operon are inducible. **Microbiology.** v.147, p. 803–810, 2001.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20th Informational Supplement, M100-S20. CLSI, Wayne, PA **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2011.

COELHO S.M.O.; MENEZES R.A.; SOARES L.C.; PEREIRA I.A.; GOMES L.P.; SOUZA M.M.S. Mapeamento do Perfil de Resistência e Detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**. v.37, n.1, p.195-200, 2007.

COUTO, I.; SANCHES, I. S.; SÁ-LEÃO, R.; LENCASTRE, H. Molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from human. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3, p.1136-1143, 2000.

COUTO, I.; WU, S. W.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.185, n.2, p.645-653, 2003.

COUTO, I.; LENCASTRE, H.; SEVERINA, E.; KLOOS, W.; WEBSTER, J.A.; HUBNER, R.J.; SANCHES, I.S.; TOMASZ, A. Ubiquitous Presence of a *mecA* Homologue in Natural Isolates of *Staphylococcus sciuri*. **Microbial Drug Resistance**. v.2, n.4, p.377-391, 2010.

CUNHA, M. L.R.S; LOPES, R.S.; RUGOLO, C. A. M.; CHALITA, L.V.A.S. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**. v.48, p. 463–478, 2002.

CUNY, C.; LAYER, F.; STROMMINGER, B.; WITTE, W. **Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany**. PLoS ONE ,v. 6, n. 9, 2011.

DANCER, S.J. The problem with cephalosporins. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v.48, p.463–478, 2001.

DEVRIESE, L.A.; NZUAMBE, D.; GODARD, C. Identification and characteristics of staphylococci isolated from lesions and normal skin of horses. **Veterinary Microbiology**. v.10, n.3, p.269-277, 1985.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783–791, 1985.

FERNANDES, C.J.; FERNANDES, L.A.; COLLIGNON, P. Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 506-10, 2005.

FIRTH, N.; SKURRAY, R.A. The *Staphylococcus*: Genetics: Accessory elements and genetic exchange. **American Society for Microbiology**, p. 326-338, 2000.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. *Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms. In: **Bayley & Scott's Diagnostic Microbiology**, 11 ed. Mosby: USA, 2002.

FRAZIER, W. C; WESHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000.

FUDA, C.; FISHER, J.; MOBASHEREY, S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**. Vol. 62, p. 2617-1633, 2005.

GOLEMI-KOTRA, D.; CHA, J.Y.; MEROUEH, S.O.; VAKULENKO, S.B.; MOBASHERY, S. Resistance to b-lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.18419-18425, 2003.

GOLLEDGE, C.L. *Staphylococcus saprophyticus* bacteremia. **J. Infect.Dis.**, v.157, p.215-234, 1988.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology.**, v.43, p.1367–1378, 2002.

GRAHAM, J. C. Comparison of PCR detection of *mecA* with methicillin and oxacillin disc susceptibility testing in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, p.111-113, 2000.

GRIETHUYSEN, A. van.; LOO, I. van.; BELKUM, A. van.; VANDENBROUCKEGRAULS, C.; WANNET, W.; KEULEN, P. van.; KLUYTMANS, J. Loss of the *mecA* Gene during Storage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, The Netherlands, v.43, n. 3, p-1361-1365, 2005.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**. v.54, pp.321–332, 2004.

HACKBARTH, C.J.; CHAMBERS, H.F. blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.37, n.(5), p. 1144-1149, 1993.

HARDY, B. The issue of antibiotic use in the livestock industry: what have we learned? **Animal Biotechnology**, v. 13, n. (1), p. 129-147, 2002.

HEIKENS, E. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2286-2290, 2005.

HEILMANN, C.; PETERS, G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: Fischetti VA; Novick RP; Ferreti JJ; Portnoy DA; Rood JI *Gram-positive pathogens*. Washington, D.C.: ASM Press, p.442-9, 2000.

HERRON-OLSON, L.; FITZGERALD, J.R.; MUSSER, J.M.; KAPUR, V. **Molecular Correlates of Host Specialization in *Staphylococcus aureus***. PLoS ONE 2(10): e1120.doi:10.1371/journal.pone.0001120, 2007.

HIGGINS, E.T., RONEY, C., CROWE, E., HYMES, C. **Ideal versus ought predilections for approach and avoidance: Distinct self-regulatory systems**. Journal of Personality and Social Psychology 66: 276±286, 1994.

HUDOME, S.M.; FISHER, M.C. Nosocomial infections in the neonatal intensive care. Curr Opin Infect Dis 2001;14:303-7.

HUSSAIN, Z. Comparison of the MicroScan system with the “API Staph-Ident” system for species identification of coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.23, n.8, p.126-128, 1986.

