

MÁRCIO LEONARDO DE MORAIS NOBRE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA
ANTIBIÓTICA de *Staphylococcus aureus* ISOLADOS EM SUÍNOS**

TERESINA, 2017

MÁRCIO LEONARDO DE MORAIS NOBRE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA
ANTIBIÓTICA de *Staphylococcus aureus* ISOLADOS EM SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Christina Sanches Muratori

TERESINA, 2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

N754c Nobre, Márcio Leonardo de Moraes

Caracterização fenotípica, genotípica e perfil de resistência
antibiótica de *Staphylococcus aureus* isolados em suínos /
Márcio Leonardo de Moraes Nobre - 2017.
99 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Orientação: Prof^ª. Dr.^ª Maria Christina Sanches Muratori

1. Suinocultura - Genética 2. Biofilme 3. mecA 4. MRSA 5.
Multirresistência I.Título

CDD 636.408 21

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA
ANTIBIÓTICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE SUÍNOS**

MÁRCIO LEONARDO DE MORAIS NOBRE

Dissertação Aprovada em: 04/04/2017

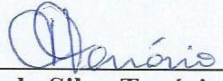
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares (Interna) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Taciana Galba da Silva Tenório (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet (Externo) / IFMA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Márcio Antonio e Zelinda Maria, e avó Maria Elda, por acreditarem no meu sonho e me acompanharem na realização deste.

Aos meus irmãos Layanna Aline, Victor Leonardo e Caio Leonardo, e amigos Alyne Rodrigues e Samuel Soares, que mesmo nas horas difíceis sabiam como ser solidários e manter a convivência.

A minha namorada Leidiane Sousa, pelo real significado de companheirismo, fundamental na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo belo dom da vida e todas as graças nela contida atribuídas as suas ações.

À Universidade Federal do Piauí, por proporcionar a oportunidade de usufruir da estrutura técnico-científica indispensável para a formação acadêmica.

À minha orientadora Maria Christina Sanches Muratori, por me conduzir em busca de minha realização profissional, sempre apresentando sugestões que contribuíram para o crescimento deste trabalho.

À minha co-orientadora Maria José dos Santos Soares, que me ensinou a transformar dúvidas em certezas, insegurança em confiança, sonho em realidade, capacitando-me a trilhar sozinho nos caminhos com sabedoria, dignidade e responsabilidade.

A todos os meus professores de Microbiologia: Eduardo Bráz, Carlos Zarden, Alessandra Lages, Conceição Moura, Mitra Mobin, Caio Salvino, Christina Muratori e Maria José, por formarem o microbiologista que hoje sou.

Aos professores Agustinho Figueirêdo, João Batista, Daniel Louçana, aos proprietários das granjas Edilson e Pinto, e aos auxiliares destes estabelecimentos Adriano, Carlos, Micael e Fernando, pela parceria firmada, credibilidade e apoio na realização das coletas.

Aos amigos de mestrado Camila Coutinho, Dérick Oliveira e Rafael Bacelar, pela espontaneidade e alegria, numa rara demonstração de amizade e solidariedade nesse tempo em que passamos juntos.

Aos companheiros de pesquisa Felipe Oliveira, Leonardo Bruno, José Arthur, Inácio Andrade, Déborah Rêgo, Amanda e Vivian, pela amizade formada e ajuda indispensável para a realização desta pesquisa.

A todos os integrantes da família NUEPPA, pelos bons momentos vividos juntos até aqui.

,

*“Só me sinto digno de minhas asas se eu as
utilizar para fazer os outros voarem.”*

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	9
2. CAPÍTULO I (ARTIGO DE REVISÃO):	11
3. CAPÍTULO II (ARTIGO CIENTÍFICO):	36
4. CAPÍTULO III (SHORT COMMUNICATIONS):	58
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	66
NORMAS DE PUBLICAÇÃO	68

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICA de *Staphylococcus aureus* ISOLADOS EM SUÍNOS

RESUMO

Staphylococcus aureus tem emergido como um importante patógeno zoonótico, cuja evolução para a aquisição de diversos mecanismos de virulência e resistência antibiótica tem sido associada à suinocultura. Este trabalho avaliou a presença de *S. aureus*, em suínos criados em três granjas, no município de Teresina, Piauí, bem como buscou caracterizar o perfil de resistência aos antimicrobianos e a virulência destas cepas, por meio da produção de biofilme. Espécimes clínicos, totalizando 164 amostras, foram obtidos de 82 suínos, para o isolamento de *Staphylococcus* spp. A identificação preliminar da espécie *S. aureus* foi realizada por meio de provas bioquímicas sendo confirmada pela presença dos genes 16S rRNA e *nuc*, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). O perfil de susceptibilidade antibiótica e a resistência à metilicina foram, respectivamente, avaliados por meio da técnica de difusão em disco e triagem em ágar, contendo metilicina. A produção de biofilme foi evidenciada pelas técnicas de ágar Vermelho Congo e Aderência em Microplaca. Foram testadas 551 colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp e destas 29 (5,3%) foram confirmadas como *S. aureus*, sendo estas isoladas de 17 (20,7%) animais. Todas as estirpes apresentavam multirresistência, contudo, nenhuma possuía o gene *mecA*. A grande maioria apresentou fenótipo de fraca produção de biofilme, e os genes *icaAD* só foram detectados em cinco estirpes. Identificamos a presença de *S. sciuri* associado a uma das estirpes de *S. aureus*, formando populações mistas, e que foram isoladas de uma única colônia. Para o nosso conhecimento este fato inusitado, não foi ainda descrito, sendo significativo principalmente devido a presença do gene *mecA* na estirpe de *S. sciuri* que apresentou, ainda, elevada resistência a outras classes de antibióticos. Esta associação pode comprometer o sucesso da terapia de infecções causadas por *S. aureus* ou *S. sciuri*, nos suínos, sendo também importante pela possibilidade de transferência do gene *mecA* entre essas espécies, favorecendo a evolução dos *S. aureus* e, ainda, contribuir para ocasionar erros de identificação destes micro-organismos.

Palavras-chave: biofilme, *mecA*, MRSA, multirresistência, suinocultura

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION AND PROFILE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED IN PIGS

ABSTRACT

Staphylococcus aureus has emerged as an important zoonotic pathogen, whose evolution for the acquisition of various mechanisms of virulence and antibiotic resistance has been associated with swine farming. This work evaluated the presence of *S. aureus*, in pigs created on three farms, in the city of Teresina, Piauí, as well as to characterize the profile of antimicrobial resistance and virulence of strains through biofilm production. Clinical specimens, totaling 164 samples, were obtained from 82 pigs for the isolation of *Staphylococcus* spp. The preliminary identification of the *S. aureus* species was performed by means of biochemical tests and confirmed by the presence of the 16S rRNA and *nuc* genes, using the polymerase chain reaction (PCR). The antibiotic susceptibility profile and methicillin resistance were, respectively, evaluated by means of the agar diffusion and methicillin-containing agar. The biofilm production was evidenced by Congo Red Agar and Microplate Adhesion techniques. A total of 551 colonies suggestive of *Staphylococcus* spp were tested, and of these 29 (5.3%) were confirmed as *S. aureus*, being isolated from 17 (20.7%) animals. All strains showed multiresistance, however, none possessed the *mecA* gene. The majority presented poor biofilm production phenotype, and *icaAD* genes were only detected in five strains. We identified the presence of *S. sciuri* associated to one of the strains of *S. aureus*, forming mixed populations, and that were isolated from a single colony. To our knowledge this unusual fact has not been described yet, being significant mainly due to the presence of the *mecA* gene in the strain of *S. sciuri* that still presented high resistance to other classes of antibiotics. This association may compromise the success of therapy for infections caused by *S. aureus* or *S. sciuri* in pigs, and is also important for the possibility of transfer of the *mecA* gene between these species, favoring the evolution of *S. aureus* and also contributing to errors of identification of these microorganisms.

Keywords: biofilm, *mecA*, MRSA, multiresistance, swine farming

1. INTRODUÇÃO

O aumento da frequência de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos tem coexistido desde o início da utilização desta classe terapêutica, e vem se tornando uma ameaça significativa para a saúde pública nos últimos anos, uma vez que há menos agentes eficazes disponíveis para combater as infecções causadas por estes micro-organismos. É aceito que o principal fator de risco para esse fenômeno é o uso de forma crescente e inadequada destes fármacos. Entretanto, outros fatores podem estar relacionados a este problema já declarado pela Organização Mundial de Saúde como um dos principais desafios da humanidade a serem enfrentados no século XXI.

Antimicrobianos são utilizados na prevenção ou tratamento de infecções bacterianas na medicina humana e veterinária, e ainda como promotores de crescimento adicionados às rações de animais de produção. Estas aplicações estão sendo apontadas como responsáveis pelo surgimento e manutenção de bactérias multirresistentes.

Dentre as espécies de animais domésticos de produção, os suínos têm sido apontados como o mais importante exemplo da utilização de promotores para crescimento e aumento de eficácia alimentar. Esta observação se deve a suinocultura ocupar, na atualidade, uma das atividades agropecuárias mais difundidas e exploradas no mundo, aliada as mudanças nos métodos de produção, ocasionadas pela pressão do mercado consumidor. Assim, para aumentar a demanda produtiva, evitar e controlar o surgimento de problemas infecciosos, neste rebanho, o emprego de antimicrobianos se configura como uma ferramenta essencial, seja favorecendo o desenvolvimento dos suínos, ou diminuindo as perdas econômicas decorrentes das enfermidades infecciosas.

Diante desse cenário, bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* têm um importante papel na suinocultura. Este destaque não se deve apenas por sua capacidade para colonizar pele e mucosas, bem como outros sítios anatômicos como trato intestinal e respiratório destes animais, ou por sua ubiquidade que os faz presente em toda a granja, em animais de todas as idades, mas também por sua elevada habilidade para adquirir diversos mecanismos de virulência e resistência a antibióticos. Em relação a este último atributo, tem surgido, na suinocultura, estirpes de diferentes espécies de *Staphylococcus* sp cujo perfil de resistência antibiótica é semelhante as

descritas em ambientes hospitalares. Estas estão a ultrapassar barreiras ecológicas, causando colonização e/ou infecções em diferentes espécies animais de produção ou silvestres e em humanos.

A transmissibilidade de *S. aureus* entre animais e humanos pode envolver nesta cadeia ecológica desde o pessoal que entra em contato com estes animais, por meio do manejo e abate (pecuarista, veterinário, tratador, manipuladores de alimentos, dentre outros), além da carne e demais produtos até o consumidor final, pois linhagens resistentes aos antibióticos podem ser transferidas para humanos pelo consumo de produtos de origem animal contaminados. Estas podem colonizá-los e transferir também mecanismos de resistência aos antimicrobianos a outros micro-organismos.

Devido à semelhança entre os antibióticos empregados na terapêutica humana com os utilizados nos animais, torna-se evidente a correlação entre a problemática da resistência bacteriana na pecuária com a saúde humana. Assim, entendendo a importância da cadeia produtiva da suinocultura e que a sanidade animal deve ser vista não apenas em relação às enfermidades que podem acometer os suínos, ao bem estar animal, mas também à saúde pública, objetivou-se com o presente trabalho, isolar *Staphylococcus aureus* em suínos, caracterizar as cepas pelo perfil de resistência antibiótica, e identificar os fatores de virulência.

2. CAPÍTULO I (ARTIGO DE REVISÃO):

Artigo em processo de submissão para o periódico: Archives of Veterinary Science

***Staphylococcus* sp, SUINOCULTURA E A RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICA: IMPORTÂNCIA DESSA RELAÇÃO PARA A SAÚDE PÚBLICA - REVISÃO**

(Staphylococcus sp, swine farming and antibiotic resistance: Importance of this relationship for public health - Review)

Márcio Leonardo de Moraes Nobre; Leidiane Sousa Santos; Felipe Araújo de Alcântara Oliveira; Maria José dos Santos Soares, Maria Christina Sanches Muratori

RESUMO: A utilização de antibióticos como promotores de crescimento, na suinocultura, tem contribuído para elevar o uso inadequado destes medicamentos, favorecendo o surgimento e o aumento da resistência antibiótica, seja entre as bactérias envolvidas nas infecções que acometem esses animais e até mesmo da própria microbiota desta espécie. Esta conduta também afeta a disseminação destes micro-organismos pela cadeia produtiva deste rebanho, podendo, ainda, prejudicar a saúde dos que consomem esta carne e seus subprodutos. Dentre as bactérias de interesse para a saúde pública elevado destaque tem sido dado aos *Staphylococcus aureus*, que tem emergido como um importante patógeno zoonótico, cuja evolução para a aquisição de diversos mecanismos de virulência e resistência antibiótica tem sido associada à suinocultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi apresentar os principais aspectos referentes à relação entre a suinocultura e a evolução da resistência antibiótica dos *Staphylococcus* sp, com especial destaque para a aquisição do gene *mecA* por esses micro-organismos, bem como seu papel para a saúde pública, uma vez que a vigilância para a detecção de cepas multirresistentes dentre as espécies deste gênero microbiano ultrapassou barreiras ecológicas e

agora deverá envolver também os animais de produção, bem como os alimentos destinados ao consumo das populações.

Palavras-chave: *mecA*; microbiota; MRSA; multirresistência; suinocultura

ABSTRACT: The use of antibiotics as growth promoters in swine farming has contributed to increase the inadequate use of these drugs, favoring the emergence and increase of antibiotic resistance, be it between the bacteria involved in the infections that affect these animals and even the microbiota itself species. This behavior also affects the dissemination of these microorganisms through the chain of production of this herd, and may also harm the health of those who consume this meat and its by-products. Among the bacteria of interest for public health, high stands have been given to *Staphylococcus aureus*, which has emerged as an important zoonotic pathogen, whose evolution for the acquisition of several mechanisms of virulence and antibiotic resistance has been associated with swine farming. Thus, the objective of this work was to present the main aspects related to the relationship between swine culture and the evolution of antibiotic resistance of *Staphylococcus* sp, with special emphasis on the acquisition of the *mecA* gene by these microorganisms, as well as its role for public health, since monitoring for the detection of multiresistant strains among the species of this microbial species has overcome ecological barriers and now must also involve the animals of production as well as the food destined for the consumption of the populations.

Keywords: *mecA*; microbiota; MRSA; multiresistance; swine farming

INTRODUÇÃO

Micro-organismos multirresistentes aos antibióticos são conhecidos desde a década de 1960 e representam sério problema à saúde pública. Dentre estes, o *Staphylococcus aureus* tem se destacado, pela capacidade de adquirir diversos mecanismos de resistência a estes fármacos, que torna esta bactéria um importante patógeno para humanos e animais (Arias e Carilho, 2012; Peton e Le Loir, 2014).

A implantação da antibioticoterapia, no início dos anos de 1930, com o emprego da sulfanilamida, aparentemente ditava o fim das doenças infecciosas. No entanto, no final daquela década surgiram as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes àquele quimioterápico. Desde então, este micro-organismo tem sobrevivido pela adaptação de cepas resistentes, a cada novo antibiótico que tem surgido e utilizado para terapia das infecções causadas por esta bactéria (Santos et al., 2007; Adaleti et al., 2010; Velázquez-Guadarrama et al., 2010; Rincón et al., 2014).

O mais importante mecanismo de resistência dos *Staphylococcus* sp. foi a aquisição do determinante genético *mec*, que confere resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos semi sintéticos, representados pela meticilina, oxacilina, cloxacilina, nafcilina (Hiramatsu et al., 2013; Rasigade e Vandenesch, 2014). Assim, as cepas desta espécie que albergam o determinante *mec* são denominadas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

As cepas MRSA surgiram na década de 60, a princípio, nos hospitais e estas foram se disseminando neste ambiente em todo o mundo (Barber, 1961; Kayser e Mak, 1972; Chambers, 1988; Mejía et al., 2010; Klein et al., 2013). Entretanto, este micro-organismo ultrapassou barreiras e além dos hospitais tem sido descrito em

infecções ou colonização de humanos, na comunidade e em animais (Figueiredo e Ferreira, 2014; Evangelista e Oliveira; 2015).

Além dos *S. aureus* outras espécies do gênero *Staphylococcus*, em especial as não produtoras da enzima coagulase, os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), também conhecidos como *Staphylococcus* não *aureus* (SNA), tem despertado o interesse da saúde pública, por sua participação em diferentes infecções humanas e animais, mas, sobretudo pela elevada capacidade para aquisição e transmissão de vários determinantes de resistência antibiótica, incluindo o *mec*. Assim, os SNA que eram considerados apenas “contaminantes” isolados de processos infecciosos, passaram a ocupar um papel de extrema importância na epidemiologia das infecções em que estão envolvidos, ainda mais quando também possuem o determinante *mec*, possibilitando o surgimento dos *Staphylococcus* resistentes a meticilina não *aureus* (Methicillin – resistant non *aureus* *Staphylococci*; MRNAS; Tulinski et al., 2012; Vanderhaeghen et al., 2012; Becker et al., 2014).

A incidência de animais domésticos portadores e/ou infectados com MRSA ou MRNAS tem sido descrita com frequência em vários países e acometendo diversas espécies. Como consequência da colonização e/ou infecção por estas bactérias, em animais de produção, destaca-se a dificuldade na terapêutica das infecções, desde que comumente além dos beta-lactâmicos, a grande maioria das estirpes MRSA e MRNAS possui outros determinantes de resistência tais como: aos aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, fluoroquinolônicos entre outros (Rincón et al., 2014; Becker et al., 2014).

Outro importante aspecto dos MRSA e MRNAS em animais é a possibilidade de contaminação dos produtos cárneos destinados ao consumo. Estudos recentes relatam o isolamento de linhagens destes micro-organismos em alimentos de origem

animal, incluindo carne suína, gado bovino, frango, entre outros, além de queijo bovino, leite e outros produtos derivados (Huber et al., 2011; Scabin et al., 2012; Cerqueira e Almeida, 2013; Mello et al., 2014; Martins et al., 2015). Os MRSA e os MRNAS de origem animal ainda se destacam como causa de infecções em indivíduos que trabalham com as espécies animais que se encontram infectadas ou colonizadas por essas cepas (Masson et al., 2012; Schmidt et al., 2015).

