

RODRIGO COELHO DE OLIVEIRA

RESISTÊNCIA A OXACILINA E VANCOMICINA EM *Staphylococcus aureus* E ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS DE DIFERENTES ORIGENS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Oliveira, Rodrigo Coelho de, 1982-
O48r Resistência a oxacilina e vancomicina em
2007 *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos
de diferentes origens / Rodrigo Coelho de Oliveira. - Viçosa,
MG, 2007.
ix, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador : Célia Alencar de Moraes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f.38-46.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Oxacilina. 3. Vancomicina.
4. Antibióticos - Resistência em microrganismos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em
Microbiologia agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.353

RODRIGO COELHO DE OLIVEIRA

RESISTÊNCIA A OXACILINA E VANCOMICINA EM *Staphylococcus aureus* E ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS DE DIFERENTES ORIGENS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de dezembro de 2007.

Prof^a Maria Aparecida S. Moreira
(Co-orientadora)

Prof^a Miriam Teresinha dos Santos

Pesq. Edna Froeder Arcuri

Prof^a Rosinéia Aparecida de Paula

Prof^a Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

*Aos meus pais,
Gerson e Maria dos Anjos*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde para alcançar meus objetivos.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia, ao BIOAGRO e à FAPEMIG pela oportunidade de realização do projeto e pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, Gerson e Maria dos Anjos, que mais uma vez me apoiaram e incentivaram para vencer mais esta etapa.

Aos meus irmãos Bruno e Fernanda pela presença e companheirismo.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação e ensinamentos que levarei comigo durante toda a minha vida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, pela disponibilidade e pelos serviços prestados com muita competência.

Às professoras Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, Miriam Teresinha dos Santos e às doutoras Edna Froeder Arcuri e Rosinéia Aparecida de Paula, pela participação na banca examinadora da dissertação

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Industrial pela amizade e cumplicidade, em especial ao Marcelo, pela colaboração na execução do projeto.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, serei eternamente grato.

BIOGRAFIA

RODRIGO COELHO DE OLIVEIRA, filho de Gerson Gonçalves de Oliveira e Maria dos Anjos Coelho de Oliveira, nasceu em 29 de Janeiro de 1982, em Ubá, Estado de Minas Gerais.

Em Fevereiro de 2000, iniciou o Curso de Farmácia e Bioquímica na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em Juiz de Fora, MG, tornando-se Farmacêutico e Bioquímico em Dezembro de 2004.

Em Agosto de 2005, ingressou no Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em Dezembro de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Características fenotípicas e ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> e estafilococos coagulase negativos	5
2.2. Importância dos <i>Staphylococcus</i> na saúde pública e em alimentos.....	6
2.3. Resistência a β -lactâmicos e vancomicina em <i>Staphylococcus</i>	8
2.3.1. Resistência a antibióticos β -lactâmicos:.....	10
2.3.2. Resistência a antibióticos glicopeptídeos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Bactérias utilizadas	18
3.2. Manutenção das culturas e reativação	18
3.3. Atividade de Coagulase	19
3.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos	20
3.5. Pesquisa de β -lactamases das classes A e D.....	20
3.6. Detecção dos genes de resistência <i>mecA</i> e <i>vanA</i> em <i>Staphylococcus</i>	21
3.6.1. Extração do DNA.....	21
3.6.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex.....	21
3.6.3. Eletroforese em gel de agarose.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Características das bactérias da família <i>Micrococcacea</i> pertencentes ao gênero <i>Staphylococcus</i> isoladas de salame fermentado, hospitais e de mastite bovina, quanto à presença da enzima coagulase.....	24
4.2. Perfil de sensibilidade dos isolados bacterianos quanto aos antimicrobianos oxacilina, cefoxitina e vancomicina pelo método de difusão em disco	25
4.3. Genes de resistência <i>vanA</i> e <i>mecA</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> e estafilococos coagulase negativos provenientes de salame fermentado, vacas com mastite e espécimes clínicos.....	29
4.4. Pesquisa das enzimas β lactamases das classes A e D.....	33
5. CONCLUSÕES	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
Anexo	48

RESUMO

OLIVEIRA, Rodrigo Coelho de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007. **Resistência à Oxacilina e à Vancomicina em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos de diferentes origens**. Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Co-Orientadores: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e Edna Froeder Arcuri

Os determinantes de resistência aos antimicrobianos vancomicina e oxacilina foram investigados em 264 bactérias do gênero *Staphylococcus* originados de salame fermentado, de bovinos acometidos com mastite e de casos clínicos humanos. Todos os isolados foram sensíveis ao antibiótico vancomicina e não apresentaram o gene *vanA*. Dos 57 isolados de salame fermentado, houve um predomínio de CNS, estafilococos coagulase negativos, (89,5%) sobre *Staphylococcus aureus* (10,5%) e apenas um isolado apresentou-se resistente à oxacilina pelo método de difusão em disco e seu mecanismo de resistência foi proveniente da atividade da enzima ESBL (β -lactamase de espectro estendido). Noventa e cinco isolados de mastite bovina foram submetidos ao teste de atividade da enzima coagulase, predominando a espécie de *S. aureus* (68,5%), sobre os CNS (32,5%) e ao teste de sensibilidade in vitro, obtendo-se 14 resistentes a oxacilina, sendo dois isolados apresentando o gene *mecA* e outros 11 atividade de ESBL, predominando este mecanismo de resistência. Dos espécimes clínicos, 52,7% foram CNS e 47,3% *S. aureus* constituindo 112 isolados, sendo 103 resistentes à oxacilina. Destes, 67 possuíam o gene *mecA*, 71 apresentaram atividade de ESBL e 40 isolados ambos os

mecanismos de resistência. Entre os da espécie *S. aureus*, predominou a presença do gene *mecA* como o provável fator de resistência, enquanto nos isolados de CNS, a atividade de ESBL foi mais significativa como possível determinante de resistência. Cinco isolados de origem humana e um de leite mastítico não tiveram seu mecanismo de resistência elucidado, sugerindo ser linhagens MODSA (modified penicillin-binding protein *S. aureus*) ou outro mecanismo de resistência. Os resultados demonstraram a maior prevalência de resistência a antimicrobianos entre os isolados relacionados a espécimes clínicos humanos seguidos daqueles de vacas mastíticas, bem como a diversidade em possíveis mecanismos de resistência.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Rodrigo Coelho de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2007. **Vancomycin and Oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from different sources.** Advisor: Célia Alencar de Moraes. Co-advisors: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira and Edna Froeder Arcuri.

The determinants of antimicrobial resistance oxacillin and vancomycin were investigated on 264 *Staphylococcus* bacteria of the genus originated from fermented sausage, ill with bovine mastitis cases in humans. All isolates were sensitive to the antibiotic vancomycin and not had the *vanA* gene. Of the 57 isolates of fermented sausage, there was a predominance of CNS, coagulase negative staphylococci, (89.5%) on *Staphylococcus aureus* (10.5%) and only one isolated presented itself resistant to oxacillin by the disk diffusion method, and its mechanism of resistance was coming from the activity of the enzyme ESBL (β -lactamase-spectrum extended). Ninety-five isolates of bovine mastitis were submitted to the test of coagulase activity of the enzyme, most kinds of *S. Aureus* (68.5%) on the CNS (32.5%) and the test sensitivity in vitro, obtaining 14 resistant to oxacillin and two isolated presenting the *mecA* gene and 11 other activity of ESBL, mainly this mechanism of resistance. Two clinical specimens, were 52.7% and 47.3% CNS *S. Aureus* isolates constituting 112, and 103 resistant to oxacillin. Of these, 67 had the *mecA* gene, 71 showed activity of ESBL and 40 isolates both mechanisms of resistance. Among the species *S. Aureus*, the predominant presence of the *mecA* gene as the likely source of resistance, while in isolated from CNS, the activity of ESBL was more significant as a possible determinant of resistance. Five isolates of human origin and a milk

mastítico not have its mechanism of resistance clear, suggesting strains be MODSA (modified penicillin-binding protein *S. aureus*) or other mechanism of resistance. The results showed a higher prevalence of resistance to antimicrobial among isolates related to human clinical specimens followed those of cows mastíticas, and the diversity in possible mechanisms of resistance.

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos da família Micrococcaceae representados, principalmente, por *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos (CNS) são bactérias de fundamental importância para a microbiologia clínica humana e animal e microbiologia de alimentos no que diz respeito à aquisição e difusão de genes de resistência a antimicrobianos, que é um dos principais problemas enfrentados pela saúde pública de todo o mundo.

CNS assumem o papel de contaminantes clínicos em indivíduos imunodeprimidos que estão submetidos à introdução de cateteres, próteses, causando sérias infecções. Estes microrganismos também fazem parte da microbiota normal de alimentos derivados de carne animal como salame e salsicha fermentados e podem atuar inclusive como culturas “starter” no processo fermentativo desses alimentos.

Já o *S. aureus* é um importante causador de intoxicação alimentar, pneumonia, bacteremia e é um dos principais causadores de infecções hospitalares. Em animais, ele provoca junto com os CNS, várias enfermidades como artrite e infecções no trato urinário, e é também, o principal agente infeccioso de mastite bovina, doença que causa grandes prejuízos à pecuária leiteira.

Desde que a penicilina foi introduzida, linhagens de *Staphylococcus* spp resistentes à penicilina começaram a surgir. Esta resistência ocorre devido à produção, por parte das bactérias, de um grupo de enzimas chamadas de β -lactamases que hidrolisam o antimicrobiano resultando em um derivado inativo. Hoje, a grande maioria dos *Staphylococcus* spp encontrados nos hospitais e isolados de mastite bovina são resistentes a este antibiótico.

Assim, devido à ineficiência da penicilina no tratamento de infecções humanas e veterinárias, antimicrobianos resistentes a β -lactamases como oxacilina, meticilina e cefalosporinas, foram introduzidos no mercado.

Com o passar dos anos, devido à pressão seletiva do uso e abuso de antibióticos, começaram a surgir os *S. aureus* resistentes a meticilina/oxacilina (MRSA) e estafilococos coagulase-negativos resistentes a meticilina/oxacilina (MR-CNS), ambos resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos incluindo as cefalosporinas e carbapenens, o que limita a opção terapêutica.

Resistência à meticilina ocorre quando as bactérias adquirem o regulon *mec* que contém vários genes, sendo o *mecA*, o gene de pré-requisito para resistência à meticilina; quando há hiperprodução de β -lactamases das classes A ou D; ou hiperprodução de penicillin binding proteins (PBP): PBP1, PBP3 ou PBP4.

Com o surgimento de bactérias multi-resistentes como MRSA e MR-CNS, antibióticos da classe dos glicopeptídeos, representados principalmente pela vancomicina, estão sendo mais usados na terapia de infecções causadas por essas bactérias. Devido ao aumento do uso de vancomicina emergiu o *Staphylococcus* resistente à vancomicina (VRS). O primeiro VRS isolado foi o *S. haemolyticus*. Em 1997, foi relatado no Japão, o primeiro caso de *S. aureus* intermediariamente resistente à vancomicina (VISA). Esses isolados VISA eram todos MRSA oriundos de pacientes que se tratavam com vancomicina. Há relato de infecções causadas por *S. aureus* vancomicina-resistentes (VRSA) que apresentam total resistência e diferentes mecanismos de disseminação. Esta linhagem VRSA adquire resistência por transferência conjugativa do operon *vanA* de *Enterococcus faecalis*, que catalisa a síntese do terminal pentapeptídico D-Alanil-D-Lactato, disseminando genes de resistência nas linhagens de estafilococos de forma mais eficiente.

A resistência à vancomicina é codificada por vários genes como: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG*, e requer a presença de 3 enzimas: Ligase; Desidrogenase e D,D-didepsipeptidase.

Como o gene *mecA* é parte de uma ilha genômica designada de cassete cromossômico estafilocócico (*sccmec*) e os genes de resistência à

vancomicina estão localizados em transposons ou plasmídeos, fica clara a facilidade de disseminação desses genes de resistência entre bactérias.

Deste modo, como as bactérias que possuem estes genes estão intimamente relacionadas com o ser humano, seja pela presença natural no organismo, pelo contágio de animais ou indivíduos portadores ou até mesmo pela cadeia alimentar, torna-se de fundamental importância caracterizar a resistência destes microrganismos aos antibióticos importantes como oxacilina e vancomicina para que possamos monitorar ou interferir na difusão desses genes de resistência.

