

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

Caracterização Fenotípica da Resistência aos Antimicrobianos
e Detecção do Gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. Coagulase-
Negativos Isolados de Amostras Animais e Humanas

Lidiane de Castro Soares

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS E DETECÇÃO DO GENE *mecA* EM
STAPHYLOCOCCUS SPP. COAGULASE-NEGATIVOS ISOLADOS
DE AMOSTRAS ANIMAIS E HUMANAS

LIDIANE DE CASTRO SOARES

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida
como requisito parcial
para obtenção do grau
de Mestre em
Microbiologia
Veterinária.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2007

579.353

S676c

T

Soares, Lidiane de Castro, 1982-

Caracterização fenotípica da resistência aos antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. Coagulase-negativos isolados de amostras de animais e humanas / Lidiane de Castro Soares. - 2007.

69 f. : il.

Orientador: Miliane Moreira Soares de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 35-49.


1. Estafilococos - Teses. 2. Estafilococos - Genética - Teses. 3. Microorganismos patogênicos - Teses. 4. Drogas - Resistência em microorganismos - Aspectos genéticos - Teses. 5. Modelos animais em pesquisa - Teses. 6. Homem - Pesquisa - Teses. I. Souza, Miliane Moreira Soares de, 1970- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

LIDIANE DE CASTRO SOARES

Dissertação submetida ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, em 28 de fevereiro de 2007.


DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/02/07.



Prof.^a Miliane Moreira Soares de Souza (Ph.D) UFRRJ - Brasil



Prof. Elmiro Rosendo do Nascimento (Ph.D) UCLA, Davis - USA



Prof. Eduardo Caio Torres dos Santos (Ph.D) UFRJ - Brasil

**“Sobre tudo que se deve
guardar, guarde o teu
coração, porque dele
procedem às fontes da
vida.”**

Provérbios: 4.23

AGRADECIMENTOS

**“Não tenho palavras para agradecer, tua bondade
Dia após dia, me cercas com fidelidade.
Nunca me deixes esquecer
Que tudo o que tenho,
Tudo o que sou e o que vier a ser
Vem de Ti, Senhor.
Dependo de Ti, preciso de Ti
Sozinha nada posso fazer...”**

Toda honra, glória e louvor, eu dedico a ti Senhor, por mais uma vitória conquistada. Obrigada por guiar meus passos e me conduzir no teu caminho. Obrigada pelo ânimo renovado nos momentos de fraqueza e por simplesmente me amar.

Aos meus pais Clair Paula Soares e Maria Aparecida Oliveira de Castro Soares, que sempre me incentivaram e me deram forças para que mais uma etapa se concluísse. Pai, obrigada por todo sacrifício realizado para que hoje sua filha tivesse mais esta vitória.

Ao meu namorado, Bruno de Barros Ramirez, que sempre caminhou ao meu lado e me deu forças. Obrigada por entender minhas ausências e sempre vibrar comigo em cada vitória.

À todos os meus familiares, avó, tios e tias, primos e primas pelo carinho e por todo apoio.

A minha orientadora e amiga, Miliane Moreira Soares de Souza que me deu oportunidade de atuar na área de Bacteriologia e apostou na minha competência. Obrigada pela paciência e por me fazer crescer não apenas profissionalmente, mas em outras áreas também.

As amigas que ganhei neste laboratório: Shana de Mattos de Oliveira Coelho e Ingrid Annes Pereira. Sei que esta amizade não se resume apenas ao convívio laboratorial e que sempre poderei contar com vocês. Obrigada por tudo. Obrigada por estarem ao meu lado quando mais precisei. O carinho e a amizade de vocês foi e é muito importante à minha vida.

Aos estagiários do Laboratório de Bacteriologia – Bruno da Rocha Pribul e Karen da Silva Dunga por toda dedicação e responsabilidade demonstrada durante a realização deste experimento. Agradeço especialmente à Angélica Nogueira Miranda e Débora Fontes Barbosa de Oliveira por estarem sempre presentes em todas as etapas deste trabalho. A ajuda de vocês foi fundamental para a conclusão do experimento.

À minha turma de mestrado, e em especial a Geisi Marine e Verônica da Silva Cardoso. Vou carregar sempre comigo o carinho que sinto por vocês. Obrigada por esta amizade.

À Cléia Maria Monteiro da Cunha por todo carinho e incentivo nestes dois anos de convívio. Obrigada também pela doação de isolados humanos e material para a realização deste experimento.

Aos meus amigos Bruno de Castro Gomes e Marcelo Santos de Oliva.

As amigas Ligia Portugal Gomes e Maura Menezes.

À minha grande amiga Aline Vilas Bôas Vianna que mesmo estando longe se fez presente em todos os momentos.

Ao Instituto Fernandes Figueira - FioCruz - pelos isolados humanos cedidos, provenientes do Laboratório de Bacteriologia.

Ao prof. Fábio Scott por permitir a coleta de material otológico dos cães pertencentes ao Departamento de Parasitologia da UFRRJ.

Ao Curso e aos professores do Curso de pós-graduação em Microbiologia Veterinária.

Aos funcionários do Projeto de Sanidade Animal e do Instituto de Veterinária, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto.

A CAPES pelo apoio concedido a este trabalho através da bolsa de estudo.

A todos aqueles que passaram pela minha vida durante esta etapa.

BIOGRAFIA

Lidiane de Castro Soares, filha de Clair Paula Soares e Maria Aparecida Oliveira de Castro Soares, nascida em 22 de março de 1982, no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o primário, ensino fundamental e ensino médio no Colégio Cenecista Paracambi.

No ano de 2001 ingressou no Curso de Ciências Biológicas – Licenciatura e Bacharelado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro –, diplomando-se em maio de 2005.

Foi estagiária de Microbiologia onde pode desenvolver projetos na área de Bacteriologia sob a orientação da professora Dr.^a Miliane Moreira Soares de Souza no período de março de 2002 – abril 2005.

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, do Instituto de Veterinária desta Instituição em 2005, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista de pós-graduação do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2005 a fevereiro de 2007.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01	Fórmula estrutural da penicilina.	05
Figura 02	Resistência à bacitracina.	12
Figura 03	Método de difusão em disco.	18
Figura 04	Método de difusão em disco modificada.	26
Figura 05	Técnica de ágar screen.	26
Figura 06	Eletroforese do fragmento do gene <i>mecA</i> (513 pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de animais.	27

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 01	Perfil de resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de amostras provenientes do conduto auditivo de cães.	19
Gráfico 02	Perfil de resistência de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos provenientes de leite bovino.	19
Gráfico 03	Perfil de resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de humanos.	20
Gráfico 04	Correlação dos resultados dos testes fenotípicos de resistência à oxacilina com a detecção do gene <i>mecA</i> .	28

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01	Distribuição dos espécimes isolados obtidos de cães, bovinos e humanos.	17
Tabela 02	Percentual de resistência dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos em diferentes sítios.	19
Tabela 03	Percentual de resistência dos isolados provenientes de humanos e animais resistentes à oxacilina a diferentes antibióticos.	23
Tabela 04	Percentual de resistência dos isolados animais e humanos à oxacilina e cefoxitina.	24
Tabela 05	Perfil de resistência/suscetibilidade dos isolados <i>mecA</i> positivos.	27

ÍNDICE DE ABREVIações

ATCC: American Type Culture Collection - Coleção de cultura americana

C.BHI: Caldo Infuso de Cérebro e Coração

CDC: Centers for Diseases Control and Prevention - Centro de controle e prevenção de doenças

CMT: California Mastitis Test

***MecA*:** gene de resistência à oxacilina

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ECN: estafilococos coagulase-negativos

MH: Müeller Hinton

MIC: Concentração inibitória mínima

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

Pb: Pares de base

PBP: Proteína ligante de penicilina

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

Rpm: Rotações por minuto

UFC: Unidade Formadora de Colônia

°C : Graus Centígrados

µg/mL: microgramas por mililitro

µg: microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Identificação dos Estafilococos Coagulase-Negativos	02
2.2 Infecções em Animais	03
2.3 Infecções em Humanos	03
2.4 Antibioticoterapia	05
2.4.1 Betalactâmicos	05
2.4.2 Betalactâmicos em associação com inibidores de beta-lactamases	06
2.4.3 Glicopeptídeos	06
2.5 Resistência Antimicrobiana	06
2.5.1 Resistência aos betalactâmicos	06
2.5.1.1 Gene <i>mecA</i>	07
2.5.1.2 Expressão fenotípica da resistência à oxacilina	08
2.5.2 Resistência aos glicopeptídeos	08
2.6 Transmissão de Estafilococos entre Humanos e Animais	09
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Coleta das Amostras Animais	11
3.1.1 Quadros de mastite	11
3.1.2 Conduto auditivo externo	11
3.2 Amostras Humanas	11
3.3 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp. Coagulase-Negativos	11
3.3.1 Isolamento	11
3.3.2 Testes de Identificação	11
3.3.2.1 Método de Gram, prova do hidróxido de potássio (KOH) a 3% e prova da catalase	11

3.3.2.2 Prova da coagulase	12
3.3.2.3 Resistência à bacitracina	12
3.3.2.4 Prova de fermentação de açúcares, produção de urease e redução de nitrato	12
3.4 Teste de Suscetibilidade aos Fármacos de Eleição	13
3.4.1 Inóculo	13
3.4.2 Controle	13
3.4.3 Discos de antibióticos (SENSIFAR-CEFAR [®])	13
3.4.4 Difusão em disco	13
3.5 Teste de Suscetibilidade à Oxacilina	13
3.5.1 Difusão em disco modificada	14
3.5.2 Ágar screen	14
3.5.3 Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima - CIM)	14
3.5.4 Diluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)	14
3.6 Detecção do Gene <i>mecA</i> pela Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	14
3.6.1 Lise bacteriana	15
3.6.2 Amplificação do gene <i>mecA</i> pela técnica de PCR	15
3.7 Análise Estatística	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Identificação das Espécies	17
4.2 Perfil de Suscetibilidade dos Isolados aos Antibióticos de Eleição	18

4.4 Suscetibilidade à Oxacilina e a Presença do Gene <i>mecA</i>	25
5 CONCLUSÃO	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	50

RESUMO

SOARES, Lidiane de Castro. **Caracterização Fenotípica da Resistência aos Antimicrobianos e Detecção do Gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos Isolados de Amostras Animais e Humanas.** 2007. 55p Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) fazem parte da microbiota normal da pele e apesar de terem sido considerados saprófitas por muito tempo, o seu significado clínico como agente etiológico tem aumentado com o passar dos anos. No entanto, apesar de todo avanço nas técnicas de identificação dos ECN e do conhecimento destes como agentes etiológicos em diversos processos infecciosos, estes microrganismos muitas vezes são negligenciados na rotina laboratorial, devido a enorme diversidade de espécies encontradas. A identificação das espécies de ECN, embora de difícil realização para a maioria dos laboratórios clínicos, é necessária para diferenciar o potencial patogênico e o perfil de resistência de cada isolado. A resistência à oxacilina em ECN é mediada pelo gene *mecA* e usualmente heterogênea, sendo detectada por vários métodos fenotípicos. Neste estudo, foram avaliados 72 isolados de ECN provenientes de amostras do conduto auditivo de cães da raça Beagles, de mastite bovina e de infecções humanas. *Staphylococcus xylosus* foi o microrganismo mais isolado, nas amostras animais, e *S. cohnii* subsp. *urealyticus* em humanos, dentro de uma ampla gama de espécies identificadas. O perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados de animais e humanas foi avaliado através da técnica de difusão em disco, na qual detectou-se um elevado nível de resistência à penicilina e ampicilina. A gentamicina, vancomicina e associação ampicilina+sulbactam foram eficientes frente aos isolados testados. A avaliação da resistência à oxacilina foi realizada através da difusão em disco modificada, ágar screen, microdiluição em caldo e em ágar. A presença do gene *mecA* foi determinada pelo método da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), sendo 5,55% dos isolados *mecA* positivos. Os resultados fenotípicos de resistência a cefoxitina e a oxacilina foram correlacionados com a detecção do gene *mecA*, que foi utilizado como padrão ouro para avaliação da sensibilidade e especificidade das técnicas utilizadas. O reduzido número de isolados *mecA* + não permitiu estabelecer o grau de correlação entre a cefoxitina e a oxacilina como método de predição do gene, embora ambas tenha apresentado o mesmo percentual de resistência. O teste fenotípico que apresentou melhor acurácia na detecção da resistência à oxacilina foi a microdiluição em caldo.

Palavras-chave: estafilococos coagulase-negativos, oxacilina, gene *mecA*

ABSTRACT

SOARES, Lidiane de Castro. **Phenotypic Characterization of Antimicrobial Resistance and Detection of the *mecA* Gene in Coagulase-Negative *Staphylococcus* spp. Isolates of Animal and Human Samples.** 2007. 55p Dissertation (Master Science in Veterinary Microbiology) Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Coagulase-negative staphylococci (SCN) take part of normal microbiota. Although it has been considered saprophytic, nowadays there is a concern about its pathogenic potential. Nevertheless, all advance in SCN identification assays, these microorganisms are continually neglected in laboratorial routine of infectious diseases, because of the wide range of species. In spite of the difficulties, it is necessary to make an appropriated species identification in order to differentiate the potential pathogenic agents and to determine its antimicrobial susceptibility pattern. Resistance in SCN is related to the presence of *mecA* gene, which expresses a heterogeneous pattern that can be detected through diverse phenotypics tests. In this study, 72 SCN isolates obtained from external ear conducts of dogs, bovine mastitis and human nosocomial infections were evaluated. *Staphylococcus xylosum* was the most prevalent microorganism in animal and *S. cohnii* subsp. *urealyticus* in human sample. The antimicrobial resistance patterns were evaluated through disc diffusion test, and a high level of resistance to penicillin and ampicillin were detected. The most efficient antibiotics evaluated were gentamicin, vancomycin and the association ampicillin+sulbactam. Oxacillin resistance was phenotypically detected by modified disc diffusion test, agar screen, broth microdilution and agar dilution. Presence of *mecA* gene where detected in 5,55% of the isolates by Polymerase Chain Reaction (PCR). Correlation with the detection of *mecA* gene was used as gold standard for evaluation of sensitivity and specificity of phenotypical assays. The low number of *mecA* positives isolates did not allowed the association between cefoxitin and oxacillin resistance as a test to detect the presence this gene. The broth microdilution and agar dilution tests presented the best accuracy in phenotypic detection of the oxacillin resistance.

Key-words: coagulase-negative staphylococci, methicilin, gene *mec*

1 INTRODUÇÃO

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) foram por muito tempo considerados microrganismos saprófitas e raramente patogênicos. No entanto, atualmente são reconhecidos como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos, sendo comumente isolados em amostras clínicas humanas e animais. Em animais, a importância dos estafilococos coagulase-negativos implicados na mastite bovina tem aumentado nos últimos anos, representando grandes perdas na economia. Além disso, estão também associados à infecções do conduto auditivo de cães, embora façam parte da microbiota normal e em humanos estão frequentemente envolvidos na infecções nosocomiais.

A detecção de uma variedade de ECN presentes em amostras clínicas, e sua implicação como agentes etiológicos, está diretamente relacionada ao considerável progresso na classificação sistemática dos estafilococos através do desenvolvimento de diferentes métodos, manuais e automatizados, para identificação de características fenotípicas e genotípicas do gênero, espécies e subespécies. No entanto, embora possam ser diferenciadas em espécies através de suas características bioquímicas, na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica, tais rotinas de identificação não são efetuadas, negligenciando sua importância clínica.

Nas décadas mais recentes, o aumento no número de infecções por ECN e sua frequente resistência à meticilina, a qual indica resistência cruzada com todas as classes de beta-lactâmicos, tem se tornado uma dificuldade adicional no problema do controle da infecção por este agente. O crescimento da resistência aos antimicrobianos se dá pelo uso inapropriado destes na medicina humana e, também, por práticas usadas na agricultura. As dificuldades no estabelecimento de medidas de controle, no que diz respeito ao uso indiscriminado de antibióticos, ampliam a gama de bactérias resistentes. Associado a isso, as células bacterianas podem trocar seu material genético, agravando ainda mais este quadro.

As infecções por estafilococos coagulase-negativos causam sérios problemas na escolha do antibiótico ideal, pois estes microrganismos são frequentemente multirresistentes. De acordo com estudo realizado em diferentes partes da Europa, Canadá, América Latina e Estados Unidos a resistência à oxacilina em ECN pode variar entre 70-80%. Para controlar a disseminação dessas infecções, as fontes de contaminação e os mecanismos de transmissão devem ser identificados.

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. é heterogênea, conferida principalmente pelo gene *mecA*, correlacionado a baixa afinidade deste antimicrobiano à proteína PBP2a. A análise da presença deste gene serve como diagnóstico e auxilia na escolha da melhor terapia antimicrobiana. Métodos moleculares para detecção de resistência à oxacilina, como a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) para o gene *mecA*, são mais sensíveis que os métodos fenotípicos e por essa razão são utilizados como padrão ouro para avaliação da sensibilidade e especificidade de outros métodos.

Considerando-se a ocorrência de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina na medicina veterinária, e sabendo-se que ela é a droga de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas graves no homem, a possibilidade de transmissão zoonótica de cepas de *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina indica a necessidade de monitorar os perfis de isolamento e suscetibilidade aos antimicrobianos na prática veterinária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os estafilococos são membros da família Micrococcaceae e classificados como cocos Gram-positivos em forma de cachos, catalase-positiva, podendo ser divididos em dois grupos com base na produção da coagulase, onde as espécies coagulase-negativas são incapazes de coagular plasma de coelho (KLOOS; SCHLEIFER, 1994; KONEMAN et al., 2001). Dentro do grupo dos estafilococos coagulase-positivos, *Staphylococcus aureus* é a espécie mais virulenta e o patógeno mais importante, porém a incidência de infecções causadas por ECN vem aumentando em todo o mundo e tem sido motivo de muito estudo pelos pesquisadores (SAKAI, 2004).