Dentre as espécies de animais domésticos, os suínos têm sido apontados como importantes reservatórios de cepas MRSA e MRNAS, despertando pesquisas que buscam melhor compreender a epidemiologia da transmissão e evolução da resistência antibiótica destes micro-organismos entre humanos e animais (Tulinski et al., 2012; Souza et al., 2012; Smith et al., 2013; Verkade e Kluytmans, 2014; Normanno et al., 2015; Butaye et al., 2016).

Nesta revisão são apresentados os principais aspectos referentes aos mecanismos de resistência dos *Staphylococcus* sp. bem como sua relação com animais de produção, com ênfase em suínos, e sua possível cadeia de transmissibilidade entre animais e humanos.

DESENVOLVIMENTO

Suinocultura e o uso de antibióticos

A produção de suínos vem, progressivamente, evoluindo de sistemas extensivos para formas mais intensivas de criação, cujo objetivo essencial é o aumento da produtividade, desencadeada pelo elevado consumo mundial desta fonte de proteína animal, que perde apenas para o leite (Gervásio, 2013; USDA, 2015). Entretanto, tal sistema ao confinar os animais acaba por aumentar o contato entre estes, o que contribui para favorecer a ocorrência e disseminação das doenças

infecciosas, neste rebanho, bem como eleva o nível de estresse dos animais, tendo reflexo negativo sobre os mecanismos de defesa do sistema imune (Barcellos et al., 2009).

Para superar esta desfavorável situação, tem se empregado estratégias que envolvem programas de medicação e normas rígidas de limpeza, desinfecção e vazio sanitário entre os lotes, e dentre os esquemas adotados para manter a sanidade desses animais, às infecções bacterianas, está a utilização de antibióticos. Os antimicrobianos na suinocultura tornaram-se, portanto, essenciais ao sistema de produção intensiva, chegando a alcançar 60,0 a 80,0% do total de antimicrobianos consumidos pelo Reino Unido, por alguns países da União Europeia e Estados Unidos (Barcellos et al., 2009; Santos et al., 2009; Aguilar et al., 2015).

Na maioria dos mercados produtores de suínos, o que se constata é que os antimicrobianos não estão sendo apenas utilizados na terapêutica das infecções nestes animais, mas, muitas vezes, durante toda a cadeia do desenvolvimento do animal até o abate, primariamente para a promoção do crescimento e profilaxia de infecções (Nisha, 2008; Regula et al., 2009; Marshall e Levy, 2011; Bartlett et al., 2013; Darwish et al., 2013; Van Boeckel et al., 2015). Tal conduta tem contribuído para elevar a utilização inadequada destes medicamentos, favorecendo o surgimento e o aumento da resistência antibiótica entre os micro-organismos envolvidos nas infecções que acometem esses animais e até mesmo da própria microbiota desta espécie (Turner, 2011; FDA, 2014; Ferreira, 2014).

A má utilização destes fármacos tem consequências também sobre o meio ambiente, desde que cerca de 90,0% dos antimicrobianos administrados aos animais são excretados pela urina e fezes, e a dispersão destes produtos no ambiente podem comprometer outros ecossistemas (Regitano e Leal, 2010).

Outro importante efeito do abuso e emprego inadequado dos antimicrobianos na suinocultura relaciona-se à saúde dos que consomem esta carne e seus subprodutos. Esta consequência pode se apresentar sob duas formas: a) à possível presença de resíduos de antibióticos que pode desencadear reações alérgicas ou outros males, culminando inclusive com o óbito; b) presença de bactérias resistentes na cadeia de alimentos (Nisha, 2008; Regitano e Leal, 2010; Seri, 2013; Darwish et al., 2013; Rakotoharinome et al., 2014).

Os principais antibióticos utilizados na prática veterinária, em animais de produção, incluindo os suínos são: tetraciclina, penicilinas, fluoroquinolônicos, estreptomicinas, eritromicina, nistatina, tilosina, virginiamicina, sulfonamidas, entre outros, sendo que muitos destes são também utilizados na terapêutica humana. Deste modo, a presença de bactérias multirresistentes pode comprometer a eficácia da terapêutica infecciosa seja para humanos ou animais, podendo conduzir ao término da era pós-antibiótica (Regula et al., 2009; Turner, 2011; FDA, 2014).

Pela cadeia produtiva da suinocultura há relatos da transmissão de bactérias resistentes e entre estas as que se destacam pela morbidade e multirresistência despontam os *Staphylococcus aureus*, os *Enterococcus* sp, a *E. coli* e as *Salmonella* sp , importantes agentes de infecções para os humanos e animais (Oliveira et al., 2011; Seri, 2013; Rakotoharinome et al., 2014; Hammerum et al., 2014; Sfaciotte et al., 2015).

***Staphylococcus* spp.**

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo descrito como cocos Gram-positivos, imóveis, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, produtores da enzima catalase, que tendem a formar agrupamentos semelhantes a

cachos de uva. Propriedades bioquímicas tais como: oxidação e fermentação de glicose e manitol, resistência à bacitracina (0,04 Unidades), sensibilidade a lisostafina e a furazolidona permitem a diferenciação deste gênero dos microorganismos pertencentes ao gênero *Micrococcus* (Winn et al., 2008; Schleifer e Bell, 2009).

Esta bactéria encontra-se amplamente distribuída na natureza sendo predominantemente isolada na pele, glândulas da pele e mucosas de mamíferos e aves, também em outros sítios anatômicos como boca, sangue, glândulas mamárias, trato intestinal, geniturinário e respiratório (Santos et al., 2007; Winn et al., 2008; Schleifer e Bell, 2009).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 52 espécies e 28 subespécies, que podem ser divididos em dois grupos baseados na capacidade da produção ou não de uma enzima denominada de coagulase (Schleifer e Bell, 2009; LPSN, 2016). Esta enzima possui a propriedade de coagular, embora em graus variados, diversos tipos de plasmas sanguíneos, mesmo na presença de anticoagulantes, entre eles o humano e o de coelho. Assim, estirpes estafilocócicas produtoras da enzima coagulase são denominadas de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e as não produtoras de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) (Winn et al., 2008; Hennekinne et al., 2010).

Dentre as espécies produtoras da enzima coagulase, *Staphylococcus aureus* é a mais importante e prevalente em diversas infecções humanas e animais, cuja multiplicidade de enfermidades que pode causar vão desde simples infecções superficiais de pele a profundas e sérias infecções invasivas, tais como pneumonia, meningites, septicemia e endocardites em humanos, bem como dermatites, otites externas, infecções urinárias e mastites em animais (Radostits et al., 2002; Silva et

al., 2007; Kraus e Peschel, 2008; Bartlett e Hulten, 2010). Este amplo espectro de infecções está relacionado à diversidade de fatores de virulência que este micro-organismo pode produzir, representados por diversas proteínas de ligação celular, enzimas, toxinas e mecanismos de escape à resposta imune dos hospedeiros (Santos et al., 2007; Winn et al., 2008; Hidron et al., 2008; Bartlett e Hulten, 2010; Mimica, 2012).

A versatilidade nutricional e a capacidade de crescer em diferentes condições ambientais fazem com que os *S. aureus* possam, ainda, se desenvolver com facilidade em vários alimentos. Produtos cárneos e laticínios configuram satisfatórias base alimentares que propiciam o crescimento deste micro-organismo tornando-o a principal causa, em todo o mundo, da intoxicação alimentar estafilocócica (IAE), devido a capacidade de algumas cepas para produzir as enterotoxinas estafilocócicas (EE) (Santana, et al., 2010).

Além da IAE, a presença de *S. aureus*, em alimentos os distinguem dos demais *Staphylococcus* spp, pois sua ocorrência pode indicar, em alimentos processados, deficiências de processamento ou condições higiênicas inadequadas do processo, além do risco da disseminação de cepas resistentes pela cadeia de alimentos (Hennekinne et al., 2010; Diedrich et al., 2013).

Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* sp

A finalidade da administração de antibióticos é de suprimir ou impedir o crescimento de um agente infeccioso sem causar danos ao hospedeiro. Estes fármacos podem agir por meio de diferentes mecanismos de ação tais como: a) interferência na síntese da parede celular do micro-organismo, comprometendo os peptideoglicanos estruturais, exercendo este efeito as penicilinas, cefalosporinas,

glicopeptídeos e polipeptídeos, b) inviabilizando a síntese de proteínas bacterianas, desempenhado pelos aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos, entre outros e c) inibindo a síntese de ácidos nucleicos, cumprindo este papel há o metronidazol, as quinolonas, a rifampicina, as sulfonamidas e a trimetoprima (Nicolini et al., 2008; Reygaert, 2013; Munita e Arias, 2016).

Para superar a ação destes diferentes fármacos os micro-organismos podem expressar diversos mecanismos de resistência decorrentes de alterações genéticas, ocasionadas por mutações, que podem ocorrer durante o processo de replicação das bactérias, bem como aqueles relacionados às transferências de DNA, por meio de conjugação, transdução ou transformação, sendo estas consagradas como as forças propulsoras da resistência entre as bactérias (Munita e Arias, 2016).

A resistência adquirida aos antibióticos pelos micro-organismos pode ser demonstrada por meio de diferentes mecanismos tais como: produção de enzimas inativadoras das drogas, alterações da permeabilidade da membrana, efluxo ativo de antibiótico e modificações do sítio de ligação deste fármaco (Reygaert, 2013; Blair et al., 2015; Munita e Arias, 2016). Utilizando um destes mecanismos, ou uma combinação deles, as cepas bacterianas vêm sobrepujando até os antibióticos mais promissores, independente da classe química as quais pertençam (Reygaert, 2013).

A aquisição sucessiva de mecanismos de resistência por *S. aureus* à maioria das classes de agentes antimicrobianos tem tornado o tratamento empírico e o controle de infecções estafilocócicas altamente desafiador (Marques et al., 2008; Ratti e Sousa, 2009).

Os antibióticos betalactâmicos são antimicrobianos bactericidas, representados pelo grupos das penicilinas, cefalosporinas, penicilinas associadas com inibidores das betalactamases e penicilinas semi-sintéticas (Plata et al., 2009). Estes se ligam

às proteínas presentes na membrana celular bacteriana conhecidas como Proteínas Ligadoras de Penicilina (PLP) ou *PBPs* (*Penicillin-Binding-Protein*) e que possuem funções enzimáticas envolvidas com o estabelecimento das ligações cruzadas (*cross-link*) entre as moléculas de peptidoglicano, resultando na síntese da parede bacteriana. Assim, estes fármacos agem impedindo essa ligação e ativando a ação das autolisinas, o que provoca a lise da parede celular e consequente morte bacteriana (Plata et al., 2009; Ratti e Sousa, 2009).

A resistência à penicilina G, pelas cepas de *S. aureus*, surgiu por volta dos anos de 1944, devido a produção de penicilinases ou betalactamases, que ao hidrolisar o anel betalactâmico deste fármaco torna-a inativa (Cohen, 1986). No final da década de 1950, a proporção de cepas de *S. aureus* resistentes a este fármaco, isoladas no ambiente hospitalar, alcançava a taxa de 80,0 % (Lyon e Skurray, 1987).

Numa tentativa de reverter este problema, foram produzidas as penicilinas resistentes às betalactamases, surgindo em 1960 um novo grupo de betalactâmicos semissintéticos que inclui, entre outras drogas, a oxacilina e a metilicina (French, 2010). Entretanto, um ano após a introdução desses fármacos, surgiram as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à metilicina, denominadas de *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Jevons, 1961; Coelho et al., 2007).

A resistência à oxacilina é determinada por um grande elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*; *Staphylococcal cassette chromosome mec*), que carrega o gene *mecA*, responsável pela resistência a estes betalactâmicos (Hiramatsu et al., 2013).

Este fenótipo de resistência em *Staphylococcus* sp ocorre devido a codificação de uma nova proteína alvo, denominada PBP2a ou PBP2 que é reconhecida por apresentar baixa afinidade para a maioria das penicilinas e

cefalosporinas (Hartman e Tomasz, 1984; Ubukata et al., 1985; Gelatti et al., 2009). Tal mecanismo de resistência compromete a utilização de diversos betalactâmicos na terapêutica das infecções, executando-se as novas cefalosporinas de quinta geração ceftobiprole e ceftarolina (Chambers e Deleo, 2009; Gelatti et al., 2009; Plata et al., 2009; Hodille et al., 2017).

A aquisição e a inserção do *SSCmec* no cromossomo de cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina (Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*; MSSA) é o evento chave para a emergência dos MRSA. O *SSCmec* é um elemento genético móvel altamente diverso na sua organização estrutural e conteúdo genético sendo classificado tomando como critérios a caracterização de três regiões: a) complexo *mec*, que carrega o gene *mecA* e que pode também conter os genes regulatórios *mecI* e *mecR1*, envolvidos com a expressão do gene *mecA*; b) o complexo *ccr* que pode carrear os genes *ccrAB* ou *ccrC*, que codificam para as enzimas recombinases que controlam a integração e a excisão no genoma que irá hospedar o *SSCmec*, sendo, portanto, responsáveis pela mobilidade do determinante *mec*; c) regiões J (J1, J2 e J3) as quais constituem componentes não essenciais ao *SSCmec* mas, em alguns casos, estas regiões tem carregado adicionais determinantes de resistência antibiótica. O *SSCmec* encontra-se integrado em um sítio específico (*attB_{scc}*), localizado próximo à origem de replicação dos *S. aureus* (Turlej et al., 2011; Hiramatsu et al., 2013; El-Hamid, 2016).

A diversidade estrutural do *SSCmec* tem sido observada em estirpes de MRSA, bem como em outras espécies estafilócicas que albergam em seus genomas este elemento genético, totalizando, até o momento, mais de 80 *SSCmec*, e que se encontram disseminados em muitas regiões do globo terrestre (Vanderhaeghen et al., 2012; El-Hamid, 2016). Para as estirpes de MRSA, tais variações tem sido

utilizadas na classificação do determinante *mec* em tipos e subtipos, sendo descritos, até o presente, 11 tipos (Turlej et al., 2011; Hiramatsu et al., 2013; El-Hamid, 2016). Alguns tipos de SSC*mec* (I - V) tem distribuição mundial, enquanto outros parecem estar restritos a uma estirpe de ocorrência no local de origem desta (El-Hamid, 2016).

Os SSC*mec* tipos I,II e III são comumente encontrados em estirpes de MRSA associadas às infecções hospitalares, os HA-MRSA (Hospital- Associated *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*). Estes apresentam o determinante *mec* relativamente grande em tamanho (34,3 a 66,9 Kb) e carregam múltiplos marcadores de resistência antibiótica. MRSA contendo SSC*mec* tipos IV e V são característicos de estirpes que emergiram na comunidade, os CA-MRSA (Community-Associated *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), que diferentemente dos HA-MRSA, possuem o determinante *mec* de menor tamanho (20,9 a 28 Kb) e comumente não possuem genes que codificam resistência a outros antimicrobianos não beta-lactâmicos, o que torna este MRSA de forma geral, susceptível à maioria dos antimicrobianos pertencentes a outras classes (Deurenberg et al., 2007).

O primeiro relato da presença de estirpes de MRSA causando infecções em animais foi descrito por Devriese e colaboradores em 1972, a partir de casos de mastite bovina, na Bélgica. Desde então relatos esporádicos ou até mesmo surtos envolvendo diversos animais de produção e companhia tais como: cavalos, aves, suínos, cães, gatos, tem sido descritos em todo mundo (Cuny et al., 2010; Price et al., 2012; Fitzgerald, 2012).

Estirpes de MRSA oriundas de animais que possuem disseminação para humanos são denominadas de LA-MRSA (Livestock-associated *S. aureus*) e desde 2005 passaram a despertar grande preocupação para a saúde pública, e em

especial para uma cepa de MRSA, denominada de LA-MRSA ST398 (Fitzgerald, 2012; Peton e Le Loir, 2014; Peeters et al.; 2015). Este clone de MRSA, que surgiu em suínos, tem sido descrito em diferentes países colonizando ou causando diversas infecções em humanos, animais de produção entre bovinos, aves, equinos, animais de companhia, cães, gatos, e espécies silvestres, demonstrando, portanto, seu elevado potencial de disseminação (Van Cleef et al., 2011; Fluit, 2012; Peeters et al.; 2015; Smith, 2015; Butaye et al., 2016; CFSPH, 2016; Lima et al., 2017).

Em 2011, Garcia-Álvarez e colaboradores descreveram uma estirpe de *S. aureus* que apresentava fenótipo de resistência à meticilina, contudo a presença do gene *mecA* não era confirmada em diversas reações de amplificação deste gene, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), já consagradas na literatura, para cepas de MRSA de diversas origens, bem como por meio de testes de aglutinação para a PBP2a. Após análise minuciosa, estes autores demonstraram diferenças nas sequências nucleotídicas do gene *mecA* nas estirpes por eles estudadas e caracterizaram um novo gene *mecA* homólogo ao já amplamente conhecido e que foi denominado por eles de *mecA*_{LGA251} e que posteriormente recebeu a designação de *mecC*. A diversidade observada no determinante *SSCmec* desta bactéria permitiu classificá-la como *SSCmec* tipo XI (IWG-SCC, 2012).

Nesse estudo, Garcia-Álvarez e colaboradores (2011) demonstraram o desafio e a importância na identificação de cepas de MRSA que albergam o gene *mecC*, desde que estas podem, dependendo das técnicas utilizadas em sua identificação, ser erroneamente classificadas como sensíveis ou *bordelaine*, e podem se apresentar resistentes a cefoxitina, mas sensíveis a oxacilina, causando verdadeira confusão (Paterson et al., 2014). Semelhante ao elevado potencial de disseminação de cepas MRSA, as estirpes que albergam o gene *mecC* também tem sido descritas

a partir de humanos, animais de produção, silvestres, bem como a partir de águas residuais e estação de tratamento de esgoto (Petersen et al., 2012; Porrero et al., 2014).