Quando presentes nessas mesmas bactérias e em outras de importância clínica, esses determinantes de resistência podem causar representativos para a população ou animais no que diz respeito ao combate destes microrganismos, como maior tempo de tratamento, custos maiores para antibióticos de amplo espectro e maior taxa de morbidade e mortalidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características fenotípicas e ocorrência de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos pertencentes à família *Micrococcaceae*. São imóveis, anaeróbios facultativos, produtores da enzima catalase, fermentadores de glicose e formam aglomerados em forma de cachos visualizados à coloração de Gram (Sneath et al., 1986).

Staphylococcus foram reconhecidos como um gênero bacteriano em 1880. A partir disso, foi subdividido em espécies, sendo os *S. aureus* e os CNS as de maior importância. Os estafilococos estão presentes universalmente em organismos, utilizando o corpo humano e outros animais com reservatórios. Eles podem ser encontrados ainda na água, leite e diversos outros alimentos consumidos por humanos e animais (Bergdoll, 1989)

Há descrito na literatura mais de 32 espécies de CNS, sendo 15 espécies da microbiota humana e as restantes não associadas ao homem (Huebner et al., 1999). Os CNS são encontrados no solo e em outros ambientes, porém seu habitat mais comum é a epiderme e as membranas mucosas de mamíferos, como o homem e bovino, onde são considerados microrganismos comensais. Além disso, várias espécies de CNS, representadas principalmente pelo *Staphylococcus xylosum*, são encontrados em alimentos fermentados, como os salames, constituindo a microbiota normal desses alimentos (Coppola et al., 2000).

Staphylococcus aureus é a espécie mais comum no homem. Coloniza comensalmente a saliva, a pele, o tubo digestivo e a mucosa nasal. Cerca de 20% da população estão colonizadas com *S. aureus*, 60% são portadores intermitentes e 20% não possuem este microrganismo. Outra característica

importante do *S. aureus*, é a capacidade de determinadas estirpes produzirem uma enterotoxina termoestável, causadora de gastroenterites. Essa bactéria é causadora de infecções em mamíferos, como humanos e bovinos. (Peacock et al., 2001).

2.2. Importância dos *Staphylococcus* na saúde pública e em alimentos

Dentre os vários patógenos de humanos e animais existentes, os *Staphylococcus* spp são os de maior interesse no que diz respeito à resistência a multidrogas, devido à sua virulência intrínseca com habilidade de causar diversas infecções (Lowy, 1998). A mortalidade em casos de bacteremia por *S. aureus* está entre 20 e 40%, apesar do uso de antimicrobianos (Mylotte et al., 1987). *S. aureus* é um dos principais causadores de infecções hospitalares e um dos agentes mais importantes das infecções adquiridas na comunidade, sendo os isolados obtidos de pacientes internados resistentes a um grande número de antimicrobianos (Lowy, 2003).

Devido à sua ampla versatilidade, esta bactéria é capaz de causar enfermidades de amplo espectro: infecções de pele, do sistema nervoso central, do trato respiratório, do trato urinário, osteomielite e síndrome do choque tóxico (Skinner et al., 1997).

Nos Estados Unidos, *S. aureus* ocupa o segundo lugar depois dos CNS como causador de bacteremia adquirida em ambiente hospitalar e letalidade (Tenover, 2000).

CNS pertencem a um grupo de bactérias oportunistas, sendo encontrados normalmente na pele, mucosas e diferentes partes do corpo (Einseinstein e Schaechter, 1994). Assumem, sem definição de espécie, o papel de contaminante clínico, não envolvido na infecção primária, mesmo havendo casos em que provocam infecção primária em indivíduos imunodeprimidos, submetidos a cateter, próteses e outros dispositivos. Várias infecções hospitalares são provenientes de CNS e, por este motivo, a resistência desses microrganismos a múltiplos antibióticos tem aumentado (Jarvis e Martoni, 1994).

Em animais, principalmente bovinos, os *Staphylococcus* provocam várias enfermidades como artrite, infecções no trato urinário e mastite. Mastite é a denominação do processo inflamatório da glândula mamária. Sua etiologia pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo esta, causada principalmente por agentes bacterianos e fungos (Costa, 1998).

Os microrganismos mais comuns em casos de mastite bovina são *CNS* e *S. aureus*, sendo este o patógeno contagioso mais freqüente (Costa, 1998; Freitas, 2005).

Na indústria alimentícia, sabe-se hoje, que a inoculação de linhagens de *Lactobacillus* e *CNS* nos alimentos fermentados de origem animal, como os salames, é importante para o processo de fermentação, gerando um produto de melhor qualidade (Coppola et al., 2000). O flavor característico da fermentação e a maturação do salame fermentado são conferidos por diferentes compostos voláteis e não voláteis (Sondergaard et al., 2002), resultado da atividade de bactérias do ácido láctico, cocos Gram-positivos catalase-positivos, principalmente os *CNS*, *Kocuria* sp e *Micrococcus* sp (Demeyer et al., 1974), e por enzimas endógenas da carne (Hierro et al., 1997, 1999).

Para se obter um produto com a devida higiene e qualidade organoléptica as indústrias de alimentos usam culturas baseadas na mistura de *Lactobacillus* e membros da família *Micrococcaceae* para iniciar a fermentação de salames. O *S. xylosus* constitui a cultura comercial iniciadora da fermentação mais encontrada em salames fermentados (Coppola et al., 2000).

Outros *Staphylococcus* como *S. epidermidis* e *S. warneri* que frequentemente fazem parte da microbiota de salames fermentados, estão relacionados como causadores de sérias infecções, assim, aspectos de segurança devem ser levados em consideração para utilização como cultura iniciadora (Miralles et al., 1996; Garcia-Varona et al., 2000).

A presença de *CNS* e principalmente de *S. aureus* em alimentos fermentados pode causar também gastroenterite, resultante do consumo de alimentos contaminados por linhagens de *Staphylococcus* produtoras de enterotoxinas (Martin et al., 2006).

Enterotoxinas estafilocócicas são proteínas com identidades definidas e organizadas em uma família de nove tipos sorológicos principais de toxinas termoestáveis: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ (Martin et al., 2006).

S. aureus está relacionado com surtos de intoxicações alimentares, embora, alguns pesquisadores ressaltem a possibilidade de CNS também causar intoxicações alimentares pela produção dessas enterotoxinas (Martin et al., 2006).

2.3. Resistência a β -lactâmicos e vancomicina em *Staphylococcus*

O desenvolvimento da resistência bacteriana a drogas emergiu depois da introdução de antimicrobianos na medicina veterinária e na humana em meados de 1940. Logo após o início dessa prática, cientistas da época questionaram o uso de antimicrobianos em ração, como promotores de crescimento, e o seu efeito para a saúde humana (Tollefson, 2004). Antibióticos são adicionados na ração e na água com o propósito de melhorar a eficiência alimentar e com isso acelerar o crescimento do animal. A concentração de antibióticos em alimentos para terapias e profilaxia são maiores do que para promoção de crescimento (Tollefson, 2004).

Esta prática favorece a pressão seletiva para genes de resistência a antibióticos resultando em bactérias multiresistentes (Woodford, 1995). Alguns análogos de glicopeptídeos, como a avoparcina, eram usados como promotor de crescimento, com isso em 1994 surgiram os *Enterococcus spp* resistentes a glicopeptídeos que foram isolados de alimento de origem animal na Inglaterra, Alemanha e Dinamarca (Woodford, 1995). Isto sugeriu que alimento de origem animal serve como reservatório para *Enterococcus spp* resistentes aos glicopeptídeo que foram rapidamente espalhados em hospitais da Europa e Estados Unidos causando uma preocupação porque eles são resistentes a drogas normalmente usadas no tratamento humano (Tollefson, 2004).

Culturas starter utilizadas na indústria alimentícia no processo fermentativo de produção de salames, podem atuar como reservatório de genes de resistência com alto risco de transferência para bactérias

patogências (Miralles et al., 1996; Garcia-Varona et al., 2000). De fato, resistência a multidrogas em patógenos e comensais transportados em alimentos de origem animal tornou-se comum, ameaçando o sucesso no tratamento de certas infecções (Levy, 1998).

Assim, a microbiota comensal de alimentos de origem animal pode constituir um reservatório para determinantes de resistência que são transferidos para patógenos ou comensais humanos (Aarestrup et al., 1999). Muitos estudos já demonstraram a transmissão direta de bactérias resistentes de alimentação animal para humanos, o que resulta em mais doenças para humanos disseminando bactérias resistentes. A produção do alimento animal estabelece condições favoráveis para seleção e expansão da resistência bacteriana (Aarestrup et al., 1999).

CNS e *S. aureus* recebem uma importante atenção como agentes causadores de infecções intramamárias em bovinos leiteiros em todo mundo (Gentilini, 2002). Diversos estudos que tratam da susceptibilidade a antimicrobianos em patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente do padrão de resistência, principalmente para os antibióticos mais freqüentemente utilizados como os β -lactâmicos (Gentilini, 2002).

Em humanos, de 80% a 90% das linhagens de *Staphylococcus* são produtoras de β -lactamases, além disso, 60% a 80% são resistentes à metilina, quando isolados em hospitais, o que induz a resistência a todos β -lactâmicos conhecidos, levando ao uso mais freqüente dos glicopeptídeos e a uma diminuição da sensibilidade a estes antimicrobianos (Lowy, 2003). Com isto, o tratamento de infecções torna-se mais complicado, limitando a opção terapêutica para um antibiótico mais tóxico, mais difícil de ser administrado, mais caro, levando a um período prolongado de doença, aumentando os índices de hospitalização, bacteremia e mortalidade.

Estes determinantes de resistência são geralmente genes de resistência, que podem ser disseminados via elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, entre diferentes espécies bacterianas, incluindo as que causam doenças em humanos (Mcdermott et al., 2003). Além disso, elementos genéticos móveis carregam vários genes de resistência e conseqüentemente a aquisição de um desses elementos pode

conferir resistência a vários antimicrobianos e resistência a diferentes drogas podem emergir quando um único antimicrobiano é usado (Levy, 1976; Catry et al., 2003; Levy, 2002).

2.3.1. Resistência a antibióticos β -lactâmicos:

Desde que a penicilina foi introduzida, linhagens de *Staphylococcus* resistentes à penicilina começaram a aparecer; esta resistência ocorre devido à produção por parte das bactérias de uma classe de enzimas chamadas de β -lactamases que hidrolisa o anel β -lactâmico do resíduo penicilânico ou cefalosporínico resultando em um derivado ácido inativo (Jeljaszewicz et al., 2000). Estas enzimas são predominantemente extracelulares, sendo sintetizadas quando os *Staphylococcus* são submetidos a antibióticos β -lactâmicos (Jeljaszewicz et al., 2000).

O gene para β -lactamase é parte de um elemento transponível localizado em um grande plasmídeo que normalmente contém mais genes de resistência como para gentamicina e eritromicina. O gene que codifica a β -lactamase em *Staphylococcus* é o *blaZ* que é controlado pelos produtos de dois genes adjacentes, um antirepressor *blaR1* e um repressor *blaI* (Lowy et al., 2003). O sinal necessário para síntese de β -lactamase é a quebra das proteínas regulatórias *BlaI* e *BlaR1*. Após a exposição a β -lactâmicos, *BlaR1* se auto-cliva (Gregory 1997; Zhang 2001). Este produto da auto-clivagem funciona como uma protease para quebra do repressor *BlaI*, direta ou indiretamente com participação de uma outra proteína, *BlaR2*, permitindo a síntese de β -lactamase por *blaZ* (Zhang 2001). Com base nas seqüências de aminoácidos e nas propriedades enzimáticas, foram determinadas 4 classes de β -lactamases: A, B, C, D (Ambler 1980; Herzberg. 1990). As classes A, C e D são enzimas que contêm serina no sítio ativo, enquanto classe B compreende metaloenzimas (Madgwick, 1987). As enzimas da classe A são constituídas de aproximadamente 270 resíduos de aminoácidos, como as presentes em *S. aureus* e muitas das β -lactamases codificadas em plasmídeos de Enterobacterias a exemplo de TEM-1 e SHV-1 (Fuchs, 1994). A classe C inclui enzimas de aproximadamente 370 resíduos e codificadas geralmente no cromossomo

como *ampC* de bactérias Gram-negativas. A classe D compreende enzimas que hidrolisam preferencialmente metilicina e oxacilina como OXA-1, OXA-2 e PSE-2, codificadas por plasmídeos. Nas β -lactamases, a serina possui um papel importante na catalise, ao participar na formação do complexo acil-enzima quando em contato com o antibiótico (Ambler, 1980; Herzberg, 1990). O número de penicilases conhecidas produzidas por *Staphylococcus* continua a crescer e aproximadamente 80% dos *Staphylococcus* encontrados nos hospitais as contêm. Porém, algumas infecções adquiridas na comunidade ainda apresentam *Staphylococcus* sensíveis à penicilina (Jeljaszewicz et al., 2000).