HUSSAIN, Z.; STOAKES, L.; MICHAEL, A.J.; GARROW, S.; FITZGERALD, V. Detection of methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase negative staphylococci by PCR, slide agglutination, disk diffusion, and a commercial method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.6, p.2251-2253, 2001.

ITO T; KATAYAMA Y.; ASDA K.; MORI N.; TSUTSUMIMOTO K.; TIENSASITORN C.; HIRAMATSU K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, pp.1323-1336, 2001.

ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, pp. 2637-2651, 2004.

JANSEN, M.D.; BOX, A.T.A.; FLUIT, A.C. *SCCmec* Typing in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains of Animal Origin. **Emerging Infectious Diseases**.v.15, n.1, p.136, 2009.

KARAKULSKA, J.; FIJAŁKOWSKI, K.; NAWROTEK, P.; POBUCEWICZ, A.; POSZUMSKI, F.; CZERNOMYSY-FUROWICZ, D. Identification and Methicillin Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Nasal Cavity of Healthy Horses. **The Journal of Microbiology**. v.50, n.3, p.444-451, 2012.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1955-1963, 2001.

KAWAMURA, Y.; HOU, X.G.; SULTANA, F.; HIROSE, K.; MIYAKE, M.; SHU, S.E.; EZAKI, T. Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical

specimens and emended description of *Staphylococcus caprae*. **J. Clin. Microbiol.** v.36, p.2038–2042, 1998.

KLOOS, W. E.; K. H. SCHLEIFER; SMITH, R. F. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.26, p. 22–37, 1975.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV – *Staphylococcus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore. p. 1.013-1.035, 1994.

KLOOS, W.E. Taxonomy and Systematic of Staphylococci Indigenous to Humans. In: Crossey KB, Archer LG, editors. The Staphylococci in Human Disease. New York: **Churchill Livingstone**. p. 113-37, 1999.

KOHNER, J. P.; UHL, J.; KOLBERT, C.; PERSING, D.; COCKERILL, F. A Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* Gene analysis for determining oxacilin (methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase -ative *staphylococcus* spp.. **Journal of Clinical Microbiology.** v.37. n.9 p.2952-2961, 1999.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. Diagn. Microbiol. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA T.; YUZAWA, H.I.; KOBAYASHI, L.; CUI, A.; OGUCHI, K.; AOKI, Y.; NAGAI, J. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New England Journal Medicine**, v.319, p.157-61, 2001.

LEE, J.H. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Appl Environ Microbiol.** v. 69, p.6489–6494, 2003.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Investigation**, v.111, p.1265-1273, 2003.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. & WHITMAN, W. B. 2009. Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf, pp. 1-32

MA, X. X.; ITO, T.; TIASANSITORN, C.; JAMKLANG, M.; CHONGTRAKOOL, P.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S.; HIRAMATSU, K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother.** 2002; 46 (4): 1147-52.

MANIE, T. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in south Africa. **Letters in Applied Microbiology.** v. 26, p. 253-258, 1997.

MARTINS, R. P.; MARQUES, M. R. H.; NETO, A .C. Etiologia da mastite subclínica em vacas do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 13, p. 104-110, 2006.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; LANSAC, N.; MENARD, C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p.231–238, 2000.

MCEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial Use and Resistance in **Animals Clinical Infectious Disease**, v.34, n.(3), p.93-106, 2002.

McKINNEY, T.K.; SHARMA, V.K.; CRAIG, W.A.; ARCHER, G.L. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and β -lactamase regulators. **Journal Bacteriology**, v.183, n.23, p. 6862-8, 2001

MOELLERING, R.C. The problem of complicated skin and skin structure infections: the need for new agents. **J Antimicrob Chemother**, v.65, n.4, p.3-8, 2010.

MORENO, L. V. Antibiotic residues and drugs resistant bacteria in beef and chicken tissues. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 3, p. 632-635, 1990.

MORSE, S.I. Estafilococos. In: Braude AI, Davis CE, Fierer J, editors. *Microbiologia Clínica*. Buenos Aires: Panamericana; 1984. p. 313-20.

MOTA, R.A.; SILVA, R.A.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal veterinary Research animal Science**. v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANBE, S. **Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction**. *Journal of Clinical Microbiology*. v.29, pp.2240-2244, 1991.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **TaxBrowser**, Washington, 12 dez. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>. Acesso em: 20 out. 2011.

OLIVEIRA, D.C., MILHEIRIÇO, C., DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, *SCCmec* type VI. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, pp.3457-3459, 2006.

OLIVEIRA, N. J. Antibióticos promotores de crescimento na produção animal. In: 4º Encontro de zootecnista do norte de minas: novas perspectivas mercadológicas, 2008, Montes Claros. **Anais da UFMG**, p. 89-115, v. 42, 2008.