Outra particularidade é que o *SSCmec* encontra-se amplamente distribuído também entre *Staphylococcus* resistentes a meticilina não *aureus* (Methicillin – resistant non *aureus* *Staphylococci*; MRNAS), sendo descritos nestes micro-organismos todos os onze tipos, até o momento, conhecidos, bem como diversos outros subtipos e tipos ainda não caracterizados. Relatos, ainda, ressaltam que estas bactérias podem albergar diferentes homólogos do gene *mecA* e *mecC* (Becker et al., 2014).

Em humanos, as estirpes MRNAS isoladas de casos clínicos pertencem, comumente, as espécies *Staphylococcus. epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*, contudo, para fontes derivadas de animais e/ou alimentos a diversidade de espécies relatadas é bem maior (Gelatti et al., 2009; Vanderhaeghen et al., 2012; Agostinis et al., 2012; Hiramatsu et al., 2013; Becker et al., 2014).

Estas propriedades dos MRNAS, aliadas aos diversos mecanismos de resistência que estes micro-organismos comumente possuem, tem elevado a importância epidemiológica destas bactérias, desde que está sendo atribuído a estes o papel de reservatórios de genes de resistência, que estão sendo compartilhados tanto entre as diferentes espécies de *Staphylococcus* sp e principalmente com as estirpes de *S. aureus* (Becker et al., 2014; Butaye et al., 2016).

***Staphylococcus* sp na suinocultura**

A ubiquidade dos micro-organismos do gênero *Staphylococcus* spp. os faz presentes em todas as granjas e em animais de todas as idades. As principais

espécies isoladas de suínos são *S. aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus xylosus* (Zimmerman et al., 2012). *S. aureus* pode causar nos suínos diversas enfermidades tais como: abscessos, artrites, enterites, mastites, metrites, septicemia neonatal, vaginites, osteomielites e endocardites enquanto que *S. hyicus* é responsável por uma das mais graves e fatais enfermidades que afeta estes animais, a epidermite exsudativa (Gyles et al., 2010; Frana et al., 2013).

Staphylococcus sp no ambiente da suinocultura podem ser isolados de diversos locais, equipamentos e utensílios imprescindíveis ao processo de abate. A avaliação em diferentes pontos e etapas deste processo comprovou a presença deste micro-organismo e de enterobactérias, inclusive nas fases de escaldagem, chamuscamento e refrigeração, que, segundo Van Cleef et al. (2010), tendem a aumentar ao longo do dia e se disseminar a outros pontos.

Outra importante fonte de infecção são os próprios animais. Análises microbiológicas, realizadas a partir suabes nasais, tonsilas e carcaças de suínos aparentemente hígidos, em processo de abate ou não, revelaram a presença de membros do gênero entre estes *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. pseudointermedius* (Tenhagen et al., 2009; O'sullivan et al., 2011). Portanto, na produção de carne, os próprios animais, trabalhadores, ambiente, equipamentos e utensílios utilizados podem ser fontes de contaminação, demonstrando a importância e o risco que a carne suína pode representar à saúde pública quando processada sem os cuidados mínimos necessários para garantir sua inocuidade (Masson et al., 2012; CFSPH, 2016).

Além deste fato, os suínos têm sido incriminados como o mais importante reservatório e ambiente para a evolução de resistência antimicrobiana para estirpes

de *S. aureus* (Butaye et al., 2016; CFSPH, 2016). Estudo realizado por Price e colaboradores (2012) evidenciaram que LA-MRSA ST 398, evoluiu a partir de um clone de MSSA humano, que ao colonizar os suínos adquiriram o *SSCmec* e cuja origem desse determinante genético e sua transmissibilidade para os *S. aureus* envolve os MRNAS (Tulinski et al., 2012; Becker et al., 2014).

Portanto, a investigação de cepas de *Staphylococcus* sp em suínos tem estabelecido o envolvimento epidemiológico dessa espécie animal na transmissão destes micro-organismos e a ocorrência de infecções humanas ou animais em todo o mundo (Masson et al., 2012; Cerqueira e Almeida, 2013).

LA-MRSA 398 no Brasil em humanos e suínos

No Brasil, a presença do clone LA-MRSA 398, foi descrita pela primeira vez, em vacas com mastite (Silva et al., 2014). Em suínos, esta ocorrência foi relatada, a partir de um caso de epidermite exudativa, no Rio Grande do Sul e a cepa apresentava, ainda, resistência intermediária ao glicopeptídeo vancomicina (Moreno et al., 2016). A descrição deste micro-organismo em humanos envolveu uma paciente com fibrose cística, cuja infecção com este micro-organismo, provavelmente ocorreu, após sua estada, em uma propriedade rural, onde teve contato recreacional com animais deste ambiente (Lima et al., 2017).

Apesar de ser baixa a frequência de isolados de clones LA-MRSA 398 em nosso país, e até o momento não ter sido descrito a presença de cepas albergando o gene *mecC* a elevada capacidade de disseminação e resistência antibiótica dos *S. aureus*, que parece não ter barreiras ecológicas, faz com que a vigilância para a detecção de cepas multirresistentes dentre os *Staphylococcus* sp deva envolver a

pesquisa a partir de animais de companhia, de produção, bem como os alimentos destinados ao consumo, sendo que especial atenção seja dada a suinocultura.

CONCLUSÃO

Indubitavelmente, a utilização indiscriminada dos antimicrobianos na suinocultura influencia a seleção de micro-organismos patogênicos ou não resistentes aos fármacos dessa classe, bem como favorece a disseminação de mecanismos de resistência entre bactérias e ainda a dispersão destas para diferentes hospedeiros. A emergência e o amplo espalhamento dos MRSA e/ou MRNAS confirmam este fato que exige atenção da saúde pública e que não deve de modo algum ser negligenciado.

REFERÊNCIAS

- ADALETI, R.; NAKIPOGLU, Y.; CERAN, N. et al. Prevalence of phenotypic of *Staphylococcus aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 11-14, 2010.
- AGOSTINIS, R. A.; MELLO, P. L. MARINS, L. A. Importância do mapeamento e monitoramento do perfil de resistência e detecção dos genes de resistência de *Staphylococcus sp.* relacionados à mastite bovina. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 57-65, 2012.
- AGUILAR, C. E. G.; BARALDI, T. G.; SANTOS, A. C. R. et al. Implementação e avaliação das práticas de biossegurança na produção de suínos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 9, n. 2, p. 320-333, 2015.
- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivos para preocupação? **Semina: Ciência Agrária**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.
- BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. **Journal Clinical Pathology**, Hove, v. 14, p. 385-393, 1961.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; MARQUES, B. M. F. P. P.; MORES, T. J. et al. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p. 151-155, 2009.

- BARTLETT, A. H.; HULTEN, K. G. *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 9, p. 860-861, 2010.
- BARTLETT, J. G.; GILBERT, D. N.; SPELLBERG, B. Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 56, n. 10, p.1445–1450, 2013.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.
- BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. L. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews**, v. 13, p. 42-51, 2015.
- BUTAYE, P.; ARGUDÍN, M. A.; SMITH, T. C. Livestock-Associated MRSA and Its current Evolution. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 3, p. 19-31, 2016.
- CERQUEIRA, E. S.; ALMEIDA, R. C. C. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 72, n. 04, p.268-281, 2013.
- CHAMBERS, H. F. Methicillin-Resistant Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 1, n. 2, p. 173-186, 1988
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, n. 9, 2009.
- COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C. et al. 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**, Santa Maria, v.37, n. 1, p. 195-200, 2007.
- COHEN, M. L. *Staphylococcus aureus*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **Journal of Pediatric**, Philadelphia, v. 108, n. 5, p.796-799, 1986.
- CUNY, C.; FRIEDRICH, A.; KOZYTSKA, S. et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in diferente animal species. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 109-117, 2010.
- DARWISH, W. S.; ELDALY, E. A.; EL-ABBASY, M. T. et al. Antibiotic residues in food: the African scenario. **Japanese Journal of Veterinary Research**, Sapporo, v. 61, p. 13-22, 2013.
- DEURENBERG, R. H.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, F. H. et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 766-777, 2007.
- DIEDRICH, C.; POZZOBON, A.; KICH, D. M. et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de leite bovino in natura obtidas de produtores no sul do Brasil. **Brazilian Journal Food and Nutrition**, Araraquara, v. 24, n. 3, p.291-296, 2013.
- EL-HAMID, M. I. A. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: an overview. **Advanced Techniques in Clinical Microbiology**, v.1, n. 1, p.1-2, 2016.

- EVANGELISTA, S. S.; OLIVEIRA, A. C. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 68, n. 1, p. 136-143, 2015.
- FERREIRA, I. M. S. **Caracterização da utilização de antimicrobianos em produção animal: alimentos medicamentosos em suinicultura**. 2014. 200f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.
- FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 3, p. 265-278, 2014.
- FITZGERALD, J. R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 192-198, 2012.
- FLUIT, A. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 8, p. 735-744, 2012.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Department of Health and Human Services. Summary report on Antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals**, September, p. 1-26, 2014.
- FRANA, T. S.; BEAHM, A. R.; HANSON, B. M. et al. Isolation and Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pork farms and visiting veterinary students. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- FRENCH, G. L. The continuing crisis in antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Birmingham, v. 36, Suplemento 3, p. S3-S7, 2010.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine population in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595-603, 2011.
- GELATTI, L. C.; SUKIENNIK, T.; BECKER, A. P. et al. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 4, p. 458-460, 2009.
- GERVÁSIO, E. W. **Suinicultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. Curitiba, 2013. 16 p. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf>. Acesso em: 07/09/2015.
- GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. Ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 675p.
- HAMMERUM, A. M.; LARSEN, J.; ANDERSEN, A. D. et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 69, n. 10, p. 2650-7, 2014.
- HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Massachusetts, v. 158, n. 2, p. 513-516, 1984.

HENNEKINNE, J.; OSTYN, A.; GUILLIER, F. et al. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized? **Toxins**, Switzerland, v. 2, p.2106-2116, 2010.

HIDRON, A. I.; EDWARDS, J. R.; PATEL, J. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008.

HIRAMATSU, K.; ITO, T.; TSUBAKISHITA, S. et al. Genomic basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Infection & Chemotherapy**, Seoul, v. 45, n. 2, p. 117-136, 2013.

HODILLE, E.; DELOUERE, L.; BOUVEYRON, C. et al. In vitro activity of ceftobiprole on 440 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bronchopulmonary infections. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 47, p. 152-157, 2017.

HUBER, H.; KOLLER, S.; GLEZENDANNER, N. et al. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Euro Surveill**, v. 15, n. 16, p. 1-4, 2010.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS - IWG-SCC. Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 4997-4999, 2012.

JEVONS, M. P. 'Celbenin'-resistant *Staphylococci*. **British Medical Journal**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 124-125, 1961.

KAYSER, F. H.; MAK, T. M. Methicillin-resistant staphylococci. **American Journal of the Medical Sciences**, Birmingham, v. 264, n. 3, 1972.

KLEIN, E. Y.; SUN, L.; SMITH, D. L. et al. The Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: A national observational study. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 177, n. 7, p. 666-674, 2013.

KRAUS, D.; PESCHEL, A. *Staphylococcus aureus* evasion of innate antimicrobial defense. **Future Microbiology**, v. 3, n. 4, p.437-451, 2008.

LIMA, D. F.; COHEN, R. W. F.; ROCHA, G. A. et al. Genomic information on multidrug-resistant livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from a Brazilian patient with cystic fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 1, p. 79-80, 2017.

List of prokaryotic names with standing in nomenclature - LPSN: Genus *Staphylococcus*. **Internacional Journal Systematic Bacterial**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em: 15 junho. 2017.

LYON, B. R.; SKURRAY, R. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. **Microbiological Reviews**, Bethesda, v. 51, n. 01, p.88-134, 1987.

MARQUES, T. C.; REIS, A. M. M.; SILVA, A. E. B. C. et al. Erros de administração de antimicrobianos identificados em estudo multicêntrico brasileiro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 02, p.305-314, 2008.

- MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 4, p. 718–733, 2011.
- MARTINS, K. B.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; RIBOLI, D. F. M. et al. Clonal profile, virulence and resistance os *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 535-543, 2015.
- MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G. S.; CARVALHO, L. F. O. S. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, Paraná, v. 17, n. 01, p. 1-14, 2012.
- MEJÍA, C.; ZURITA, J.; GUZMÁN-BLANCO, M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 79-86, 2010.
- MELLO, J. F.; ROCHA, L. B.; LOPES, E. S. et al. Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp. in food services. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 1031-1037, 2014.
- MIMICA, J. M. Methicillin- and Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 278-279, 2012.
- MORENO, L. Z.; DUTRA, M. C.; FERREIRA, T. S. P. et al. Vancomycin-intermediate livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398/t9538 from swine in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 10, p. 659-661, 2016.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.
- NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V. et al. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência e saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13 (Sup): p. 689-696, 2008.
- NISHA, A. R. Antibiotic Residues - A Global Health Hazard. **Veterinary World**, Wankaner, V. 01, n. 12, p. 375-377, 2008.
- NORMANNO, G.; DAMBROSIO, A.; LORUSSO, V. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy. **Food Microbiology**, Foggia, v. 51, p. 51-56, 2015.
- OLIVEIRA, F. H.; SANTANA, E. S.; SOBESTIANSKY, J. et al. Salmonelose em sistema intensivo de criação de suínos: epidemiologia, patogenia, diagnóstico e controle. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 7, N.12, 2011. 25 p.
- O’SULLIVAN, T.; FRIENDSHIP, R.; BLACKWELL, T. et al. Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 75, p. 106-111, 2011.
- PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42-47, 2014.

- PEETERS, L. E.; ARGUDÍN, M. A.; AZADIKHAH, S. et al. Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus aureus* recovered from pigs farms. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 1-2, p. 151-156, 2015.
- PETERSEN, A.; STEGGER, M.; HELTBERG, O. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, p. 16-22, 2012.
- PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, Rennes, v. 21, p. 602-615, 2014.
- PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 56, n. 4, p. 597-612, 2009.
- PORRERO, M. C.; VALVERDE, A.; FERNÁNDEZ-LLARIO, P. et al. *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in animals and urban wastewater, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 899-901, 2014.
- PRICE, L. B.; STEGGER, M.; HASMAN, H. et al. *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistant in livestock. **mBio**, v. 3, n. 1, p305-311, 2012.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002, 1737p.
- RAKOTOHARINOME, M.; POGNON, D.; RANDRIAMPARANY, T. et al. Prevalence of antimicrobial residues in pork meat in Madagascar. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 49-55, 2014.
- RASIGADE, J.; VANDENESCH, F. *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. **Infection, Genetics and Evolution**, Lyon, v. 21, p. 510-514, 2014.
- RATTI, R. P.; SOUSA, C. P.. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 02, p.137-143, 2009.
- REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.
- REGULA, G.; TORRIANI, K.; GASSNER, B. et al. Prescription patterns of antimicrobials in veterinary practices in Switzerland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 63, p. 805–811, 2009.
- REYGAERT, W. C. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. In: MÉNDEZ –VILAS, A. [Ed]. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Badajoz: Formatex, 2013, p. 297-305.
- RINCÓN, S.; PANESSO, D.; DÍAZ, L. et al. Resistencia a antibióticos de última línea em cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. **Biomédica**, Bogotá, v. 34, n. 1, p. 191-209, 2014.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 77, n. 03, p.545-554, 2010.

- SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 06, p.413-423, dez. 2007.
- SANTOS, W. R. M.; INFORZATO, G. R.; ALVES, R. M. et al. Antibioticoterapia em suínos – matrizes e engorda. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VII, N. 12, 2009.
- SCABIN, K. E. M.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; FRIAS, D. F. R. Qualidade microbiológica do leite *in natura* durante o processo de obtenção e após o resfriamento. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, Medellín, v. 7, n. 1, 2012.
- SCHLEIFER, K. H.; BELL, J. A. Family VIII. *Staphylococcaceae*. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 03, p. 393-420, 2009.
- SCHMIDT, T.; KOCK, M. M.; EHLERS, M. M. Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of staphylococci isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6257-6269, 2015.
- SERI, H. I. Introduction to Veterinary drug residues: Hazards and Risks. **Veterinary Drug Residues in Food Derived from Animals** (Our goal of protecting consumers). Organized by The National Medicinal and Poisons Board, Khartoum, Sudan, 26-27th, 2013.
- SFACIOTTE, R. A. P.; CORONEL, L. G.; OSAKI, S. C. et al. Gram-positive bacterial resistant strains of interest in animal and public health. **Semina: Ciência Agrária**, Londrina, v. 56, n. 4, p. 2693-2712, 2015.
- SILVA, E. C. B. F.; MACIEL, M. A. V.; MELO, F. L. et al. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, v. 52, n. 2, p.168 172, 2007.
- SILVA, N. C. C.; GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. **Letters In Applied Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 665-669, 2014.
- SMITH, T. C. Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*: The United States Experience. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 2, 2015
- SMITH, T. C.; GEBREYES, W. A.; ABLEY, M. J. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. **Plos One**, United Kingdom, v. 8, n. 05, may. 2013.
- SOUZA, M. M. S.; COELHO, S. M. O.; PEREIRA, I. A. et al. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* Species of Animal Origin. In: PANA, M. (Ed.). **Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium**. Rijeka: INTECH, 2012. P. 273-303.
- TENHAGEN, B. A.; FETSCH, A.; STÜHRENBERG, B. et al. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. **Veterinary Record**, Londor, v. 165, n. 20, p. 589-593, 2009.
- THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH - CFSPH. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Institute for International Cooperation in Animal Biologics**, p.1-27, 2016.

TULINSKI, P.; FLUIT, A. C.; WAGENAAR, J. A. et al. Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci on pig farms as a reservoir of heterogeneous Staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 299-304, 2012.

TURLEJ, A.; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 95-103, 2011.

TURNER, J. Antibiotics in animal farming: Public health and animal welfare. **Compassion in World Farming**, 2011. 43 p.