Devido à ineficiência da penicilina no tratamento de infecções, antimicrobianos resistentes a β -lactamases como metilicina/oxacilina e cefalosporinas foram introduzidos no mercado (Jeljaszewicz et al., 2000).

Os antibióticos metilicina/oxacilina são da classe dos β -lactâmicos, introduzido no mercado em 1961, sendo a metilicina o primeiro antibiótico semi-sintético dessa classe resistente às penicilases (Lowy, 2003). Com o passar dos anos, devido à pressão seletiva do uso e abuso de antibióticos, começaram a surgir os *Staphylococcus* resistentes à metilicina, que são resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos incluindo as cefalosporinas e carbapenens.

Esta resistência está presente em bactérias que produzem grande quantidade de β -lactamases da classe D ou A e/ou apresentam uma PBP alternativa que foi alterada e apresenta uma baixa afinidade a todos os antibióticos β -lactâmicos (Jeljaszewicz et al., 2000). Como exemplos de bactérias resistentes à metilicina temos o *S. aureus* (MRSA) e os estafilococos coagulase-negativos (MR-CNS).

A primeira linhagem de MRSA foi descrita em 1961 (Jeovons, 1961). Semelhante às linhagens resistentes à penicilina, isolados resistentes a metilicina também frequentemente carregam outros genes de resistência a outros antimicrobianos (Lyon, 1984). Ito, em 1999, utilizando isolados provenientes de diferentes continentes, relatou as primeiras evidências da existência de três tipos de cassetes cromossômicos estafilococais, SCCmec I-III. Recentemente foi descrito um quarto tipo, SCCmecIV. Desde 1998, linhagens de MRSA associados a comunidades, CA-MRSA, que são

distintas genotípica e fenotipicamente dos tipos MRSA hospitalares, NA-MRSA, foram descritas como causadoras de infecções que envolvem a pele, pneumonia e até mesmo morte (Herold, 1998; Naimi, 2003). CA-MRSA são sensíveis a vários agentes antimicrobianos, com exceção dos β -lactâmicos, diferentemente dos NA-MRSA que são resistentes a várias outras drogas além destas. Isto ocorre porque CA-MRSA carrega o SCCmec do tipo IV preferencialmente aos dos tipos I, II ou III, presentes nos NA-MRSA (Salgado, 2003). Outra diferença entre eles é a presença de um fator de virulência nos CA-MRSA chamado de Pantón-Valentine Leukocidin (PVL) que está ausente nos NA-MRSA. Este é endêmico em hospitais, enquanto que CA-MRSA está sendo encontrado em poucos casos nos últimos anos, principalmente em unidades de tratamento intensivos de neonatal nos Estados Unidos, Europa e Austrália (Bratu, 2005).

A fonte da expansão e o mecanismo de transmissão dos CA-MRSA para hospitais ainda não foi elucidado, mas, sugere-se que os próprios trabalhadores dos hospitais adquirem essas linhagens na comunidade e as proliferam nos seus locais de trabalho (Bratu, 2005).

Há 3 mecanismos que conferem resistência aos *Staphylococcus spp*: uma resistência clássica e dois outros tipos de resistência marginal (Chambers, 1997). Esses mecanismos são:

Resistência Clássica: a síntese da parede celular bacteriana é uma reação catalisada por enzimas, proteínas ligadoras da penicilina, chamadas de PBPs, que são o alvo dos antibióticos β -lactâmicos. As PBPs diferem entre *Staphylococcus* sensíveis (MSSA) e resistentes (MRSA) a oxacilina. Em linhagens MSSA, cinco PBPs foram descritas: 1, 2, 3, 3', e 4. Linhagens MRSA estão associadas com a produção de uma única proteína, que não está presente nas sensíveis, a PBP2a ou PBP2'. Esta proteína tem baixa afinidade por agentes antimicrobianos com anel β -lactâmico e é codificado pelo gene *mecA* (Chambers, 1997).

O gene *mecA* é parte de uma ilha genômica designada de cassete cromossomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Quatro diferentes elementos SCC*mec* que variam de 21 a 67 Kb já foram caracterizados (Hiramatsu et al., 2002). Esses quatro SCC*mec* contêm dois genes para recombinases, *ccrA* e *ccrB* da família da invertase/resolvase, que são responsáveis pela

integração sítio-específica e excisão de *attB_{scc}*, um operon desconhecido do cromossomo que funciona próximo da origem de replicação (Lowy, 2003).

O gene *mecA*, que é uma seqüência de 2,13 Kb de DNA de origem não estafilocócica, sendo transferido lateralmente para diferentes espécies de *Staphylococcus* (Hiramatsu et al., 1997), atua na síntese de PBPs de 76 KDa, que pode ser de quatro tipos: PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4. As estirpes MRSA expressam uma nova PBP, a PBP2a ou 2', adquirida de outras espécies de CNS e codificada pelo gene *mecA*. Esta PBP2a mostra baixa afinidade, não apenas à meticilina e à oxacilina, mas praticamente a todos os antibióticos β -lactâmicos (Fuchs et al., 1994). Dois genes principais atuam no controle fenótipo de resistência, estando associados com a regulação: *mecI* (repressor de *mecA*) e *mecR1* (sensor β -lactâmico transmembrana). *MecI* é muito similar a *BlaI*, o repressor de β -lactamase de *Staphylococcus* e *MecR1* é similar a *BlaRI*. Devido a esta similaridade *mecI* e *mecR1*, *blaI* e *blaRI* regulam a transcrição de *mecA*, porém a repressão de *blaI* é mais fraca que a de *mecI* (Mlynarczk, 1998).

Resistência Marginal (*Borderline*): algumas linhagens de *Staphylococcus* apresentam um tipo menos comum de resistência à oxacilina não relacionado à presença do gene *mecA*, a resistência marginal, em que os MICs (concentração inibitória mínima) de oxacilina estão próximos aos pontos de corte. O mecanismo de resistência nesses isolados pode ser devido a:

- 1 – Hiperprodução de β -lactamase tipo A que resulta na hidrólise parcial do anel β -lactâmico das penicilinas, linhagens conhecidas como BORSA (borderline oxacillin-resistant *S. aureus*).
- 2 – Modificações nas PBPs 1,3 e 4, linhagens conhecidas como MODSA (modified penicillin-binding protein *S. aureus*). Quando submetidas ao teste para pesquisa de PBP2a, verifica-se que essas linhagens não produzem essa proteína (gene *mecA* negativa) (Chambers, 1997).

As linhagens marginalmente resistentes apresentam MICs para oxacilina de 4 a 8 μ g/mL e zonas de inibição próximos ao ponto de corte para resistência. Essas estirpes apresentam significado clínico não-definido e uma freqüência relativamente baixa. Normalmente, os isolados com

resistência marginal não apresentam resistência cruzada a outros β -lactâmicos, como acontece na resistência clássica. Na prática são classificados como MRSA, e esses antimicrobianos são considerados opção terapêutica (Chambers, 1997).

As linhagens de *Staphylococcus* que são resistentes à oxacilina são geralmente tratadas com antibióticos glicopeptídeos como vancomicina e teicoplanina (Sundsford et al., 2004).

2.3.2. Resistência a antibióticos glicopeptídeos

Antibióticos glicopeptídeos são usados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas em casos de resistência ou alergia a outros antimicrobianos (Florence et al., 2004). Desde a sua criação há 35 anos, o uso desses antibióticos até hoje é limitado, porém com o surgimento de bactérias multi-resistentes como MRSA e MR-CNS, esses antibióticos estão sendo mais usados na terapia de infecções causadas por estas bactérias (Jeljaszowicz et al., 2000). Há também relatos de poucas bactérias como *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Erysipelothrix* que são intrinsecamente resistentes à vancomicina (Woodford, 1995).

Antibióticos glicopeptídicos agem na bactéria ligando-se ao resíduo carboxi-terminal D-alanil-D-alanina de precursores de peptideoglicano, UDP-N-acetilmurâmico-pentapeptídeos e inibindo reações de transglicosilação e transpeptidação, impedindo, portanto, a síntese do peptideoglicano (Reynolds, 1989).

O primeiro relato de plasmídeo mediando uma alta resistência a antimicrobianos glicopeptídeos ocorreu em *Enterococcus* no ano de 1988 (Woodford, 1995). A resistência a vancomicina é codificada por vários genes como: *vanA*, *vanB*, *vanB1*, *vanB2*, *vanC1*, *vanC2*, *vanC3*, *vanD*, *vanE* e *vanG* (SUNDSFJORD et al., 2004).

A resistência mediada pelo gene *vanA* é caracterizada por promover uma concentração inibitória mínima (MIC) alta de vancomicina (MIC > 256 μ g/mL) e resistência a teicoplanina (MIC > 16 μ g/mL) (Jeljaszowicz et al., 2000). Resistência mediada por *vanA* está presente em *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. mundtii*, *E. raffinosus* e

E. avium (Jeljaszowicz et al., 2000), e é a mais preocupante por ser uma resistência de alto nível (Klare, 1997).

A resistência mediada pelo gene *vanB* é caracterizada por conferir resistência a concentrações variáveis de vancomicina (MIC>64µg/mL), mas não à teicoplanina (Jeljaszowicz et al., 2000). Este tipo de resistência foi descrito em *E. faecalis*, *E. faecium* e, recentemente, em *Streptococcus bovis* (Jeljaszowicz et al., 2000).

A resistência do tipo *vanC* é caracterizada pelo baixo nível de resistência à vancomicina (MIC 4-16 µg/mL) e sensibilidade a teicoplanina (Jeljaszowicz et al., 2000). Este tipo de resistência é propriedade intrínseca de *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens* (Jeljaszowicz et al., 2000).

O fenótipo VanD foi recentemente descrito para uma linhagem de *E. faecium* e é caracterizado por resistência a vancomicina (MIC = 64µg/mL) e baixo nível de resistência a teicoplanina (MIC = 4µg/mL) (Perichon et al., 2004).

A resistência mediada pelo gene *vanG* também está relacionado com resistência à vancomicina, porém foi descoberto há pouco tempo e ainda está sendo estudada com mais detalhes (Sundsfjord et al., 2004).

O gene *vanE* está relacionado com a resistência a antibióticos glicopeptídeos encontrada em linhagem de *E. faecalis* (Fines, 1999). Este tipo de resistência é similar a resistência intrínseca de *vanC*. A linhagem foi resistente a baixas concentrações de vancomicina (MIC=16µg/mL) e foi sensível a teicoplanina (Fines, 1999).

Os *Enterococcus* que possuem os tipos *vanA*, *vanB* ou *vanD* de resistência, sintetizam precursores de peptidoglicano não em D-alanil-D-alanina, mas no depsipeptídeo com D-alanil-D-lactato que possui baixa afinidade aos antibióticos glicopeptídeos (Jeljaszowicz et al., 2000).

A resistência a glicopeptídeos requer a presença de três enzimas: Ligase (VanA, VanB ou VanD) catalisando a síntese de D-alanil-D-lactato; Desidrogenase (VanX, VanXb ou VanXd) gerando D-lactato de piruvato e D,D-didepsipeptidase (VanH, VanHb ou VanHd) que hidrolisam o pentapeptídeo precursor D-alanil-D-alanina produzido por uma ligase normal presente na célula bacteriana (Jeljaszowicz et al., 2000).

Genes responsáveis pela resistência a antibióticos glicopeptídeos do fenótipo associado a *vanA* são mais difundidos do que *vanB* em *Enterococcus*. Os conjuntos de genes *vanA* foram originalmente localizados no plasmídeo não-conjugativo *pIP816* em *E. faecium* BM4147. Mas, investigações mostraram que esses genes são parte do transposon *Tn 1546* (Jeljaszowicz et al., 2000).

Os tipos *vanC* e *vanE* de resistência à vancomicina diferem dos outros. O precursor da síntese de peptidoglicano termina com um dipeptídeo D-Alanil- D-serina. Esta substituição reduz a ligação da vancomicina, mas não no mesmo grau que D-Alanil-D-lactato encontrado nos fenótipos associados a *vanA* e *vanB* em *Enterococcus* (Jeljaszowicz et al., 2000).

Há genes de resistência à vancomicina de *Enterococcus* que foram comprovadamente demonstrados em laboratório, transferidos para *S. aureus* (Hiramatsu et al., 1997). O primeiro *Staphylococcus* reconhecidamente resistente à vancomicina foi o *S. haemolyticus* (Hiramatsu et al., 1997).