Atualmente são reconhecidas cerca de 24 espécies de estafilococos coagulase-negativos, sendo 13 pertencentes a microbiota normal de humanos e 11 isolados de animais. São habitantes normais da microbiota da pele e membranas de humanos e animais, no entanto, adquirem potencial patogênico se tiverem acesso ao tecido do hospedeiro através de trauma na barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implante de materiais médicos e em pacientes imunossuprimidos (KLOOS; LAMBE, 1991; HEIKENS, 2005). Devido à natureza ubíqua dos ECN na pele e superfícies mucosas e o seu potencial patogênico, a epidemiologia desses microrganismos tem assumido maior importância no estudo dos isolados (PATRICK, 1990). Embora existam muitas espécies de ECN, 13 delas são consideradas importantes tanto em humanos quanto em animais: *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. caprae*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (FORBES et al., 2002).

2.1 Identificação dos Estafilococos Coagulase-Negativos

O primeiro relato de estafilococos coagulase-negativos como agente patogênico foi na década de 50, com a prática das cirurgias cardiovasculares, onde técnicas de implantação de próteses foram desenvolvidas. Os relatos até os anos 70 são escassos, já que eram quase que exclusivamente reconhecidos como contaminantes provenientes da microbiota cutânea (THYLEFORS et al., 1998). Durante os últimos 20 anos, o número de documentações de infecções causadas pelos ECN aumentou significativamente, principalmente *Staphylococcus epidermidis*, a causa mais comum de infecção nosocomial da corrente circulatória primária (SILVA, 2000). Devido ao potencial patogênico dos ECN dentro do ambiente hospitalar, o interesse pela variedade de espécies relacionadas às infecções, pelo potencial toxigeno e pela virulência dessas bactérias tem sido motivo de muitos estudos e publicações (CUNHA et al., 2004).

O esquema de identificação das espécies de ECN proposto por Kloos e Schleifer (1975) e modificado por Bannerman (2003) é o método mais utilizado para a diferenciação das espécies; no entanto, este método é trabalhoso devido à quantidade de testes bioquímicos necessários para sua realização em um laboratório de rotina. Os testes utilizados são: fermentação de 07 açúcares, redução de nitratos, produção de urease e resistência a novobiocina.

Sistemas automatizados ainda não são capazes de fazer uma diferenciação confiável entre as diferentes espécies de estafilococos coagulase-negativos devido à expressão variável

das características fenotípicas. Weinstein (1998) em um estudo com painéis do MicroScan (rápido e convencional) para a identificação de Gram-positivos concluíram que esta metodologia foi capaz de identificar corretamente 95,7% e 85,6% dos isolados de *S. epidermidis* pelo método rápido e convencional, respectivamente, mas o mesmo não foi demonstrado para outras espécies de ECN, onde cepas de *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* foram identificadas erroneamente. Kawamura et al. (1991) também relatam que o uso de aparelho automatizado não foi capaz de identificar cepas de *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. hominis*. A dificuldade enfrentada pelos laboratórios clínicos de rotina em identificar as espécies de ECN faz com que estes microrganismos não recebam muitas vezes a importância devida como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos (BANNERMAN, 2003).

2.2 Infecções em Animais

Na Medicina Veterinária, bactérias do gênero *Staphylococcus* ocupam um papel destacado na etiologia de infecções intramamárias no gado leiteiro e do conduto auditivo de animais de companhia. A mastite representa um grande problema para a produção leiteira e constitui grandes perdas econômicas na indústria devido às alterações na qualidade do leite. Adicionalmente, o impacto desta doença se estende a custos financeiros de um programa de controle baseado em estratégias terapêuticas e serviço laboratorial e veterinário (GENTILINI et al., 2002). Desse modo, a disponibilidade de informações sobre as características biológicas e epidemiológicas dos agentes etiológicos é essencial para o desenvolvimento apropriado de programa de prevenção e de terapias bem sucedidas (GIANNEECHINI et al., 2002). Os ECN fazem parte da microbiota do úbere e são frequentemente associados às infecções intramamárias, sendo *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* as espécies mais comumente encontradas. Estudos relatam que espécies pertencentes a este grupo elaboram uma série de estratégias de sobrevivência para colonizar a glândula mamária mediante a aquisição de uma variedade de fatores de virulência. Estes fatores permitem que a bactéria invada as células fagocíticas do hospedeiro, facilitem sua aderência às células epiteliais e a colonização no tecido e favorecem sua persistência extracelular (BOOTH, 1995). Os animais de produção servem ainda de reservatório para bactérias resistentes ou mesmos genes de resistência que podem se disseminar para populações humanas, e limitar o valor clínico de antibióticos que podem vir a ser a única opção de tratamento (NORMAND et al., 2000). As otites representam de 8 a 15% dos casos atendidos na clínica veterinária no Brasil (LEITE, 2000), e a otite externa crônica corresponde a até 76,7% dos casos de otopatias em cães (FARIAS, 2002). Estudos enfocando o isolamento de microrganismos a partir de meato acústico de cães sadios (JUNCO; BARRASA, 2002) e otopatas (NOBRE et al., 2001), corroboram que a microbiota normal do conduto auditivo externo canino, constituída por *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Malassezia pachydermatis*, apresenta-se alterada em animais otopatas (AUGUST, 1993). Nestes, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* são as principais espécies de estafilococos coagulase-negativos isolados, enquanto que em cães sadios, o isolamento é bastante diversificado (COLE et al., 1998; LILENBAUM et al., 2000).

2.3 Infecções em Humanos

O papel das espécies de estafilococos coagulase-negativos como agentes causais de infecções nosocomiais tem sido reconhecido ao longo das duas últimas décadas, especialmente para a espécie *S. epidermidis*. Sua importância como patógenos é principalmente devido ao

aumento no uso de próteses, cateteres e dispositivos invasivos associados ao crescente número de pacientes imunocomprometidos (JARVIS; MARTONE, 1992; BANNERMAN, 2003), resultando em um aumento da morbidez e o custo do tratamento (HUEBNER; GOLDMANN, 1999). Os pacientes mais vulneráveis a esse tipo de infecção são aqueles internados em unidades de terapia intensiva, transplante ou oncologia, já que na maioria das vezes são submetidos a tais procedimentos. Além disso, a imunossupressão e o uso de antimicrobianos de amplo espectro tornam estes pacientes especialmente vulneráveis (AGVALD-ÖHMAN et al., 2004). Em recém-nascidos, a prematuridade e o baixo peso, associados com a imaturidade do sistema imune e habilidade prejudicada em combater as infecções, a necessidade de acessos vasculares e o uso de cateteres intravasculares são considerados importantes fatores de risco em infecções causadas por ECN (RAIMUNDO, 2002).

As infecções nosocomiais, causadas por esses microrganismos, vêm assumindo uma posição de destaque, devido à emergência de clones epidêmicos resistentes à meticilina e a vários outros antimicrobianos (TOMASZ et al., 1991; MUSSER; KAPUR, 1992). Os estafilococos resistentes à meticilina são responsáveis por um elevado número de infecções hospitalares, oriundas da transmissão do patógeno horizontalmente, via transmissão direta, através de auto-infecção, quando o microrganismo parte de um sítio do corpo para outro; de transmissão cruzada, quando o microrganismo é transmitido pelos profissionais de saúde ou por outros pacientes; e finalmente, através de via indireta, devido a contaminações oriundas do ambiente, veiculadas pelo ar, poeira, pelo uso de cateteres e equipamentos cirúrgicos ou outros equipamentos hospitalares, como nebulizadores e sondas (BOYCE et al., 1997; TRZCINSKI et al., 1997). O método mais comum de introdução de estafilococos resistentes à meticilina numa instituição é através da admissão de um paciente colonizado ou infectado, que atua como fonte de infecção. O constante trânsito de pacientes faz com que uma instituição funcione como via de transmissão de estafilococos resistentes à meticilina para outra (STRAUSBAUGH et al., 1991; HOEFNAGELS-SCHUERMANS et al., 1997). A transmissão de estafilococos resistentes à meticilina de um paciente a outro é feita, principalmente, através das mãos da equipe de saúde, que se tornam transitóriamente contaminada, principalmente após contato direto com pacientes infectados ou colonizados (MATTHEWS; STEWART, 1984; BOYCE, 1997; COELLO et al., 1997). O tratamento das infecções causadas por bactérias multirresistentes leva como consequência a um aumento do tempo de internação e a um aumento do custo no cuidado com esses pacientes, pois as opções terapêuticas, geralmente, ficam restritas ao uso de antibióticos parenterais e de custo elevado (BRADLEY et al., 1991).

Entre as espécies de ECN, os isolados com maior frequência de infecções humanas são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. saprophyticus* (BANNERMAN, 2003).

Segundo Cunha et al. (2004), *S. epidermidis* é a espécie mais relacionada com infecções hospitalares, sendo isoladas de endocardites, infecções do trato urinário, próteses articulares e cateter intravascular. É o microrganismo mais frequentemente isolado de bacteremias (PERL et al., 1994; BANNERMAN, 2003).

A espécie *S. haemolyticus* é o segundo ECN mais frequentemente encontrado associado com infecções humanas, tendo implicância em infecções ósseas e articulares, peritonites, endocardites e septicemias. Os *S. hominis* estão envolvidos em artrites, endocardites e são isolados de hemoculturas associadas com septicemia. Dentre os ECN, esta é a terceira espécie isolada em infecções hospitalares (BANNERMAN, 2003). *S. saprophyticus* é um importante patógeno oportunista em infecção do trato urinário, especialmente em mulheres jovens. Além destas espécies de ECN, inúmeras outras como *S. capitis*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. cohnii* têm sido implicadas em uma variedade de infecções (MARTINEAU et al., 2000).

2.4 Antibioticoterapia

Com o aparecimento das sulfonamidas na década de 1930, uma nova era terapêutica instala-se, porém, apesar de altamente eficaz, cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas no período pré-sulfônico já eram naturalmente resistentes a esse fármaco (WISE et al., 1989). A resistência às sulfonamidas desenvolveu-se rapidamente, e, em meados da década de 1940, a prevalência de cepas sulfonamidas resistentes mostrou-se extremamente elevada, com 15% em 1942 e 59% em 1943 (TAVARES, 2000). Com o aparecimento da penicilina em 1941 e sua indicação para o tratamento das infecções estafilocócicas, uma nova era se iniciou. Os *Staphylococcus* spp. resistentes à penicilina foram detectados a partir de 1950 e, em 10 anos, 60% dos isolados tornaram-se resistentes. Atualmente cerca de 90% das cepas são resistentes a este antibiótico (CDC - MMWR, 2002). Posteriormente, iniciou-se o uso das penicilinas semi-sintéticas estáveis às beta-lactamases, como a meticilina e oxacilina, sendo detectada as primeiras cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina no Reino Unido em 1960 (WISE et al., 1989). Devido ao surgimento de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina, a vancomicina passou a ser considerada uma alternativa terapêutica no tratamento das infecções estafilocócicas. Os primeiros relatos de sensibilidade diminuída à vancomicina foram descritos primeiramente em *S. haemolyticus* (SCHWALBE et al., 1987), em seguida para *S. aureus* (CDC – MMWR, 1997) e em *S. epidermidis* demonstrando resistência heterogênea (SIERADZKI et al., 1999). O mecanismo de resistência descrito foi o espessamento da parede celular, e embora todos estes isolados fossem resistentes não apenas ao glicopeptídeo, mas a todos os antibióticos testados, não foram detectados genes de resistência (TENOVER et al., 2001).

Os fármacos de eleição utilizados nas infecções estafilocócicas estão compreendidos em três principais grupos: beta-lactâmicos, glicopeptídeos e aminoglicosídeos.

2.4.1 Betalactâmicos

Pertencem a esse grupo todos os antibióticos que apresentam o anel beta-lactâmico em sua estrutura, sendo a penicilina (figura 01), 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.

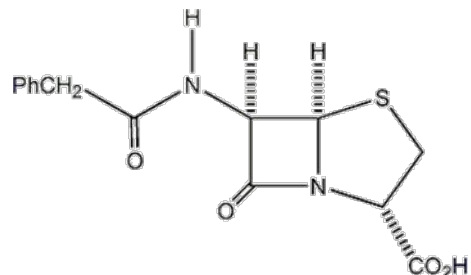


Figura 01: Fórmula estrutural da penicilina

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 se ligarem aos antibióticos beta-lactâmicos. As “PBPs” são proteínas de membrana que estão envolvidas na biossíntese da parede celular e que possuem função transpeptidase (WALKER et al., 1999; WITTE et al., 1999; BLACK, 2002; LOWY, 2003). Estas proteínas possuem atividade bioquímica similar à das serina proteases, catalisando a reação de transpeptidase que faz a ligação cruzada dos peptidoglicanos da parede celular. 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). Promovem 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. Os antibióticos beta-lactâmicos, ao inibirem as “PBPs”, impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular, o que parece desencadear a morte bacteriana por um processo ainda desconhecido (WAXMAN; STROMINGER, 1983; TOMASZ et al., 1989; DOMINGUEZ et al., 1997; MARANGONI, 1997; De GIUST, 1999; PINHO et al., 2004).

2.4.2 Betalactâmicos em associação com inibidores de beta-lactamases

O ácido clavulânico, sulbactam e o tazobactam são inibidores das beta-lactamases. Possuem fraca atividade antibacteriana, no entanto protegem o antimicrobiano contra a degradação por enzimas beta-lactamases e estende de forma efetiva seu espectro de ação antimicrobiana (SCHECHTER; MARANGONI, 1998; MOTTI, 1990). Comumente utilizado em cepas resistentes à ampicilina e amoxicilina.

2.4.3 Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos como a vancomicina, teicoplanina, lincosamina e clindamicina atuam inibindo a síntese da parede celular pelo bloqueio da transglicosilação, mecanismo diferente do empregado pelos fármacos beta-lactâmicos, não são degradadas por beta-lactamases, alteram a permeabilidade da membrana celular bacteriana, além de serem capazes de inibir a síntese de RNA (SCHECHTER; MARANGONI, 1998; HEIJENOORT, 2001). A vancomicina foi introduzida em 1958 para o tratamento clínico de infecções por bactérias Gram-positivas.

2.5 Resistência Antimicrobiana

Uma característica importante dos ECN envolvidos na patogênese é a alta taxa de resistência aos agentes antimicrobianos, principalmente à oxacilina, onde em alguns estudos tem sido descrita em até 80% dos isolados clínicos (MICHELIM, 2005). Além disso, essa resistência em estafilococos coagulase-negativos está frequentemente relacionada com resistência a outros antimicrobianos, particularmente aminoglicosídeos e macrolídeos (LYYTIKÄINEN, 1996). Estes ECN possuem plasmídeos, os quais podem ser transferidos por conjugação entre espécies diferentes de estafilococos coagulase-negativos ou até mesmo entre ECN e *S. aureus*. Este mecanismo representa uma importante via de transmissão de determinantes de resistência antimicrobiana, especialmente para beta-lactâmicos e aminoglicosídeos (HUEBNER; GOLDMANN, 1999).

2.5.1 Resistência aos betalactâmicos

Os estafilococos resistentes à penicilina foram detectados a partir de 1950 e atualmente cerca de 90% das cepas são resistentes a este antibiótico. Um dos mecanismos considerados para resistência à penicilina é mediado por um plasmídeo de alta transferência que confere a capacidade de produção de beta-lactamase, uma enzima capaz de hidrolisar a penicilina

(WALKER et al., 1999; WITTE et al., 1999; BLACK, 2002; LOWY, 2003). Até alguns anos atrás, estes fármacos apresentavam eficácia terapêutica no tratamento das infecções estafilocócicas, atualmente, no entanto, inúmeros trabalhos vêm relatando a disseminação de cepas resistentes, nas quais a produção de beta-lactamases e modificação das “PBPs” são os mais importantes mecanismos relatados (AARESTRUP, 2001).

Embora a maioria dos isolados de estafilococos coagulase-negativos clinicamente significativos apresente resistência aos beta-lactâmicos, esses fármacos oferecem vantagens devido ao baixo custo, sendo, portanto recomendados para o tratamento de isolados sensíveis (GRAHAN, 2000). No entanto, o aumento no número de infecções causadas por ECN nos últimos anos e sua freqüente resistência à meticilina e oxacilina, penicilinas resistentes às penicilinas, indicadores de resistência cruzada com todas as classes de beta-lactâmicos incluindo as cefalosporinas, têm sido fonte de estudo de muitos pesquisadores em todo o mundo (De GIUSTI, 1999).

O mecanismo pelo qual a oxacilina inibe o crescimento bacteriano dos *Staphylococcus* spp. está baseado na inibição da síntese da parede celular pela ligação deste antimicrobiano as “PBPs” presente na parede celular destes microrganismos. Os estafilococos resistentes à oxacilina produzem uma PBP2 alterada (chamada PBP2a), a qual se liga aos beta-lactâmicos com menor afinidade. Este tipo de resistência é codificada pelo gene *mecA*, e é denominada de resistência intrínseca (BOYCE, 1997; CHAMBERS, 1997; BLACK, 2002; LOWY, 2003). A produção de PBP2a, uma proteína ligante de penicilina com característica de baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos, 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 (JARLOV, 1997; De GIUSTI, 1999; PETERSSON et al., 1999; PETINAKI et al., 2001).

Segundo Hussain et al. (2002) é necessária a realização de testes de suscetibilidade para que se possa utilizar os agentes beta-lactâmicos sempre que estes se apresentarem sensíveis, diminuindo, com isso, o uso desnecessário de glicopeptídeos.

Nos últimos anos, o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005) anteriormente NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 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 (OKONOGI et al., 1989; DANCER, 2001) e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica (MURAKAMI et al., 1987).

2.5.1.1 Gene *mecA*

Os estafilococos resistentes à meticilina produzem uma “PBP” específica, denominada PBP2a ou PBP2', codificada pelo gene *mecA* que está presente em um DNA cromossomal adicional, de aproximadamente 30 a 50 kb, constituído por um elemento genético móvel designado como cassete cromossômico estafilocócico (*SCCmec*) que está integrado ao cromossomo das cepas resistentes (ITO et al., 1999; ITO et al., 2001; KATAYAMA et al., 2001; KURODA et al., 2001).