UBUKATA, K.; YAMASHITA, N.; KONNO, M. Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococci*. **Antimicrobial Agents Chemother**, Washington, v. 27, n. 5, p. 851–857, 1985.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Foreign Agricultural Service/USDA Office of Global Analysis, 2015. **The Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Disponível em:

http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Acesso em: 31/08/2016.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18 p. 5649–5654, 2015.

VAN CLEEF, B. A. G. L.; BROENS, E. M.; VOSS, A. et al. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 138, p. 756-763, 2010.

VAN CLEEF, B. A. G. L. MONNET, D. L.; VOSS, A. et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 502-505, 2011.

VANDERHAEGHEN, W.; VANDENDRIESSCHE, S.; CROMBÉ, F. et al. Species and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) diversity among methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 123-128, 2012.

VELÁZQUEZ-GUADARRAMA, N.; GALINDO, J. C. V.; VENEGAS, G. E. et al. Resistencia a linezolid en *Staphylococcus aureus* resistente a metilina y enterococos con elevada resistencia a aminoglucósidos en um hospital pediátrico de tercer nivel. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, Ciudad de México, v. 67, p. 19-26, 2010.

VERKADE, E.; KLUYTMANS, J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: Animal reservoirs and human infections. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 21, p. 523-530, 2014.

WINN, W. C.; ALLEN, S.; JANDA, W. et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760 p.

ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A. et al. **Diseases of swine**. 10. Ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. 1012p.

3. CAPÍTULO II (ARTIGO CIENTÍFICO)

Artigo em processo de submissão para o periódico: Pesquisa Agropecuária Brasileira

Caracterização pelo perfil de resistência antibiótica e fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* isolados em suínos

Márcio Leonardo de Moraes Nobre⁽¹⁾, Leidiane Sousa Santos⁽¹⁾, Felipe Araújo de Alcântara Oliveira⁽¹⁾, Alyne Rodrigues de Araújo⁽²⁾, Déborah Rêgo Pires da Silva⁽¹⁾, Agostinho Valente de Figueirêdo⁽¹⁾, Maria José dos Santos Soares⁽¹⁾ e Maria Christina Sanches Muratori⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Socopo, Teresina, Piauí, CEP: 64.049-550. E-mail: marcio.leo.nobre@gmail.com, leidiane.vet@gmail.com, oliveira2201@gmail.com, deborahrego@yahoo.com.br, agustinhov@yahoo.com.br, chrismuratori@uol.com.br, mrsapijf@gmail.com ⁽²⁾ Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Bairro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí, CEP: 64.202-020. E-mail: alyne_biomed@hotmail.com

Resumo – Este trabalho avaliou a presença de *S. aureus* em suínos, bem como seu perfil de resistência antibiótica e a capacidade de produção de biofilme. Espécimes clínicos, totalizando 164 amostras, foram obtidos de 82 suínos, para o isolamento de *Staphylococcus* spp. A identificação preliminar da espécie *S. aureus* foi realizada por meio de provas bioquímicas, confirmada pela presença dos genes 16S rRNA e *nuc*. O perfil de susceptibilidade antibiótica e a resistência à meticilina foram, respectivamente, avaliados por meio da técnica de difusão em disco e triagem em ágar contendo meticilina. A produção de biofilme foi evidenciada pelas técnicas de ágar Vermelho Congo, Aderência em Microplaca e presença dos genes *icaA* ou *icaD*. Foram testadas 551 colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp e destas 29 (5,3%) foram confirmadas como *S. aureus*, sendo estas isoladas de 17 (20,7%) animais. Todas as estirpes apresentavam multirresistência e fraca produção de biofilme. Entretanto, nenhuma delas possuía o gene *mecA*. *Staphylococcus aureus* estão presentes prevalentemente na microbiota nasal de suínos, sendo encontrados também no ambiente

entérico de suínos. As estirpes isoladas foram resistentes aos principais antibióticos utilizados na suinocultura. Entretanto, não são portadoras do gene *mecA* e produzem biofilme como um dos fatores de virulência.

Termos para indexação: *mecA*; Microbiota; MRSA; Suinocultura

Abstract – This work evaluated the presence of *S. aureus* in pigs, as well as its antibiotic resistance profile and biofilm production capacity. Clinical specimens, totaling 164 samples, were obtained from 82 pigs for the isolation of *Staphylococcus* spp. Preliminary identification of the *S. aureus* species was performed by means of biochemical tests, confirmed by the presence of the 16S rRNA and *nuc* genes. The antibiotic susceptibility profile and the resistance to methicillin were respectively evaluated by disc diffusion technique and screening in agar containing methicillin. Biofilm production was evidenced by Red Congo agar, Microplate Adhesion and presence of *icaA* or *icaD* genes. A total of 551 colonies suggestive of *Staphylococcus* spp were tested, and of these 29 (5.3%) were confirmed as *S. aureus*, being isolated from 17 (20.7%) animals. All strains showed multiresistance and poor biofilm production. However, none of them possessed the *mecA* gene. *Staphylococcus aureus* are present predominantly in the nasal microbiota of swine, being also found in the enteric environment of swine. The isolated strains were resistant to the main antibiotics used in pig farming. However, they are not carriers of the *mecA* gene and produce biofilm as one of the virulence factors.

Index terms: *mecA*; Microbiota; MRSA; Swine farming

Introdução

O gênero *Staphylococcus* abrange mais de 50 espécies, que tem despertado a atenção de diferentes profissionais de saúde entre médicos, farmacêuticos, bioquímicos, geneticistas veterinários, desde sua descrição, em 1880, por Sir Alexander Ogston, a partir de secreção purulenta de uma infecção cirúrgica (Licitra, 2013; Euzeby, 2017).

Staphylococcus aureus é a espécie, de maior destaque, devido sua elevada prevalência nos mais diferentes quadros clínicos humanos ou animais, podendo está associados tanto às infecções comunitárias quanto às hospitalares e cujo envolvimento passa por infecções mais simples, como as localizadas na pele, até doenças graves e disseminadas, incluindo

bacteremias, endocardites, pneumonias, meningites, osteomielites, mastites, artrites, bem como toxemias, como a intoxicação alimentar estafilocócica. Tal habilidade se deve a surpreendente plasticidade genômica deste micro-organismo, para adquirir diferentes mecanismos de virulência, representados por adesinas, e enzimas que exercem efeitos de agressinas, evasinas e modulinas da resposta imune, bem como pela elevada resistência antibiótica que esta bactéria pode possuir (Souza et al., 2012; Peton & le Loir, 2014).

Seu alto poder adaptativo e de disseminação fez com que essa bactéria evoluísse a linhagens mais resistentes, sobrevivendo então a cada novo antibiótico lançado. Este último atributo tem sido o de maior preocupação para a saúde pública mundial, e pode ser representado pelo mais importante mecanismo de resistência já adquirido pelos *S. aureus*, o determinante genético *mec*, que confere resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos semi sintéticos ou não. Assim, as cepas desta espécie que albergam esse determinante de resistência são denominadas de *S. aureus* resistentes à meticilina, ou MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Santos et al., 2007; Hiramatsu et al., 2013).

Desde seu surgimento, na década de 60, a epidemiologia do MRSA tem se modificado drasticamente, e em especial, nos últimos anos. Este de um patógeno humano e essencialmente nosocomial (HA-MRSA, Hospital-Associated Methicillin-resistant *S. aureus*), passou a ser também um importante agente nas infecções na comunidade, com destaque para indivíduos que não mantem contato com os centros de saúde (CA-MRSA, Community-Associated Methicillin-resistant *S. aureus*). Contudo, desde 2005, a presença de um clone distinto de MRSA, tem sido relatada em uma grande variedade de espécies animais, causando colonização e/ou infecções que também estão a afetar humanos. Este MRSA tem sido denominado de LA-MRSA – Livestock-associated Methicillin-resistant *S. aureus* ST 398 (Figueiredo & Ferreira, 2014; Mocillio et al., 2015).

Dentre as espécies de animais domésticos, os suínos têm sido apontados como importantes reservatórios para a evolução de *S. aureus* à LA - MRSA, despertando pesquisas que buscam melhor compreender a epidemiologia da transmissão e evolução da resistência antibiótica destes micro-organismos entre humanos e animais. Na cadeia da suinocultura, desde o processo de produção de carne, os próprios animais, trabalhadores, ambiente, equipamentos e utensílios utilizados, podem ser fontes de contaminação e transmissão deste MRSA, demonstrando a importância e o risco que os suínos podem representar à saúde

pública, em todas as etapas de desenvolvimento sem os cuidados mínimos necessários para garantir sua inocuidade (Masson et al., 2012; Smith et al., 2013).

A presença de linhagens LA-MRSA ST 398, nestes monogástricos, tem sido descritas em infecções de pacientes da comunidade, de hospitais, ou apenas colonizando sítios anatômicos do corpo humano, em especial àqueles que mantem contato com os suínos (Lewis et al., 2008; Gómez-Sanz et al., 2010; Pantosti, 2012). Não há evidência científica referente à presença destas linhagens nos suínos criados em granjas no Piauí. Entretanto, o monitoramento da presença destes micro-organismos se faz importante para o controle da disseminação destes agentes seja entre os suínos, ou de sua cadeia produtiva e na saúde pública.

Considerando-se que não há relatos que abordem a ocorrência de *S. aureus* e do perfil de sensibilidade antibiótica, para cepas deste micro-organismo, isoladas de suínos criados no Piauí, os resultados encontrados, nesta pesquisa, tornam-se relevantes por revelar a presença de cepas multirresistentes deste micro-organismo, colonizando os animais estudados, demonstrando a necessidade para a condução de ações direcionadas ao uso mais racional dos antimicrobianos, objetivando assim a proteção aos animais e a saúde pública. Com base nessas informações, com esse trabalho objetivou-se isolar *Staphylococcus aureus* em suínos, caracterizar as cepas pelo perfil de resistência antibiótica, e identificar os fatores de virulência.

Material e Métodos

Aspectos éticos

Todas as amostras foram coletadas de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, estabelecido pela Lei nº 11.794, de 2008 (Brasil, 2008) e aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEAA/UFPI), em 06 de janeiro de 2016, sob o protocolo nº 115/2015.

Caracterização do local de coleta

Foram selecionadas três granjas de ciclo completo de suínos que abastecem o mercado consumidor de Teresina-PI, escolhidas conforme autorização prévia do proprietário após indicação por membros da Associação Piauiense de Suinocultura - APISUI. As granjas estão

localizadas no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí – DZO/UFPI; a 30 km de Teresina-PI, no município de Altos-PI; e a 15 km de Teresina-PI, no município de Timon-MA.

Animais

Foram escolhidos animais de raças mistas provenientes de linhagens com características que favoreçam a produção de carne e resistência a fatores ambientais (Duroc, Landrace, Piau e Mouro). Os leitões selecionados estavam entre seis e oito semanas de vida, com aproximadamente 15 kg de peso.

Coleta das amostras

Com o auxílio de *swabs* esterilizados, foram colhidos espécimes clínicos da cavidade nasal e anal de 82 suínos, perfazendo um total de 164 amostras. Para isso, os animais foram contidos fisicamente por auxiliares das granjas visitadas, de forma a garantir a qualidade da coleta e o bem-estar animal durante o procedimento. O tamanho da amostra foi adequado para cada estabelecimento tendo como base uma prevalência de *Staphylococcus* spp. maior do que 20,0%, com um nível de confiança em 95,0% (Neeling et al., 2007; Khanna et al., 2007; Van Duijkeren et al., 2008).

Os *swabs* nasais e anais foram, respectivamente, acondicionados em tubos de ensaio (13 X 100 mm) estéreis contendo 2,0 mL de caldo de enriquecimento seletivo TNaCl (10,0 g tripton/L, 75 g NaCl/L, 10 g manitol/L e 2,5 g de extrato de levedura/L) e 2,0 mL de água peptonada 0,1% (AP). Os tubos contendo os materiais coletados foram mantidos sob condições de refrigeração, em caixa isotérmica com gelo reciclável, sendo transportados ao Laboratório de Doenças Infecciosas, localizado no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), do Centro de Ciências Agrárias, na Universidade Federal do Piauí, onde foram imediatamente incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa bacteriológica por 24 horas.

Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça bacteriológica, alíquotas do caldo TNaCl, contendo as amostras nasais, foram semeadas, por meio de estrias, sobre a

superfície de placas de Petri contendo Ágar Manitol Salgado (AMS; Difco®) e estas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa bacteriológica por 48-72 horas, em aerobiose.

Do cultivo em AP contendo as amostras anais foram retirados volumes de 100 μL e estes foram inoculados em caldo TNaCl, repetindo assim, o mesmo processo das amostras nasais (incubação e semeio em AMS).

Com base nas características morfológicas macroscópicas e a fermentação do manitol, em média, cinco colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp. por amostra, foram transferidas, individualmente, para tubos de ensaio contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA), e estes foram incubados sob as mesmas condições descritas por um período de 24 horas. Em seguida, os crescimentos microbianos obtidos foram submetidos a testes de confirmação para a identificação do gênero, como descrito por Winn et al. (2008), envolvendo as seguintes provas: coloração de Gram, teste da produção da enzima catalase, e susceptibilidade aos antimicrobianos bacitracina (0,04 U) e furazolidona (100 μg). Foram consideradas como *Staphylococcus* spp. as amostras que se apresentaram como cocos Gram positivos, produtores da enzima catalase, resistentes à bacitracina e sensíveis à furazolidona.

Identificação de *Staphylococcus aureus*

A partir das colônias isoladas em PCA, confirmadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, foram realizados testes para a identificação da espécie *S. aureus* tais como: presença do fator de coagulação (*clumping factor*), produção da enzima coagulase (utilizando plasma de coelho liofilizado, obtido com EDTA), prova de fermentação de manitol, produção de acetoina (teste de Voges - Proskauer, VP), produção da enzima β -galactosidase, resistência ao corante acriflavina (Cloreto de 3,6-diamino-10-metilacridínio misturado com 3,6-acridinodiamina), e resistência a Polimixina B (300 μg), utilizando procedimentos propostos por Roberson et al. (1992), Winn et al. (2008) e Murray et al. (2004) para a confirmação desta espécie e diferenciação de outras espécies produtoras da enzima coagulase (*Staphylococcus* coagulase – positivos).

As estirpes microbianas que se apresentaram como positivas para a produção de *clumping factor* e coagulase, e revelaram provas positivas para fermentação de manitol, produção de acetoina, resistência a acriflavina e não produção da enzima β -galactosidase foram consideradas como *S. aureus*.

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados de *S. aureus* foram submetidos à avaliação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro*, por meio da técnica de difusão da droga em meio sólido, a partir de discos, de acordo com as normas estabelecidas pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Foram utilizados os seguintes discos impregnados de antibióticos: penicilina G (10 U), sulfametoxazol + trimetoprim (25 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), cefoxitina (30 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), ceftiofur (30 µg), oxacilina (1 µg), clindamicina (2 µg), tilmicosin (15 µg), tigeciclina (15 µg) e linezolida (30 µg).

A aferição dos halos de inibição formados, em torno dos antibióticos testados, foi realizada com o auxílio de paquímetro e os valores obtidos (expressos em mm) e estes foram analisados como preconizado pelos documentos M31-A2 (CLSI, 2002) e M100-S26 (CLSI, 2016), que estabelece os valores a serem considerados para caracterizar o perfil de sensibilidade, resistência intermediária ou resistência completa aos antimicrobianos avaliados. O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado conforme metodologia descrita por Kruperman (1983), sendo este índice determinado pela relação entre o número de antimicrobianos que a amostra foi resistente e o número total de antimicrobianos testados.

Foi realizado o teste de disco aproximação (teste D), como descrito por Fiebelkorn et al. (2003), para avaliação do fenótipo de resistência aos macrolídeos e lincosamidas. A partir dos discos de clindamicina (2 µg) e eritromicina (15 µg), foi observada a formação ou não do achatamento do halo inibitório da clindamicina, pela ação induzível da eritromicina, revelando o fenótipo de resistência ou sensibilidade da cepa à essa droga.

Teste de Triagem para detecção de estirpes MRSA, utilizando Ágar Meticilina (AMetc)

A fim de confirmar estirpes de *S. aureus* resistentes à Meticilina (MRSA), bem como identificar possíveis cepas que expressam de modo heterogêneo a resistência aos beta-lactâmicos semi sintéticos, realizou-se o teste de triagem de resistência à metilina, utilizando ágar Mueller-Hinton suplementado com 25 µg/mL desse antibiótico (AMetc), como descrito por Soares (1997). Para isso, a partir dos cultivos em PCA, uma porção destes foi semeado em tubos de ensaio contendo 2,0 mL de caldo Tripticaseína de soja (TSB) e estes foram

incubados temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em estufa com agitação de 200 rpm, por 24 horas, assegurando uma vigorosa aeração para a obtenção de uma elevada concentração celular bacteriana (cerca de 10^{10} UFC/mL).

Decorrido o período de incubação uma alíquota de 25 μL do cultivo em TSB foi semeado, com auxílio de uma alça de Drigalsky, sobre a superfície de placas de Petri contendo o AMetc e estas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas.

O crescimento obtido (confluente ou de colônias isoladas) foi avaliado quanto a confirmação da pureza microbiana, realizando a coloração de Gram e os testes de catalase e coagulase em tubo, confirmando, assim, a presença de estirpes de MRSA.

Caracterização fenotípica da produção de biofilme utilizando Ágar Vermelho Congo (AVC)

O Ágar Vermelho Congo (AVC) foi preparado com a seguinte formulação: Caldo BHI (Brain Heart Infusion, 37 g/L), 5,0 % de Sacarose e 1,5 % de Ágar bacteriológico e separadamente, foi produzida uma solução contendo 0,8 g/L do corante Vermelho Congo. Ambos foram esterilizados, em vapor úmido sob pressão a 121°C por 15 minutos. Após arrefecimento, em banho Maria, a temperatura de 50°C , por cerca de 60 minutos, a solução de Vermelho Congo foi acrescida, ao ágar em condições assépticas (Freeman, 1989).