Em 1997, foi relatado no Japão o primeiro caso de *S. aureus* intermediariamente resistente à vancomicina (VISA). Os isolados VISA eram todos MRSA oriundos de pacientes que se tratavam com vancomicina devido a infecções causadas por MRSA (Fridkin, 2003). Há relato de infecções causadas por *S. aureus* vancomicina-resistentes (VRSA) que apresentam total resistência e diferente mecanismo de disseminação. Em contraste com a resistência mediada cromossomalmente das linhagens VISA, a linhagem VRSA adquire resistência por transferência conjugativa do operon *van* de *Enterococcus*, disseminando genes de resistência nas linhagens de *Staphylococcus* de forma mais eficiente (Hiramatsu et al., 1997).

Há duas formas de resistência à vancomicina identificadas. Uma forma são as linhagens VISA que possuem MIC à vancomicina de 8-16 µg/mL (Hiramatsu et al., 1997). As linhagens VISA são notáveis para a quantidade adicional de síntese de peptidoglicano que resulta em forma irregular, aumentando a espessura da parede celular. Há também diminuição das ligações cruzadas do peptidoglicano, expondo mais os resíduos D-Alanil-D-Alanina (Hanaki 1998a; Hanaki 1998b). Como resultado

há mais resíduos de D-Alanil-D-Alanina disponíveis para ligar e prender vancomicina, impedimento a droga de chegar ao seu alvo na membrana citoplasmática (Hanaki 1998b).

A segunda forma de resistência à vancomicina resulta da transferência conjugativa do operon *vanA* de um *E. faecalis* resistente à vancomicina. Esses isolados VRSA demonstraram completa resistência à vancomicina, com MIC > 128 µg/mL. A resistência nesses isolados é causada por alteração do peptídeo terminal D-Alanil-D-Alanina para D-Alanil-D-Lactato, nos casos dos genes *vanA*, *vanB* e *vanD* e de D-Alanil-D-Alanina para D-Alanil-D-Serina, para os genes *vanC* e *vanE*. A síntese de D-Alanil-D-Lactato ocorre somente com exposição a baixas concentrações de vancomicina (Hiramatsu et al., 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

3.1. Bactérias utilizadas

Bactérias do gênero *Staphylococcus* foram obtidas de alimentos, hospital e de vacas com mastite.

- As bactérias de origem alimentar foram isoladas de amostras de salame tipo italiano provenientes de 2 indústrias da região Sul do Brasil (Oliveira et al., 2006). Foram analisadas 57 amostras.
- *Staphylococcus spp* são provenientes de espécimes clínicos originados de pacientes em tratamento hospitalar ou ambulatorial. Os isolados foram gentilmente cedidos por um hospital situado na Zona da Mata Mineira. Um total de 112 amostras foram analisadas.
- Totalizando 264 isolados, 95 isolados originados de vacas com mastite foram generosamente cedidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (Embrapa Gado de Leite) situada em Juiz de Fora - MG.
- Como amostras controles positivo e negativo foram usadas as estirpes gentilmente cedidas pelo Dr. Helio Hehl Caiafa Filho do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (Tabela 1).

3.2. Manutenção das culturas e reativação

Todos os isolados obtidos foram estocados e conservados isoladamente em glicerol 16% (v/v). Foi feita uma concentração de células a 3500 rpm em centrífuga refrigerada SORVALL RT6000B e o sobrenadante

foi descartado. A massa de células foi ressuspensa em 2 mL de caldo brain heart infusion – Difco, EUA (BHI) fresco e distribuída em 2 microtubos contendo cada um 200µL de glicerol. Os tubos Eppendorfs foram identificados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a aproximadamente -80°C e -20°C.

A reativação das amostras foi realizada em 5 mL de caldo BHI a 37°C por 18 horas e as amostras repicadas em ágar BHI para incubação por 24 horas a 37°C.

3.3. Atividade de Coagulase

Para o plasma sanguíneo avaliar a atividade de coagulase foi obtido de coelhos, dos quais foi retirado sangue total que foi colocado em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e concentração final de 1%. Em seguida, os tubos foram centrifugados 2500 rpm por 10 minutos e o plasma retirado e estocado a -20°C, segundo Brito et al. (2001).

Tabela 1 - Linhagens controles, utilizadas neste trabalho, para genes de resistência a Vancomicina e Oxacilina.

Estipe	Controle
<i>Enterococcus faecium</i> NCTC 717	Controle positivo para o gene <i>vanA</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Controle negativo para o gene <i>vanA</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	Controle positivo para o gene <i>mecA</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Controle negativo para o gene <i>mecA</i>

Para utilização do plasma, o mesmo foi descongelado e diluído com solução salina 0,9%, estéril, na proporção 1:4 e alíquotas de 0,5 mL do plasma diluído foi colocada em cada tubo de ensaio estéril previamente identificado com o número da respectiva amostra. As amostras bacterianas foram retiradas do estoque, semeadas em ágar BHI e incubadas por 24 horas a 37°C.

Posteriormente, foi retirada uma colônia pura de cada isolado que foi inoculado no tubo de ensaio contendo o plasma diluído de coelho. Os tubos foram incubados a 35°C e a leitura visual feita entre 18-24 horas.

3.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A sensibilidade a antimicrobianos foi testada pelo método de Kirby-Bauer, de acordo com o manual National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2001. As bactérias foram ativadas por 18 horas a 37°C e diluídas em solução salina 0,85% até se obter uma turvação correspondente a 0,5 na escala de MacFarland correspondente a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL e espalhadas na superfície de placas contendo ágar Mueller-Hinton com um swab estéril em três direções diferentes.

Discos de papel-filtro com os antibióticos oxacilina, 1µg, cefoxitina, 30 µg e vancomicina, 30µg, foram colocados sobre a placa sob leve pressão. As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e os halos foram medidos, considerando o diâmetro total da zona de inibição em torno do disco. A interpretação dos halos foi feita de acordo com a tabela 2.

3.5. Pesquisa de β -lactamases das classes A e D

Para identificação de bactéria produtora de β -lactamase das classes A e D foi utilizada a metodologia de Double-disc synergism que utiliza antibióticos marcadores da possível presença da enzima (CLSI 2004). Utilizou-se uma placa de petri contendo ágar Muller-Hinton, previamente inoculada com o isolado a ser estudado, e ajustado para 0,5 na escala de MacFarland. Colocou-se no centro do ágar um disco de amoxicilina/ácido

Tabela 2 - Interpretação dos halos de sensibilidade, em milímetros, para os antibióticos Vancomicina 30 µg, Oxacilina 1 µg e Cefoxitina 30 µg, nos isolados de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos (CNS), segundo CLSI, 2007:

Antibiótico	<i>S. aureus</i>			CNS		
	R	I	S	R	I	S
Cefoxitina 30 µg	<21	-	>22	<24	-	>25
Oxacilina 1 µg	<10	-	>11	<17	-	>18
Vancomicina 30 µg	<14	-	>15	<14	-	>15

R= Resistente; I= Intermediário; S= Sensível

clavulânico 20/10 µg e, ao redor deste, os antimicrobianos marcadores cefotaxima, 30 µg; aztreonam, 30 µg; ceftazidima, 30 µg e ceftriaxone, 30 µg, na distância de 20 a 30 milímetros de centro a centro, em relação ao disco central. Após incubação por 19 horas ± 1 hora a 34°C ± 1°C, foi feita a interpretação do teste. A formação de uma zona fantasma entre qualquer antimicrobiano marcador e o disco contendo ácido clavulânico é positiva para a presença de β-lactamase das classes A e D.

3.6. Detecção dos genes de resistência *mecA* e *vanA* em *Staphylococcus*

Genes *mecA* e *vanA* codificadores das enzimas PBP (penicillin binding proteins) 2a e Ligase respectivamente, foram pesquisados por reação em cadeia de polimerase Multiplex.

3.6.1. Extração do DNA

Os DNAs das amostras bacterianas foram extraídos a partir de colônia pura de acordo com Ramos-Trujillo 2003.

As células de uma colônia de cada bactéria, cultivada em ágar nutriente, foram suspensas em 200µL de água purificada por Quantum TM EX MLLIPORE Ultapure Organex Cartridge, acrescida de 12,5 µL de proteinase K (Gibco, BRL) na concentração de 20mg/mL, em tubos Eppendorfs de 500 µL. Após incubação por 90 minutos a 65°C em banho maria Cole-Parmer modelo 1095-00 (Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, Illinois, USA), as amostras foram fervidas por 10 minutos em banho maria. Centrifugação a 8000 g por cinco minutos a 4°C em microcentrifuga refrigerada Sigma Laborzentrifugen foi feita para separar o sobrenadante contendo o DNA das células, que foi armazenado a -20°C.

3.6.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex

A presença dos genes *mecA* e *vanA* no DNA de cada isolado bacteriano foi prospectada a partir da PCR multiplex utilizando

oligonucleotídeos recomendados por Ramos-Trujillo 2003. As sequências dos primers estão descritas na tabela 3.

As reações de amplificação foram feitas em volumes finais de 25 µL e todos os reagentes utilizadas foram da marca Promega. Neste volume havia 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA); 10 µL de Tampão Go taq (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) com concentração final de 0,2mM; 1µL de cada deoxinucleosideo trifosfato dATP, dCTP, dTTP e dGTP com concentração de 0,2mM cada (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA); 3µL de cada primer de VanA (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) com concentração 1,5µM; 0,8 µL de cada primer de MecA (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) com concentração de 0,4 µM; 5 µL de DNA bacteriano e o restante do volume completado com água purificada estéril. A amplificação do DNA procedeu-se em termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc, com os seguintes ciclos: Desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos para amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 64° por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos) e outros 25 ciclos também para amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50° por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos) com uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos (Ramos-Trujillo 2003).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para pesquisa dos genes *mecA* e *vanA* com seus respectivos tamanhos de sequências esperados após amplificação.

Par de primers	Gene	5' →3' sequências	Tamanho do amplicon (pares de base)
VanA1/ VanA2	<i>vanA</i>	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	732
MecA1/MecA2	<i>mecA</i>	GTAGAAATGACTGAACGT CCGATAA CCAATTCCACATTGTTTC GGTCTAA	310

3.6.3. Eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação do DNA por PCR, 5 μ L da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% dissolvida em tampão TBE, constituído de 0,09 M de Tris-borato e 0,002 M de EDTA. A eletroforese durou aproximadamente 2 horas a 80volts na fonte Power Pac Basic 041 BR 150Va da Biorad. A revelação do gel foi feita em brometo de etideo 1 μ g/mL por 20 minutos e visualizado sob radiação ultravioleta no Eagle eye II, Stratagene. Os resultados foram registrados como presença ou ausência de bandas correspondentes a DNA do tamanho esperado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram caracterizados 264 isolados de gênero *Staphylococcus*, sendo 57 provenientes de salame tipo italiano fermentado, 112 originado de espécimes clínicos humanos e 95 de vacas com mastite.

4.1. Características das bactérias da família Micrococcacea pertencentes ao gênero *Staphylococcus* isoladas de salame fermentado, hospitais e de mastite bovina, quanto à presença da enzima coagulase.

Os resultados do teste da coagulase estão apresentados na tabela 4. Este teste foi executado para classificar os *Staphylococcus* spp de suas respectivas origens e, previamente identificados pela classificação de Gram e teste da catalase, em *S. aureus* (coagulase positivo) e CNS, *Staphylococcus* coagulase negativos.

Tabela 4 – Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* de diferentes origens quanto à presença de enzima coagulase.

Origens (Nº)	Salame fermentado	Mastite bovina	Espécimes clínicos humanos
Característica	57	95	112
Coagulase -	89,5%	32,5%	52,7%
Coagulase +	10,5%	68,5%	47,3%

Como pode ser observado na Tabela 4, há um grande predomínio de CNS em salame fermentado, uma vez que estas bactérias são utilizadas na indústria alimentícia como cultura starter no processo fermentativo de alimentos derivados de carne, ou fazem parte da fermentação natural destes alimentos como o salame (Aymerich et al., 2003). Os CNS, caracterizados principalmente por *Staphylococcus xylosus*, estão sendo universalmente aceitos como cultura starter por participar de reações desejáveis que ocorre durante a maturação dos salames fermentados, conferindo aos mesmos, um flavor e coloração atraentes para o consumo humano (Martin et al., 2005). *S. aureus* é um microorganismo que se desenvolve bem em salames

fermentados devido à concentração salina ideal deste alimento, e é indicativo de contaminação do produto alimentício, podendo estar relacionado, assim como os CNS, com problemas de intoxicação alimentar humana devido a presença de vários genes de enterotoxinas estafilocócicas (Oliveira, 2006).