A região promotora do *mecA* e seus genes reguladores possuem seqüências similares para a região análoga do gene da beta-lactamase. Elementos reguladores que controlam a transcrição do *mecA* também presentes são *mecI* e *mecR1* e mais 20 a 45 kb de DNA está associado ao complexo *mec* (CHAMBERS, 1997). Os genes *mecI* e *mecR1* são elementos

regulatórios. O gene *mecI* codifica uma proteína MecI, que se liga ao DNA e reprime a transcrição do gene *mecA*. O gene *mecRI* codifica uma proteína transdutora de sinal que na presença de beta-lactâmicos leva a transcrição do gene *mecA* (SHARMA et al., 2001).

2.5.1.2 Expressão fenotípica da resistência à oxacilina

A oxacilina foi o agente recomendado pelo NCCLS (1997) para testes fenotípicos de predição de resistência às penicilinas devido a sua estabilidade e sensibilidade superior sobre outras penicilinas em testes de suscetibilidade (SWENSON et al., 2005).

Em termos clínicos, cepas de estafilococos coagulase-negativos resistentes à oxacilina são problemáticas, pois apresentam resistência cruzada a praticamente todos os beta-lactâmicos e também a outras classes de agentes antimicrobianos. A expressão fenotípica da resistência à oxacilina é usualmente heterogênea (JAPONI et al., 2003). Um fenótipo menos freqüente é a resistência homogênea, onde toda a população de células é altamente resistente. Devido a esta expressão heterogênea, vários métodos de detecção de resistência à oxacilina vêm sendo desenvolvidos e utilizados pelos laboratórios, já que a expressão fenotípica desta resistência é frequentemente influenciada pelas condições da cultura como concentração do inóculo, tempo de incubação, temperatura, pH e concentração de sal no meio (De GIUSTI, 1999). A maioria das células nos isolados heterogêneos são sensíveis a baixas concentrações de antimicrobianos beta-lactâmicos, com somente uma pequena proporção de células crescendo em concentrações de metilina de 50 µg/mL ou mais. Isolados heterogêneos podem, no entanto, parecer homogêneos quando certas condições de cultura são alteradas, como crescimento em meio de cultura hipertônico suplementado com NaCl ou incubação à 30°C. A incubação de 37 a 43°C favorece o padrão heterogêneo e pode suprimir totalmente a resistência (CHAMBERS, 1997). A natureza heterogênea da resistência à oxacilina é uma limitação inerente da acurácia dos testes de suscetibilidade. Os métodos mais utilizados para detecção dessa resistência contam com modificações das condições de cultura para o aumento da expressão fenotípica da resistência, principalmente para os ECN, onde estes métodos apresentam maiores problemas em comparação com os *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina. Os mecanismos reguladores da expressão da resistência são complexos e ainda não totalmente conhecidos (EL-ADHAMI; STEWART, 1997; MARANGONI, 1997). Estudos que definam técnicas com maior sensibilidade e especificidade, além de praticidade e rapidez, são de grande interesse para o diagnóstico clínico-laboratorial e para o controle de infecções hospitalares. A técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), direcionada à amplificação específica da seqüência de DNA que codifica para o gene *mecA*, apresenta alta sensibilidade e especificidade além de ser independente das condições físicas e químicas das culturas bacterianas, constituindo assim uma técnica valorosa na detecção da resistência à oxacilina (MURAKAMI et al., 1991; TOKUE et al., 1992; SPELDOOREN et al., 1998).

2.5.2 Resistência aos glicopeptídeos

Entre 1958 e 1978, a literatura não relata resistência bacteriana à vancomicina, sendo o primeiro caso detectado em 1979 (TUAZON; MILLER, 1983) em isolados de *Enterococcus* spp. (LECLERCQ et al., 1988) portadores do gene *vanA*, o qual codifica a resistência a esta classe de drogas. A disseminação clonal de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina, através do genótipo *vanA* é uma realidade em nosso meio (MORETTI et al., 2004) e uma das principais recomendações e preocupações do Centro de Controle de Doenças (CDC) em relação

a possibilidade da transferência deste gene de resistência para *Staphylococcus* spp. (CDC – MMWR, 1995).

A resistência à vancomicina é um fato recente e ocorre basicamente pela produção de precursores de peptidoglicano na parede celular que apresentam pouca afinidade de ligação à vancomicina, impedindo assim sua ação no bloqueio da síntese de parede celular (LAI et al., 2004).

Uma vez que a vancomicina é a droga de eleição nas infecções causadas por *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina, o decréscimo de sua suscetibilidade preocupa a comunidade científica (HIRAMATSU et al., 1997; SMITH, 1999). A seleção de resistência aos glicopeptídeos e sua potencial transmissão entre espécies tem mostrado a necessidade do uso restrito desses antimicrobianos (De GIUSTI, 1999). Srinivasan (2002) relatou que amostras clinicamente significante de ECN apresentaram suscetibilidade diminuída à vancomicina. Experimentos *in vitro* demonstram que a pressão seletiva pode produzir cepas resistentes a vancomicina, mas também pode induzir a diminuição simultânea da resistência aos beta-lactâmicos por estafilococos coagulase-negativos e *S. aureus* resistentes à metilina (SIERADZKI; TOMASZ, 1997; DOMARACKI et al., 1998). Os ECN podem ser considerados como reservatórios de genes de resistência a diversos antibióticos, entre eles a vancomicina, no ambiente hospitalar podendo, portanto, transferir esses fatores a outros patógenos hospitalares (CERCENADO et al., 1996; DOMARACKI et al., 1998; TENOVER et al., 1998; SIERADZKI et al., 1999).

2.6 Transmissão de Estafilococos entre Humanos e Animais

Os estafilococos são importante causa de infecção nosocomial e infecções adquiridas na comunidade (TOMLIN et al., 1999; DUIJEKEREN et al., 2003). A transmissão zoonótica de *Staphylococcus* spp. de animais de estimação para o homem tem sido descrita na literatura (TANNER et al., 2000; KIKUCHI et al., 2004). Duijkeren et al. (2004) relataram caso de transmissão de *S. aureus* resistentes à metilina de humano para animal. Nos Estados Unidos, a transmissão de estafilococos entre cães de companhia e seus proprietários já foi previamente relatada. Um paciente diabético teve infecções recorrentes no membro inferior e sua esposa apresentou um quadro de celulite. Culturas de amostras destes pacientes e da cavidade nasal de seu cão identificaram *S. aureus* resistentes à metilina. Os isolados revelaram o mesmo padrão genético na eletroforese de campo pulsado (PFGE) (MANIAN, 2003). Cefai et al. (1994) já haviam relatado o isolamento de estafilococos com o mesmo perfil de resistência provenientes de um enfermeiro, sua esposa e seu cão.

Cães e outros animais de companhia que possuem contato próximo com seus proprietários carregam cepas de estafilococos que podem colonizar o homem e resultar em infecções (TOMLIN et al., 1999; BOAG et al., 2004). Da mesma forma, os humanos podem carrear microrganismos para os animais (HARTMANN et al., 1997). Cães, após serem expostos aos humanos infectados, podem atuar como fontes de infecção para futuras reinfecções (MANIAN, 2003; DUIJEKEREN et al., 2004; GARDABASSI et al., 2004).

Além da transmissão de estafilococos entre humanos e cães, e vice-versa, Seguin et al. (1999) relataram a transmissão de estafilococos entre humanos e cavalos em hospital veterinário nos Estados Unidos. Os ECN foram encontrados em cavalos internados no hospital veterinário e apresentaram elevado percentual de resistência aos antimicrobianos.

As infecções animais ou a transmissão de agentes patogênicos a partir de um animal representam um perigo potencial para a população humana. O uso indiscriminado de

antibióticos em animais, também tem sido motivo de preocupação em virtude do aumento da transferência de bactérias resistentes aos antimicrobianos (NORMAND et al., 2000; GUARDABASSI et al., 2004). Neste sentido, Moriarty (2004) argumentou que altas quantidades terapêuticas podem ocasionar resistência, não só selecionando bactérias que são resistentes, como também induzindo uma rápida propagação de genes com resistência a múltiplos antibióticos.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram:

Isolar e identificar *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos a partir de amostras clínicas provenientes de espécie humana e animais;

Avaliar o fenótipo de resistência dos isolados aos agentes antimicrobianos;

Determinar o perfil de suscetibilidade à oxacilina e cefoxitina em *Staphylococcus* spp coagulase-negativos;

Detectar a presença do gene *mecA* através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR);

Avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes fenotípicos para detecção da resistência à oxacilina.

3 MATERIAL E METÓDOS

Para alcançar o objetivo proposto, foram obtidos 16 espécimes clínicos provenientes de amostras coletadas de mastite, 32 isolados do conduto auditivo de cães saudáveis e 24 isolados clínicos oriundos de amostras humanas, perfazendo um total de 72 isolados (ANEXO 01).

3.1 Coleta das Amostras Animais

3.1.1 Quadros de mastite – foram obtidas 16 amostras de leite a partir de vacas pertencentes à Bovinocultura de Leite, situada no Instituto de Zootecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, nas quais foi realizado o “California Mastitis Test” (CMT) e que apresentaram resultado positivo para o teste, foram coletadas, em tubos de ensaios estéreis.

3.1.2 Conduto auditivo externo – foram obtidas 50 amostras do conduto auditivo de cães saudáveis da raça Beagles pertencentes ao Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com o auxílio de *swabs* estéreis.

3.2 Amostras Humanas

Após a identificação laboratorial presuntiva, 24 amostras humanas isoladas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ – Rio de Janeiro, foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia, situado no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As amostras foram reisoladas com o objetivo de confirmar a identificação para posteriormente realizar os testes fenotípicos de resistência aos antimicrobianos.

3.3 Pesquisa de *Staphylococcus* spp. Coagulase-Negativos

3.3.1 Isolamento

Os espécimes animais e isolados humanos foram submetidos à rotina de identificação que consistiu no isolamento em ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, posteriormente repicadas em ágar seletivo manitol vermelho de fenol, para observação das características das colônias e fermentação, ou não, do manitol (KONEMAN et al., 2001).

3.3.2 Testes de Identificação

3.3.2.1 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 uma gota da suspensão 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%) à uma gota da suspensão 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., 2001).

3.3.2.2 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), incubado a 35°C, por 24 horas. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada a 0,5 mL de sangue total de carneiro, acrescido de etilenodiaminatetraacetato (EDTA-1%) 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., 2001).

3.3.2.3 Resistência à bacitracina

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos apresentam as mesmas características apresentadas pelo 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 (0,2 ml) crescida por 24 horas em Caldo BHI foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar Mueller Hinton - VETEC) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos de bacitracina (0,04U – 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 02) e crescem até a borda do disco, enquanto que os micrococos são sensíveis e apresentam halo de 10 mm ou maiores (KOHNER et al., 1999; FORBES, 2002).

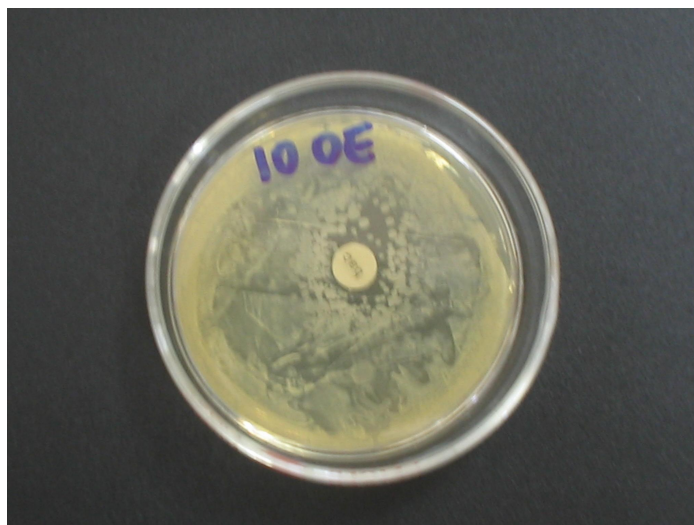


Figura 02. Resistência à bacitracina - o crescimento bacteriano ao redor do disco de antibiótico indica resistência.

3.3.2.4 Prova de fermentação de açúcares, produção de urease e redução de nitrato

A fermentação de açúcares foi testada utilizando o caldo Vermelho de Fenol e o açúcar a 1%. 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: xilose, sacarose, trealose, maltose, lactose, frutose e manose (KONEMAN et al., 2001).

A prova da uréia foi ederealizada com uma suspensão densa do microrganismo preparada em uma solução balanceada de sais (KH₂PO₄ a 0,1%, K₂HPO₄ a 0,1%, NaCl a 0,5% e 0,5 mL de uma solução de vermelho-de-fenol a 2%). O desenvolvimento de cor vermelha no meio após 4 horas de incubação representa resultado positivo da prova; as provas negativas devem ser reincubadas durante uma noite (KONEMAN et al, 2001).

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO₃). A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada em lâmina, uma gota do caldo inoculado após 24 horas a 37°C e, uma gota de cada reativo (A e B) de Griess Ilosway. A coloração rosa indica presença de nitrito no caldo e, conseqüentemente prova de redução positiva (KONEMAN et al., 2001). O anexo 02 apresenta o padrão de identificação das espécies de estafilococos coagulase-negativos utilizado, segundo os testes acima citados.

3.4 Teste de Suscetibilidade aos Fármacos de Eleição

Após identificação, os isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos foram submetidos aos testes de suscetibilidade segundo os padrões da CLSI, 2005.

3.4.1 Inóculo

Os isolados foram inoculados em caldo Müeller Hinton, incubados durante 18 horas a 37°C e diluídas na concentração do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a 1,5 x 10⁶ células/mL.

3.4.2 Controle

Para comparação e controle dos testes foram utilizadas as cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

3.4.3 Discos de antibióticos (SENSIFAR-CEFAR[®])

Após identificação destes microorganismos, foi avaliado o perfil de suscetibilidade em todos os isolados, através dos seguintes fármacos: penicilina (10UI), oxacilina (1µg), vancomicina (30µg), ampicilina (10µg), cefoxitina (30µg), gentamicina (10µg) e da associação ampicilina-sulbactam (10/10µg).

3.4.4 Difusão em disco

A suspensão bacteriana (0,5mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar Müeller Hinton) com o auxílio da alça de Drigalski. Foram avaliadas as concentrações terapêuticas dos fármacos testados já presentes em discos de sensibilidade. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 18 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (CLSI, 2005). O anexo 03 especifica as zonas de inibição do diâmetro avaliado em milímetros dos antibióticos utilizados.

3.5 Teste de Suscetibilidade à Oxacilina

Para a realização dos testes de suscetibilidade à oxacilina, o antibiótico foi diluído a uma concentração estoque de 1,0mg/mL, em água destilada estéril.

3.5.1 Difusão em disco modificada

Nesta técnica de difusão em disco, o meio utilizado - ágar Mueller Hinton - foi suplementado com 4% de NaCl. A suspensão bacteriana (0,5mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar Müller Hinton) com o auxílio da alça de Drigalski. Após incubação por 24 horas a 37⁰C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos em milímetros. Os diâmetros acima de 13 mm indicavam a sensibilidade da amostra ao antibiótico (KOHNER et al., 1999).

3.5.2 Ágar screen

O desenvolvimento desta técnica se fez através da diluição da oxacilina (1,0mg/mL) a uma concentração final de 6µg de antibiótico por mililitro de meio de cultura (Müller Hinton), suplementado com 4% de NaCl. As placas de Petri foram divididas em quatro partes iguais e sobre cada linha foi possível a inoculação de uma suspensão, ou seja, para cada placa foi possível a inoculação de 4 suspensões bacterianas distintas, semeadas com o auxílio da alça de platina. Após 24 horas de incubação a 37⁰C a resistência das cepas bacterianas ao antibiótico foi avaliada, onde qualquer colônia crescida na superfície do meio de cultura foi considerada resistente (KOHNER et al., 1999).

3.5.3 Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima - CIM)

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0mg/mL) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,25µL/mL; 0,5µL/mL; 1,0µL/mL; 2,0µL/mL; 4,0µL/mL até 8,0µL/mL em caldo Müller Hinton (MH) suplementado com 2% de NaCl. As suspensões bacterianas crescidas por 24h a 37⁰C em caldo BHI, foram diluídas até 10⁻³ em caldo MH, a fim de obter-se uma quantidade final de, aproximadamente, 10⁶UFC/mL. Para cada amostra, 0,1 mL de suspensão bacteriana foi adicionada a 0,9 mL de caldo MH contendo as concentrações distintas do antibiótico e incubadas a 37⁰C por 24 horas. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos tubos. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração da droga presente no caldo MH. Logo, o valor da concentração do caldo anterior ao primeiro que apresentou turvação, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (KOHNER et al., 1999).

3.5.4 Diluição em ágar (determinação da CIM)

O desenvolvimento desta técnica se fez através uma concentração inicial de 1mg/mL de oxacilina que foi diluída em ágar MH às concentrações de 0,25µL/mL; 0,5µL/mL; 1,0µL/mL; 2,0µL/mL; 4,0µL/mL até 8,0µL/mL. O resultado foi obtido pela avaliação do crescimento de colônias que indicou resistência à concentração e a CIM foi considerada como a primeira concentração de oxacilina que não apresentou crescimento. Como controle positivo foi utilizado ágar MH sem antibiótico (MANN; MARKHMAN, 1998). Isolados que cresceram em ágar contendo valores de CIM maior ou igual a 2,0µg/mL foram considerados resistentes.

3.6 Detecção do Gene *mecA* pela Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

O procedimento de detecção do gene *mecA* foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no qual os isolados tiveram a presença do gene avaliada através da técnica de PCR.

3.6.1 Lise bacteriana

Para a obtenção do DNA bacteriano, uma única colônia de cada cepa, crescida em ágar Mueller-Hinton após 24h a 37°C, foi suspensa em tampão (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA- pH 8.0) a fim de estabelecer uma concentração final de 3×10^8 UFC/mL de acordo com a escala de Mc Farland. Foi adicionado um volume de 40µl de lisozima (PROMEGA) (10mg/mL), 45µl de proteinase K (PROMEGA) (20mg/mL) a 210 µl de suspensão recém preparada. Após a incubação a 37°C por 1hora, a 250µl dessa solução foi adicionado 2,5µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) (20%), incubado a 100°C por 10 minutos e resfriados em gelo. Após centrifugação a 9.500xg por 5 minutos, 15µl do sobrenadante contendo o DNA foi retirado e utilizado para técnica de PCR (COELHO et al., 2007).