As bactérias previamente cultivadas por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em ágar Mueller-Hinton foram inoculadas, por meio de estrias, no AVC e incubadas aerobicamente a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 horas. O resultado foi analisado a partir da coloração apresentada pelas colônias bacterianas: As colônias negras foram classificadas como produtoras normais de biofilme, enquanto as demais cores foram consideradas como indicativo de uma fraca ou até mesmo incapacidade de produção de biofilme (Arciola, 2002).

Detecção da formação de biofilme pelo teste de aderência em microplaca

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 cavidades com os isolados de *S. aureus* em fase de crescimento logarítmico em caldo TSB. Em cada orifício da placa adicionou-se 100 μL (Tryptical Soya Broth) suplementado com 0,5% de glicose e as bactérias, a uma concentração de 5×10^5 UFC/mL. Em seguida, as microplacas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h, sob condições aeróbicas. Após este período de incubação, o meio de cultura foi

removido e os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril. Posteriormente, o biofilme formado foi fixado com 100 µL de metanol (PA), corado com uma solução de cristal violeta a 0,1% (v/v) e enxaguado com água destilada estéril até a completa remoção do corante do controle negativo (poços que continham apenas meio TSB sem inóculo bacteriano). O corante foi ressuscitado com 100 µL de etanol (95,0 %), e as placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 492 nm, de acordo com Stepanovic et al. (2000), com modificações. Foram utilizadas, como controle positivo para formação de biofilme, as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e a estirpe de referência *Staphylococcus epidermidis* 70D. O valor da densidade óptica (DO) usado foi o valor médio das quatro leituras feitas para cada linhagem bacteriana. Considerou-se produtor de biofilme as amostras, cuja média de leitura da DO para cada isolado foi maior do que o ponto de corte (DOc), definido pela seguinte fórmula:

$DOc = [MCN + 3s]$, onde MCN é a média da DO do controle negativo e s é o desvio padrão das leituras do controle negativo. As bactérias foram classificadas como fortes ($DO \geq 4DOc$), moderadas ($2DOc \leq DO \leq 4DOc$), fracas ($DOc \leq DO \leq 2DOc$) ou não produtoras de biofilme ($DO \leq DOc$) (Stepanovic et al., 2007).

Confirmação gênica da espécie e de fatores de virulência das estirpes de *S. aureus*.

Uma colônia de *S. aureus* crescida previamente em ágar PCA foi transferida para um microtubo contendo 50 µl de água mili Q estéril. Os tubos foram incubados por 10 minutos em banho Maria a 100 °C, e, após este período, centrifugados por dois minutos a 10.000 xg. O sobrenadante com o DNA foi transferido para novos microtubos.

Os oligonucleotídios utilizados foram sintetizados pela Exxtend com as seguintes sequências: Staph756F (5'-AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA-3') e o Staph750R (5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3') para o rRNA específico do gênero *Staphylococcus*; Nuc 1 (5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3') e Nuc 2 (5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3') para o gene específico de *S. aureus*; MecA1 (5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3') e MecA2 (5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3') para o gene de resistência *mecA*; IcaAF (5'-ACA CTT GCT GGC GCA GTC AA-3') e IcaAR (5'-TCT GGA ACC AAC ATC CAA CA-3') para gene de produção de biofilme *icaA*; IcaDF (5'-ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG-3') e IcaDR (5'-CGT GTT

TTC AAC ATT TAA TGC AA-3') para gene de produção de biofilme *icaD* (Arciola et al., 2001; Zhang et al., 2004; Mariana et al., 2009).

As reações de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas utilizando um volume total de mistura de 25 µl contendo tampão (100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo (DNTp) , 1 U de Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo , 2,0 µL de DNA e água estéril para completar o volume final. Foram utilizados os seguintes parâmetros: desnaturação inicial de 94°C por cinco minutos; 28 ciclos de 94 °C por um minuto, 52 °C por um minuto e 72°C por um minuto; uma etapa de extensão final de 72°C for cinco minutos.

Em todas as reações foram utilizados como controle positivo para todos os oligonucleotídios avaliados uma estirpe da coleção do Laboratório de Microbiologia e MRSA Med55 e como controle negativo a estirpe de *Escherichia coli* ATCC 25922.

O DNA amplificado foi visualizado sob luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) diluído 1.000 vezes.

Análise estatística

O presente trabalho investigou os efeitos do sítio anatômico na prevalência de *Staphylococcus aureus* no grupo de animais envolvido na pesquisa. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 6.0, utilizando o teste qui-quadrado de proporções com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Foi observado em duas das três granjas que, a partir do momento em que os animais são deslocados da maternidade para a creche, passaram a se alimentar com ração comercial suplementada com antimicrobianos, tais como Sulfadimidina, Trimetoprima, Clortetraciclina, dentre outros. Essa prática pode influenciar diretamente no desempenho dos leitões de creche, bem como na formação da microbiota animal (Kummer et al., 2009).

Um total de 831 colônias foram isoladas e submetidas aos testes de identificação para o gênero *Staphylococcus*, que revelou a presença deste micro-organismo em 66,3 % ($n = 551$) das colônias analisadas e estas foram submetidas às provas para identificação da espécie *S.*

aureus. Os dados obtidos evidenciaram uma prevalência de 97,5% de animais colonizados por esse gênero bacteriano e 20,7% eram portadores desta espécie bacteriana (Tabela 01).

Tabela 01. Frequência absoluta de colônias bacterianas testadas e identificadas por sítio de coleta, Teresina, 2017

Colônias isoladas	Espécimes clínicos (N %)					
	Amostra Anal		Amostra Nasal		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Staphylococcus</i> spp.	215	39%	336	61%	551	100%
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos	209	40%	313	60%	522	100%
<i>S. aureus</i>	06	21%	23	79%	29	100%
Total	408	49%	423	51%	831	100%

FONTE: dados da pesquisa

A alta prevalência deste gênero bacteriano (97,5%, $n = 80$) observada nos animais avaliados, nessa pesquisa, corrobora a afirmação de que *Staphylococcus* spp. constitui parte da microbiota normal de suínos (Linhares et al., 2015). A elevada frequência de isolamento de estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativos, a partir dos animais das granjas avaliadas era um resultado esperado, uma vez que estes micro-organismos compõem a microbiota normal destes sítios anatômicos, sendo evidenciado em outros trabalhos sobre a colonização nasal deste agente em suínos (Masson et al., 2012).

O fato de *S. aureus* ser considerado frequentemente como um membro da microbiota de mamíferos, cuja a importância ecológica o classifica como um patógeno oportunista, faz com que poucos estudos procurem analisar a prevalência deste micro-organismo como microbiota normal nesses monogástricos. A grande maioria das pesquisas tem se dedicado ao isolamento e identificação de cepas de MRSA (Crombé et al., 2012; Frana et al. 2013; Linhares et al., 2015).

Em uma ampla avaliação de colonização nasal, buscando estabelecer o perfil de suínos carreadores persistentes, intermitentes ou não carreadores de *S. aureus*, Espinosa-Gongora e colaboradores (2015) relataram prevalência de 52,0 % de suínos carreadores intermitentes

desta bactéria. Linhares e colaboradores (2015) também descreveram prevalência de *S. aureus* nas narinas de 67,9 % dos suínos avaliados. Portanto, ambos os estudos, apresentaram resultados bem superiores aos dados obtidos no presente estudo. De modo contrário, em pesquisa, idealizada por Fall e colaboradores (2012) a prevalência deste micro-organismo foi de 12,5 % entre os suínos avaliados, sendo os dados aqui descritos bem superiores.

A proporção de amostras positivas para *S. aureus* variou significativamente entre os sítios anatômicos ($X^2 = 5,316$; $p = 0,0211$), onde a prevalência foi de 15,85 % ($n = 13$) para amostra nasal e 4,88% ($n = 4$) para amostra anal. Os dados obtidos corroboram com os descritos por Khanna et al. (2007) e Linhares et al. (2015), embora suas frequências de isolamento tenham sido maiores. É importante ressaltar que esse estudo foi realizado em um pequeno número de propriedade e há evidências de variação entre fazendas. Além disso, exercem influencia nos estudos de prevalência de colonização fatores ambientais tais como: densidade animal, taxa de ventilação utilizada nas instalações, época do ano e o manejo higiênico-sanitário (Linhares et al., 2015).

A partir das provas fenotípicas e genotípicas utilizadas, 29 estirpes foram identificadas como pertencentes à espécie *S. aureus*, e estas foram isoladas de 17 suínos (20,7%). Prevalências superiores a essa foram encontradas nos trabalhos realizados por Khanna et al. (2007), Masson et al. (2012) e Linhares et al. (2015) (Tabela 02).

Tabela 02. Caracterização fenotípica e gênica de determinantes de virulência e resistência à meticilina das estirpes de *S. aureus* isoladas, Teresina, 2017

Amostras	Identificação gênica			Produção de biofilme		
	16S rRNA	<i>nuc</i>	<i>mecA</i>	AVC	Microplaca	<i>icaA/icaD</i>
01	+	+	-	NP	Fraca	+ / +
02	+	+	-	NP	Fraca	+ / +
03	+	+	-	NP	Fraca	- / -
04	+	+	-	NP	Fraca	- / -
05	+	+	-	NP	Fraca	- / -
06	+	+	-	NP	Fraca	- / -
07	+	+	-	NP	Fraca	- / -
08	+	+	-	NP	Fraca	- / -

09	+	+	-	NP	Fraca	+ / +
10	+	+	-	NP	Fraca	+ / +
11	+	+	-	NP	Fraca	+ / +
12	+	+	-	NP	Fraca	- / -
13	+	+	-	NP	Fraca	- / -
14	+	+	-	NP	NP	- / -
15	+	+	-	NP	Fraca	- / -
16	+	+	-	NP	Moderada	- / -
17	+	+	-	NP	Moderada	- / -
18	+	+	-	NP	Fraca	- / -
19	+	+	-	NP	Moderada	- / -
20	+	+	-	NP	Fraca	- / -
21	+	+	-	NP	NP	- / -
22	+	+	-	NP	Fraca	- / -
23	+	+	-	NP	Fraca	- / -
24	+	+	-	NP	Fraca	- / -
25	+	+	-	NP	Fraca	- / -
26	+	+	-	NP	Fraca	- / -
27	+	+	-	NP	Moderada	- / -
28	+	+	-	NP	Fraca	+ / +
29	+	+	-	NP	Moderada	- / -

Legenda: AVC: Ágar Vermelho congo; NP: não produção; +: Positivo; -: Negativo.

Não houve crescimento de colônias bacterianas no teste de triagem para detecção de estirpes MRSA em ágar Meticilina. Esse fato foi evidenciado pela ausência do gene *mecA* nas amostras (Tabela 02), bem como pela total sensibilidade aos antimicrobianos oxacilina e cefoxitina (teste de *screening*), obtidos nos testes de difusão em disco (Tabela 03).

Diversos são os relatos da presença de cepas MRSA na microbiota de suínos pelo mundo (Cui et al., 2009; Gómez-Sanz et al., 2010; Arriola et al. 2011). No Brasil, Masson e colaboradores (2012) apresentaram resultados semelhantes aos que foram obtidos no presente trabalho, relatando a ausência de cepas MRSA nos suínos por eles investigados. Entretanto,

Takeuti e colaboradores (2016), descreveram a presença de 5,1% ($n = 18$ animais) de suínos na fase de engorda colonizados por MRSA, em fazendas, por eles avaliadas, no Rio Grande do Sul. Este fato denota a importância de uma maior vigilância epidemiológica nas granjas do país quanto à pesquisa de *S. aureus* e deste fenótipo de resistência, desde que comumente além de resistência aos beta-lactâmicos estas estirpes são resistentes a outras classes de antimicrobianos, apresentando, portanto, multirresistência, que dificulta a terapêutica das infecções causadas por estes micro-organismos e cuja disseminação para humanos se apresenta como uma realidade (Santos et al. 2007; Aarestrup et al., 2008; Rincón et al., 2014). Desse modo a resistência bacteriana aos compostos antimicrobianos utilizados na terapia humana e animal, bem como os empregados na alimentação suína como promotores de crescimento, tornou-se uma preocupação de saúde pública mundial.

Foi observado a presença dos genes *icaA* e *icaD* em 20,7% ($n = 6$) das amostras isoladas. Este dado não corroborou aos resultados encontrados no crescimento em Ágar Vermelho Congo e na adesão em microplacas, visto que no primeiro não foi evidenciada a produção de biofilme pelo crescimento de colônias negras, e no segundo houve adesão moderada em cinco estirpes (17,2%) que não portam os genes *icaA* e *icaD*.

Zmantar et al. (2010) também relataram resultado positivo para *icaA/icaD* em linhagens que apresentaram fraca formação de biofilme em microplaca, semelhante ao encontrado nesse estudo. Esse fato pode ser explicado pela influência dos fatores ambientais, que são importantes para diferenciação de bactérias planctônicas em bactérias sésseis (Costerton et al., 1999; Cramton et al., 1999; Rachid et al., 2000; Chaieb et al., 2007). Talvez a suplementação do meio com outros compostos, além da glicose, seja necessária para a expressão dos genes supracitados, nas linhagens isoladas da microbiota dos animais. As amostras que apresentaram produção moderada no teste de adesão e não portam os genes estudados podem ser justificadas pela existência de outros fatores genéticos que induzem a produção de biofilme, como os genes *icaB* e *icaC* (Rohde, 2001).

Os resultados quanto ao perfil de susceptibilidade antibiótica das estirpes de *S. aureus* deste estudo e as frequências de fenótipos de multirresistência estão apresentados na Tabela 03.

Tabela 03. Perfil de resistência de *S. aureus* isolados de suínos de creche em granjas de ciclo completo, Teresina, 2017

Antimicrobianos	Resistente	Intermediário	Sensível
Penicilina G (10 U)	29 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Oxacilina (1 µg)	0 (0%)	0 (0%)	29 (100%)
Tetraciclina (30 µg)	29 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Sulfametoxazol - trimetoprim (25 µg)	0 (0%)	2 (6,9%)	27 (93,1%)
Gentamicina (10 µg)	0 (0%)	3 (10,4%)	26 (89,6%)
Enrofloxacin (5 µg)	7 (24,1%)	17 (58,6%)	5 (17,3%)
Ceftiofur (30 µg)	0 (0%)	0 (0%)	29 (100%)
Tilmicosin (15 µg)	0 (0%)	0 (0%)	29 (100%)
Eritromicina (15 µg)	29 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Clindamicina (2 µg)	19 (65,5%)	10 (34,5%)	0 (0%)
Tigeciclina (15 µg)	0 (0%)	0 (0%)	29 (100%)
Linezolida (30 µg)	0 (0%)	0 (0%)	29 (100%)
	Positivo	Negativo	
Teste <i>screening</i> para cefoxitina	0 (0%)	29 (100%)	
Teste D de resistência induzível	0 (0%)	29 (100%)	
	Multirresistência		
Resistente a 3 classes de antimicrobianos	2 (6,9%)		
Resistente a 4 classes de antimicrobianos	9 (31,1%)		
Resistente a 5 classes de antimicrobianos	11 (37,9%)		
Resistente a 6 classes de antimicrobianos	7 (24,1%)		

Os maiores índices de resistência foram obtidos para penicilina G, tetraciclina e eritromicina (100%), valores que corroboram com relatos descritos por outros autores (Combré et al., 2012; Masson et al., 2012). Esses antibióticos são frequentemente utilizados na suinocultura para o tratamento de enfermidades e a capacidade dos *S. aureus* para adquirir resistência a esses medicamentos já é conhecida ao longo da história.

Não evidenciou-se resistência aos fármacos veterinários de amplo espectro, aqui representados por Tilmicosin e Ceftiofur, nem aos de uso hospitalar restrito para humanos,

Tigeciclina e Linezolida. Entretanto, antibióticos de aplicação mais comum, inclusive da linha veterinária, apresentaram frequências significativas de resistência tais como: como Enrofloxacina (24,1%) e Clindamicina (65,5%). Para Gentamicina e Sulfametoxazol-Trimetoprim observou-se apenas uma baixa resistência intermediária de 10,4 % e 6,9 %, respectivamente.

Todas as estirpes apresentaram-se resistentes ou com resistência intermediária a Eritromicina e Clindamicina. Entretanto, nenhuma das amostras foi positiva no teste D de resistência induzível, sugerindo o mecanismo de resistência constitutiva MLSBc (Macrolídeos, Lincosamida e Estreptogramina B), codificada pelo gene *erm* (Shrestha & Rana, 2014).

A multirresistência é um fenômeno extremamente relevante, pois compromete a eficácia dos fármacos utilizados para a terapia de possíveis enfermidades causadas por microorganismos como *S. aureus*. Segundo Magiorakos et al. (2012), os peritos internacionais pertencentes do *European Center for Disease Control* (ECDC) e do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), caracterizam como bactéria multirresistente aquela capaz de se apresentar resistente a três ou mais classes ou subclasses de agentes antimicrobianos a partir de testes *in vitro*. Outra definição proposta pelos mesmos autores é a de que são aquelas resistentes a um agente antimicrobiano chave, que confere uma co-resistência a múltiplas classes, tais como *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

Apesar da ausência de estirpes MRSA, os dados obtidos demonstraram um fato alarmante: todas as amostras de *S. aureus* estudadas apresentaram resistência a no mínimo três classes de antimicrobianos que deveriam ser sensíveis e para os quais há indicação terapêutica para suínos, no qual sete dessas amostras apresentaram resistência a seis classes destes fármacos. Isso caracteriza todos os isolados de *S. aureus* como multirresistentes.

Uma possível justificativa para a elevada frequência de cepas multirresistentes observadas neste estudo pode estar relacionada à utilização de suplementos alimentares contendo antibióticos (Sulfadimidina, Trimetoprima e Clortetraciclina), que se encontram misturados de forma homogênea à ração dada a estes animais e que são administrados desde a fase de creche até a de terminação do suíno. Embora seja a forma mais eficaz do ponto de vista do custo-benefício para manter ou melhorar a saúde do animal, tratar e prevenir doenças, além de promover o crescimento e melhorar a eficiência da alimentação, seu uso acarreta a

seleção de bactérias colonizadoras do animal que apresentam perfil de resistência a esses fármacos.