De maneira consistente, aproximadamente dois terços dos 95 isolados com origem mastítica apresentam-se coagulase positivos (Tabela 4). *S. aureus* tem sido relatado como principal agente causador de mastite (Freitas et al., 2005), embora os CNS sejam hoje considerados também importantes agentes etiológicos causadores dessa doença em bovinos (Gentilini, 2002). Nader Filho, 1985 relatou uma prevalência de 11,3% e 52,1% de CNS e *S. aureus*, respectivamente, como causadores de mastite bovina. Vianni (1992), descreveu que das amostras de leite de vacas acometidas de mastite, *S. aureus* estava presente em 52,2% e os CNS em 16,6%.

Os isolados clínicos humanos, apresentaram um equilíbrio entre as quantidades de amostras CNS e *S. aureus*, mostrando que ambas podem estar relacionadas como importantes causadores de infecção hospitalar, embora os CNS sejam considerados microrganismos comensais da microbiota humana e atuando, nestes casos, como um patógeno oportunista (Lowy, 2003). Já *S. aureus* é um dos principais causadores de infecções hospitalares, resistentes a um grande número de antibióticos e frequentemente obtidos de pacientes internados (Lowy, 2003).

4.2. Perfil de sensibilidade dos isolados bacterianos quanto aos antimicrobianos oxacilina, cefoxitina e vancomicina pelo método de difusão em disco

O teste de difusão em disco, também conhecido como antibiograma, foi realizado utilizando 3 antibióticos: oxacilina, cefoxitina e vancomicina (Figura 1). Para detectar resistência à vancomicina foi utilizado o próprio antibiótico na concentração de 30 µg. Já para a resistência à oxacilina foram testados os dois outros antibióticos, oxacilina 1 µg e cefoxitina 30 µg. Até 2004 o CLSI/NCCLS recomendava o uso de oxacilina 1 µg para avaliar a resistência por este método, porém após 2004, passou a recomendar o uso

do disco de cefoxitina 30 µg para prever a susceptibilidade. Por este motivo, neste trabalho foram testados os dois antibióticos para avaliar se há alguma diferença no diagnóstico de resistência com relação a estes antibióticos (CLSI, 2007). O teste de disco difusão é o método mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica por sua fácil e rápida execução e pelo baixo custo, embora seja o menos confiável para a detecção da resistência à



Figura 1 - Representação das placas após incubação das amostras por 24 horas a 35-37°C com os 3 antibióticos: oxacilina 1 µg, cefoxitina 30 µg e vancomicina 30 µg. (A região mais clara representa o halo de sensibilidade).

oxacilina e vancomicina (York, 1996). Apresenta baixa especificidade quando comparado com outros testes, como descrito no trabalho publicado por Hussain et al. (2002), onde foi utilizado disco de 1 µg de oxacilina e seguidas às recomendações do CLSI/NCCLS.

Das 57 amostras de salame fermentado, apenas uma foi resistente à oxacilina e cefoxitina e todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, por esta técnica. Embora haja baixa incidência de amostras resistentes em alimento fermentado, é importante salientar o possível risco dessas bactérias atuarem como reservatórios de determinantes de resistência a antibióticos

com a possibilidade de transmissão para comensais e patógenos humanos (Martin et al., 2005).

Para as amostras de origem bovina, dos 95 isolados, 65 eram *S. aureus*, e destes 8 (13%) resistentes a oxacilina e cefoxitina, e 30 CNS, sendo 6 (20%) resistentes a oxacilina e cefoxitina (Figura 2). Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina (Figura 2). De acordo com esses resultados, notamos que há uma significativa resistência desses microorganismos à oxacilina e uma manutenção dos níveis de resistência à vancomicina quando comparados com resultados anteriores como no trabalho de Brito et al., 2001, onde relatou-se que das 112 amostras de *S. aureus* isoladas de infecções intramamária bovina, todas foram sensíveis à oxacilina, e no trabalho realizado por Freitas et al., 2005, 59 amostras de *Staphylococcus spp*, sendo 52 *S. aureus* e 7 CNS, isolados de mastite bovina, 100% foram sensíveis à vancomicina, enquanto apenas 65% foram susceptível à oxacilina.

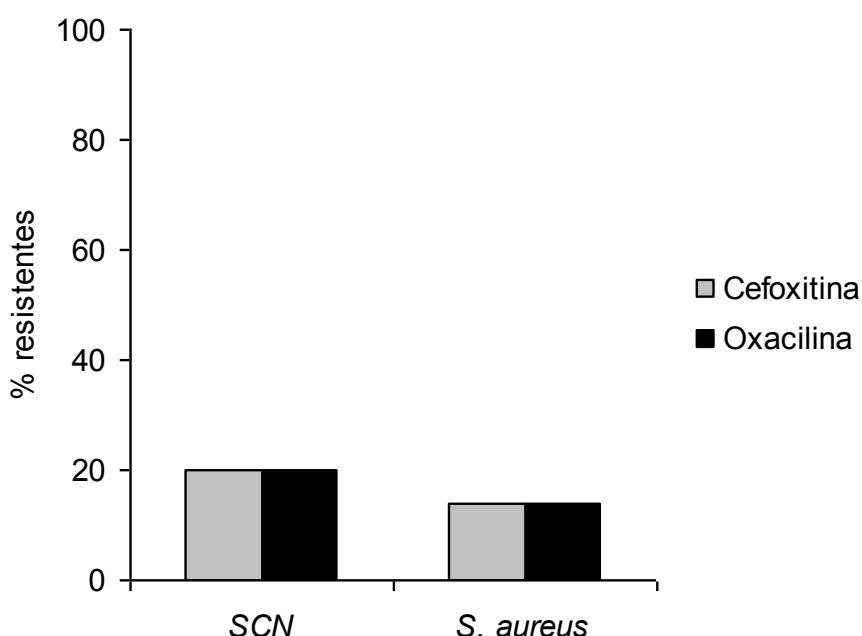


Figura 2 – Percentual de *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase Negativos (CNS) resistentes a oxacilina e cefoxitina originados de vacas com mastite. O percentual de resistência dessas bactérias para o antibiótico vancomicina foi de 0%

Analisando os resultados de resistência a oxacilina e vancomicina em isolados clínicos humanos, observamos que das 112 amostras, 53 são *S. aureus*, sendo 52 cefoxitina e oxacilina resistentes e dos 59 CNS, 51 são cefoxitina e oxacilina resistentes (Figura 3). Cem por cento dos isolados foram sensíveis à vancomicina segundo esta metodologia (Figura 3). Estes resultados refletem o nível de resistência à oxacilina em hospitais mundiais e justificam o porquê desta resistência já ser considerada um problema endêmico mundial (Lowy, 2003).

Levantamento feito de janeiro de 1990 a maio de 1999, nos Estados Unidos, indicou que os CNS são isolados de infecções em pacientes internados com maior frequência, 37,3%, que os *S. aureus*, 12,6% (Richards, 1999). Nos hospitais dos Estados Unidos, o percentual de MRSA passou de 4% em 1980 para 55% em 2001. Na Europa, como Dinamarca, Alemanha e outros países, a prevalência é de 1%, enquanto na região central e sudeste europeu os níveis de MRSA encontrados chegam a 10% e 30% respectivamente (Richards, 1999). Em um hospital de Caxias do Sul, RS, Brasil, foram analisadas 214 amostras de *S. aureus* de 194 pacientes, sendo encontrados 32,7% resistentes a oxacilina e nenhuma resistente à vancomicina (Spiadorello et al., 2000). No México, houve um aumento na resistência a oxacilina em *S. aureus* de 7% em 1989 para 20% em 1998 (Vlazquez-Meza, 2005).

Os perfis de susceptibilidade a drogas de 120 isolados clínicos bacterianos, sendo 58 *S. aureus*, 23 *S. epidermidis* e 39 *Staphylococcus* spp recuperados de pacientes de diversas enfermarias do Hospital Universitário de Juiz de Fora, foram avaliados. Nenhuma delas foi resistente à vancomicina, mas, apesar da eficácia deste antimicrobiano, 18% das amostras apresentaram resistência intermediária à vancomicina. (Larcher et al., 2002).

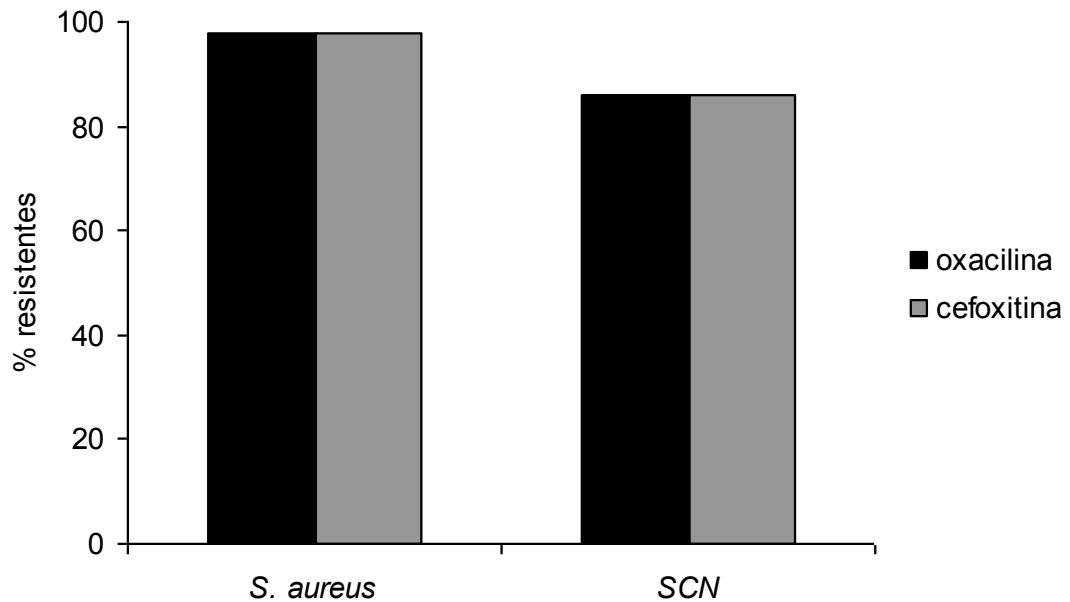


Figura 3 - Percentual de *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase Negativos (CNS) resistentes a oxacilina e cefoxitina originados de espécimes clínicos. O percentual de resistência dessas bactérias para o antibiótico vancomicina foi de 0%

Já com relação à vancomicina, foram relatados no Brasil, apenas 4 isolados de *S. aureus* resistentes, sendo ainda, uma tipo de resistência de baixa frequência. Mas, o uso contínuo deste antibiótico, nos tratamento de infecções causadas por MRSA e MR-CNS, poderá levar a um perfil de resistência maior, podendo chegar ao nível da resistência à oxacilina. Por isso, é importante conhecer os determinantes destas resistências, para tentar controlá-las, erradicá-las e evitar seu aumento.

4.3. Genes de resistência *vanA* e *mecA* em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos provenientes de salame fermentado, vacas com mastite e espécimes clínicos

A pesquisa da presença dos genes de resistência a vancomicina e oxacilina, *vanA* e *mecA*, respectivamente, por meio da técnica de PCR, está representada na Figura 5. Os resultados positivos para *vanA* foram

considerados quando o amplicon obtido apresentava tamanho equivalente a 732 pb, correspondente ao do controle *E. faecium* NCTC 717, como representado na ala nº 2 na Figura 4. Os resultados positivos para *mecA* foram considerados quando o amplicon obtido apresentava tamanho equivalente a 310 pb, correspondente ao do controle *S. aureus* ATCC 33591, como representado na ala nº 4 na Figura 4.

Dentre todos os isolados derivados de salame fermentado, nenhuma amostra apresentou os genes de *mecA* e *vanA* mostrando que, apesar da possibilidade de essas bactérias atuarem como reservatório de genes de resistência, tal fato ainda não foi comprovado com relação a estes determinantes genéticos de resistência pesquisados (Tabela 5).

Do mesmo modo, das amostras provenientes de vacas com mastite bovina, apenas duas, sendo um *S.aureus* e um CNS possuíam o gene *mecA*, representando uma percentagem de 1,5% e 3,3% respectivamente do total destas amostras e nenhuma amostra apresentou o gene *vanA* (Tabela 5). O uso da avoparcina, um aditivo alimentar dado a bovinos e análogo dos glicopeptídeos, a resistência à vancomicina não foi detectada por este método também.