3.6.2 Amplificação do gene *mecA* pela técnica de PCR

Para tal a amplificação do gene, foi preparado uma suspensão utilizando-se:

- 0,25mM de primer (PROMEGA) específico para amplificação do gene:
 - . 5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 3'
 - . 3' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C 5'
- Tampão 10X (PROMEGA);
- 25mM de MgCl₂ (PROMEGA);
- 2,5mM de nucleotídeos (PROMEGA);
- 2 U de *Taq* polimerase (PROMEGA).

A 45µl deste tampão, foi adicionado um volume de 5µl de DNA extraído. O material utilizado na amplificação foi levado ao termociclador, no qual foram realizados 40 ciclos:

- desnaturação a 94°C por 30s;
- anelamento a 55°C por 30s;
- extensão a 72°C por 1minuto;
- um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Um volume de 10 µl do produto da reação foi aplicado em gel de agarose (SIGMA) a 1,5% para separação do segmento do gene *mecA* através da eletroforese, utilizando o marcador de 100pb, para quantificação dos pares de base (pb) do fragmento gene. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (COELHO et al., 2007).

3.7 Análise Estatística

Para determinar o perfil de resistência fenotípica dos isolados bacterianos frente aos antibióticos testados, os resultados foram submetidos uma análise estatística linear generalizada com distribuição binomial, para avaliar o efeito dos antibióticos sobre as amostras, utilizando-se o software R2.4.1. (2006).

Na determinação do perfil de resistência dos isolados bacterianos frente à oxacilina, os resultados dos testes de avaliação fenotípica (difusão em disco, difusão em disco modificada, ágar screen, microdiluição em caldo e diluição em ágar) foram submetidos a uma análise

estatística multivariada para estabelecer uma correlação entre os resultados fenotípicos com a presença do gene *mecA* (VERNABLES, 2002; HAIR et al., 2005).

O programa Excel (Microsoft®) foi utilizado para confecção dos gráficos com os percentuais de resistência antimicrobiana dos isolados e para o cálculo de sensibilidade e especificidade dos testes fenotípicos para detecção de resistência à oxacilina como método preditivo da presença do gene *mecA*. A sensibilidade das técnicas fenotípicas é dada pelos isolados que são resistentes nos testes fenotípicos e que possuem o gene, considerados os isolados verdadeiramente positivos (VP), sendo calculada através da seguinte equação: $VP / (VP + FN)$ (falso-negativo), onde FN corresponde aos isolados que são resistentes nos testes fenotípicos, porém não expressam o gene. A especificidade é a capacidade de distinguir os isolados sensíveis aos testes fenotípicos e que não apresentam o gene *mecA*, sendo detectados através do seguinte cálculo: $VN / (FP + VN)$ (verdadeiro negativo) (PEREIRA, 1995).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das Espécies

Dos 24 isolados provenientes de espécimes clínicas humanas, foram identificadas as seguintes espécies: *Staphylococcus haemolyticus*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. epidermidis* e *S. capitis* subsp. *urealyticus*. Dos 48 isolados provenientes de animais, as seguintes espécies foram identificadas: *S. xylosus*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. hominis*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. cohnii* subsp. *cohnii*. A tabela 01 contém o número de isolados de ECN provenientes de espécimes do conduto auditivo de cães da raça Beagles, leite de vacas com mastite e espécimes nosocomiais.

Tabela 01. Distribuição dos espécimes isolados obtidos de cães, bovinos e humanos.

Espécies de ECN	Isolados n=72		
	Cães	Bovinos	Humanos
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	03	-	06
<i>S. haemolyticus</i>	02	01	05
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	04	04	03
<i>S. xylosus</i>	09	05	02
<i>S. simulans</i>	03	-	02
<i>S. hominis</i>	06	02	02
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-	02
<i>S. epidermidis</i>	02	02	01
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	03	02	01
Total	32	16	24

No presente trabalho, foi possível detectar diversas espécies de ECN, sendo *S. xylosus* o microrganismo que apresentou maior frequência dentre os isolados caninos e bovinos. Nas amostras humanas, *S. cohnii* subsp. *cohnii* e *S. haemolyticus* foram as espécies mais prevalentes. Lilenbaum et al. (2000) ao analisarem um total de 44 isolados do gênero *Staphylococcus* provenientes de espécimes animais, identificaram 27 estafilococos coagulase-negativos, onde *S. epidermidis* foi o microrganismo que apresentou maior prevalência, representando um percentual de 25%. Além deste, outros estafilococos coagulase-negativos foram isolados, como *S. simulans* (15,9%), *S. haemolyticus* (11,4%) e *S. saprophyticus* (9,1%). Ferreira et al. (2003) isolaram *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. xylosus* associados a processos infecciosos em humanos.

Alguns autores consideram *S. epidermidis* o microrganismo mais comumente isolado em infecções por estafilococos coagulase-negativos (CUNHA et al., 2002; BANNERMAN, 2003). Cunha et al. (2002) relataram que de um total de 54 recém-nascidos com infecção por ECN, *S. epidermidis* foi o agente etiológico isolado de 46 crianças (85,2%). *S. lugdunensis* (5,6%), *S. haemolyticus* (3,7%), *S. simulans* (1,8%), *S. warneri* (1,8%) e *S. xylosus* (1,8%) também foram responsáveis pelo quadro infeccioso apresentado nos recém-nascidos. Embora o *S. epidermidis*

seja a espécie mais caracterizada e envolvida etiologicamente, outras espécies de ECN patogênicas têm sido isoladas de uma variedade de fontes clínicas (BANNERMAN, 2003).

Apesar de todo avanço nas técnicas de identificação dos ECN e do conhecimento destes como agentes etiológicos em diversos processos infecciosos, estes microrganismos muitas vezes são negligenciados na rotina laboratorial, sendo reconhecidos apenas como contaminantes (GRANT et al., 1994; BANNERMAN, 2003; De PAULIS, 2003). Weinstein (1998) relataram o grande problema enfrentado pelos microbiologistas e clínicos com relação à identificação dos estafilococos coagulase-negativo, devido a enorme diversidade de espécies encontradas. A identificação das espécies de ECN, embora de difícil realização para a maioria dos laboratórios clínicos, é necessária para diferenciar o potencial patogênico e o perfil de resistência de cada isolado (De PAULIS, 2003).

4.2 Perfil de Suscetibilidade dos Isolados aos Antibióticos de Eleição

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de eleição foi avaliado através da medição do tamanho, em milímetros, da área de inibição dos antibióticos (Figura 03). A tabela 02 apresenta os percentuais de resistência obtidos. Os gráficos 01, 02 e 03 demonstram o perfil de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos avaliados de acordo com os sítios.

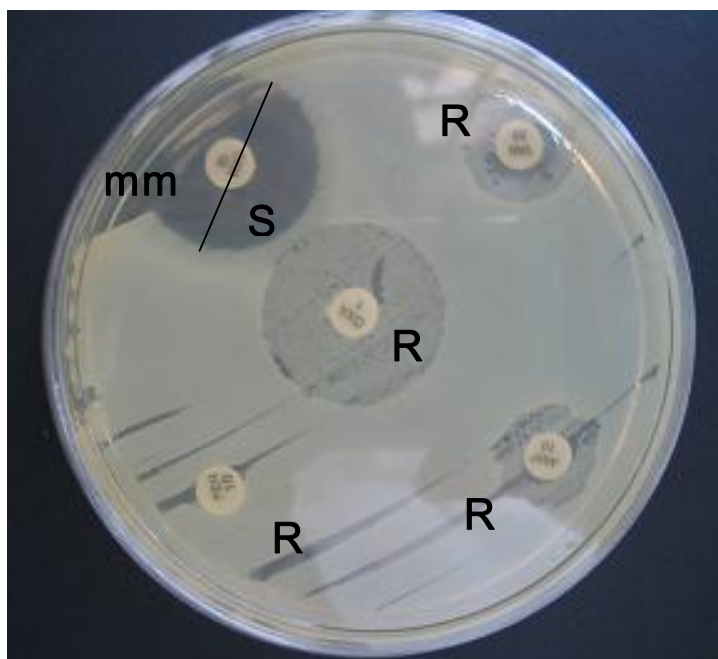


Figura 03. Método de difusão em disco. A linha demonstra o halo de sensibilidade (S) avaliado em milímetros (mm), e, pode-se avaliar o crescimento bacteriano ao redor dos discos de antibióticos (R).

Tabela 02. Percentual de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos em diferentes sítios.

Antibióticos	Percentual de Resistência (%)		
	Cães (n=32)	Bovino (n=16)	Humanos (n=24)
Ampicilina	87,5	18,75	91,7
Penicilina	87,5	18,75	91,7
Gentamicina	15,6	00	12,5
Vancomicina	15,6	00	16,7
Oxacilina	56,2	00	79,2
Amp+ sulb	12,5	00	4,2
Cefoxitina	50	37,5	54,2

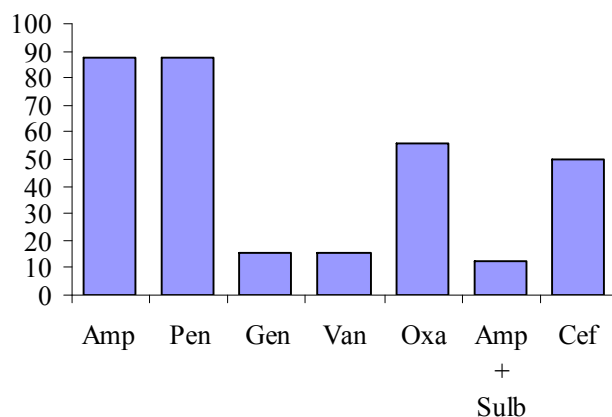


Gráfico 01. Perfil de resistência de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras provenientes do conduto auditivo de cães.

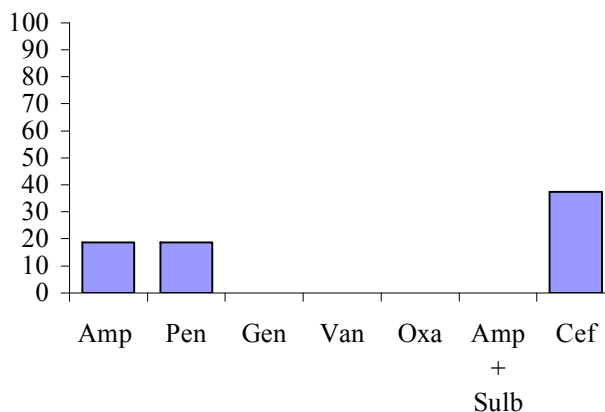


Gráfico 02. Perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos provenientes de leite bovino.

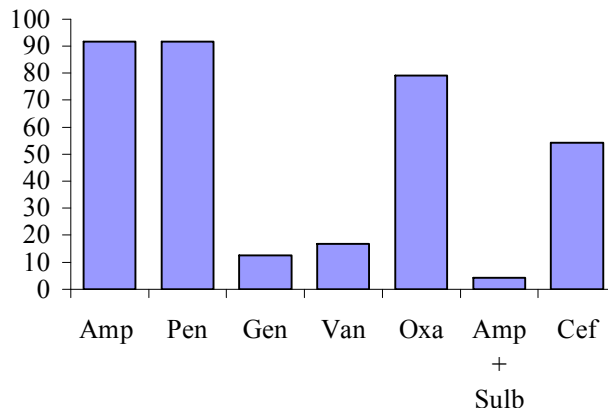


Gráfico 03. Perfil de resistência de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de humanos.

Dados da literatura relatam o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos ao longo do tempo (GIGLIO et al., 1999; LIVERMORE, 2000). Estudos, como o presente, que visam monitorar a resistência bacteriana têm se tornado cada vez mais importante. Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem ser gerados por pressão seletiva pelo uso excessivo de antibióticos, principalmente em ambientes hospitalares, pelo aumento de pacientes imunocomprometidos e aumento de processos cirúrgicos invasivos (KHACHATOURIANS, 1998; FILE Jr., 1999). Os dados obtidos a partir do teste de difusão em disco utilizando diferentes antimicrobianos foram submetidos à análise estatística para a avaliação da diferença significativa entre os percentuais de suscetibilidade encontrada (anexo 04).

O monitoramento da resistência à penicilina e ampicilina vem sendo avaliado ao longo das últimas décadas. Trabalhos desenvolvidos por Adang et al. (1992) e Magee et al. (1990) já relatavam resistência em isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos de origem clínica. Os resultados dos testes de suscetibilidade apontam para um elevado percentual de resistência à penicilina e ampicilina tanto nos isolados provenientes de animais e humanos, apresentando similaridades aos encontrados na literatura, como os de Adesiyun et al. (1995) que ao avaliarem 554 isolados de *Staphylococcus* spp. encontraram um percentual de resistência de 74,5%. Kakar et al. (1999) detectaram 85,9% de resistência em 64 isolados de *Staphylococcus* spp. de crianças com pioderma. Tenssay (2000) analisou 432 ECN e encontrou 95% de resistência à penicilina. Barelli et al. (1999) encontraram 88,6% de resistência à penicilina em 42 isolados de *S. epidermidis*. Shuhaibar et al. (1992) encontraram valores de resistência de 84,5% a penicilina e 87,7% a ampicilina em 180 isolados estudados. Indudharan et al. em 1999 avaliaram o perfil de suscetibilidade de isolados de *Staphylococcus* spp. e outras espécies bacterianas provenientes de amostras humanas, e concluíram que a ampicilina foi o antibiótico menos efetivo. Tahnkiwale et al. (2002) obtiveram um percentual de 100% de resistência à penicilina e ampicilina em 230 isolados provenientes de humanos. Baseados em dados obtidos de sistemas de monitoramento da resistência bacteriana na Hungria, Kaszanyitzky et al. (2004) concluíram que a penicilina foi o antibiótico menos eficiente frente a cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de humanos, mastite bovina e cães. A elevada resistência a antimicrobianos que vem sendo observada nos isolados clínicos é causa de grande preocupação mundial.

No presente estudo, os isolados provenientes de humanos e do conduto auditivo de cães apresentaram 16,67% e 15,62% de resistência à gentamicina, respectivamente. Não foi detectada resistência nos 16 isolados de mastites testados. Segundo Barrasa et al. (2000) e Farias (2002), os aminoglicosídeos têm mostrado boa efetividade contra infecções por estafilococos, sendo, portanto, apontados como fármaco de eleição no tratamento destas infecções. Estes resultados corroboram com Lilenbaum et al. (2000), onde, num total de 44 isolados de estafilococos, observaram 15,9% de resistência à gentamicina. No trabalho desenvolvido por Blue; Waoley (1977) e Cole et al. (1998) à resistência à gentamicina foi de 5,6% e 3,7% ao avaliarem 85 e 54 isolados, respectivamente.

No entanto, assim como os beta-lactâmicos, a resistência aos aminoglicosídeos também tem emergido entre os estafilococos coagulase-negativos. Este fato foi demonstrado por Archer; Scott (1991), que encontraram um percentual de resistência superior a 60% em 208 isolados de ECN a partir de várias fontes clínicas. Resultados similares foram verificados por Cunha; Lopes (2002), onde foi detectada elevada resistência à gentamicina. Estes autores analisaram 117 estafilococos coagulase-negativos, sendo 70,9% resistentes ao fármaco. Segundo Archer; Climo (1994), os ECN transportam genes que codificam enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, assim como o *S. aureus*. A redução da sensibilidade à gentamicina tem sido notada recentemente.

As espécies isoladas de humanos e do conduto auditivo de cães apresentaram 16,67% e 15,62% de resistência à vancomicina, respectivamente. Os isolados de leite bovino não apresentaram resistência à vancomicina, a semelhança do que ocorrera com a gentamicina. Esses percentuais podem ser considerados elevados se comparados a trabalhos anteriores desenvolvidos por Shuhaibar; Falkiner (1992), Tahnkiwale et al. (2002), nos quais a vancomicina apresentou 100% de eficácia frente a isolados de *Staphylococcus* spp. A resistência à vancomicina entre os estafilococos coagulase-negativos foi relatada pela primeira vez há 20 anos atrás (TUAZON; MILLER, 1983). Desde então, isolados de ECN tem demonstrado diminuída suscetibilidade à vancomicina. Estudo desenvolvido por Froggatt et al. (1989), demonstrou que num total de 70 isolados de ECN, 42% das cepas de *S. haemolyticus* apresentaram resistência intermediária ao fármaco. Os isolados humanos resistentes foram provenientes de pacientes internados em unidades intensivas que foram submetidos ao tratamento com o glicopeptídeo por pelo menos 20 dias. No entanto, Palazzo et al. (2005) relataram quatro casos de estafilococos coagulase-negativos resistentes à vancomicina isolados de pessoas saudáveis em São Paulo.

Acredita-se que o aumento dessa resistência, ao passar dos anos, está associado à constante exposição à vancomicina e sucessiva pressão seletiva ocasionando na transferência do gene de resistência entre as cepas (SIERADZKI et al., 1997; DOMARACKI et al., 1998).

A resistência bacteriana às penicilinas, causada pela produção de beta-lactamases, pode ser evitada pela co-administração de um inibidor de beta-lactamases, como sulbactam ou ácido clavulânico. Estes inibidores possuem fraca atividade antibacteriana, no entanto protegem o antimicrobiano contra a degradação por enzimas beta-lactamases (MOTTI, 1990). A associação beta-lactâmico mais inibidor de beta-lactamase foi o antibiótico que apresentou menor percentual de resistência nos isolados do conduto auditivo de cães, representando 12,5%. Nos isolados humanos a resistência foi de 19,1% e nenhum isolado de mastite bovina apresentou resistência. Thauvin-Eliopoulos et al. (1990) relataram a eficácia *in vivo* de 75% da associação ampicilina+sulbactam no tratamento de 16 animais com endocardites causadas por estafilococos resistentes à oxacilina. Estes dados corroboram com o trabalho desenvolvido por Ramos et al. (1992), onde este antibiótico foi o mais efetivo na prevenção de endocardites por ECN.