Outro método utilizado para detecção de múltipla resistência foi o Índice de Resistência Múltipla Antimicrobiana (IRMA), descrito por Krumperman (1983), onde valores maiores que 0,2 determinam o fenômeno de multirresistência (Tabela 04). Os *S. aureus* apresentaram IRMA entre 0,25 e 0,50, caracterizando-se como multirresistentes, corroborando a classificação já mencionada por Magiorakos et al. (2012).

Tabela 04. Distribuição do padrão de resistência e índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA) dos *S. aureus* isolados de suínos de creche em granjas de ciclo completo, Teresina, 2017

Perfil de Resistência aos antimicrobianos	Nº de amostras	IRMA
PEN, TET, GEN, ENO, ERI, CLI	7	0,50
PEN, TET, GEN, CLI, ERI	11	0,41
PEN, TET, GEN, ERI	8	0,34
PEN, TET, ERI, CLI	1	0,34
PEN, TET, ERI	2	0,25

Legenda: PEN: Penicilina G; TET: Tetraciclina; GEN: Genamicina; ENO: Enrofloxacina; ERI: Eritromicina; CLI: Clindamicina.

Staphylococcus aureus mostraram-se importantes micro-organismos presentes na microbiota de suínos em fase de creche, isolados tanto de fossas nasais quanto de região anal. Apesar de não ter sido detectado estirpes MRSA, linhagens de multirresistência foram isoladas, motivo este de preocupação, devido à possibilidade de disseminação no rebanho e veiculação destas cepas ao homem, por meio do manuseio da carne ou contato direto com o animal.

Conclusões

1. *Staphylococcus aureus* estão presentes na microbiota de suínos, prevalentemente em mucosa nasal em relação à amostra anal.

2. As estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em suínos foram resistentes as principais classes de antimicrobianos utilizadas na suinocultura.
3. As linhagens de *S. aureus* isoladas que fazem parte da microbiota de suínos são multirresistentes, mesmo não sendo portadoras do gene *mecA*, e algumas produzem biofilme como um dos fatores de virulência.

Agradecimentos

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, da Universidade Federal do Piauí de Parnaíba, BIOTEC/UFPI/CMRV, pela colaboração científica de fundamental importância para com o trabalho.

Referências

- AARESTRUP, F. M.; DURAN, C. O.; BURCH, D. G. S. Antimicrobial resistance in swine production. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 135-148, 2008.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in collection os Staphylococcal strain from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 06, p. 2151-2156, 2001.
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S. et al. Detection of Slime production by means of an optimized Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, v. 23, p. 4233-4239, 2002.
- ARRIOLA, C. S.; GÜERE, M. E.; LARSEN, J. et al. Presence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs in Peru. **Plos One**, v. 6, n. 12, 2011.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 09 de outubro de 2008. N. 196. Seção 1, p.1-2.
- CHAIEB, K.; CHEHAB, O.; ZMANTAR, T. et al. In vitro effect of pH and ethanol on biofilm formation by clinical *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. **Annals of Microbiology**. V. 7, p. 431-437, 2007.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition**. NCCLS document M31-A2 (ISBN 1- 56238-461-9). NCCLS, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition**. CLSI document M02-A11 (ISBN 1-56238-781-2 [Print]; ISBN 1-56238-782-0 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, , Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2012.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Testing; Twenty-Sixth Informational Supplement**. CLSI document M100-S26 (ISBN 1-56238-785-5 [Print]; ISBN 1-53238-786-3 [Electronic]). Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087, USA 2016.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. V. 284, p. 1318-1322, 1999.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F. et al. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infect. Immun.** V. 67, p. 5427–5433, 1999.

CROMBÉ, F.; WILLEMS, G.; DISPAS, M. et al. Prevalence and Antimicrobial susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* among pigs in Belgium. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 2, p. 126-131, 2012.

CUI, S.; LI, J.; HU, C. et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 680-683, 2009.

ESPINOSA-GONGORA, C.; DAHL, J. ELVSTRØM, A.; et al. Individual predisposition to *Staphylococcus aureus* colonization in pigs on the basis of quantification, carriage dynamics, and serological profiles. **Applies and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 1251-1256, 2015.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Staphylococcus*. **Internacional Journal Systematic Bacterial**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em: 23/03/2017.

FALL, C.; SECK, A.; RICHARD, V. et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in pigs and farmers in the Largest farm in Dakar, Senegal. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 10, p. 962-965, 2012.

FIEBELKORN, K. R. et al. Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci*. **Journal. Clinical of. Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4740-4744, 2003

FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 3, p. 265-278, 2014.

FRANA, T. S.; BEAHM, A. R.; HANSON, B. M. et al. Isolation and Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pork farms and visiting veterinary students. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal od CLinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C. et al. Detection, Molecular Characterization, and Clonal diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1269-1277, 2010.

- HIRAMATSU, K.; ITO, T.; TSUBAKISHITA, S. et al. Genomic basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Infection & Chemotherapy**, Seoul, v. 45, n. 2, p. 117-136, 2013.
- KHANNA, T.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C. et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary Microbiology**, 2007. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.10.006.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 01, p. 165-170, 1983.
- KUMMER, R.; GONÇALVEZ, M. A. D.; LIPPKE, R. T. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de crêche. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p.195-209, 2009.
- LEWIS, H. C.; MØLBAK, K.; REESE, C. e al. Pigs as source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 9, p. 1383-1389, 2008.
- LICITRA, G. Etymologia: *Staphylococcus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p. 1553, 2013.
- LINHARES, L. L.; YANG, M.; SREEVATSAN, S. et al. The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in Pig. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 1, p. 55-60, 2015.
- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 3, p.268-81, 2012.
- MARIANA, N. S.; SALMAN, S. A.; NEELA, V. et al. Evaluation od modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 6, p. 330-338, 2009.
- MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G. S.; CARVALHO, L. F. O. S. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, Paraná, v. 17, n. 01, p. 1-14, 2012.
- MORCILO, A.; CASTRO, B.; RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ, C. Descriptive analysis of Antibiotic-Resistant patterns of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) st398 isolated from healthy swine. **International Journal of Enviironmental Research and Public Health**, v. 12, p. 611-622, 2015.
- MURRAY, P.R. et al. **Microbiologia médica**. 4 ed. Washington D.C: American Society For Microbiology. 2004, 188p.
- NEELING, A. J.; BROEK, M. J. M.; SPALBURG, E. C.; et al. High prevalence of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 122, p. 366-372, 2007.
- PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, v. 3, p. 1-12, 2012.

PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, Rennes, v. 21, p. 602-615, 2014.

RACHID, S.; OHLSEN, K.; WALLNER, U. et al. Alternative transcription factor sigma (B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. **J. Bacteriol.** V. 182, p. 6824-6826, 2000.

RINCÓN, S.; PANESSO, D.; DÍAZ, L. et al. Resistencia a antibióticos de última línea em cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. **Biomédica**, Bogotá, v. 34, n. 1, p. 191-209, 2014.

ROBERSON, J. R. et al. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v. 30, n. 12, p. 3217-3219, dez. 1992.

ROHDE, H.; KNOBLOCH, J. K. M.; HORSTKOTTE, M. A. et al. Correlation os *Staphylococcus aureus* icaADBC genotype and biofilm expression. **Phenotype. Journal of Clinical Microbiology**, v. 39. n. 12, p. 4595-4596, 2001.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 06, p.413-423, dez. 2007.

SHRESTHA, B.; RANNA, S. S. D test: A simple test with big implication for *Staphylococcus aureus* Macrolide-Lincosamide-StreptograminB Resistance Pattern. **Nepal Med Coll Journal**, v. 16, n. 1, p. 88-94, 2014.

SMITH, T. C.; GEBREYES, W. A.; ABLEY, M. J. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. **Plos One**, United Kingdom, v. 8, n. 05, may. 2013.

SOARES, M. J. S.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N. H.; NOLETO, A. L. S. et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III)::B:A) among isolates from food handlers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, p. 214-221, 1997.

SOUZA, M. M. S.; COELHO, S. M. O.; PEREIRA, I. A. et al. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* Species of Animal Origin. In: PANA, M. (Ed.). **Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium**. Rijeka: INTECH, 2012. P. 273-303.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891-999, 2007.

TAKEUTI, K. L.; MALGARIN, C. M.; AMARAL, A. F. et al. Frequency of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in fattening pigs the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Acta Scientae Veterinariae**, n. 44, p. 1-4, p. 2016.

van DUIJKEREN, E. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n.5, p.383-389, 2008.

WINN, W. C.; ALLEN, S.; JANDA, W. et.al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760 p.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B. L. et al. New quadriplex PCR assay for detection of Methicillin and Mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4947-4955, 2004.

ZMANTAR, T.; CHAIEB, K.; MAKNI, H. et al. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**. V. 48, p. 308-314, 2008.

4. CAPÍTULO III (SHORT COMMUNICATION):

Artigo em processo de submissão para o periódico: Journal of Veterinary Science

***Staphylococcus aureus* sensível e *Staphylococcus sciuri* resistente a meticilina: Diferentes espécies isoladas de uma única colônia**

Márcio Leonardo de Moraes Nobre¹; Leidiane Sousa Santos¹; Felipe Araújo de Alcântara Oliveira¹; Alyne, Rodrigues de Araújo², Maria Cícera da Silva Carvalho³; Agnes Marie Sá Figueiredo³, Maria José dos Santos Soares¹, Maria Christina Sanches Muratori⁴

¹ Laboratório de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Socopo, Teresina, Piauí, Brasil

² Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Bairro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí, Brasil

³ Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

⁴ Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Socopo, Teresina, Piauí, Brasil

Uma estirpe de *Staphylococcus aureus* sensível a Meticilina foi co-isolada com uma linhagem de *Staphylococcus sciuri* resistente a este antimicrobiano a partir de uma única colônia. Para o nosso conhecimento este é o primeiro relato, a partir de estudos de colonização em suínos, que descreve tal fenômeno. Tal isolamento é preocupante, pois dificulta a correta identificação de estirpes *S. aureus*, bem como demonstra a possibilidade de erros quanto o real perfil de resistência antibiótica desta espécie, contribuindo, ainda, para o fracasso da terapêutica antimicrobiana com beta-lactâmicos, ocasionado pelos *S. sciuri* resistente a estes fármacos.

Palavras-chave: *mecA*, MSSA, MRNAS, colonização, suínos

O gene *mecA* confere resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos semi sintéticos, representados pela meticilina, oxacilina, cloxacilina, nafcilina, sendo considerado como o mais importante mecanismo de resistência já adquirido pelo gênero *Staphylococcus*.

Esse gene está contido dentro de um elemento genético móvel denominado elemento *mec* ou cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*; do inglês *staphylococcal cassette chromosome mec*) [7].

O SSC*mec* pode ser encontrado não só na espécie *Staphylococcus aureus*, a mais importante e prevalente em diversas infecções humanas e animais, mas também nas diversas espécies que formam os *Staphylococcus* coagulase negativos (ou *Staphylococcus* não *aureus*). Estas que por muito tempo foram considerados apenas “contaminantes” isolados de processos infecciosos passaram a ocupar um papel de extrema importância na epidemiologia das infecções em que estão envolvidos, atualmente [12, 14].

Cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) e *Staphylococcus* resistentes a meticilina não *aureus* (Methicillin-resistant non *aureus Staphylococci*; MRNAS) tem sido descritas colonizando ou infectando humanos em hospitais (HA-MRSA; HA - MRNAS) e na comunidade (CA-MRSA; CA-MRNAS) [9,13]. Entretanto, a ocorrência destes micro-organismos em animais de produção e/ou companhia, bem como nos indivíduos que se correlacionam a estes, representados por proprietários, veterinários, tratadores, manipuladores de alimentos, ocasionando nestes uma colonização ou infecção (Livestock associated Methicillin – resistant *S. aureus*; LA-MRSA), acendeu a importância destes micro-organismos para a saúde pública mundial [5].

Os LA-MRSA impulsionaram a realização de diversas pesquisas objetivando compreender a dinâmica da transmissibilidade, bem como de estudos sobre a epidemiologia desses micro-organismos nos rebanhos animais e nos humanos. Dentre os animais de produção especial destaque tem sido direcionado aos suínos, sendo este considerado como o mais importante habitat para a evolução das estirpes de *Staphylococcus* sp; seja para a aquisição do gene *mecA*, ou de determinantes de virulência [10]. Dentre as estirpes LA-MRSA, o clone ST398, que emergiu em suínos, tem recebido grande atenção dos pesquisadores devido a sua ampla disseminação e envolvimento em graves infecções em humanos [12].

Neste relato, ao pesquisar a presença de estirpes MRSA, a partir de amostras de swab nasal de 82 suínos, em fase de creche, criados em três granjas localizadas nos municípios de Teresina, Altos (Piauí State) e Timon (Maranhão State), a partir de uma única colônia, obtida do animal 48, uma estirpe de *Staphylococcus aureus* sensível a Meticilina (methicillin-

sensitive *S. aureus*; MSSA) foi co-isolada com uma linhagem de *Staphylococcus sciuri* resistente a este antimicrobiano (Methicillin – resistant non *aureus* *Staphylococci*).

O isolado primário foi identificado fenotipicamente como *S. aureus*, analisando as características apresentadas nos testes bioquímicos e fisiológicos: cocos Gram positivos, produtor da enzima catalase, resistente à bacitracina (0,04 U), sensível à furazolidona (100 µg), fermentador de manitol, presença de *clumping factor*, produtor da enzima coagulase, em plasma de coelho, produtor de acetoína, resistência à Polimixina B (300 µg) e a 7 µg/de acriflavina e não produtor da enzima β-galactosidase.

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi estabelecido pela técnica de difusão droga em meio sólido, a partir de disco, de acordo com as normas estabelecidas *pelo Clinical Laboratory Standards Institute* e a interpretação dos halos de inibição aferidos foram analisados como preconizado pelos documentos M31-A2 [2] e M100-S26 [3]. A estirpe apresentou resistência à Penicilina G (10 U) e sensibilidade à Oxacilina (1 µg) e Cefoxitina (teste de *screening*, 30 µg), caracterizando-a como MSSA.

Contudo, ao realizar o semeio desta estirpe em Ágar Meticilina (Ágar Mueller-Hinton suplementado com 25 µg/mL desse antibiótico; AMet 25) para triagem de MRSA [11], foi observado o crescimento heterogêneo de colônias com variações macroscópicas por todo o meio de cultura.

Para confirmação do resultado, visto que não era esperado o crescimento de colônias no AMet, uma vez que a amostra apresentou prévia sensibilidade aos antimicrobianos oxacilina e cefoxitina, no teste em disco, quatro diferentes morfotipos coloniais foram reisolados e avaliados fenotipicamente quanto a identificação de gênero e espécie, incluindo perfil de resistência aos antimicrobianos e novo crescimento em AMet. Dessa avaliação, os quatro morfotipos foram identificados como estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativos (não *aureus*) resistentes a Meticilina, com crescimento homogêneo no AMet.

Com o intuito de explicar o fenômeno, foi realizada uma série de sementeiras da amostra inicial em ágar Padrão para Contagem (PCA), sempre realizando a avaliação morfotintorial de Gram, a prova de catalase, da enzima coagulase livre, em plasma de coelho, e o crescimento no AMet, com o objetivo de buscar purificar e isolar a linhagem de *S aureus*. Por meio destes procedimentos foram produzidos seis amostras (*Staphylococcus aureus*, isolado inicial, e as quatro colônias reisoladas do AMet) e estas foram submetidas a técnicas

mais específicas de identificação e perfil de susceptibilidade antimicrobiana, tais como: colorimetria e turbidimetria pelo Vitek[®] 2 Compact (Biomérieux); reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação gênica em gel de agarose dos genes: rRNA, específico do gênero *Staphylococcus*, *nuc*, específico para a espécie *S. aureus*, *mecA*, para resistência aos betalactâmicos semi-sintéticos e os genes *icaA/icaD*, envolvidos na formação de biofilme nos *Staphylococcus* sp; e a identificação por espectrometria de massa automatizada por tecnologia MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) [1, 15]. Os resultados das análises estão descritos na Tabela 01.

O isolamento a partir de uma única colônia de micro-organismos com diferentes perfis de resistência antibiótica foi relatado por outras pesquisas [4, 11], a partir de amostras nasais de colonização em humanos. Contudo, nesses estudos, foram identificadas duas linhagens de *S. aureus*, uma sensível e outra resistente a meticilina. Relato de coassociação entre micro-organismos também foi observado no isolamento de *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus* sp, obtido de uma amostra de urina [6]. Em ambos os estudos, semelhantes aos resultados desse estudo, a correta identificação dos micro-organismos e do perfil de resistência antibiótica necessitou de outras técnicas moleculares para auxiliar na compreensão do fenômeno, que prejudica e dificulta a identificação fenotípica, ainda hoje, bastante utilizada por muitos laboratórios no Brasil e no mundo.

S. sciuri era comumente considerado o micro-organismo comensal não patogênico mais isolado a partir da pele e mucosas de animais de sangue quente. Entretanto, sua importância se exacerbou, pois agora também é reconhecido como um potencial patógeno, devido seu envolvimento em diversas enfermidades animais tais como: mastites, dermatites e epidermites, bem como em endocardites, infecções de feridas, peritonites, choque séptico e infecção urinária em humanos [8]. Somam-se a estes fatos diversas evidências de que esta espécie desempenha importante papel como reservatório e disseminação de mecanismos de resistência antibiótica, com especial destaque para o *SSCmec*, para as espécies de *Staphylococcus* incluindo *S. aureus* contribuindo, assim, por tornar as estirpes MSSA em MRSA [8, 12, 14].