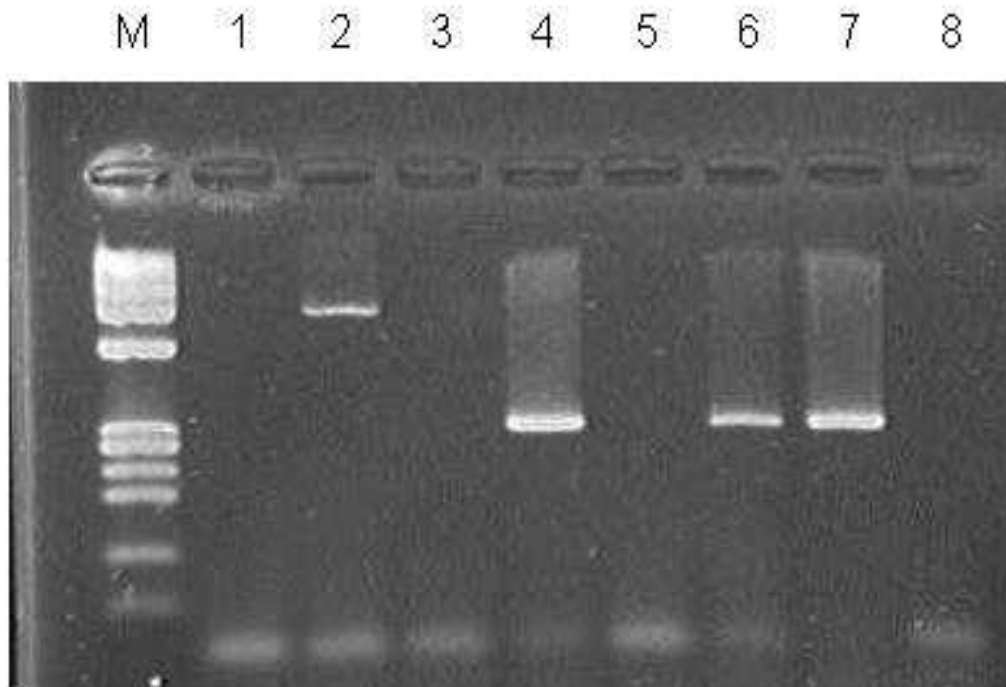


Figura 4: Representação das amostras bacterianas quanto a presença dos genes *vanA* e *mecA*. (M: marcador de 100 pb); 1: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 - Controle negativo na PCR para *vanA*; 2: *Enterococcus faecium* NCTC 717 - Controle positivo na PCR para *vanA* 732 pb; 3: Representação de todas as amostras negativas na PCR para *vanA*; 4: *S.aureus* ATCC 33591 – Controle positivo na PCR para *mecA* 310 pb; 5: *S.aureus* ATCC 29213 – Controle negativo na PCR para *mecA*; 6: Representação das amostras de mastite bovina positivas na PCR para *mecA*; 7: Representação das amostras clínicas humanas positivas na PCR para *mecA*; 8: Representação de todas as amostras negativas na PCR para *mecA*.

Alguns análogos de glicopeptídeos, como a avoparcina, eram usados como promotor de crescimento em bovinos, com isso em 1994 surgiram os *Enterococcus spp* resistentes a glicopeptídeos como a vancomicina que foram isolados de ração animal e fezes de bovinos na Inglaterra, Alemanha e Dinamarca (Woodford, 1995). Isto sugeriu que os alimentos derivados de carne e o próprio animal atuariam como reservatório para bactérias

resistentes aos glicopeptídeos, podendo ser disseminados para humanos via cadeia alimentar ou contato direto com animal (Henrik, 2003). Assim, há uma preocupação quanto a esta possibilidade porque essas bactérias seriam resistentes a drogas normalmente usadas no tratamento humano (Henrik, 2003).

Considerando as amostras clínicas humanas, observamos uma alta incidência do gene *mecA* em bactérias presentes em ambiente hospitalar, Tabela 5, devido, provavelmente ao uso desta droga em pacientes.

Analisando a frequência do gene *mecA* dentro do gênero *Staphylococcus* de amostras clínicas humanas, observa-se um predomínio deste gene em *S.aureus* (Tabela 6). O gene *mecA*, é uma seqüência de 2131 pb de DNA de origem não estafilocócica, sendo transferido lateralmente para diferentes espécies de *Staphylococcus* (Hiramatsu et al.; 1997), atua na síntese de uma proteína de 76 KDa PBP, que podem ser de quatro tipos: PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4. As estirpes MRSA expressam uma nova PBP, a PBP2a ou 2', adquirida de outras espécies de CNS e codificada pelo gene *mecA*. Esta PBP2a mostra baixa afinidade, não apenas à meticilina e à oxacilina, mas praticamente a todos os antibióticos β -lactâmicos (Fuchs, 1994).

Tabela 5: Distribuição de *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase Negativos (CNS), provenientes de salame fermentado, vacas acometidas de mastite e espécimes clínicos humanos quanto a presença do gene *mecA* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Origens (Nº)	Salame fermentado (57)	Mastite bovina (95)	Clinica humana (112)
Característica			
<i>mecA</i> positivo	0	2	67
(%)	0	2,1	60

Tabela 6: Distribuição de *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase Negativos (CNS), provenientes de espécimes clínicos humanos, positivos para a presença do gene *mecA* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

	<i>S. aureus</i>	CNS
Total de amostra	53	59
<i>mecA</i> positivo	35	32
%	66	54

Como este gene faz parte de um cassete cromossomal estafilocócico, este determinante genético pode ser facilmente transferido de um indivíduo para outro podendo causar sérios danos à saúde do paciente e até mesmo à comunidade (Lowy, 2003). Hoje este tipo de resistência já está associado não apenas ao ambiente hospitalar, mas também à comunidade em geral, apresentando um risco à população comum e podendo colonizar animais como os bovinos através da manipulação de humanos colonizados e/ou infectados (Naimi, 2003).

Nos isolados humanos, apesar do maior uso da vancomicina em função do tratamento de infecções provocadas por MRSA e MR-CNS, também não foi encontrado o gene *vanA*, coerentemente com os resultados de teste de difusão em disco.

4.4. Pesquisa das enzimas β lactamases das classes A e D.

Um outro mecanismo de resistência aos antibióticos β lactâmicos, além do fenótipo MecA, é pela produção, por parte das bactérias, de enzimas β -lactamases. As penicilinas semi-sintéticas, como a oxacilina, foram criadas para serem resistentes a estas enzimas, porém as bactérias que produzem outras β -lactamases, chamadas de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) passaram a ser selecionadas pelo uso de antibióticos da classe dos β -lactâmicos (Bush, 2001). Estas enzimas são classificadas, segundo Ambler et al., 1991, em 4 classes: A, B, C, D, sendo as das classes A (serina- β -lactamases) e D (oxacilinas) produzidas também por bactérias do gênero *Staphylococcus* (Bush, 2001). Por isto, foi realizada a pesquisa

deste mecanismo de resistência em todos os isolados pelo método preconizado pelo NCCLS/CLSI, 2004 (figura 5). Os resultados são expressos de acordo com a origem da amostra.

Nas amostras de salame fermentado, apenas uma de CNS, que já tinha resultado de Resistente para o teste de difusão de disco tanto para oxacilina quanto cefoxitina, apresentou teste positivo para presença de ESBLs. Nenhum *Staphylococcus* provenientes desta fonte apresentou o gene *mecA*. Sendo assim, confirmamos a presença de um isolado resistente e seu mecanismo de resistência. Essas enzimas responsáveis pela resistência são codificadas por plasmídeos, que são elementos genéticos extra-cromossomais e potencialmente transmitido para outras bactérias, por conjugação (Dalmarco et al., 2006). Há possibilidade de um alimento que possui tal bactéria resistente transmitir este microrganismo e este o seu determinante de resistência para comensais humanos como CNS ou até mesmo patógenos como *S. aureus*.

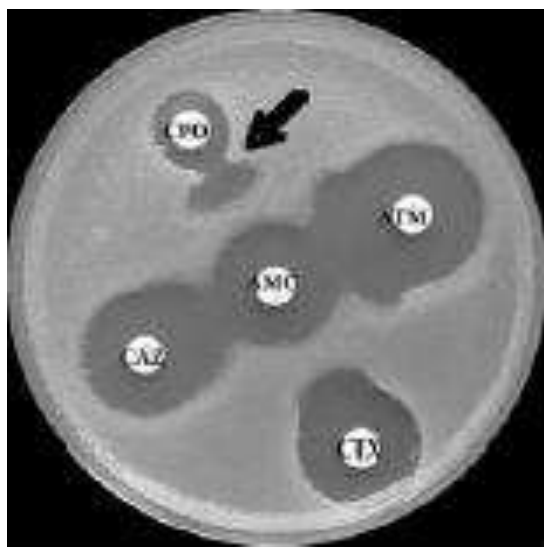


Figura 5 - Exemplificação da metodologia de aproximação do Disco (pesquisa de β -lactamases das classes A e D de Ambler). AMC= amoxicilina + ácido clavulânico; CTX= Cefotaxima; ATM= Aztreonam; CAZ= Ceftazidima; CPO= Ceftriaxone. A seta negra, demonstra o aparecimento da Zona Fantasma ou “Ghost Zone”, que caracteriza a produção de β -lactamases pelo isolado bacteriano estudado.

Já nas amostras de mastite bovina, oito *S. aureus* e seis CNS apresentaram resistência a cefoxitina e oxacilina pelo teste de difusão em disco. Das oito *S. aureus*, um possuía o gene *mecA* e outros seis isolados diferentes apresentaram teste positivo para pesquisa de ESBLs. Seis CNS, um possuía o gen *mecA* e outros cinco diferentes presença de ESBLs. Assim, notamos o predomínio de ESBLs como mecanismo de resistência nestes isolados e percebemos que apenas um isolado de *S. aureus* que foi resistente pelo teste de difusão em disco não teve seu mecanismo elucidado, sugerindo que seja uma linhagem MODSA ou algum outro de mecanismo de resistência como bomba de efluxo.

Na amostras de origem humana, obteve-se um resultado diferente daqueles de origem alimentar e animal. Dos 53 *S. aureus*, sendo 52 resistentes a cefoxitina e oxacilina, 35 possuíam o gene *mecA* e 31 possuíam atividade de ESBL, sendo que 19 tiveram ambos mecanismos de resistência, 12 apresentam apenas ESBL e 16 apenas *mecA* (figura 6). Com estes resultados, observa-se um predomínio da presença de gene *mecA* como possível responsável pela resistência, nota-se também que um mesmo isolado possuía no mínimo 2 tipos diferentes de determinantes de resistência, isto provavelmente pela exposição aos antibióticos que estas bactérias têm em casos clínicos. Por outro lado, cinco *S. aureus* foram resistentes a oxacilina e cefoxitina, pelo método de difusão em disco, mas não tiveram seu mecanismo de resistência elucidado sugerindo ser linhagem MODSA (York, 1996).

Com relação aos 59 CNS isolados de humanos, 51 foram resistentes à cefoxitina e oxacilina, sendo que, desses, 32 possuíam o gene *mecA*, 40 atividade de ESBL, 21 apresentam ambos os tipos de resistência, 11 possuem apenas *mecA* e 19 apenas atividade de ESBL (figura 7).

Com estes resultados observamos que mesmo sendo de uma mesma origem, os isolados de espécimes diferentes apresentaram tipos de resistência diferentes. Nos isolados *S. aureus* predominou o gene *mecA*, já nos CNS a presença de β -lactamases, além da presença de isolados com no mínimo 2 tipos de resistência a β -lactâmicos diferentes. Nestes isolados, todos tiveram seu mecanismo de resistência elucidado.

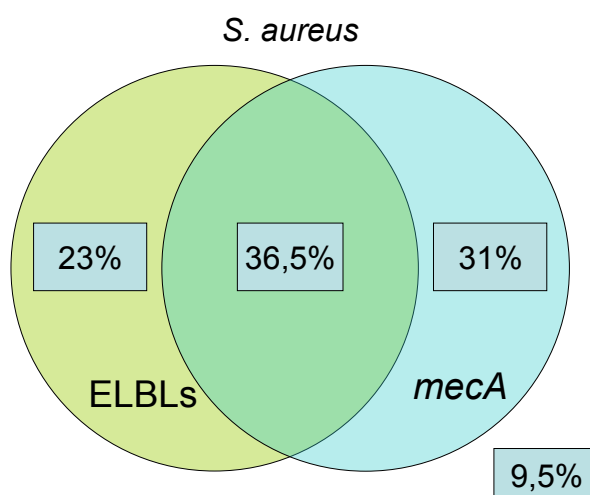


Figura 6 – Mecanismos de resistência à oxacilina referentes às amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de espécimes clínicos humanos. A taxa de 9,5% é referente aos isolados que não tiveram seu mecanismo de resistência elucidado neste trabalho.