Kernodle; Kaiser (1993) confirmaram a eficácia profilática dos beta-lactâmicos associados aos inibidores de beta-lactamase na prevenção de infecções estafilocócicas resistentes à meticilina em animais. Esses dados corroboram com trabalho desenvolvido por Monroy et al. (2003), no qual 73 isolados de estafilococos foram testados frente a diferentes fármacos e, a associação ampicilina+sulbactam se mostrou bastante eficaz. Hirano; Bayer (1991) afirmam que ampicilina+sulbactam é uma opção terapêutica para as infecções causadas por cepas produtoras de beta-lactamase e multirresistentes. Os baixos valores de resistência encontrados, possivelmente, estão relacionados ao custo e ao uso ainda restrito deste tipo de antibiótico nas clínicas veterinária e humana (RUSSEL; CHOPRA, 1996).

A cefoxitina é uma cefalosporina que apresenta alta afinidade com a PBP2, PBP4 e resistência à meticilina, sendo indutora na expressão do gene *mecA* e apresentando grande especificidade (CAUWELIER et al., 2004). Os isolados do conduto auditivo de cães, mastite bovina e isolados nosocomiais apresentaram 46,87%, 18,75% e 50% de resistência, respectivamente. Cauwelier et al. (2004) avaliaram a resistência de 155 isolados de ECN à cefoxitina, sendo 60% dos isolados resistentes, corroborando com trabalho desenvolvido por Palazzo; Darini (2006) que obtiveram 49,66% de resistência dos 151 isolados de ECN avaliados. O aumento da resistência em estafilococos coagulase-negativos pode estar associado ao fato desses microrganismos fazerem parte da microbiota normal e assim, estarem mais expostos aos efeitos dos antimicrobianos. As sucessivas exposições permitem que essas bactérias tornem-se resistentes a esses antibióticos (HARIHARAN et al., 2006).

Os isolados de espécimes humanos apresentaram um percentual de resistência de 79,16% a oxacilina. Nos isolados do conduto auditivo a resistência foi de 59,35%. Já os isolados de mastite bovina não apresentaram resistência ao fármaco. John et al. (2002) analisaram 658 estafilococos coagulase-negativos e encontraram índices de resistência à oxacilina para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* igual a 62% e 82%, respectivamente. Ferreira et al. (2002) encontraram 64% de resistência à oxacilina em 152 ECN isolados de diferentes sítios clínicos, sendo *S. haemolyticus* o isolado que apresentou maior índice de resistência à oxacilina.

No trabalho desenvolvido por Terasawa (2006), os índices de resistência à oxacilina encontrados também foram bastante elevados, sendo de 83,9% em 118 isolados de *S. epidermidis* e 97,92% em 48 isolados de *S. haemolyticus*. Tais dados apresentam prevalência superior aos demais relatados na literatura internacional, os quais em média apresentam de 50 a 70% de isolados resistentes (KRCMERY et al., 1996; LIVERMORE, 2000; VON EIFF et al., 2000; DIEKEMA et al., 2001; HANBERGER et al 2001; FINKELSTEIN et al., 2002; JOHN et al., 2002; STEFANI; VARALDO, 2003). Os dados nacionais relatam de 66 a 68 % de isolados resistentes à oxacilina (SADER et al., 2001; FERREIRA et al., 2002; CHANG et al., 2003). Sader et al. (2001) relataram uma alta frequência de resistência à oxacilina (80%) em 261 isolados de estafilococos coagulase-negativos, provenientes de humanos, relacionados a infecções sanguíneas. Os isolados também foram resistentes à gentamicina, eritromicina e ciprofloxacina, com valores acima de 60%. Resultado similar foi encontrado por Michelim (2005), onde num total de 98 ECN, 74,2% foram resistentes à oxacilina e aos demais beta-lactâmicos. Segundo Agvald-Ohman et al. (2004), de um total de 182 isolados de estafilococos, 95% foram resistentes à penicilina, 86% à oxacilina e 54% à gentamicina. Nenhum isolado foi resistente à vancomicina. No presente trabalho foi encontrado um total de 37 isolados resistentes à oxacilina, sendo 18 provenientes do conduto auditivo de cães e 19 isolados humanos. A tabela 03 apresenta os percentuais de resistência dos isolados resistentes à oxacilina, provenientes de amostras animais e humanas, frente aos antibióticos testados e o anexo 05 contém análise estatística dos isolados resistentes à oxacilina e seu comportamento frente aos outros

antibióticos testados, para a avaliação da diferença significativa entre os percentuais de suscetibilidade encontrada.

Tabela 03. Percentual de resistência dos isolados provenientes de humanos e animais resistentes à oxacilina a diferentes antibióticos.

Antibióticos	Percentual de Resistência (%)	
	Cães (n=18)	Humanos (n=19)
Ampicilina	100	100
Penicilina	100	100
Gentamicina	22,2	15,8
Amp+sulb	5,6	5,3
Vancomicina	22,2	16,7
Cefoxitina	72,2	68,4

Estes isolados demonstraram 100% de resistência apenas à penicilina e ampicilina, não apresentando, portanto, multirresistência, uma vez que a vancomicina, gentamicina e a associação de ampicilina+sulbactam foram eficazes frente a estes. Resultados similares foram encontrados por Ferreira et al. (2003), onde isolados de estafilococos coagulase-negativos demonstraram baixos níveis de resistência à gentamicina, vancomicina, clindamicina, teicoplanina e tetraciclina, com exceção apenas à penicilina. O uso incorreto de antibióticos, associado à seleção natural dos microrganismos, provavelmente, resultou no fenômeno da resistência, tanto na medicina veterinária quanto na humana.

Segundo Meng; Doyle (1998), a resistência às drogas está relacionada, principalmente, com o uso excessivo de antibióticos e às aplicações subterapêuticas de antimicrobianos para a prevenção de doenças.

A emergência de cepas resistentes passou a ser um problema cada vez mais freqüente, e o paralelismo entre o uso de antimicrobianos e a seleção e conseqüente disseminação de estafilococos resistentes, é registrado e aceito internacionalmente (MANRIQUE; GALVÃO, 1997). A elevada resistência aos antimicrobianos, que vem sendo observada nos isolados, é causa de grande preocupação mundial. A prática da adição de antibióticos à ração animal, como também o mau hábito de prescrever terapia antimicrobiana, sem prévia identificação do agente, têm contribuído enormemente para a disseminação das cepas resistentes (ALBUQUERQUE et al., 1996; AARESTRUP, 2001).

4.3 Resistência Fenotípica à Cefoxitina e à Oxacilina como Método Preditivo para Presença do Gene *mecA*

De acordo com o CLSI (2005), 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 e sensibilidade equivalente a oxacilina, tem sido preferencialmente recomendada. A melhor maneira de determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados à cefoxitina é através da técnica da difusão em disco enquanto que para a oxacilina é o

teste da CIM. O teste com disco de cefoxitina, quando comparado com os testes de CIM com oxacilina, possui idêntica sensibilidade, mas maior especificidade, sendo, portanto mais preciso na identificação.

Felten (2002) avaliou 152 *Staphylococcus* spp. e obteve 100% de sensibilidade e especificidade com o método de difusão em disco com cefoxitina e correlação com a presença do gene *mecA*. Da mesma forma, Skov et al. (2003) encontraram 100% de sensibilidade e 99% de especificidade em 157 isolados de *Staphylococcus* spp. e Cauwelier et al. (2004) encontraram 100% de sensibilidade e especificidade ao avaliarem 155 ECN utilizando este método. Swenson et al. (2005) ao compararem os testes da CIM e difusão em disco com oxacilina e cefoxitina para detecção fenotípica do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. relataram que tanto a CIM quanto a difusão em disco para oxacilina e cefoxitina são essencialmente equivalentes no desempenho da sensibilidade e especificidade em *S. aureus*. Entretanto, para os ECN, a cefoxitina mostrou melhor especificidade do que os testes com oxacilina. Hussain et al. (2002), avaliaram 181 estafilococos coagulase-negativos e encontraram a mesma sensibilidade e especificidade da difusão em disco com oxacilina e cefoxitina.

Terasawa (2006) ao avaliar a detecção do gene *mecA* através do método de difusão em disco para a oxacilina e cefoxitina em 185 isolados de ECN, não encontrou diferença significativa entre os resultados dos dois antimicrobianos. A sensibilidade e especificidade para os dois testes foram de 100% e 92%, respectivamente. Comparando os métodos de difusão em disco e diluição em ágar para os dois antimicrobianos, observou-se que a difusão em disco tanto para a oxacilina quanto para a cefoxitina apresentou resultados semelhantes ou melhores do que os resultados para a diluição em ágar. No entanto, embora o uso da cefoxitina seja recomendado para predição da presença do gene *mecA* por ser um método eficiente, Terasawa (2006), relatou que o disco de oxacilina e cefoxitina identificaram dois isolados gene *mecA* negativos como resistentes. Já Frigatto et al. (2005) relataram que discos de cefoxitina podem falhar na detecção da resistência e por isso, devem ser utilizados juntamente com os de oxacilina. Ao avaliarem 241 isolados de estafilococos coagulase-negativos quanto a resistência à oxacilina e cefoxitina, reportaram que 5 isolados apresentaram diferença no perfil de suscetibilidade, sendo resistentes à oxacilina e sensíveis à cefoxitina, embora estes fossem gene *mecA* positivos.

No presente trabalho, foi possível observar diferenças significativas entre os percentuais de resistência fenotípica à oxacilina e cefoxitina para os isolados testados. Os percentuais de resistência à oxacilina e cefoxitina em isolados provenientes de animais e humanos estão representados na tabela 04.

Tabela 04. Percentual de resistência dos isolados animais e humanos à oxacilina e cefoxitina.

Antibióticos	Percentual de Resistência (%)		
	Isolados Animais		Isolados Humanos
	Cães (n=32)	Bovino (n=16)	Infecção Hospitalar (n=24)
Oxacilina	56,2	00	79,2
Cefoxitina	50	37,5	54,2

Segundo Swenson et al. (2005), a utilização do disco de cefoxitina juntamente com o disco de oxacilina para a predição do gene *mecA* deve ser realizado, pois casos discordantes entre os dois antimicrobianos podem ocorrer. De acordo com Palazzo; Darini (2006), o método

de difusão em disco com cefoxitina e oxacilina pode ser utilizado como teste inicial para determinação da suscetibilidade à meticilina em isolados de ECN, mas combinar os dois métodos minimiza erros na detecção da resistência à meticilina nos isolados. Entretanto, a possibilidade de erros na identificação não é excluída e estes resultados devem ser confirmados pela técnica de PCR (SWENSON et al., 2005). No presente trabalho, foi possível detectar a presença do gene *mecA* em apenas quatro isolados de ECN, onde 3 isolados (75%) foram resistentes à cefoxitina e oxacilina, no entanto, um isolado, embora *mecA* positivo, não expressou resistência fenotípica. O reduzido número de isolados *mecA* positivos, correspondendo a apenas 5,55% do total de isolados avaliados não permitiu estabelecer o grau de correlação entre a cefoxitina e a oxacilina como método de predição do gene.

4.4 Suscetibilidade à Oxacilina e a Presença do Gene *mecA*

A detecção da resistência à oxacilina pela utilização de métodos fenotípicos apresenta problemas devido a expressão heterogênea do gene *mecA* em muitos isolados de estafilococos coagulase-negativos, onde nem todas as células que possuem o gene o expressam através da síntese de PBP2a. Por isso, várias metodologias estão sendo desenvolvidas e outras modificadas para aumentar a detecção de isolados verdadeiramente resistentes à oxacilina. Entre estas metodologias, destaca-se o teste de difusão em disco modificado pela adição de NaCl, o método de diluição em ágar e microdiluição em caldo para determinação da CIM e o teste do ágar screen (HUSSAIN et al., 2000). Métodos moleculares para detecção do gene *mecA* de resistência à oxacilina, como o PCR, são considerados mais sensíveis que os métodos fenotípicos e por essa razão são utilizados como padrão ouro para avaliação da sensibilidade e especificidade de outros métodos (HUSSAIN et al., 2000; LOUIE et al., 2001; ZBINDEN et al., 2001; ALCARÁZ, 2003; CORSO, 2004). No entanto, não é um método viável para os laboratórios clínicos de rotina por apresentar custo mais elevado e necessitar de espaço físico e equipamentos especiais (JARLOV, 1997; HORSTKOTTE et al., 2002).

Segundo Ferreira et al. (2002) e Swenson et al. (2005) os testes fenotípicos com a oxacilina e cefoxitina utilizados na predição do gene *mecA*, precisam ser reavaliados para o estudo dos ECN, pois os parâmetros estabelecidos consideraram, em sua maioria, *Staphylococcus aureus*, o que tem gerado um grau de correlação entre os resultados fenotípicos e genotípicos inferior aos obtidos para esta espécie.

Os testes de suscetibilidade à oxacilina foram avaliados quanto à sensibilidade e especificidade em comparação com os resultados obtidos pela técnica de PCR. Os testes fenotípicos utilizados foram: difusão em disco modificada (figura 04), ágar screen (figura 05), microdiluição em caldo e diluição em ágar.

De acordo com os resultados dos quatro testes realizados, os isolados apresentaram os seguintes perfis de suscetibilidade:

- 26 amostras desenvolveram resistência nos quatro testes e apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) igual ou superior a 8,00µg/mL;
- 01 amostra demonstrou sensibilidade em todos os testes analisados;
- 21 amostras foram sensíveis no teste de difusão em disco modificada e ágar screen, onde 85,7% apresentou CIM superior a 8,0µg/mL;
- 10 amostras foram resistentes na difusão em disco modificada e sensível no teste do ágar screen e apresentaram CIM igual ou superior a 8,00µg/mL;

- 03 amostras foram sensíveis na difusão em disco modificada e resistentes no ágar screen e apresentaram CIM igual ou superior a 8,00µg/mL;
- 11 amostras foram resistentes aos testes realizados e apresentaram CIM igual a 1,00 µg/mL.

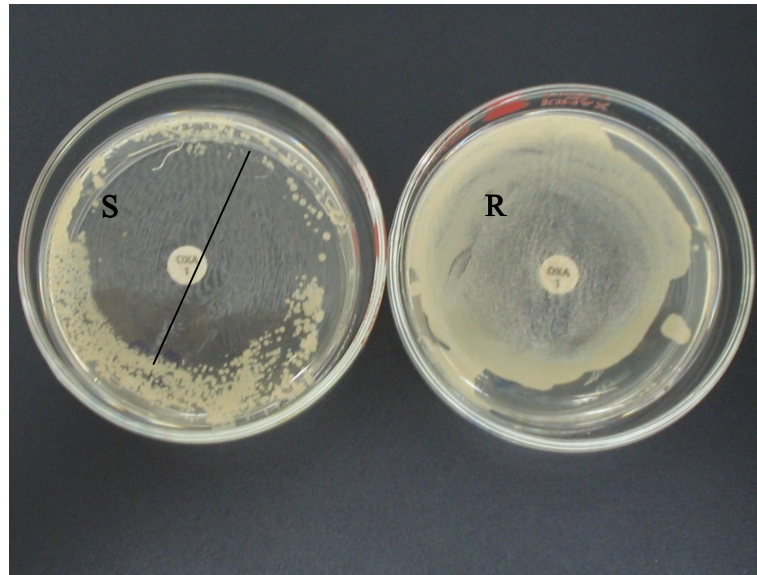


Figura 04. Método de difusão em disco modificada. A linha demonstra o halo de sensibilidade ao disco de oxacilina (10UI), e, pode-se avaliar o crescimento bacteriano ao redor do disco de antibiótico (R).

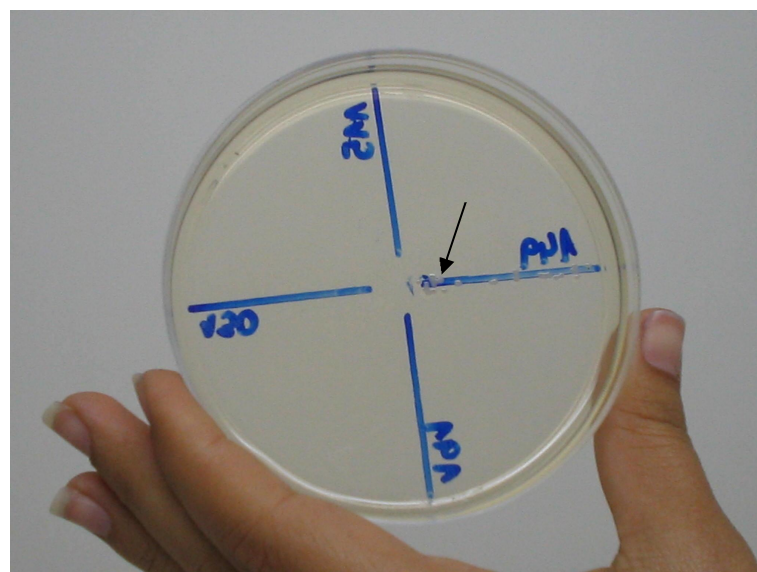


Figura 05. Técnica de ágar screen. A seta indica colônia crescida em meio contendo oxacilina (6µl/mL).

Após análise fenotípica, os isolados foram avaliados quanto a presença do gene *mecA* pela técnica de PCR. Do total de 72 isolados avaliados, 4 (5,55%) foram positivos para a presença do gene *mecA* (figura 06) e 68 negativos. Todas os isolados *mecA* positivos são provenientes de amostras animais. A tabela 05 apresenta o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, *mecA* positivos.