Tabela 01: Testes confirmatórios de gênero, espécie e fatores de virulência de estirpes purificadas de colônia única e estirpes isoladas de Ágar Meticilina, Teresina, 2017

Estirpes	PCR				Vitek 2 Compact		MALDI-TOFF	Cassete
	rRNA	nuc	mecA	icaA/icaD	ID	CFO/OXA	ID	
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+ / +	<i>S. aureus</i>	S / S	<i>S. aureus</i> ¹	Ausente
MRNAS	+	-	+	+ / +	<i>S. sciuri</i> ²	S / R ²	<i>S. sciuri</i> ³	SSCmec V
Colônia 01	+	-	+	+ / +	<i>S. sciuri</i>	R / R	<i>S. sciuri</i> ⁴	SSCmec V
Colônia 02	+	-	+	+ / +	<i>S. sciuri</i>	R / R	<i>S. sciuri</i> ⁴	SSCmec V
Colônia 03	+	-	+	+ / +	<i>S. sciuri</i>	R / R	<i>S. sciuri</i> ⁴	SSCmec V
Colônia 04	+	-	+	+ / +	<i>S. sciuri</i>	R / R	<i>S. sciuri</i> ⁴	SSCmec V

Legenda: PCR: Reação da Polimerase em Cadeia; ID: Identificação; CFO: *screening* para Cefoxitina; OXA: Oxacilina; +: Positivo;

-: Negativo; R: Resistente; ¹ Identificação altamente provável a nível de espécie; ² Alerta aplicado para Identificação e Antibiograma;

³ Identificação segura a nível de gênero e provável a nível de espécie com alerta; ⁴ Identificação segura a nível de gênero e provável a nível de espécie.

A coexistência entre *S. aureus* e *S. sciuri*, neste estudo, pode ter sido devido a produção de biofilme pela estirpe de *S. sciuri* e que foi avaliada pela técnica de microplaca (dados não mostrados) e evidenciada pela presença dos genes *icaAD* nas estirpes desta espécie (Tabela 1). Esta propriedade pode estar relacionada à coassociação observada, podendo, ainda, contribuir para possível transmissão do *SSCmec* presente neste micro-organismo e que foi identificado como pertencente ao tipo V.

Na rotina laboratorial, não é conhecida a frequência em que essa coexistência entre *S. aureus* e *S. sciuri* ocorre em suínos em pesquisas de colonização nasal ou infecção, sendo este, para nós, até o momento, o primeiro relato para esta associação.

Tal isolamento é preocupante, pois dificulta a correta identificação de estirpes *S. aureus*, bem como demonstra a possibilidade de erros quanto o real perfil de resistência antibiótica desta espécie, contribuindo, ainda, para o possível fracasso da terapêutica antimicrobiana com beta-lactâmicos, ocasionado pelos *S. sciuri* resistente a estes fármacos.

O teste de triagem utilizando o Amet 25 foi o que possibilitou evidenciar esta associação, caracterizando inequivocamente o perfil de resistência/susceptibilidade entre os micro-organismos identificados. Este teste também foi que evidenciou o mesmo fenômeno nos estudos aqui descritos anteriormente [4, 11]. Esse método se constitui em uma poderosa prova para confirmação da sensibilidade ou resistência a este fármaco, seja de estirpes de *Staphylococcus* obtidas de colonização ou infecção e cuja especificidade e sensibilidade deste teste se aproxima a 100% em relação as técnicas moleculares que utilizam sondas de DNA [4, 11]. Este, ainda, pode facilitar a identificação de culturas mistas de *Staphylococcus* constituídas por estirpes que possuam perfil de susceptibilidade diferente à meticilina.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Análises Clínicas Bioanálise, em Teresina – PI, ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, em Parnaíba – PI, e ao Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em Rio de Janeiro – RJ, pela parceria realizada e colaboração na realização do trabalho.

Referências

1. **Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L.** Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infection. *J Clin Microbiol* 2001, **39**, 2151-2156.

2. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Document M31-A2. NCCLS, Wayne, 2002.
3. **Clinical Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Testing. Twenty-Six Informational Supplement Document M100-S26. CLSI, Wayne, 2015.
4. **Falcão MHL, Texeira LA, Ferreira-Carvalho BT, Borges-Neto AA, Figueiredo AMS.** Occurrence of methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* within a single colony contributing to MRSA mis-identification. J Med Microbiol 1999, **48**, 515-521.
5. **Fitzgerald JR.** Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. Trends in Microbiology 2012, **20**, 192-198.
6. **Fraenkel CJ, Melhus A.** *Enterococcus faecium* coisolated with *Lactobacillus* species can mimic vancomycin-resistant enterococci. Infection Ecology & Epidemiology 2011, **1**, 1-2.
7. **Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T.** Genomic basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Infect Chemother 2013, **45**, 117-136.
8. **Nemeghaire S, Argudín MA, Febler AT, Hauschild T, Schwarz S, Butaye P.** The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes. Vet Microbiol 2014, **171**, 342-356.
9. **Oliveira CF, Cavanagh JP, Fredheim EGA, Reiter KC, Rieger A, Klingenberg C, d’Azevedo PA, Sollid JE.** Coagulase-negative staphylococci in Southern Brazil: looking toward its high diversity. Rev Soc Bras Trop 2016, **49**, 292-299.
10. **Smith TC, Gebreyes WA, Abley MJ, Harper AL, Forshey BM, Male MJ, Martin HW, Molla BZ, Sreevatsan S, Thakur S, Thiruvengadam M, Davies PR.** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. P One 2013, **8**. Epub ahead of print. doi: 10.1371/journal.pone.0063704.
11. **Soares MJS, Tokumaru-Miyazaki NH, Noletto ALS, Figueiredo AMS.** Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from foos handlers. J Med Microbiol 1997, **46**, 214-221.
12. **Tulinski P, Fluit AC, Wagenaar JÁ, Mevius D, van de Vijver L, Duim B.** Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci on pig farms as a reservoir of heterogeneous Staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. Appl Environ Microbiol 2012, **78**, 299-304.
13. **Uhlemann AC, Otto M, Lowy FD, DeLeo FR.** Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infection, Genetics and Evolution 2014, **21**, 563-574.
14. **Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, Crombé F, Dispas M, Denis O, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P.** Species and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) diversity among methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci isolated from pigs. Vet Microbiol 2012, **158**, 123-128.
15. **Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM.** New quadriplex PCR assay for detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative Staphylococci. J Clin Microbiol 2004, **42**, 4947-4955.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Staphylococcus aureus mostraram-se importantes micro-organismos presentes na microbiota de suínos em fase de creche, isolados tanto de fossas nasais quanto de região anal. Apesar de não ter sido detectado estirpes MRSA, linhagens de multirresistência foram isoladas, motivo este de preocupação, devido à possibilidade de disseminação no rebanho e veiculação destas cepas ao homem, por meio do manuseio da carne ou contato direto com o animal.

O co-isolamento de MSSA e MRNAS em uma mesma colônia é preocupante, pois dificulta a correta identificação de estirpes *S. aureus*, bem como demonstra a possibilidade de erros quanto o real perfil de resistência antibiótica desta espécie, contribuindo, ainda, para o fracasso da terapêutica antimicrobiana com beta-lactâmicos, ocasionado pelos *S. sciuri* resistente a estes fármacos.

Considerando-se que não há relatos que abordem a ocorrência de *S. aureus* e do perfil de sensibilidade antibiótica, para cepas deste micro-organismo, isoladas de suínos criados no Piauí, os resultados encontrados, nesta pesquisa, tornam-se relevantes por revelar a presença de cepas multirresistentes deste micro-organismo, colonizando os animais estudados, demonstrando a necessidade para a condução de ações direcionadas ao uso mais racional dos antimicrobianos, objetivando assim a proteção aos animais e a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivos para preocupação? **Semina: Ciência Agrária**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; MARQUES, B. M. F. P. P.; MORES, T. J. et al. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p. 151-155, 2009.
- DIAS, M., MONTEIRO, M. S. MENEZES, M. F. Antibióticos e Resistência Bacteriana, velhas questões novos desafios. **Clínica, Investigação e Inovação**, p.1-12, 2010.
- EVANGELISTA, S. S.; OLIVEIRA, A. C. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 68, n. 1, p. 136-143, 2015.
- FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 3, p. 265-278, 2014.
- GERVÁSIO, E. W. **Suinocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. Curitiba, 2013. 16 p. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf>. Acesso em: 07/09/2015.
- MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 3, p.268-81, 2012.
- MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 4, p. 718–733, 2011.
- MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G. S.; CARVALHO, L. F. O. S. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, Paraná, v. 17, n. 01, p. 1-14, 2012.
- MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS, L. B. A. et al. Uso Racional de Antimicrobianos. **Medicina**, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.
- MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; PORTO, W. J. N. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, Rennes, v. 21, p. 602-615, 2014.

SANTOS, W. R. M.; INFORZATO, G. R.; ALVES, R. M. et al. Antibioticoterapia em suínos – matrizes e engorda. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VII, N. 12, 2009.

SCHLEIFER, K. H.; BELL; J. A. Family VIII. *Staphylococcaceae*. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 03, p. 393-420, 2009.

WINN, W. C.; ALLEN, S.; JANDA, W. et.al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760 p.

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

01 - ARCHIVES OF VETERINARY SCIENCE

INSTRUÇÃO AOS AUTORES

O periódico **ARCHIVES OF VETERINARY SCIENCE** (AVS) é publicado trimestralmente, sob orientação do seu Corpo Editorial, com a finalidade de divulgar artigos completos e de revisão relacionados à ciência animal sobre os temas: clínica, cirurgia e patologia veterinária; sanidade animal e medicina veterinária preventiva; nutrição e alimentação animal; sistemas de produção animal e meio ambiente; reprodução e melhoramento genético animal; tecnologia de alimentos; economia e sociologia rural e métodos de investigação científica. A publicação dos artigos científicos dependerá da observância das normas editoriais e dos pareceres dos consultores “ad hoc”. Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e os conceitos e/ou patentes emitidos nos artigos, são de inteira responsabilidade dos autores, eximindo-se o periódico de quaisquer danos autorais. A submissão de artigos deve ser feita diretamente na página da revista (www.ser.ufpr.br/veterinary). Mais informações são fornecidas na seção “Informações sobre a revista”.

APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

Para agilizar a tramitação e publicação de seu artigo, recomendamos fortemente que as normas sejam obedecidas, inclusive para as referências

1. Digitação: O artigo com no máximo vinte e cinco páginas deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297 mm, com margens laterais direita, esquerda, superior e inferior de 2,5 cm. As páginas deverão ser numeradas de forma progressiva no canto superior direito. Deverá ser utilizado fonte arial 12 em espaço duplo; em uma coluna. Tabelas e Figuras com legendas serão inseridas diretamente no texto e não em folhas separadas.

2. Identificação dos autores e instituições (máximo 6 autores por artigo): Todos os dados referentes a autores devem ser inseridos exclusivamente nos metadados no momento da submissão online. Não deve haver nenhuma identificação dos autores no corpo do artigo enviado para a revista. Os autores devem inclusive remover

a identificação de autoria do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista.

3. Tabelas: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte superior da tabela em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título. (Ex.: Tabela 1 – Título.). As abreviações devem ser descritas em notas no rodapé da tabela. Estas serão referenciadas por números sobrescritos (1,2,3). Quando couber, os cabeçalhos das colunas deverão possuir as unidades de medida. Tanto o título quanto as notas de rodapé devem fazer parte da tabela, inseridos em "linhas de tabela".

4. Figuras: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte inferior da figura em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título (Ex.: Figura 1 – Título). As designações das variáveis X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses. São admitidas apenas figuras em preto-e-branco. **Figuras coloridas terão as despesas de clicheria e impressão a cores pagas pelo autor.** Nesse caso deverá ser solicitada ao Editor (via ofício) a impressão a cores.

NORMAS EDITORIAIS

Artigo completo - Deverá ser inédito, escrito em idioma português (nomenclatura oficial) ou em inglês. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Nota informando aprovação por Comitê de Ética (quando houver); Referências.

Artigo de Revisão - Os artigos de revisão deverão ser digitados seguindo a mesma norma do artigo científico e conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Referências. **A publicação de artigos de revisão fica condicionada à relevância do tema, mérito científico dos autores e disponibilidade da Revista para publicação de artigos de Revisão.**

ESTRUTURA DO ARTIGO

TÍTULO - em português, centralizado na página, e com letras maiúsculas. Logo abaixo, título em inglês, entre parêntesis e centralizado na página, com letras minúsculas e itálicas. Não deve ser precedido do termo título.

RESUMO - no máximo 1800 caracteres incluindo os espaços, em língua portuguesa. As informações devem ser precisas e sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço duplo. Deve ser precedido do termo “Resumo” em caixa alta e negrito.

PALAVRAS-CHAVE – inseridas abaixo do resumo. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título, e alinhado a esquerda. Não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Palavras-chave” em caixa baixa e negrito.

ABSTRACT -deve ser redigido em inglês, refletindo fielmente o resumo e com no máximo 1800 caracteres. O texto deve ser justificado e digitado em espaço **duplo**, em parágrafo único. Deve ser precedido do termo “Abstract” em caixa alta e negrito.

KEY WORDS - inseridas abaixo do abstract. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título em inglês, e alinhado a esquerda. Não precisam ser traduções exatas das palavras-chave e não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Key words” em caixa baixa e negrito.

INTRODUÇÃO – abrange também uma breve revisão de literatura e, ao final, os objetivos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Introdução” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

MATERIAL E MÉTODOS - o autor deverá ser preciso na descrição de novas metodologias e adaptações realizadas nas metodologias já consagradas na experimentação animal. Fornecer referência específica original para todos os procedimentos utilizados. Não usar nomes comerciais de produtos. O texto deverá

iniciar sob a primeira letra do termo “Material e Métodos” (escrito em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

RESULTADOS (O item Resultados e o item Discussão podem ser apresentados juntos, na forma RESULTADOS e DISCUSSÃO, ou em itens separados)

o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Resultados” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Símbolos e unidades devem ser listados conforme os exemplos: Usar **36%**, e não 36 % (não usar espaço entre o no e %); Usar **88 kg**, e não 88Kg (com espaço entre o no e kg, que deve vir em minúsculo); Usar **42 mL**, e não 42 ml (litro deve vir em L **maiúsculo**, conforme padronização internacional); Usar **25oC**, e não 25 oC (sem espaço entre o no e oC); Usar (**P<0,05**) e não (p < 0,05); Usar **r² = 0,89** e não r²=0,89; Nas tabelas inserir o valor da probabilidade como “valor de P”; Nas tabelas e texto utilizar média ± desvio padrão (15,0 ± 0,5). Devem ser evitadas abreviações não-consagradas, como por exemplo: “o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6”. Este tipo de redação é muito cômodo para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor. Escreva os resultados e apresente suporte com dados. Não seja redundante incluindo os mesmos dados ou resultados em tabelas ou figuras.

DISCUSSÃO - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Discussão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Apresente a sua interpretação dos seus dados. Mostre a relação entre fatos ou generalizações reveladas pelos seus resultados. Aponte exceções ou aspectos ainda não resolvidos. Mostre como os seus resultados ou interpretações concordam com trabalhos previamente publicados ou discordam deles, mas apresente apenas trabalhos originais, evitando citações de terceiros. Discuta os aspectos teóricos e/ou práticos do seu trabalho. Pequenas especulações podem ser interessantes, porém devem manter relação factual com os seus resultados. Afirmações tais como: "Atualmente nós estamos tentando resolver este problema..." não são aceitas. Referências a "dados não publicados" não são aceitas. Conclua sua discussão com uma curta afirmação sobre a significância dos seus resultados.

CONCLUSÕES - preferencialmente redigir a conclusão em parágrafo único, baseada nos objetivos. Devem se apresentar de forma clara e sem abreviações. O texto deverá

iniciar sob a primeira letra da palavra “Conclusão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

AGRADECIMENTOS - os agradecimentos pelo apoio à pesquisa serão incluídos nesta seção. Seja breve nos seus agradecimentos. Não deve haver agradecimento a autores do trabalho. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Agradecimento” (escrita em caixa baixa).

NOTAS INFORMATIVAS - quando for o caso, antes das referências, deverá ser incluído parágrafo com informações e número de protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética e ou Biossegurança. (quando a Comissão de Ética pertencer à própria instituição onde a pesquisa foi realizada, deverá constar apenas o número do protocolo).

REFERÊNCIAS - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Referências” (escrita em caixa alta e negrito). Omitir a palavra bibliográficas. Alinhada somente à esquerda. Usar como base as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 10520 (NB 896) - 08/2002). Devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es). Os destaques deverão ser em NEGRITO e os nomes científicos, em ITÁLICO. NÃO ABREVIAR O TÍTULO DOS PERIÓDICOS. Indica-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes. Mencionam-se os autores separados por ponto e vírgula. Digitá-las em espaço simples e formatá-las segundo as seguintes instruções: no menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... ESPAÇAMENTO...ANTES...6 pts.**Exemplo de como referenciar:**

ARTIGOS DE PERIÓDICOS:

(citar os 3 primeiros autores seguido de "et al.")

JOCHLE, W.; LAMOND, D.R.; ANDERSEN, A.C. et al. Mestranol as an abortifacient in the bitch. **Theriogenology**, v.4, n.1, p.1-9, 1975.

Livros e capítulos de livro. Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação. Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.]. Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.l.: s.n.].

REFERÊNCIA DE LIVROS (*in totum*):

BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Small animal practice**. Philadelphia : W.B. Saunders, 1997. 1467 p.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo com autoria)

SMITH, M. Anestrus, pseudopregnancy and cystic follicles. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1986, Cap.x, p.585-586.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo sem autoria)

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4., p.72-90.

OBRAS DE RESPONSABILIDADE DE UMA ENTIDADE COLETIVA: A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente. Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.

REFERÊNCIA DE TESE/DISSERTAÇÃO/MONOGRRAFIA:

BACILA, M. **Contribuição ao estudo do metabolismo glicídico em eritrócitos de animais domésticos**. 1989. Curitiba, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

REFERÊNCIA DE PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS:

KOZICKI, L.E.; SHIBATA, F.K. Perfil de progesterona em vacas leiteiras no período do puerpério, determinado pelo radioimunoensaio (RIA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXIV., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996, p. 106-107.