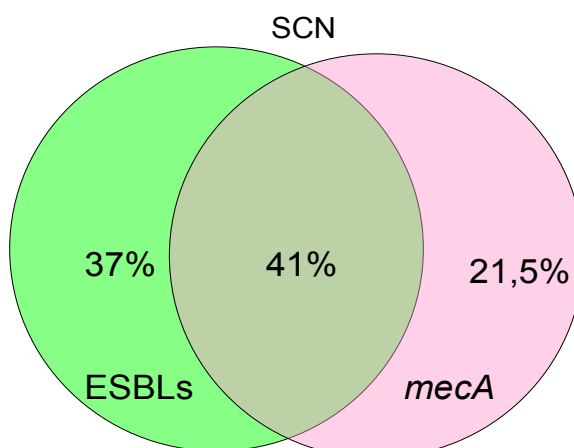


Figura 7 – Mecanismos de resistência à oxacilina referente as amostras de Estafilococos Coagulase Negativos (CNS) isoladas de espécimes clínicos humanos.

5. CONCLUSÕES

- O teste de difusão em disco permitiu a caracterização da resistência a oxacilina e vancomicina, e quase todos os resistentes por este método, tiveram seus mecanismos de resistência elucidados.
- Os resultados de resistência a β -lactâmicos usando-se discos de oxacilina e cefoxitina mostram-se equivalentes, podendo, para *Staphylococcus*, serem usados indistintamente.
- Foi observada diferença entre determinantes de resistência dependendo da origem das amostras, ou seja, para as de salame fermentado, o único isolado resistente foi por produção de ESBL; nos isolados de CNS e *S. aureus* de mastite bovina e nos CNS de ambiente hospitalar, houve predomínio de isolados resistentes por produção de ESBL; por outro lado, os *S. aureus* clínicos humanos, houve predomínio de resistência mediado pela presença do gene *mecA*
- Os isolados clínicos humanos e de mastite bovina apresentaram mais de um mecanismo de resistência, enquanto que os *Staphylococcus* provenientes de salame fermentado apenas um tipo de mecanismo de resistência foi encontrado.
- A resistência à vancomicina não prevalece nos isolados estudados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A resistência à oxacilina prevalece nos isolados pesquisados, devido, provavelmente, ao uso de antibióticos, principalmente da classe dos β -lactâmicos, em casos clínicos humanos e na medicina veterinária.
- Se o uso de glicopeptídeos continuarem a aumentar, como no tratamento preferencial nas infecções causadas por MRSA e CNS-MR, possivelmente os isolados resistentes à vancomicina começarão a surgir com mais frequência causando danos ainda maiores para a população humana e veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP F. WEGENER H. 1999. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. **Microbiology Infection**. 1, 639-644.
- AMBLER, R., P. 1980. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lond (Biol)**. 289, 321-331.
- AYMERICH T, MARTIN B, GARRIGA M, HUGAS M. 2003. Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. **Applied and Envir. Microbiology**, 69, 4583-4594.
- BERGDOLL MS - Foodborne Bacterial Pathogens, 1989
- BRATU, S. Community-associated Methicillin-resistant *S. aureus* in Hospital Nurse and Maternity Units. 2005. **Emerging Infectious Diseases**. 11. 808-812
- BRITO, MAVP; BRITO, J.R.F., SILVA, M.A.S., CARMO, R.A. 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina veterinária e Zootecnia**. 53. 10-17

- BUSH, K. 2001. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infection Disease**. 1. 32, 1085-1089.
- CATRY B. LAEVENS H. DEVRIESE L. 2003. Antimicrobial resistance in livestock. **Journal Vet Pharmacol Ther**. 26, 81-93.
- CHAMBERS, H.F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical microbiology reviews** 10, 781-791.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2007. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**. 2th ed. CLSI.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2004. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**. 1th ed. CLSI.
- COPPOLA, S., MAURIELLO, G., APONTE. M., MOSCHETTI, G., e VILLANI, F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami. A Southern Italian fermented sausage. **Meat Science**, 56, 321-329.
- COSTA E, O. importância da mastite na produção leiteira do Brasil. 1998. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. 1. 3-9
- DALMARCO, E.M.; BLATT,S.L. CORDOVA,C.M.M. 2006. Identificação Laboratorial de β -lactamases de Espectro Estendido. **RBAC**. 38, 171-177.
- DEMEYER, D. I., HOOZE, J., MESDOM, H., 1974. Specificity of lypolisis during dry sausage ripening. **Journal Food Science**. 39, 293-296.

- EINSENSTEIN, B.I. e SCHAECHTER, M. 1994. Biota microbiana normal. In Microbiologia. **Mecanismo de lãs Enfermedades Infecciosas**, 2nd edn. Pp. 36-46. Barcelona, Spain: Panamericana.
- FINES M. 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *E. faecalis* BM4405. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43, 1261-2164.
- FLORENCE, D., PERICHON, B., PATRICE, C. 2004. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. **Journal Clinical Microbiology.** 12, 5857-5860.
- FUCHS, L., Y. 1994. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. **Salud Publica Mexico.** 36, 428-438.
- FREITAS, MFI. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase-positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, 72, 2, 171-177.
- FRIDKIN, S.K. 2003. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. **Clinical Infection Disease.** 36, 429-439.
- GARCIA-VARONA, M., SANTOS, E.M., JAIME, I., ROVIRA, J. 2000. Characterization of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. **International Journal Food Microbiology**, 54, 189-195.
- GENTILINI, E. Antimicrobial susceptibility coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. 2002. **Journal of Dairy Science.** 85. 1913-1917

- GREGORY, P. D. 1997. Studies of the repressor (Blal) of β -lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Microbiol.** 24, 1025-1037
- HANAOKI, H. 1998. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. **Journal Antimicrob Chemother.** 42, 315-320. a
- HANAOKI, H. 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu 50. **Journal Antimicrob Chemother.** 42, 199-209. b
- HENRIK, C.W. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology.* 6,439-445.
- HERZBERG O. 1990. Refined crystal structure of β -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.0 Å Resolution. **Journal Molecular Biology.** 217,1-18
- HIERRO, E., DE LA HOZ, L., ORDÓÑEZ, J.A., 1997. Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the lipolysis of dry fermented sausages. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2989-2995.
- HIERRO, E., DE LA HOZ, L., ORDÓÑEZ, J.A., 1999. Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the free amino acid and amine contents of dry fermented sausages. **Journal Agric. Food Chem.** 47, 1156-1161.
- HIRAMATSU, K.; OKUMA, K., MA, X.X., YAMAMOTO., HORI., KAPI, M. 2002. New trends in *S. aureus* infections: glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community. **Current Opinion in Infectious Diseases.** 15, 407-413.

- HIRAMATSU, K., ARITAKA, N., HANAKI H. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**. 350, 1670-1673.
- HEROLD B.C. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* in children with no identified predisposing risk. **JAMA**. 279. 593-598
- HUEBNER, J., GOLDMANN, D. A. Coagulase negative staphylococci: Role as pathogens. **Annual Review of Medicine**, 50, 223-236, 1999.
- HUSSAIN, Z. et.al. 2002. 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**. 40. 6. 2251-2253.
- ITO T. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 1999. **Antimicrob Agents Chemother**. 43. 1449-1458.
- JARVIS, W.R. e MARTONE, W.J. 1994. Predominant pathogens in hospital infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 29 (Suppl. A), 19-24.
- JELJASZEWICZ, J., MLYNARCZYK, G., MLYNARCZYK, A. 2000. Antibiotic resistance in gram-positive cocci. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 16, 473-478.
- JEOVONS, M. P. 1961. **Brit. Medic. Journal**. 1, 124-125
- KLARE, I. 1997. Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible high-level resistance to glycopeptides. **FEMS Microbiol. Lett**. 106, 23-30.

- LEVY S. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. **Nature**. 1976,260, 40-42.
- LEVY, S. Multidrug resistance – a sign of the times. 1998. **N Engl J Med**, 338, 1376-1378.
- LYON. B. R. 1984. Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus aureus* in Australian hospitals. **Journal Medic. Microbiol.** 17, 79-89.
- LOWY, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**. 111, 1265-1273.
- LOWY, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N. England. **Journal. Medic.** 339, 520-532
- MADGWICK, P., J. 1987. Structure and site-directed mutagenesis. **Biochemiq Journal** 248, 657-662.
- MARTIN, B., GARRIBA, M., HUGAS, M., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T. e AYMERICH, T. 2006. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, 107 . 148-158.
- MIRALLES, M.C., FLORES, J., PEREZ-MARTINEZ, G. 1996. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. **Food Microbiology**, 13, 227-236.
- MLYNARCZK, A. 1998. Genome in *Staphylococcus aureus*: a review. **Zentb1 Bakteriол.** 287, 277-314.

- MYLOTTE, J.M., et al. 1987. Prospective study of 114 consecutive episodes of *S. aureus* bacteremia. **Revist. Infection. Disease** . 9, 891-907.
- NAIMI, T.S. 2003. Comparison of community and health care-associated methicillin-resistant *S. aureus* infection. **JAMA**.290. 2976-2984.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 2001. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**. 8th ed. Wayne, Approved Standard: M2-A7 e Supplement M100-S9. NCCLS.
- RICHARDS, MJ. 1999. Nosocomial Infections in Pediatric Intensive Care Units in the United States.NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. **(NNIS)**.
- NADER FILHO, A. 1985. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesq. Veterinária brasileira**. 5. 2, 53-56.
- OLIVEIRA,IHT. 2006. Caracterização bioquímica de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano para uso como culturas *starter*: atividade antagonista, atividade de catalase e de nitrato redutase e produção e degradação de aminas biogênicas.100p. **Dissertação** (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.
- PERICHON, B., FLORENCE, D., PATRICE, C. 2004. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. **Journal Clinical Microb**. 12, 5857-5860
- PEACOCK SJ, SILVA I, LOWY FD. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? **Trends Microbiology**. 9:605–610

- RAMOS-TRUJILLO, E. 2003. Multiplex PCR simultaneous detection of enterococcal genes *vanA* and *vanB* and staphylococcal genes *mecA*, *ileS-2* and *femB*. **Journal International Microbiology**. 6, 113-115.
- REYNOLDS, P.E. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **Europe Journal Clinical Microbiology Infection Disease** 43-950.
- SALGADO, C.D. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *S. aureus*: a meta-analyses of prevalence and risk factors. **Clinical Infection Disease**. 36.131-139
- SKINNER D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. 1997. **Archives International Medical**. 851-875
- SNEATH, P. H. A. Editor; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E., **Associate editors**. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol. 2. Williams e Wilkins, Baltimore, 1023 p., 1986.
- SONDERGAARD, A. K., e STAHNKE, L. H. 2002. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum* a comparative study in model systems. **International Journal of Food Microbiology**, 75, 99-109.
- SUNDSFJORD, A., SIMONSEN, G.S., HALDORSEN, BC., HAAHEIM, H., HJELMEVOLL, S., LITTAUER., DAHL, K.H. 2004. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **APMIS**. 112, 815-837.
- SPIADORELLO W.P. The resistance of *Staphylococcus aureus* to oxacilin in a Caxias do Sul hospital. 2000. **AMRIGS**. 44. 120-124

- TENOVER, F. C. 2000. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: An overview. **Clinical Infection Disease**, 33, 108-115.
- TOLLEFSON L. 2004. Developing new regulatory approaches to antimicrobial safety. **Journal veterinary medicine**. 51, 415-418.
- VIANNI, M. 1992. Frequência de isolamento de estafilococos coagulase negativos e coagulase positivos na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção láctea. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. 15. 2, 187-192.
- VLASQUEZ-MEZA M.B. 2005. **Salud Public Mex**. 47. 381-387
- ZHANG, H.Z. 2001. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. **Science**. 291, 1962-1965.
- YORK, M. K. 1996. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicilin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. 34. 2, 249-253.
- WOODFORD, N. 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance, **Clinical Microbiology Revist**. 8, 585-615.

Anexo: Resultados de todos os testes realizados no trabalho:

Todos os resultados estão expressos na tabela do anexo 1 do trabalho. As amostras foram identificadas em ordem numérica, sendo que as de salame fermentado representam de 1 à 60; de ambiente hospitalar 61 à 201 e de mastite bovina de 202 à 305.

S= Sensível; R= Resistente; neg= negativo; pos= positivo; + (positivo); - (negativo).