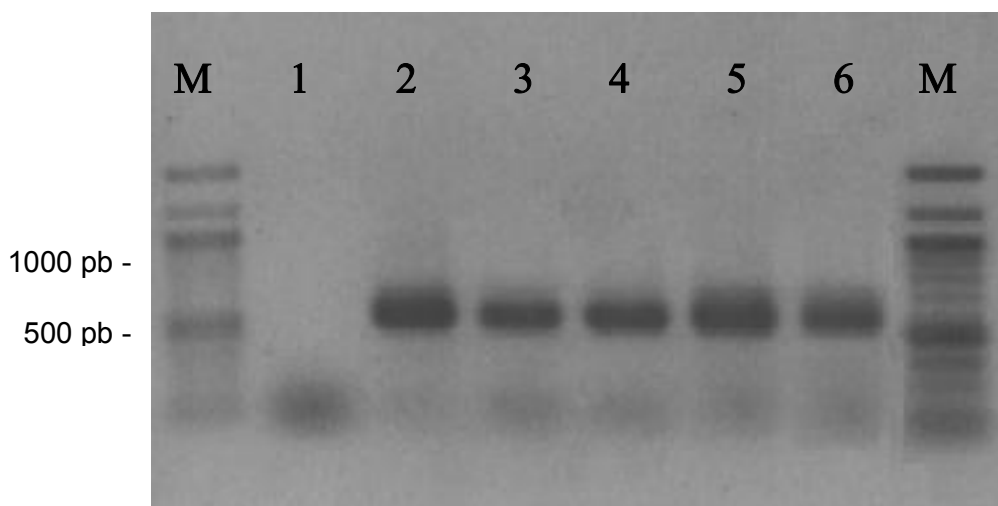


Figura 06. Eletroforese do fragmento do gene *mecA* (513 pb) de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isoladas de animais, em gel de agarose a 1,5%. Legenda: M. Marcador de peso molecular (100 kb), 1. controle negativo, 2. Controle positivo, 3-6. Isolados positivos para o gene.

Tabela 05 – Perfil de resistência/suscetibilidade dos isolados *mecA* positivos:

Isolado	Difusão em Disco Simples	Difusão em Disco Modificada	Ágar Screen	CIM (caldo)	CIM (ágar)
1	R	S	R	R	R
2	R	R	R	R	R
3	S	S	S	S	S
4	R	S	S	R	R

Estudos relatam que isolados resistentes à oxacilina em diferentes testes fenotípicos podem não apresentar o gene *mecA*, podendo este fato ser explicado pelo fenótipo de hiperprodução de beta-lactamases (CHAMBERS, 1997; MARTINEAU et al., 2000; BROWN, 2001; McKINNEY et al., 2001). A produção de beta-lactamase foi descrita por McDougal; Thornsberry (1986) sendo reconhecida como causadora da resistência *in vitro* em *Staphylococcus* spp. desprovidos do gene *mecA*. A resistência clássica à oxacilina está diretamente relacionada a alterações da PBP2a, onde os isolados possuem o gene *mecA* expresso. A transferência horizontal deste gene em clones de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (JACOBY; ARCHER, 1991) e, principalmente em *S. aureus* (KREISWIRTH et al., 1993; WIELDERS et al., 2001) resultaram na disseminação mundial de clones oxacilina

resistentes. Além destes mecanismos mencionados, Tomasz et al. (1991), relataram um terceiro mecanismo de resistência à oxacilina que é baseado na modificação da afinidade de outras “PBPs”. Segundo Petinaki et al. (2001), a PBP3 é a principal proteína envolvida neste caso de resistência.

Além destes fatores, a detecção de apenas quatro isolados *mecA* positivos pode estar relacionada a pouca disseminação deste gene em populações de espécies de ECN não envolvidas frequentemente em processos infecciosos, ao contrário do que ocorre com *S. epidermidis* (FERREIRA et al., 2002).

Após a detecção do gene *mecA*, os testes realizados foram avaliados quanto a sua sensibilidade e especificidade na predição da resistência. De acordo com os resultados obtidos, a difusão em disco simples e a microdiluição em caldo e diluição em ágar apresentaram sensibilidade de 75%, ao passo que a difusão em disco modificada e a técnica do ágar screen apresentaram sensibilidade de 50%. A sensibilidade das técnicas fenotípicas como método preditivo da presença do gene *mecA* é dada pelos isolados que são resistentes nos testes fenotípicos e que possuem o gene. Em relação a especificidade, a difusão em disco simples apresentou 48%, a técnica do ágar screen 41%, a difusão em disco modificada 38% e a CIM em caldo e em ágar, 14%. A especificidade é definida como a capacidade de distinguir os isolados sensíveis aos testes fenotípicos e que não apresentam o gene *mecA* (PEREIRA, 1995).

Apesar do limitado número de isolados que apresentaram o gene *mecA*, os resultados foram submetidos à análise Fatorial Q para estabelecer uma correlação linear entre os métodos fenotípicos e genotípico. Desta, foi possível detectar que a técnica da CIM (gráfico 04) obteve melhor correlação com a detecção do gene *mecA*, podendo este ser usado nos laboratórios como método para predição deste gene.

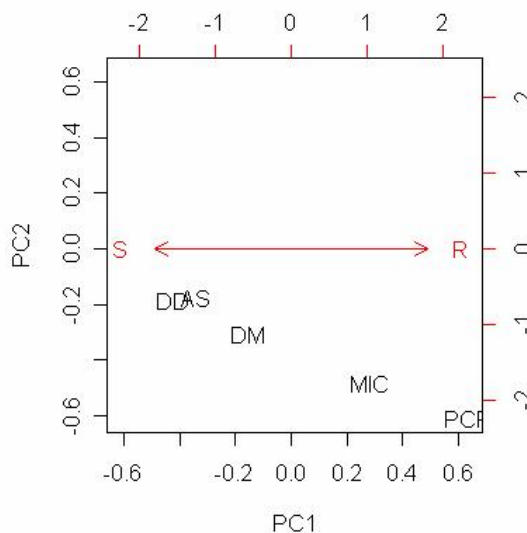


Gráfico 04. Correlação dos resultados dos testes fenotípicos de resistência à oxacilina com a detecção do gene *mecA*. Legenda: DD - difusão em disco simples, AS - ágar screen, DM - difusão em disco modificada, MIC - concentração inibitória mínima e PCR - reação em cadeia de polimerase.

A eficácia do teste de difusão em disco é bastante discutida e seus resultados são controversos. Autores como York et al. (1996), relatam que, embora seja o ensaio mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica por sua praticidade e baixo custo, foi o método menos confiável para a detecção da resistência à oxacilina. Este autor avaliou 142 estafilococos coagulase-negativos, onde 12 isolados de *S. saprophyticus* sensíveis à oxacilina foram *mecA* positivos. Da mesma forma, Ferreira et al. (2003), isolaram 152 ECN e relataram que a difusão em disco foi o método que apresentou menor sensibilidade, onde seis isolados de *S. epidermidis*, *mecA* positivos, foram sensíveis à oxacilina e 4 *mecA* negativos foram resistentes, demonstrando 94,2% de sensibilidade e 91,8% de especificidade. Como já mencionado, estes achados podem estar associados com a heterorresistência das cepas à oxacilina, como também a ausência da expressão do gene *mecA* nestes isolados ou hiper produção de beta-lactamase (FREBOURG et al., 1998). Já Hussain et al. (2002), consideram a difusão em disco o método de melhor acurácia na detecção da resistência à oxacilina, com 99,4% de sensibilidade e 91,8% de especificidade. Dos 293 estafilococos coagulase-negativos avaliados, 158 foram *mecA* positivos. Destes, em apenas um não foi detectado resistência pela difusão em disco. Hussain et al. (1998) avaliaram 181 isolados de ECN, sendo 82 sensíveis à oxacilina e *mecA* negativos e 99 resistentes e *mecA* positivos. A difusão em disco identificou todas as cepas *mecA* negativas como sensíveis à oxacilina. Kampf et al. (1998) relataram que a difusão em disco simples e a diluição em ágar apresentaram maior sensibilidade, 100% e 98%, respectivamente ao analisarem 151 isolados de estafilococos. Da mesma forma, Coelho (2005) ao analisar 59 isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. relatou que a difusão em disco simples foi o método que apresentou melhor resultado fidedigno à presença do gene, uma vez que a sensibilidade do teste foi de 83,3%.

No entanto, Ferreira et al. (2002) e Rowe et al. (2002) relataram ser o teste de diluição em ágar o de maior acurácia na detecção da resistência à oxacilina em *S. epidermidis*, considerado na literatura uma metodologia mais sensível que a difusão em disco, apresentando fácil execução e interpretação. Já Hussain et al. (2002) relataram que a diluição em ágar com isolados de ECN é limitada devido a detecção de falsos resistentes.

Ferreira et al. (2003) avaliaram a suscetibilidade de 152 estafilococos coagulase-negativos à oxacilina pelos métodos de diluição em ágar e ágar screen, sendo este último realizado em placas contendo 1, 2, 4 e 6 µg/mL de oxacilina. Dos 152 isolados, em 103 foram detectados o gene *mecA* e 49 isolados foram *mecA* negativos. Os resultados apontaram que o ágar screen com 4 µg/mL de oxacilina apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, sendo este o método mais acurado para a detecção da resistência à oxacilina entre os estafilococos testados. Além disso, foi considerado um método barato e de fácil execução. As concentrações 1, 2, 6 µg/mL demonstraram baixa sensibilidade e especificidade. A diluição em ágar apresentou 73,5% de especificidade e 100% de sensibilidade. Da mesma forma Caeirão (2004) testou a resistência à oxacilina em 175 estafilococos coagulase-negativos isolados de pacientes hospitalizados. Os métodos utilizados foram difusão em disco e ágar screen com 0,6 µg/mL e 4 µg/mL de oxacilina. O ágar screen com 4 µg/mL de oxacilina foi o método que apresentou melhor acurácia, identificando corretamente a resistência dos ECN. Esta técnica também foi considerada uma opção simples para ser utilizada pelos laboratórios clínicos de rotina. Terasawa (2006), de um total de 185 isolados de ECN, relatou apenas quatro amostras gene *mecA* positivas como sensíveis à oxacilina pela técnica do ágar screen.

Os estafilococos expressam resistência à oxacilina de forma heterogênea, isto é, apenas uma em 10^4 a 10^8 das células, e isto frequentemente dificulta a identificação de isolados *mecA* positivos (HUSSAIN et al., 2000). Esta dificuldade persiste mesmo quando utilizamos métodos

para detecção da CIM, em testes de suscetibilidade por diluição em caldo ou em ágar (GRADELSKI et al., 2001; NCCLS, 2003).

A expressão do gene sofre interferência de fatores ambientais *in vitro*, como variações de osmolaridade, temperatura, pH, tamanho do inóculo e tempo de incubação, assim como é induzida pelos próprios antimicrobianos beta-lactâmicos. Os fatores externos, portanto, interferem na detecção da resistência nos testes microbiológicos tradicionais. O uso adicional de sal no meio de cultura tem sido sugerido por diversos pesquisadores. Barber (1964) usou 5% de NaCl e reportou melhor crescimento no meio suplementado com sal quando comparado ao meio de cultura simples. Da mesma forma, Barry e Badal (1977) reportaram que a adição de 5% de NaCl ao caldo MH aumenta a detecção da resistência à meticilina. A utilização de NaCl no meio de cultura foi descrito como sendo uma possibilidade de aumentar o reconhecimento de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (THORNSBERRY; MCDUGAL, 1983). O mecanismo pelo qual a adição de NaCl se faz importante e a significância da influência da adição de sal no fenômeno de resistência bacteriana ainda não são bem elucidados. A possibilidade de mudanças na atividade dos antibióticos através da adição de NaCl e a ativação dos mecanismos de resistências conhecidos – produção de PBP's e betalactamases - também precisam ser avaliados (JUNG et al, 2002). Alguns autores discordam da eficácia da adição de NaCl como indutor da expressão de resistência, Rowe et al. (2002) avaliaram os diferentes testes fenotípicos de predição de resistência à oxacilina em 100 isolados clínicos provenientes do Hospital Mãe de Deus em Porto Alegre. Neste estudo foi verificado o desempenho de diferentes métodos fenotípicos na detecção da resistência à meticilina. O teste de diluição em ágar, sem adição de NaCl, foi bastante acurado na detecção da resistência em *S. aureus* e *S. epidermidis mecA* positivos. No entanto, os resultados não foram confiáveis quando se realizou a suplementação com 4% de NaCl, gerando resultados falsos, onde cepas *mecA* negativas foram resistentes à oxacilina. Lencastre et al. (1991) também afirmaram que a adição de sal não parece ser favorável no teste da difusão em disco, pois pode produzir inúmeros erros de leitura. Da mesma forma, Huang et al. (1993) afirmaram que a adição de 2%, 4% e 5% de NaCl utilizadas na detecção da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. não apresentou resultados satisfatórios.

Huang et al. (1993) analisaram a acurácia da microdiluição em caldo com 2% de NaCl em 124 ECN. Somente 3 *Staphylococcus epidermidis* e 3 *Staphylococcus haemolyticus* foram resistentes à oxacilina, embora estes fossem *mecA* negativos. Já York et al. (1996) encontraram resultados discordantes ao correlacionar a microdiluição em caldo com 2% de NaCl à presença do gene *mecA*, onde, das 45 cepas *mecA* positivas, 23 foram sensíveis à oxacilina. No entanto, Baker et al. (1994) afirmaram que a concentração de 2% de NaCl e não 4% é eficaz na detecção da resistência.

Murakami et al. (1991) estão entre os primeiros pesquisadores a utilizar a técnica de PCR para a detecção de resistência à oxacilina em isolados de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativos. Uma região de 533 pb contendo o gene *mecA* foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC) correspondente aos nucleotídeos 1282 a 1303, e o outro (5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC) complementar aos nucleotídeos 1793 a 1814. Entre os ECN, as espécies que apresentaram o gene *mecA* foram *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* e *S. caprae*, sendo que dois *S. haemolyticus* que não apresentaram gene *mecA* foram resistentes à oxacilina, sugerindo a presença de um outro mecanismo responsável pela resistência, que não está ligada com a produção de PBP2a. Para os *S. epidermidis*, quatro isolados foram sensíveis na técnica da microdiluição em caldo, porém foram gene *mecA* positivos. Em conclusão, os autores

consideraram a técnica eficaz na detecção de isolados oxacilina resistentes, incluindo aqueles com resistência heterogênea.

No presente trabalho, as espécies de ECN encontradas com maior frequência dentre os isolados animais foram *Staphylococcus xylosus* e nas amostras humanas foram *S. cohnii* subsp. *cohnii* e *S. haemolyticus*. No entanto, relatos sobre a presença do gene *mecA* em determinadas espécies de ECN são escassos. Diversos estudos reportam alta prevalência de isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus mecA* positivos associados à infecção hospitalar provocadas por contaminação de fômites (BANNERMAN 2003; FERREIRA et al, 2003) Esta espécie é altamente relatada em amostras humanas, porém no presente estudo, apresentou baixa prevalência, possivelmente devido aos sítios de coleta das amostras.

Existe a necessidade de estudos que padronizem metodologias especificamente para os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, uma vez que a grande maioria dos ensaios foi estabelecida tomando *Staphylococcus aureus* como modelo.

5 CONCLUSÃO

- Os isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos provenientes de amostras coletadas de animais e humanos apresentaram elevada resistência à penicilina e à ampicilina.

- A associação beta-lactâmico mais inibidor de beta-lactamase foi o antibiótico que apresentou menor percentual de resistência nos isolados do conduto auditivo, possivelmente pelo uso restrito na terapêutica veterinária;

- Os isolados resistentes à oxacilina não apresentaram multirresistência, visto que a vancomicina, a associação de ampicilina-sulbactam e a gentamicina foram eficazes frente aos isolados animais e humanos;

- Não houve correlação entre a cefoxitina e a oxacilina como método de predição do gene *mecA* devido ao reduzido número de isolados *mecA* positivos;

- A heteroresistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos foi demonstrada frente às diferenças de características de crescimento nos testes utilizados, onde possivelmente uma população apresentava tanto organismos suscetíveis quanto organismos resistentes;

- As técnicas de microdiluição em caldo e diluição em ágar apresentaram maior correlação com a presença do gene *mecA*;

- A baixa frequência do gene *mecA*, apenas 4 isolados positivos de um total de 72 isolados avaliados, indica não ser este o principal mecanismo de resistência utilizado por estes isolados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canidea gives possible evidence for host specificity and co-evolution of bacteria and hosts. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1343–1347, 2001.
- ADANG, R.P.; SCHONTEN, H.C.; VAN TIEL, F.H.; e BLIJHAM, G.H. Pneumonia due to *Micrococcus* spp in a patient with acute myeloid leukaemia. **Leukaemia**, v.6, p.224-226, 1992.
- ADESYIUN, A.A.; PRABHAKAR, P.; ALI, C.; LEWIS, M. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical and non-clinical human sources in Trinidad: susceptibility to bacteriophages and antimicrobial agents, and toxigenicity. **Zentralbl Bakteriologie**, v.282, p. 519–532, 1995.
- AGVALD-ÖHMAN, C.; LUND, B.; EDLUND, C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. **Critical Care**, v.8, n.1, p.42-47, 2004.
- ALBUQUERQUE, L.M.B.; MELO, V.M.M.; MARTINS, S.C.S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza-CE-Brasil. **Higiene Alimentar**, v.10, n.41, p.29-32, 1996.
- ALCARÁZ, L.E. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.45-51, 2003.
- ARCHER, G.L.; SCOTT, J. Conjugative transfer genes in staphylococcal isolates from the United States. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.35 p.2500–2504, 1991.
- ARCHER, G.L.; CLIMO, M.W. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.38 p.2231–2237, 1994.
- AUGUST, J.R. Enfermedades del oído. **Clinical Veterinary North American**, v.18, p. 260-274, 1993.
- BAKER, C.N.; HUANG, M.B.; TENOVER, F.C. Optimizing testing of methicillin-resistant *Staphylococcus* species. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.19, p.167–170, 1994.
- BANNERMAN, T.M. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.384-404, 2003.
- BARBER M. Naturally occurring methicillin-resistant staphylococci. **Journal Gen Microbiology**, v.35, p.183–190, 1964.

BARELLI, C.; MINTO, E.C.; MARTINEZ, R.; DARINI, A.L. Evaluation of the antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci by Etest. **Revista Latinoamericana Microbiologia** v.41, n.2, p.67–72, 1999.