PEREIRA, I. A. **Processos infecciosos de animais de companhia: uma abordagem sobre fatores de virulência em *Staphylococcus* spp. e resistência à azitromicina e oxacilina como modelo de estudo**. 166 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

PRESCOTT, M.L., HARLEY, J.P. AND KLEIN, D.A. Prokaryotic cell structure and function in Microbiology. **WCB** . p 33-72, 1996.

ROSATO, A.E.; KREISWIRTH, B.N.; CRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.; ARCHER, G.L. *mecA-blaZ* Corepressors in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.(4), p. 1460–1463, 2003.

SAKAI, H. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p.5739-5744, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2002.

SEVERIN, A.; WU, S.W; TABELI, K.; TOMASZ, A. High-Level β -Lactam Resistance and Cell Wall Synthesis Catalyzed by the *mecA* Homologue of the *Staphylococcus sciuri* Introduced into *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v.187, n.19, p.6651-6658, 2005.

SILVA, C.C.M. Resistência a Antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* Isolados de Gado de Leite Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doctor Scientiae. 2008.

SNARY, E.L.; KELLY, L.A.; DAVISON, H.C.; TEALE, C.; WOOLDRIDGE, M. Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.53, n.6, pp.906-917, 2004.

SOARES, L. C. **Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus spp.* coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina.** 82 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

SOUZA, M. M. S., COELHO, S. M. O., PEREIRA, I. A., SOARES, L. C., PRIBUL, B. R., COELHO, I. S. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* species of animal origin. *Antibiotic Resistance*, 2012, *in press*.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* mechanisms and modulation. **Scientific Program**. v.85, n.(1), p. 57–72, 2002

STEPANOVIC, S.; DAKIC, I.; MORRISON, D.; HAUSCHILD, T.; JEZEK, P.; PETRÁS, P.; MARTELA, A.; VUKOVIC, D.; SHITTU, A.; DEVRIESE, L.A. Identification and Characterization of Clinical Isolates of Members of the *Staphylococcus sciuri* Group, **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.2, p.956-958, 2005.

SUZUKI, E.; KUWAHARA-ARAI, K.; RICHARDSON, J. F.; HIRAMATSU, K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.37, p.1219–1226, 1993.

SUYAMA, M.; BORK, P. Evolution of prokaryotic gene order: genome rearrangements in closely related species. **Trends Genetics**, v. 17, p.10–13, 2001.

SWENSON, J.M.; TENOVER, F.C.; WILLIAMS, P.P.; KILLGORE, G.; Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.8, p.3818-3823, 2005.

TENOVER, F. C. (2008). Vancomycin-resistant staphylococcus aureus: a perfect but geographically limited storm? **Clinical Infectious Disease**; v. 46, p. 675–677, 2008.

TOPLEY, W.W.C. Wilson GS. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 6th ed. London: E. Arnold; 1976. p.764-801.

VELASCO, D. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 379-82, 2005.

VON EIFF, C.; PETERS, G. HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet of Infectious Disease**. v. 2, p. 677-685, 2004.

WALKER. J.; BORROW, R.; GOERING, R.V.; EGERTON, S.; FOX, A.; OPPENHEIN, B.A. Subtyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the North-West of England: a comparison of standardized pulsed-field gel electrophoresis with bacteriophage typing including an inter-laboratory reproducibility study. **Journal of Medical Microbiology**. v.48, p.297-301, 1999.

WEESE, J. S.; ROUSSEAU, J.; TRAUB-DARATZ, J.L.; WILLEY, B.M., MCGREER, A.J.; LOW, D.E. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *Journal of The American Veterinary Medicine Association*. v.226, pp.580–583, 2005.

WELLER, T. M. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v.43, p.15–22, 1999.

WILKE, M.S.; LOVERING, A.L.; STRYNADKA, N.C.J. b-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.525–533, 2005.

WITTE, W.; KRESKEN. M.; BRAULKE, C.; CUNY, C. Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. **Clinical of Microbiology Infections**. v.3, n.40, p.414-422, 1999.

YASUDA, R.; KAWANO, J.; MATSUO, E.; MASUDA, T.; SHIMIZU, A.; ANZAI, T.; HASHIKURA, S. Distribution of *mecA*-harboring staphylococci in healthy horses. **Journal Veterinary Medicine Science**. v.69, n.4, p.821-827, 2002.

YOUNG, H. K. Do nonclinical uses of antibiotics make a difference? **Infectious Control Hospital Epidemiology**. v. 15, p. 484-487, 1994.

ZHANG, L.; GRAY, L.; NOVICK, R.P. & JI, G. Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biology and Chemistry**.v.277, p.34736-34742, 2004.

ZHOU, Y.; ANTIGNAC, A.; WU, S.W.; TOMASZ, A. Penicillin-binding proteins and cell wall composition in β -lactam-sensitive and -resistant strains of *Staphylococcus sciuri*. **Journal of Bacteriology**. V.190, n.2, p.508-514, 2008.