Nº	Coagulase	Vancomicina	Oxacilina	Cefoxitina	<i>mecA</i>	<i>vanA</i>	ESBL
1	-	S	S	S	neg	neg	neg
2	-	S	S	S	neg	neg	neg
3	+	S	S	S	neg	neg	neg
4	-	S	S	S	neg	neg	neg
5	-	S	S	S	neg	neg	neg
6	-	S	S	S	neg	neg	neg
7	-	S	S	S	neg	neg	neg
8	-	S	S	S	neg	neg	neg
9	-	S	S	S	neg	neg	neg
10	-	S	S	S	neg	neg	neg
11	-	S	S	S	neg	neg	neg
12	-	S	S	S	neg	neg	neg
13	-	S	S	S	neg	neg	neg
14	+	S	S	S	neg	neg	neg
15	-	S	S	S	neg	neg	neg
16	+	S	S	S	neg	neg	neg
17	-	S	S	S	neg	neg	neg
18	+	S	S	S	neg	neg	neg
19	-	S	S	S	neg	neg	neg
20	-	S	S	S	neg	neg	neg
21	-	S	S	S	neg	neg	neg
22	-	S	S	S	neg	neg	neg
23	-	S	S	S	neg	neg	neg
24	-	S	S	S	neg	neg	neg
25	-	S	S	S	neg	neg	neg
26	-	S	S	S	neg	neg	neg
27	-	S	S	S	neg	neg	neg
28	-	S	S	S	neg	neg	neg
29	-	S	S	S	neg	neg	neg
30	-	S	S	S	neg	neg	neg
31	-	S	S	S	neg	neg	neg
32	-	S	S	S	neg	neg	neg
33	-	S	S	S	neg	neg	neg
34	-	S	S	S	neg	neg	neg
35	-	S	S	S	neg	neg	neg

36	-	S	S	S	neg	neg	neg
37	-	S	S	S	neg	neg	neg
38	+	S	S	S	neg	neg	neg
39	+	S	S	S	neg	neg	neg
41	-	S	S	S	neg	neg	neg
42	-	S	S	S	neg	neg	neg
43	-	S	S	S	neg	neg	neg
44	-	S	S	S	neg	neg	neg
45	-	S	S	S	neg	neg	neg
46	-	S	S	S	neg	neg	neg
47	-	S	R	R	neg	neg	pos
48	-	S	S	S	neg	neg	neg
49	-	S	S	S	neg	neg	neg
50	-	S	S	S	neg	neg	neg
51	-	S	S	S	neg	neg	neg
52	-	S	S	S	neg	neg	neg
53	-	S	S	S	neg	neg	neg
54	-	S	S	S	neg	neg	neg
55	-	S	S	S	neg	neg	neg
56	-	S	S	S	neg	neg	neg
59	-	S	S	S	neg	neg	neg
60	-	S	S	S	neg	neg	neg
62	+	S	R	R	neg	neg	pos
65	+	S	R	R	pos	neg	neg
68	-	S	R	R	pos	neg	pos
69	+	S	R	R	neg	neg	neg
70	+	S	R	R	pos	neg	neg
71	+	S	R	R	pos	neg	neg
72	+	S	R	R	pos	neg	neg
75	+	S	R	R	pos	neg	neg
76	+	S	R	R	pos	neg	neg
79	+	S	R	R	pos	neg	pos
82	+	S	R	R	pos	neg	pos
84	-	S	R	R	pos	neg	pos
85	+	S	R	R	neg	neg	pos
86	+	S	R	R	pos	neg	neg
87	+	S	R	R	neg	neg	pos
88	+	S	R	R	pos	neg	pos
89	+	S	R	R	pos	neg	neg
90	+	S	R	R	pos	neg	pos
91	+	S	R	R	neg	neg	pos
92	-	S	R	R	neg	neg	pos
93	+	S	R	R	neg	neg	pos
95	-	S	S	S	neg	neg	neg
96	-	S	S	S	neg	neg	neg
97	+	S	R	R	pos	neg	pos
98	-	S	S	S	neg	neg	neg
100	-	S	S	S	neg	neg	neg

101	+	S	R	R	pos	neg	pos
104	+	S	R	R	pos	neg	pos
105	-	S	R	R	pos	neg	pos
106	+	S	R	R	pos	neg	neg
107	+	S	R	R	pos	neg	pos
108	+	S	R	R	pos	neg	pos
109	+	S	R	R	pos	neg	neg
110	+	S	R	R	neg	neg	neg
111	+	S	R	R	pos	neg	pos
112	+	S	R	R	pos	neg	neg
113	+	S	R	R	pos	neg	neg
114	+	S	R	R	neg	neg	pos
115	-	S	S	S	neg	neg	neg
116	+	S	R	R	pos	neg	pos
117	+	S	R	R	pos	neg	pos
118	+	S	S	S	neg	neg	neg
119	+	S	R	R	pos	neg	pos
120	+	S	R	R	pos	neg	neg
121	+	S	R	R	neg	neg	pos
122	+	S	R	R	pos	neg	pos
123	+	S	S	S	neg	neg	neg
124	-	S	R	R	neg	neg	neg
125	+	S	R	R	neg	neg	pos
126	+	S	R	R	neg	neg	pos
127	-	S	R	R	neg	neg	pos
128	+	S	R	R	neg	neg	pos
129	+	S	R	R	pos	neg	neg
130	+	S	R	R	neg	neg	pos
131	+	S	R	R	neg	neg	neg
132	-	S	R	R	neg	neg	pos
133	+	S	R	R	neg	neg	neg
134	-	S	R	R	neg	neg	pos
135	-	S	R	R	neg	neg	pos
136	-	S	R	R	neg	neg	pos
138	-	S	R	R	neg	neg	neg
140	-	S	S	S	neg	neg	neg
141	-	S	R	R	pos	neg	pos
142	-	S	R	R	neg	neg	pos
143	-	S	R	R	pos	neg	pos
144	-	S	S	S	neg	neg	neg
145	-	S	R	R	neg	neg	pos
146	-	S	R	R	neg	neg	pos
148	-	S	R	R	pos	neg	pos
149	-	S	R	R	neg	neg	pos
150	-	S	R	R	neg	neg	pos
152	-	S	R	R	pos	neg	neg
153	-	S	R	R	neg	neg	pos
154	-	S	R	R	neg	neg	pos

155	-	S	R	R	neg	neg	pos
156	-	S	R	R	pos	neg	neg
157	-	S	R	R	pos	neg	neg
158	-	S	R	R	pos	neg	pos
161	-	S	R	R	pos	neg	pos
162	-	S	R	R	pos	neg	neg
163	-	S	R	R	pos	neg	pos
164	-	S	R	R	neg	neg	neg
165	-	S	R	R	pos	neg	pos
166	+	S	R	R	pos	neg	pos
167	-	S	R	R	pos	neg	pos
168	-	S	R	R	pos	neg	pos
169	-	S	R	R	pos	neg	pos
170	-	S	R	R	pos	neg	pos
171	-	S	R	R	neg	neg	pos
173	-	S	R	R	pos	neg	neg
174	+	S	R	R	pos	neg	pos
175	-	S	R	R	pos	neg	neg
176	-	S	R	R	pos	neg	neg
177	-	S	R	R	pos	neg	pos
178	-	S	S	S	neg	neg	neg
180	+	S	R	R	neg	neg	pos
181	-	S	R	R	neg	neg	pos
183	-	S	R	R	neg	neg	pos
184	+	S	R	R	pos	neg	neg
186	+	S	R	R	neg	neg	neg
188	-	S	R	R	pos	neg	neg
189	-	S	R	R	pos	neg	pos
191	-	S	R	R	pos	neg	pos
192	-	S	R	R	neg	neg	pos
193	-	S	R	R	pos	neg	pos
194	-	S	R	R	pos	neg	neg
195	-	S	R	R	neg	neg	pos
196	-	S	R	R	pos	neg	neg
197	+	S	R	R	pos	neg	neg
198	+	S	R	R	pos	neg	neg
199	+	S	R	R	pos	neg	pos
200	-	S	R	R	pos	neg	pos
201	-	S	R	R	pos	neg	pos
202	-	S	S	S	neg	neg	neg
203	-	S	S	S	neg	neg	neg
204	+	S	S	S	neg	neg	neg
205	+	S	S	S	neg	neg	neg
206	+	S	S	S	neg	neg	neg
207	+	S	S	S	neg	neg	neg
208	-	S	S	S	neg	neg	neg
209	-	S	R	R	pos	neg	neg
210	-	S	S	S	neg	neg	neg

211	-	S	S	S	neg	neg	neg
213	+	S	S	S	neg	neg	neg
214	-	S	S	S	neg	neg	neg
215	+	S	S	S	neg	neg	neg
216	-	S	R	R	neg	neg	pos
217	+	S	R	R	neg	neg	pos
218	+	S	S	S	neg	neg	neg
219	-	S	S	S	neg	neg	neg
220	-	S	S	S	neg	neg	neg
221	+	S	R	R	neg	neg	pos
222	-	S	R	R	neg	neg	pos
223	-	S	R	R	neg	neg	pos
224	+	S	S	S	neg	neg	neg
226	+	S	S	S	neg	neg	neg
227	+	S	R	R	neg	neg	pos
228	-	S	S	S	neg	neg	neg
229	-	S	S	S	neg	neg	neg
230	+	S	R	R	neg	neg	neg
231	+	S	S	S	neg	neg	neg
232	+	S	R	R	neg	neg	pos
233	-	S	S	S	neg	neg	neg
234	-	S	S	S	neg	neg	neg
235	+	S	R	R	neg	neg	pos
236	+	S	S	S	neg	neg	neg
237	-	S	S	S	neg	neg	neg
238	-	S	S	S	neg	neg	neg
239	-	S	S	S	neg	neg	neg
240	-	S	S	S	neg	neg	neg
241	-	S	S	S	neg	neg	neg
242	+	S	R	R	pos	neg	neg
243	+	S	R	R	neg	neg	pos
244	-	S	R	R	neg	neg	pos
245	-	S	S	S	neg	neg	neg
246	-	S	R	R	neg	neg	pos
247	-	S	S	S	neg	neg	neg
248	-	S	S	S	neg	neg	neg
249	+	S	S	S	neg	neg	neg
253	+	S	S	S	neg	neg	neg
254	+	S	S	S	neg	neg	neg
255	+	S	S	S	neg	neg	neg
256	+	S	S	S	neg	neg	neg
257	+	S	S	S	neg	neg	neg
258	-	S	S	S	neg	neg	neg
259	-	S	S	S	neg	neg	neg
260	+	S	S	S	neg	neg	neg
261	+	S	S	S	neg	neg	neg
262	-	S	S	S	neg	neg	neg
263	+	S	S	S	neg	neg	neg

264	+	S	S	S	neg	neg	neg
265	+	S	S	S	neg	neg	neg
266	+	S	S	S	neg	neg	neg
267	+	S	S	S	neg	neg	neg
268	+	S	S	S	neg	neg	neg
269	+	S	S	S	neg	neg	neg
271	+	S	S	S	neg	neg	neg
272	+	S	S	S	neg	neg	neg
273	-	S	S	S	neg	neg	neg
274	+	S	S	S	neg	neg	neg
275	+	S	S	S	neg	neg	neg
276	+	S	S	S	neg	neg	neg
277	+	S	S	S	neg	neg	neg
278	+	S	S	S	neg	neg	neg
279	+	S	S	S	neg	neg	neg
280	+	S	S	S	neg	neg	neg
281	+	S	S	S	neg	neg	neg
282	+	S	S	S	neg	neg	neg
283	+	S	S	S	neg	neg	neg
284	+	S	S	S	neg	neg	neg
285	+	S	S	S	neg	neg	neg
286	+	S	S	S	neg	neg	neg
287	+	S	S	S	neg	neg	neg
288	+	S	S	S	neg	neg	neg
289	+	S	S	S	neg	neg	neg
291	+	S	S	S	neg	neg	neg
292	+	S	S	S	neg	neg	neg
293	+	S	S	S	neg	neg	neg
294	-	S	S	S	neg	neg	neg
295	+	S	S	S	neg	neg	neg
296	+	S	S	S	neg	neg	neg
297	+	S	S	S	neg	neg	neg
299	+	S	S	S	neg	neg	neg
300	+	S	S	S	neg	neg	neg
301	+	S	S	S	neg	neg	neg
302	+	S	S	S	neg	neg	neg
303	+	S	S	S	neg	neg	neg
304	+	S	S	S	neg	neg	neg
305	+	S	S	S	neg	neg	neg
C+	+	R	R	R	pos	pos	pos
C-	-	S	S	S	neg	neg	neg