BARRASA, J.L.; GOMEZ, P.L.; LAMA, Z.G. Antibacterial susceptibility patterns of strains isolated from chronic canine otitis externa. **Jornal Medicina Veterinária**, v.47, p.191- 196, 2000.

BARRY, L. A.; BADAL, R.E. Reliability of the microdilution technique for detection of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **American Journal Clinical Pathologic**, v.63, p.489-495, 1977.

BLACK, J.G. Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas. 4^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.370-419, 2002.

BLUE, J.L.; WAOLEY, R.E. Antibacterial sensitivity patterns of bacteria isolated from dogs with otitis externa. **Journal of American Veterinary Medical Association** v.171, p. 362-363, 1997.

BOAG, A.; LOEFFLER, A.; LLOYD, D.H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in small animal practice. **Veterinary Record**. v.154, p.366, 2004.

BOOTH, J.M. Progress in the control of mastitis. **International Mastitis Seminar**, 3, 1995, Tel Aviv. Proceedings. Tel Aviv: International Dairy Federation, v.2, p.3-10, 1995.

BOYCE, J.M.; POTTER-BYNOE, G.; CHENEVERT, C.; KING, T. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. **Infections Control Hospitalar Epidemiology**, v.18, p.622-627, 1997.

BRADLEY, S.F.; TERPENNING, M.S.; RANSEY, M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term care facility. **Ann. Internation Medicine**, v.115, p.417-422, 1991.

BROWN, D.F.J. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.65-70, 2001.

CAIERÃO, J. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p. 1195-1199, 2004.

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 Infectious Disease**, v.23, p.389-392, 2004.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Recommendation for preventing the spread of vancomycin resistance recommendations of the hospital infection control practices advisory committee (HICPAC). **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 44(RR12): 1-13, 1995.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 46(27): 626-628, 635, 1997.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 51(26): 565-7, 2002.

CEFAI, C.; ASHURST, S.; OWENS, C. Human carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. **Lancet**, v.344, p.539-540, 1994.

CERCENADO, E.; GARCÍA-LEONI, M.E.; DÍAZ, M.D.; SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; CATALÁN, P.; BERNALDO DE QUEIRÓS, J.C.L.; BOUZA, E. Emergence of teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci. **Journal Clinical Microbiology**, v. 34, n.7, p. 1765-8, 1996.

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.

CHANG, M. R.; CARVALHO, N. C.P.; OLIVEIRA, A.L.L.; MONCADA, P.M.F.; MORAES, B.A.; ASENSI, M.D. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v.7, n.2, p. 149-60, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2005.

COELHO, S.M.O. Caracterização genética e mapeamento do perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* isolados a partir de amostras clínicas provenientes de espécies humanas e animais. Dissertação de mestrado. Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.

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.

COELLO, R.; GLYNN, J.R.; GASPAR, C.; PICAZO, J.J.; FERERES, J. Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA. **Journal Hospital Infectious**, v.37, p. 39-46, 1997.

COLE, L.K.; KWOCKKA, K.W.; KOWALSKI, S.J. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear and middle ear dogs with otitis media. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.212, p.534-538, 1998.

CORSO, A. Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p.223-225, 2004.

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 Chemotherapy**, v.48, p. 463–478, 2002.

CUNHA, M.L.R.S.; SINZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.V.A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.8, 2004.

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

De GIUSTI, M. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.44, p. 351-358, 1999.

De PAULIS, A.N.; PREDARI, S.; CHAZARRETA, C.D.; SANTOIANNI, J.E. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **Journal Clinical Microbiology** v.41, p.1219-1224, 2003.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical Infectious Disease**, v.32, p. S114–S132, 2001.

DOMARACKI, B.E.; EVANS, A.; PRESTON, K.E.; FRAIMOW, H.; VENEZIA, R.A. Increased oxacillin activity associated with glycopeptides in coagulase-negative staphylococci. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**, v.17, p.143–150, 1998.

DOMINGUEZ, M.A.; LINARES, J.; MARTIN, R. Molecular mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**. v.13, p.301-308, 1997.

DUIJKEREN, E.V.; MAURICE J.H.M.; WOLFHAGEN A.; BOX, T.A.; MAX E.O.C.; HECK W.J.B.; FLUIT W. Human-to-Dog Transmission of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Emer. Infec. Dis**. v.10, n.12, p. 2235-2237, 2003.

DUIJKEREN, E.V; BOX, A.T.A; HECK, M.E.O.C; WANNET ,W.J.B; FLUITB, A.C. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology** v.103, p.91–97, 2004.

EL-ADHAMI, W.; STEWART, P.R. Genome organization of *Staphylococcus aureus* isolates from different populations. **Journal Medical Microbiology**, v.46, p.297-306, 1997.

FARIAS, M.F. Terapêutica otológica. In: **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo, Roca, 2002.

FELTEN, A. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.8, p.2766-2771, 2002.

FERREIRA, R.B.R.; NUNES, A.P.F.; KOKIS, V.M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L.S.; BASTOS, M.C.F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K.R.N. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 42, p. 205-212, 2002.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentrations of oxacillin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3609-3614, 2003.

FILE Jr, T. M. Overview of resistance in the 1990s. **CHEST**, 115: 3s-8s. Supplement, 1999.

FINKELSTEIN, R.; FUSMAN, R.; OREN, I.; KASSIS, I.; HASHMAN, N. Clinical and epidemiologic significance of coagulase-negative staphylococci bacteremia in a tertiary care university Israeli hospital. **American Journal Infectious Control**, v.30, p.21-25, 2002.

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

FREBOURG, N.B.; NOUET, D.; LEME, E.L.; MARTIN, E.; LEMELAND, J.F. Comparison of ATB Staph, Rapid ATB Staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*. **Journal Clinical Microbiology**, v.36, p.52-57, 1998.

FRIGATTO, E.A.M.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.4, p.2028-2029, 2005.

FROGGATT, J.W.; JOHNSTON, J.L.; GALETTO, D.W.; ARCHER, G.L. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 33, p. 460-466, 1989.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A.; REBUELTO, M.; FERMEPIN, M.R.; De TORRES, R.A.J. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina **American Dairy Science**, v.85, p.1913-1917, 2002.

GIANNEECHINI, R.; CONCHA, E.; FRANKLIN, C.A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the West Littoral region of Uruguay. **Acta Veterinary**, v. 43, p.31–41, 2002.

GIGLIO, M.S.; FARIAS, O.; LAFOUCADE, M.; PINTO, M.E. Surveillance of gram positive cocci susceptibility to betalactams, glycopeptides, and other antimicrobial. **Revista Medicina Chilena**, v.127, n.8, p. 919-925, 1999

GRADELSKI, E. VALERA, L.; ALEKSUNES, L.; BONNER, D.; FUNG-TOMC, J. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.8, p. 2961-2963, 2001.

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.

GRANT C.E.; SEWELL, D.L.; PFALLER, M.; BUMGARDNER, R.V.S.; WILLIAMS, J.A. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative *Staphylococcus* to species level. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.18, p.1-5, 1994.

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

HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. **Análise multivariada de dados**, 5ª edição – Porto Alegre, ed. Bookman, 2005.

HANBERGER, H.; HOFFMANN, M.; LINDGREN, S.; NILSSON, L.E. High incidence of antibiotic resistance among bacteria in 4 intensive care units at a university hospital in Sweden. **Scand. Journal Infectious Disease**, v.29, p.607–614, 2001.

HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D.; LUND, L.; PAGE, R. Update on microbial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. **Canadian Veterinarian Journal**, v.47, p.253-257. 2006.

HARTMANN, F.A.; TROSTLE, S.S.; KLOHNEN, O.A.A. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.221, p.590-592, 1997.

HEIJENOORT, J.V.; Formation Of Glycan Chains In The Synthesis Of Bacterial Peptidoglycan, **Glycobiology**, v.11, n.3, p.25R-36R, 2001.

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

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal Antimicrobial Chemother.** v.40, p.135-136, 1997.

HIRANO, L.; BAYER, A. S. b-Lactam–b-lactamase inhibitor combinations are active in experimental endocarditis caused by b-lactamase-producing oxacillin-resistant staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.35, p. 685–690, 1991.

HOEFNAGELS-SCHUERMANS, A.; BORREMANS, A.; PEETERMANS, W.; VAN-LIERDE, S.; REYBROUCK, G.; VAN-ELDERE, J. Origin and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an endemic situation: differences between geriatric and intensive-care patients. **Journal Hospital Infectious,** v.36, p.209-222, 1997.

HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K.; ROHDE, H.; MACK, D. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology,** v.39, n.10, p.3700-3702, 2002.

HUANG, M.B.; GAY, T.E.; BAKER, C.N.; BANERJEE, S.N. TENOVER, F. C. Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with oxacillin when using agar-based dilution methods, **Journal Clinical Microbiology,** v.31, p.2683–2688, 1993.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D.A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annu. Ver. Med.,** v. 50, p. 223-236, 1999.

HUSSAIN, Z.; STOAKES, L.; LANNIGAN, R.; LONGO, S.; NANCEKIVELL, B. Evaluation of Screening and Commercial Methods for Detection of Methicillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci **Journal of Clinical Microbiology,** v.36,n.01, p. 273–274, 1998.

HUSSAIN, Z. STOAKES, L.; MASSEY, V.; DIAGRE, D.; FITZGERALD, V.; SAYED, S.; LANNIGAN, R. Rapid detection of *mec-A*-Positive and *mec-A*-Negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology,** v.38, n.6, p.2051-2054, 2000.

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, 2002.

INDUDHARAN R.; HAQ, J.A.; AIYAR, S. Antibiotics in chronic suppurative otitis media: a bacteriologic study. **Journal Clinical of Microbiology,** v.108, n.5, p.440-445, 1999.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v.43, p.1449-1458, 1999.

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 p.1323-1336, 2001.

JACOBY, G.A.; ARCHER, G.L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **New England Journal Medicine**, v.324, n.9, p.601-612, 1991.

JAPONI, A.; ALBORZI, A.; MANOOCHHEHR, R.; POURABBAS, B. Modified DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin-resistant staphylococci. **Iran. Biom. J.** v.8, n.3, p.161-164, 2003.

JARLOV, J.O. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p. 241-249, 1997.

JARVIS, W.R., MARTONE, W.J. Predominant Pathogens in Hospital Infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.29, p.19-24, 1992.

JOHN, M.A.; PLETCH, C.; HUSSAIN, S. *In vitro* activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telitromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p. 933-938, 2002.

JUNCO, M.T.T.; BARRASA, J.T.M. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. **Journal Veterinary Medicine**, v.49, p.419-423, 2002.

JUNG, S.; KIEM, S.; LEE, N.Y.; KIM, Y.; OH, W.S.; CHO, H.L.; PECK, K.R.; SONG, J. One-Point Population Analysis and Effect of Osmolarity on Detection of Hetero-Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1493-1495, 2002.

KAKAR, N.; KUMAR, V.; METHA, G.; SHARMA, R.C.; KORANNE, R.V. Clinico-bacteriological study of Pyodermas in children. **The Journal of Dermatology**, v.26, p.288-293, 1999.

KAMPF, G.; LECKE, C.; CIMBAL, A.K.; WEIST, K.; RUDEN, H. Evaluation of mannitol salt for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion and agar screening. **Journal Clinical Microbiology**, v.36, p.2254-2257, 1998.

KASZANYITZKY E.J.; EGYED Z.; JANOSI S.; KESERU J.; GAL, Z.; SZABO, I.; VERES, Z.; SOMOGY, I. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. **Acta Veterinaria Hung.** v.52, n.1, p.7-17, 2004.

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.; NAGASE, K.; ENDO, M.; SHIGEMATSU, T.; EZAKI T.; STAPHYOGRAM, E. a new rapid identification kit for the aerobic, gram-positive, catalase-positive cocci. **Jpn. J. Bacteriol.** v.46, p.597–610, 1991.

KERNODLE, D.S.; KAISER A.B. Efficacy of prophylaxis with b-lactams and b-lactamase inhibitor combinations against wound infection by methicillin-resistant and borderline-susceptible *Staphylococcus aureus* in a guinea pig model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p.702–707, 1993.

KHACHATOURIANS, G.G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **CMAJ**, v.159, p.1129–1136, 1998.

KIKUCHI, K.; KARASAWA, T.; PIAO, C. Molecular conformation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. **Journal Infections and Chemotherapy**, v.10, p.46-48, 2004.

KLOOS, W.; SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.1, n.1, p.82-85, 1975.

KLOOS, W.E., LAMBE, JR. D.W. *Staphylococcus*. In Ballows A, Hausler Jr WJ, Herrman KL, Iseberg HG, Shalomy HJ: **Manual of Clinical Microbiology**, 5th ed. Washington, American Society for Microbiology, p.222-237, 1991.

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

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.1, p. 117-140, 1994.

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 negative *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. **Diagnóstico Microbiológico**, 5.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2001.

KRCMERY Jr, V.; TRUPL, J.; DRGONA, L.; KACKA, J.; KUKUCHKOVA, E.; ORAVCOVA, E. Nosocomial bacteremia due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in four patients with cancer, neutropenia, and previous treatment with vancomycin. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**, v.15, p.259-261, 1996.

- KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT, R.D.; EISNER, W.; MASLOW, J.N.; McGEER, A.; LOW, D.E.; NOVICK, R.P. Evidence for a Clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science**, v.259, p.227-230, 1993.
- 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*. **N. Engl J Med**, v.319, p.157-61, 2001.
- LAI, K.K.; KELLEY, A.L.; MELVIN, Z.S.; BELLIVEAU, P.P.; FONTECCHIO, S.A. Failure to eradicate Vancomycin-resistant Enterococci in a University hospital and the cost of barrier precautions. **Infect Control Hospital Epidemiology**, v.19, p.647-652, 2004.
- LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DURVAL, J.; COURVALIN, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New Engl J Med**, v.319, p.157-61, 1988.
- LEITE, C.A.L. As otites de cães e gatos. Parte 1– Epidemiologia. *Cães Gatos*, v.15, p.22-26, 2000.
- LENCASTRE, H.; FIGUEIREDO, A.; URBAN, C.; RAHAL, J.; TOMASZ, A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p. 632-639, 1991.
- LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from otitis externa in dogs. **Letters Applied Microbiology**, v.31, p.42-45, 2000.
- LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.16, p. S3-S10, 2000.
- LOUIE, L.; MAJURI, A.; GOODFELLO, J.; LOUIE, M.; A. SIMOR, E. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.11, p.4149-4151, 2001.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Invest**, v.111, p.1265-1273, 2003.
- LYYTIKÄINEN, O. Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**, v.15, n.2, p.133-138, 1996.
- MAGEE, J.T.; BURNETT, I.A.; HINDMARCH, J.M.; SPENCER, R.C. *Micrococcus* and *Stomatococcus* spp. From human infections. **Journal Hospital Infection**, v. 16, p.67-73, 1990.
- MANIAN, F.A. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. **Clinical Infectious Disease**, v.36, p.26-28, 2003.

MANN, C.; MARKHAM, J.L.A. New method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

MANRIQUE, E. I.; GALVÃO L.L. Racionalização e controle de antimicrobianos. **Infeção Hospitalar: prevenção e controle**. São Paulo, Sarvier. p.117-130, 1997

MARANGONI, D.V. *Staphylococcus aureus*. **Infeção Hospitalar: prevenção e controle**. São Paulo, Sarvier. p. 573-591, 1997.

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.

MATTHEWS, P.R.; STEWART, P.R. Resistance heterogeneity in methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.22, p.161-162, 1984.

McDOUGAL, L.K.; THORNSBERRY, C. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. **Journal Clinical Microbiology**, v.23, n.5, p. 832-239, 1986.

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.

MENG, J.; DOYLE, M.P. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. **Bull. Inst. Pasteur**, v.96, p.151–164, 1998.

MICHELIN, L. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.17-23, 2005.

MONROY, P.E.; PANIAGUA, C.G.L.; VACA, P.S.; GONZÁLEZ, A.S.E. Comparación de la efectividad de antibióticos β -lactámicos en cepas de *Staphylococcus aureus*. **Rev Hosp M Gea Glz**. v.6, n.1, p.7-12, 2003.

MORETTI, M.L.; BRATFICH, O.J.; STUCCHI, R.B.; LEVI, C.; LEVIN, A.S.; DUBOC, G.M.; VORMITTAG, E.; BLUM-MENEZES, D. Clonal dissemination of *vanA* type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* between hospitals of two cities located 100 Km apart. **Brazilian Journal Medicine Biology Res.**, v.37, n.9, p.1339-1343, 2004.

MORIARTY, D. J. W. Os perigos do uso de antibióticos na aquacultura. Disponível em: <<http://www.aqualider.com.br/article.php?recid=88>>. 2004. Acesso em 10 jan 2007.

MOTTI E.F. Contribuição Prática dos Novos Antibióticos: avanços e perspectivas. **Ver. Brás. Méd.**, v.47, n.6, p.236-244, 1990.

MURAKAMI, K.; NOMURA, K.; DOI, M.; YOSHIDA, T. Increased susceptibility to cephamycin-type antibiotics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* defective in penicillin-binding protein 2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.31, p.1423–1425, 1987.

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 Clinical Microbiology**, v.29, p. 2240-2244, 1991.

MUSSER, J.M.; KAPUR, V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus* strains from intercontinental sources: Association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. **Journal Clinical Microbiology**, v.30, p.2.058-2.063, 1992.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7–A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 1997.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, M2-A8. Wayne, PA. 2003.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others infectious agents as cause external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal Microbiology**, v.32, p. 245-249, 2001.

NORMAND, E.H.; GIBSON, N. R.; TAYLOR, D.J. Trends of antimicrobial resistance in bacterial isolates from a small animal referral hospital. **Veterinary Record** v.146, p.151–155, 2000.

OKONOJI, K., NOGI, Y., KONDO, M., IMADA, A., YOKOTA, T. Emergence of methicillin-resistant clones from cephamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.24, p.637–645, 1989.

PALAZZO, I.C.V.; ARAUJO, M.L.C.; DARINI, A.L.C. First report of vancomycin resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.179-185, 2005.

PALAZZO, I.C.; DARINI, A.L. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion. **Microbiology Letters**, v.257, p.299–305, 2006.

PATRICK, C.C. Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. **The Journal of Pediatrics**, v.116, n.4, p.497-507, 1990.

PEREIRA, M.G. Epidemiologia: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS. p.358-375, 1995

PERL, T.M.; RHOMBERG, P.R.; BALE, M.J.; FUCHS, P.C.; JONES, R.N.; KOONTZ, F.P.; PFALLER, M.A. Comparison of identification systems for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.18, p151–155, 1994.

PETERSSON, A.C.; KAMME, C.; MIÖRNER, H. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. **Journal Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.2047-2050, 1999.

PETINAKI, E.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Decreased affinity of PBP3 to methicillin in a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* with borderline resistance to methicillin and free of the *mecA* gene **Microbiology Drug Resistance**, v.7, n.3, p.297-300, 2001.

PINHO, M.G.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Na acquired and a native penicillinbinding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. **PNAS**, v.98, n.19, p.10886-10891, 2004.

R Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

RAIMUNDO, O. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v.51, p.33-42, 2002.

RAMOS, M.; WITT, M.; BAYER, A. Ampicillin-sulbactam prophylaxis of experimental endocarditis caused by b-lactamase-producing staphylococci, abstr. 1455, p. 353. In Program and abstracts of the 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992.

ROWE, F.; SUPERTI, S.V.; SCHEIBE, R.M.; DIAS, C.G. Agar diffusion, agar dilution, Etest®, and agar screening test in the detection of methicillin resistance in staphylococci. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.43, p.45-48, 2002.

RUSSEL, A.D.; CHOPRA, I. Understanding antibacterial action and resistance. (Second Edition) **El. Horwo. Chichester**, 1996.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v.5, n.4, p.200-214, 2001.

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.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D.V. Doenças Infecciosas - Conduta Diagnóstica e Terapêutica. 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan, 1998.

SCHWALBE, R.S.; STAPLETON, J.T.; GILLIGAN, P.H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. **New England Journal Medicine**, v.316, n.15, p.927-931, 1987.

SEGUIN, J.C.; WALKER, R.D.; CARON, J.P.; KLOOS, W.E.; GEORGE, C.G.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N.E.; PFALLER, M.A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak in a Veterinary Teaching Hospital: Potential Human-to-Animal Transmission. **Journal Clinical Microbiology**, v.37, p.1459 – 1463, 1999.

SHARMA, M.; RIEDERER, K.; JOHNSON L. B.; KHATIB, R. Molecular analysis of coagulase-negative staphylococcus isolated from blood cultures: prevalence of genotypic variation and polyclonal bacteremia. **Clinical Infectious Disease**, v.33, p.1317-1323, 2001.

SHUHAIBAR, M.N.; FALKINER, F.R. The prevalence, antibiotic susceptibility and phage-type of nasally carried *Staphylococcus aureus* in the Dublin community. **Iran Journal Medicine Science**. v.161, n.10, p.589,1992.

SIERADZKI, K., TOMASZ, A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, v.179, p.2557–2566, 1997.

SIERADZKI, K.; ROBERTS, R. B.; SERUR, D.; HARGRAVE, J.; TOMASZ. A. Heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. **Journal Clinical of Microbiology**, v.37, n.1, p.39- 44, 1999.

SILVA, H.L. Nosocomial coagulase negative *Staphylococci* bacteremia: five years prospective data collection. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.4, n.6, p. 271-274, 2000.

SKOV, R.; SMITH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A.R.; FRIMODT-MOLLE, N.; OLSSON-LILJUIST, B.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30 mg disc on Iso-sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, p.204–207, 2003.

SMITH, T.L. Jarvis for the Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **New England Journal Medicine**, v.340, p.493–501, 1999.

SPELDOOREN, V.; HEYM, B.; LABIA, R.; NICOLAS-CHANOINE, M. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.42, p.879-884, 1998.

SRINIVASAN, A.; DICK, J. M.; PERL, T. M. Vancomycin resistance in staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.3, p.430-438, 2002.

STEFANI, S.; VARALDO, P. E. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. **Clinical Microbiology Infectious**, v.9, n.12, p.1179-86, 2003.

STRAUSBAUGH, L.J.; JACOBSON, C.; SEWELL, D.L.; POTTER, S.; WARD, T.T. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in extended care facilities: experiences in a Veteran's Affairs Nursing Home and a review of the literature. **Infections Control Hospital Epidemiology**, v.12, p.36-45, 1991.

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.

TAHNKIWALE, S.S; ROY, S.; JALGAONKAR, S.V. Methicillin resistance among isolates of *Staphylococcus aureus*: antibiotic sensitivity pattern & phage typing. **Archives of Internacional Medicine**, v.56, n.7, p.330, 2002.

TANNER, M.A.; EVERETT, C.L.; YOUVAN, D.C. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, p.1628–1631, 2000.

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TENOVER, F.C.; LANCASTER, M.V.; HILL, B.C.; STEWARD, C.D.; STOCKER, S.A.; HANCOCK, G. A.; O'HARA, C.M.; CLARCK, N.C. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. **Journal Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1.020-1.027, 1998.

TENOVER, F.C.; BIDDLE, J.W.; LANCASTER, M.V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infections Disease**, v.7, n.2, p.327-32, 2001.

TENSAY, Z.W. Staphylococci: frequency of isolation and antibiotic susceptibility pattern in Jimma Hospital, south-west Ethiopia. **Journal Ethiopia Medicine**, v.38, n.3, p.175-184, 2000.

TERASAWA, L.B. Caracterização da Resistência à Oxacilina em Estafilococos Coagulase-Negativos Isolados no Hospital de Clínicas de Curitiba – Paraná, Universidade Federal do Paraná, Dissertação de Mestrado, 2006.

THAUVIN-ELIOPOULOS, C.; RICE, L. B.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, JR.R.C. Efficacy of oxacillin and ampicillin-sulbactam combination in experimental endocarditis caused by b-lactamase-hyperproducing *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobials Agents Chemotherapy**, v.34, p.728–732, 1990.

THORNSBERRY, C.; MCDUGAL, L.K. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. **Journal Clinical Microbiology**, v.18, p.1084–1091, 1983.

THYLEFORS, J. D.; HARBARTH, S.; PITTET, D. Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 19, n. 8, p. 581-589, 1998.

TOKUE, Y.; SHOJI, S.; SATOH, K.; MOTOMYIA, M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, p.6-9, 1992.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H.B.; DE LENCASTRE, H.M.; JABES, D.; MCDUGALL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* : Clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, p.1869-1874, 1989.

TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAF, H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.124-129, 1991.

TOMLIN, J.; PEAD, M.J.; LLOYD, D.H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. **Veterinary Record**, v.144, p. 60–64, 1999.

TRZCINSKI, K.; HRYNIEWICZ, W.; KLUYTMANS, J.; VAN-LEEUVEN, W.; SIJMONS, M.; DULNY, G.; VERBRUGH, H.; VAN-BELKUM, A. Simultaneous persistence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* in a neonatal ward of a Warsaw hospital. **Journal Hospital Infections**, v.36, p. 291-303, 1997.

TUAZON, C.U., MILLER, H. Clinical and microbiologic aspects of serious infections caused by *Staphylococcus epidermidis*. **Scand. Journal Infectious Disease**, v.15, p.347–360, 1983.

VERNABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. *Modern Applied Statistics with S*, 4th ed. Springer-Verlag, New York. 495 pp. 2002

VON EIFF, C.; REINERT, R.R.; KRESKEN, M.; BRAUERS, J.; HAFNER, D.; PETERS, G. Nationwide German multicenter study on prevalence of antibiotic resistance in staphylococcal bloodstream isolates and comparative in vitro activities of quinupristin-dalfopristin. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, n.8, p.2819-23, 2000.

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.

WAXMAN, D.J.; STROMINGER, J.L. Penicillin-binding protein and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. **Ann. Rev. Biochem**, v.52, p.825-869, 1983.

WEINSTEIN, M. P. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan rapid and dried overnight gram-positive panels versus a conventional reference method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.7, p.2089-2092, 1998.

WIELDERS, C.L.C.; VRIENS, M.R.; BRISSE, S.; GRAAF-MILTENBURG, L.A.M.; TROELSTRA, A.; FLEER, A.; SCHMITZ, F.J.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v.357, p.1674-5, 2001.

WISE, R.I.; OSSMAN, E.A.; LITTLEFIELD, D.R. Personnel reflections on nosocomial staphylococcal infections and the development of hospital surveillance. **R. Infectious Disease** v.11, p.1.105-1.119, 1989.

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 Microbiology Infectious**, v.3, n.40, p.414-422, 1999.

YORK, M.K.; GIBBS, L.; CHEHAN, F.; BROOKS, G.F. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal Clinical Microbiology**, v.34, n.2, p.249–253, 1996.

ZBINDEN, R.; RITZLER, M.; RITZLER, E.; BERGER-BÄCHI, B. Detection of penicillin-binding protein 2a by rapid slide latex agglutination test in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.1, p.412, 2001.

ANEXO 01

Isolados provenientes de animais e humanos.

Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de animais e humanos		Origem
Animais	Departamento de Parasitologia Animal UFRRJ	
D' - <i>S. simulans</i>	Cão	
M - <i>S. cohnii urealyticus</i>	Cão	
P - <i>S. hominis</i>	Cão	
R - <i>S. capitis urealyticus</i>	Cão	
T - <i>S. epidermidis</i>	Cão	
Z - <i>S. capitis urealyticus</i>	Cão	
9C - <i>S. xylosus</i>	Cão	
11C - <i>S. cohnii urealyticus</i>	Cão	
01OE - <i>S. xylosus</i>	Cão	
09OE - <i>S. xylosus</i>	Cão	
10OE - <i>S. xylosus</i>	Cão	
5ING - <i>S. hominis</i>	Cão	
6ING - <i>S. capitis urealyticus</i>	Cão	
7ING - <i>S. hominis</i>	Cão	
10ING - <i>S. hominis</i>	Cão	
03' - <i>S. cohnii cohnii</i>	Cão	
09 - <i>S. epidermidis</i>	Cão	
11 - <i>S. cohnii cohnii</i>	Cão	
11' - <i>S. cohnii urealyticus</i>	Cão	
19 - <i>S. xylosus</i>	Cão	
25' - <i>S. cohnii cohnii</i>	Cão	
26' - <i>S. haemolyticus</i>	Cão	
27 - <i>S. xylosus</i>	Cão	
30 - <i>S. xylosus</i>	Cão	
30' - <i>S. xylosus</i>	Cão	
32 - <i>S. xylosus</i>	Cão	
43 - <i>S. cohnii urealyticus</i>	Cão	
47' - <i>S. simulans</i>	Cão	
80' - <i>S. hominis</i>	Cão	
81' - <i>S. hominis</i>	Cão	
164 - <i>S. haemolyticus</i>	Cão	
		Bovinocultura de Leite – UFRRJ (IZ)
6A - <i>S. haemolyticus</i>	Bovino	
19 - <i>S. xylosus</i>	Bovino	
21 - <i>S. xylosus</i>	Bovino	
37 - <i>S. epidermidis</i>	Bovino	

38 - <i>S. hominis</i>	Bovino
40 - <i>S. capitis urealyticus</i>	Bovino
42 - <i>S. epidermidis</i>	Bovino
44 - <i>S. xylosus</i>	Bovino
47 - <i>S. cohnii urealyticus</i>	Bovino
88 - <i>S. hominis</i>	Bovino
94 - <i>S. capitis capitis</i>	Bovino
105 - <i>S. xylosus</i>	Bovino
109 - <i>S. xylosus</i>	Bovino
115 - <i>S. cohnii urealyticus</i>	Bovino
150 - <i>S. xylosus</i>	Bovino
191 - <i>S. cohnii urealyticus</i>	Bovino

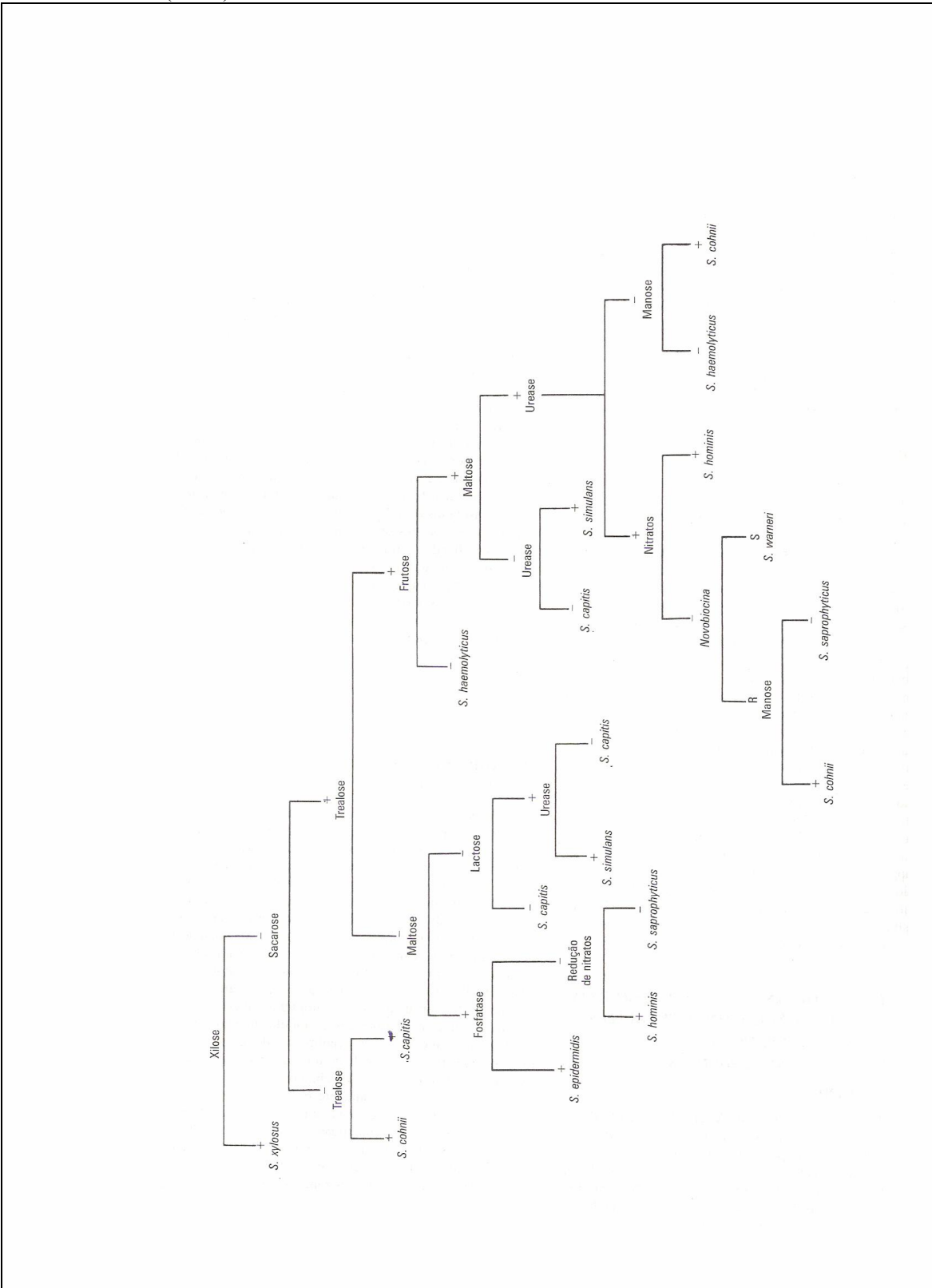
Humanos

**Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ
(RJ)**

1FC - <i>S. epidermidis</i>	Humano
2FC - <i>S. haemolyticus</i>	Humano
3FC - <i>S. cohnii urealyticus</i>	Humano
4FC - <i>S. haemolyticus</i>	Humano
5FC - <i>S. cohnii cohnii</i>	Humano
149- <i>S. cohnii cohnii</i>	Humano
198 - <i>S. capitis urealyticus</i>	Humano
230 - <i>S. simulans</i>	Humano
237 - <i>S. cohnii cohnii</i>	Humano
1615 - <i>S. hominis</i>	Humano
1674 - <i>S. cohnii</i>	Humano
1711 - <i>S. cohnii</i>	Humano
1804 – <i>S. cohnii urealyticus</i>	Humano
1867 - <i>S. capiti capitis</i>	Humano
2194 - <i>S. cohnii</i>	Humano
2206 - <i>S. haemolyticus</i>	Humano
3207 - <i>S. xylosus</i>	Humano
3336 - <i>S. capitis capitis</i>	Humano
3532 - <i>S. haemolyticus</i>	Humano
3750 - <i>S. xylosus</i>	Humano
5534 - <i>S. hominis</i>	Humano
5564 - <i>S. haemolyticus</i>	Humano
5476 - <i>S. haemolyticus</i>	Humano
6983 - <i>S. simulans</i>	Humano

ANEXO 02

Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, segundo Koneman et al. (2001).



ANEXO 03

Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro (mm) dos antibióticos utilizados.

Antibióticos (SENSIFAR-CEFAR [®])	Zonas de inibição		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina	≤28	-	≥29
Ampicilina + sulbactam	≤11	12-14	≥15
Gentamicina	≤12	13-14	≥15
Penicilina	≤28	-	≥29
Oxacilina	≤10	11-12	≥13
Vancomicina	≤12	13-14	≥15
Cefoxitina	≤ 14	15-17	≥18

ANEXO 04

Análise de deviance para avaliação da diferença significativa entre os percentuais de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Fonte de variação	g.l.	Deviance	Valor de p
Amostra	2	50,33	0,078
Antibiótico	6	153,01	0,001
Antibiótico x Amostra	12	25,93	0,242
Resíduo	483	433,37	

ANEXO 05

Análise de deviance dos isolados resistentes à oxacilina para avaliação da diferença significativa entre os percentuais de suscetibilidade encontrada.

Fonte de variação	g.l.	Deviance	Valor de p
Amostra	1	0,297	0,618
Antibiótico	5	171,710	0,001
Antibiótico x Amostra	5	0,053	0,965
Resíduo	210	135,63	