RESTLE, J.; SOUZA, E.V.T.; NUCCI, E.P.D. et al. Performance of cattle and buffalo fed with different sources of roughage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. p.301-303.

REFERÊNCIA DE ARTIGOS DE PERIÓDICOS ELETRÔNICOS: Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão “Disponível em: xx/xx/xxxx” e a data de acesso do documento, precedida da expressão “Acesso em: xx/xx/xxxx.”

PRADA, F.; MENDONÇA Jr., C. X.; CARCIOFI, A. C. [1998]. Concentração de cobre e molibdênio em algumas plantas forrageiras do Estado do Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.6, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/> Acesso em: 05/09/2000.

MÜELLER, Suzana Pinheiro Machado. A comunicação científica e o movimento de acesso livre ao conhecimento. *Ciência da Informação*, Brasília, v. 35, n. 2, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-19652006000200004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 13/05/2007.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. **Digestión de la soja integral em ruminantes**. Disponível em: http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf. Acesso em: 12/10/2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URPE, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônico...**Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21/01/1997.

CITAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS EM CD ROM:Na citação de material bibliográfico publicado em CD ROM, o autor deve proceder como o exemplo abaixo:

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Gmosis, 1999, 17par. CD-ROM. Forragicultura. Avaliação com animais. FOR-020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Bases de dados em Ciência e Tecnologia.** Brasília, n. 1, 1996. CD-ROM.

E.mail Autor, < e-mail do autor. “Assunto”, Data de postagem, e-mail pessoal, (data da leitura)

Web Site Autor [se conhecido], “Título”(título principal, se aplicável), última data da revisão [se conhecida], < URL (data que foi acessado)

FTPAutor [se conhecido] “Título do documento”(Data da publicação) [se disponível], Endereço FTP (data que foi acessado)

CITAÇÕES NO TEXTO: As citações no texto deverão ser feitas em caixa baixa. Quando se tratar de dois autores, ambos devem ser citados, seguido apenas do ano da publicação; três ou mais autores, citar o sobrenome do primeiro autor seguido de et al. obedecendo aos exemplos abaixo:

Silva e Oliveira (1999)

Schmidt et al. (1999)

(Silva et al., 2000)

02 – PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA (PAB)

Diretrizes para Autores

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

“Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado “.....” e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer:

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#).

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.

- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo **Conclusões** deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra **Agradecimentos** deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.

- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.

- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Redação das citações dentro de parênteses
- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.

- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo

ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

- Devem ser auto-explicativas.

- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.

- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.
- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:
- Resumo com 100 palavras, no máximo.
- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: sct.pab@embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB
Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito deve ser inédito e não pode ter sido submetido, simultaneamente, a outro periódico, e seus dados (tabelas e figuras) não podem ter sido publicados parcial ou totalmente em outros meios de publicação técnicos ou científicos (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas, etc.).
2. O texto deve ser submetido no formato do Microsoft Word, em espaço duplo, escrito na fonte Times New Roman 12, tamanho de papel A4, com páginas e linhas numeradas; e o arquivo não deve ultrapassar o tamanho de 20 MB.
3. O artigo deve ter, no máximo, 20 páginas e tem que estar organizado na seguinte ordem: Título; nome completo dos autores, seguido de endereço institucional e eletrônico; Resumo; Termos para indexação; Title, Abstract; Index terms; Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Referências; tabelas e figuras.
4. Os padrões de texto e de referências bibliográficas devem ser apresentados de acordo com as orientações, para a apresentação de manuscritos, estabelecidas nas Diretrizes aos autores, as quais se encontram na página web da revista PAB.
5. Mensagens de concordância dos coautores com o conteúdo do manuscrito e sua submissão à revista devem ser compiladas pelo autor correspondente em um arquivo do Microsoft Word e carregadas no sistema como um documento suplementar, no quarto passo do processo de submissão.
6. Diante do grande número de trabalhos recebidos para publicação (média de 110 por mês), solicitamos sua concordância com os seguintes procedimentos adotados pela revista PAB:

Os trabalhos são analisados pela Comissão Editorial, antes de serem submetidos à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se os seguintes aspectos, entre outros: escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura; resultados com contribuição significativa; qualidade das tabelas e figuras; e, finalmente, originalidade e consistência das conclusões.

Após a aplicação desses critérios, caso o número de trabalhos aprovados ultrapasse a capacidade de publicação mensal, é aplicado o critério da **relevância relativa**. Segundo esse critério, os trabalhos com contribuição mais significativa para o avanço do conhecimento científico são aprovados. Esse critério é aplicado apenas aos trabalhos que atendam aos requisitos de qualidade, mas que, por excederem a capacidade de publicação mensal da revista, não podem ser todos aprovados. Por esse mesmo motivo, informamos que não aceitamos pedido de reconsideração.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

03 – Journal of Veterinary Science

■ Categories of Publications

The J Vet Sci publishes reviews, original articles, short communications and case reports.

Review

- Review and monographs dealing with all aspects of veterinary sciences will be accepted, but subject to the approval of the Editor-in-Chief. Authoritative and critical reviews of the current state of knowledge are preferred. There is no prescribed layout for reviews, but the tables, and manner of citations should conform to the guidelines (Form of Manuscripts) for articles. Unsolicited reviews will normally only be accepted under special circumstances.

Original articles

- Original articles cover full reports of research work that must be written following the guidelines (Form of Manuscripts) with the minimum length that requires for precise description and clear interpretation of theoretical or experimental work. It should not exceed eight (8) printed pages (double-spaced, typewritten 16 pages) including the figure(s), table(s) and references.

Short communications and case reports

- Short communications are intended to rapidly communicate novel ideas and results in new and developing areas of veterinary science, but which are insufficient to fill the requirements of a full-length article. Case reports deal with important issues to clinicians and biomedical researchers. They should not exceed the following maximums, four (4) printed pages (double-spaced, typewritten 8 pages) including the figure(s) and table(s); one-paragraph abstract, 100 words; number of references, 15; number of figure parts, 2; table, 1. Do not use section heading in the body of the short communication and case report; introduction, materials and methods, results and discussion should be in a single section. The references section is identical to that of articles. To be considered for publication in the J Vet Sci, a single case report must meet the following requirements.
 1. Must describe a significantly novel presentation (clear pathological diagnosis required)
 2. Must describe a clinical technique or treatment that would significantly change the course and prognosis of the described disease (in this case more than one case

recommended)

3. Must be the definite first clinical report or first case(s) of diseases in a particular location with epidemiologic factor.

4. Must explain the best practice pursued

Errata

- The Erratum section provides a means of correcting errors that occurred during the writing, typing, editing, or printing of a published article. Send Errata directly to the Editor-in-Chief. Please see a recent issue for correct formatting.

Retractions

- Retractions are reserved for major errors or breaches of ethics that, for example, may call into question the source of the data or the validity of the results and conclusions of an article. Send a Retraction and an accompanying explanatory letter signed by all of the authors directly to the Editor-in-Chief of the journal. The editor who handled the paper and the chairman of the Editorial Board will be consulted.

Instructions to Author

Manuscript Format

All materials must be written in proper and clear English. The manuscript, prepared according to "Uniform Requirements for Manuscripts" submitted to the J Vet Sci, is not returned to the corresponding author because of the incorrectness of the format.

The manuscript including tables and their footnotes, and figures legends, must be typed in double space on A4 size (21 × 28 cm) white paper, with a margin of at least 2.5 cm on each every side. Materials should be prepared with a letter quality printer using ragged right margin and standard 12 point font (Times New Roman style). Good quality photocopies are acceptable. The manuscript should be in the following sequence: abstract and keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, conflict of interest, references, tables, and figure legends. The copyright assignment form, cover letter, title page should be uploaded separate file. The abstract, references, each table and figure legend should start with a new page. All pages should be numbered consecutively starting from the title page. All tables and figures are to be numbered consecutively using Arabic numerals. Their approximate positions should be indicated in the appropriate margin of the typescript. The average

size of original articles is around eight (8) printed pages including table(s), figure(s) and references (double-spaced, typewritten 16 pages). A short communication and case reports are four (4) printed pages (double-spaced, typewritten 8 pages) including the figure(s) and table(s), and there is no size limitation for reviews.

Cover letter

- The corresponding author must give written assurance that neither the submitted materials nor portions therefore have been published previously or are under consideration for publication elsewhere. When more than one related manuscript has been published or is under consideration for publication by this or other journals, authors are required to declare this in their letter and to enclose copies of those publications for an editorial perusal. Failure to do so may lead to automatic rejection of the submitted manuscript. The corresponding author should certify that all listed authors participated meaningfully in the study and that they have seen and approved the final manuscript.

Title page

- This should be contain the title of an article, full names of author(s) and institutional affiliation(s). If several authors, and institutions are listed, they should be clearly indicated with which department and institution each author is affiliated. In separate paragraph, address for correspondence, including the name of corresponding author, address (institutional affiliation, city, zip-code and country), telephone and fax number, and e-mail address, should be given. Information concerning sources of financial support should be placed as an acknowledgment. A running title, less than ten words, should not be declarative or interrogative sentences.
- **1. Title** : Titles should be brief but informative. It is important for literature retrieval to include the key words in the title which are necessary to identify the nature of the subject matter, including the species of the animal on which the work is done. Use of expressions such as "Studies on" "Observation of" or "Effects of" should be avoided, since they are not sufficiently informative. Chemical formulas or abbreviations should not be used. Titles in the form of declarative or interrogative sentences are not encouraged. Also, do not use Roman or Arabic numerals to designate that the paper is one in a series.
- **2. Authors and Affiliation** : Authors are urged to include their full names (e.g. Michael Johns, David N. Fisher, Ana M. Fernandez Cabrera etc.). Confusion often arises in the

literature when authors are identified by surname and initials only. Authors' academic degrees should not be included. The full name of institutions and subsidiary departments should be given, together with a useful address including postal code. If several authors and institutions are listed on a paper, it should be clearly indicated with which department and institution each author is affiliated. The affiliation address in each case should be indicated by superscript.

- **3. Running title** : A brief running title should be provided, not to exceed ten words. If running title is declarative or interrogative sentences, it is not acceptable.

Abstracts

- Abstract should be concise less than 200 words for original article (100 words in case of short communication and case report) and describe in one paragraph, concisely purpose, methods, important results and describe conclusion of the study, but not repeat information already presented in the title. It should be suitable for direct inclusion in Index Medicus/Medline and CAB/ Index Veterinarius.

Keywords

- This is a list important terms relevant to the content of paper. Up to 5 keywords should be listed at the bottom of abstract to be used as index terms. For the selection of key words, please refer Medical Subject Heading (MeSH) in Index Medicus/Medline

Introduction

- This is a brief background. It is not necessary to include all of the background literature. Brief reference to the most pertinent generally is enough to inform readers with findings of others in the field. The specific questions to be addressed the study should also described. It should not contain either authors' result and conclusion.

Materials and Methods

- Experimentation of the experimental methods should be concise but sufficient for repetition by other qualified investigators. Procedures that have been published previously should not be described in detail, but merely cited with appropriate references. However, new or significant modifications of previously published procedures need full descriptions. The sources of special chemical(s), equipment(s) or preparation(s) should be given along with their company name and country. All chemicals and reagents should be used a generic name but not brand name. For animal experimentation reported in this Journal, it is expected that the "Guide for the care and use of laboratory animals" approved by the National Research Council(ILAR)

in USA will have been observed. We encourage that the ethical guidelines of animal welfare committee should be cited. Research on humans must be approved by IRB. Please refer the Declaration of Helsinki (www.wma.net).

Results

- This part should be included a concise textual description of the data presented in tables and figures. Repetition of the same data in different forms should be avoided. The results should not included materials appropriate to the discussion.

Discussion

- In this section, the data should be interpreted concisely without repeating material already presented in the results section. It should be considered the results in relation to any hypotheses advanced in the introduction. This may include an evaluation of the methodology and of the relationship of new information to the knowledge in that field.

Acknowledgments

- All person who have made a genuine contribution and who endorse the data and conclusions may be included. Authors are responsible for obtaining written permission to use any copyrighted text and/or illustration

Conflict of Interest

- Conflict of interest exists when an author (or the author's institution), reviewer, or editor has financial or personal relationship that inappropriately influence his/her actions (such relationships are also known as dual commitments, competing interests, or competing loyalties). All authors should disclose their conflict of interest, i.e., (1) financial relationships such as employment, consultancy, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, (2) personal relationship, (3) academic competition, and (4) intellectual passion. These conflicts of interests must be included in the end of manuscript.

References

- The references section must include all relevant published works, and all listed references must be cited in the text. Arrange the references in alphabetical order by the first author's surname, and number the entries consecutively. And the cited references in the text should be cited by their list number. Cite each listed reference in the text by number in square brackets. Journal name should be abbreviated in accordance with the style of Index Medicus/Medline (www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html). The number of references should be less than forty (40) for original article and fifteen (15) for short

communication and case report. Follow the styles shown in the example below: Endnote style

1. **Brock TD, Madigan MT.** Biology of Microorganism. 5th ed. pp. 42-59, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1988.
2. **Berghoff N, Suchodolski JS, Steiner JM.** Association between serum cobalamin and methylmalonic acid concentrations in dogs. *Vet J* 2012, **191**, 306-311.
3. **Palmer N, Jensen ML, Raine H.** Tumors of joint. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Burke E (eds.). *Pathology of Domestic Animals*. 2nd ed. pp. 140-144, Academic Press, San Diego, 1993.
4. **Rogers PL, Lee KJ, Skotnicki ML, Fiecher DE** (eds.). *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 23. pp. 15-25, Springer-Verlag, Berlin, 1999.
5. **Alberghina D, Amorini AM, Lazzarino G.** Modulation of peripheral markers of the serotonergic system in healthy horses. *Res Vet Sci* 2010. Epub ahead of print. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.06.023.

The following types of references are not valid for listing: unpublished data, personal communication, manuscripts in preparation or submitted, pamphlets, thesis for a degree, proceedings, abstracts, patents, newsletters, website, in press and material that has not been subjected to peer review. However, article(s) that can be available in Medline/PubMed and SCOPUS can be used as reference(s).

Tables and Figures

- Tables should be typewritten separately from the text, double spaced, and each table should include a title. Arrange the data so that columns of like material read down, not across. Figures should be included separately from the text, and ordinarily be original drawings. However, glossy photographs of line- drawing are usually satisfactory. In each original line-drawing, letters or numbers should be left blank because they will be typed in during printing. Letters or numbers should be included in the figures contained in a submitted manuscript along with caption for figures. Figures should be submitted in final size (printed 1 : 1). They may be printed in either single column (75 mm width) or double column (165 mm width) format. The size of text in figures should be 8~10 points, except for single letter markers which may be 12 points. Numbers, letters, and symbols used in multi-paneled figures must be consistent. Authors should place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all nonstandard abbreviations that are used in each table. For footnotes use the following symbols, in

sequence: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, †††....

Draw each curve with a different kind of line (solid, dashed, dotted) or with a different symbol for the plotted points dot, triangle and square in order of ○, ●, △, ▲, □, ■, ○....

All figures should be created with applications that are capable of preparing high resolution TIFF, JPEG or PPT files acceptable for publication. Diagrams and photographs submitted in electronic format must be of the following minimum resolutions:

*600 dpi for photographs or halftones with B/W, color or line art work as insets or lettering

*1200 dpi for line art work and artwork with greyscale

All kinds of figures may be reduced, enlarged or trimmed for publication by the Editor.

The figure numbers should be appeared directly at the lower left corner. And then symbols, arrows, or letters used in photographs could be possible to rearrange for journal format.

Nomenclatures, Unit, and Abbreviations

- Nomenclatures for chemicals and biochemicals, microorganism, and genes should follow the guidelines in the instructions to authors of journals published by American Society for Microbiology. SI units (System International Unites) should be used whenever possible. Abbreviations should be used for those recommended by IUPA-IUB Commission on Biochemical Nomenclature and Related Documents. In addition to abbreviation to SI unit, other common abbreviations may be used without definition. (the same abbreviations are used for plural forms): hour(s) = h, minute(s) = min, second(s) = sec, liter(s) = L, milliliter(s) = mL, meter(s) = m, centimeter(s) = cm, gram(s) = g, miligram(s) = mg, microliter(s)= μL, micrometer(s) = μm, micron(s) = μm, standard deviation = SD, standard error = SE, molar = M, mole = mol.

Alteration in proof

The J Vet Sci provides corresponding author with galley proofs for their correction.

Corrections should be kept to minimum. The Editor retains the prerogative to question minor stylistic alterations and major alteration that might affect the scientific content of the paper. Fault found after publication is a responsibility of the authors. We urge our contributors to proofread and their accepted manuscript very carefully. The corresponding author may be contacted by Editorial Office, depending on the nature of

correction in proof. If the proof is not returned to Editorial Office within 48 hours, it may be necessary to reschedule the paper for a subsequent issue. Extensive alteration in proof cause delays in publication.

Publication is usually in order of acceptance after review. For publication, authors should be charged the following fees.

Publication charge

The J Vet Sci will charge the publication cost to manuscript submitted from June 01, 2012.

Page charges

\$ 300 for 3 printed pages

Additional pages: \$ 50 per page

Color figure surcharges

\$ 100 per page

English proofreading charges

Actual expense on an article

Reprints charges with shipping if required at published time

\$ 50 for 50 copies, \$80 for 100 copies

Reprints are normally shipped four (4) weeks after publication of the J Vet

Sci. [Reprints Order Form](#)

Authorship policy

The J Vet Sci follows the recommendations for authorship by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, 2010, <http://www.icmje.org>) and the Good Publication Practice Guidelines by the Korean Association of Medical Journal Editors (KAMJE, 2008, <http://kamje.or.kr>). The Uniform Requirements by the ICMJE recommends authorship as follows. "Authorship credit should be based on 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2, and 3." Beyond the ICMJE recommendations, the KAMJE

guidelines suggest that all authors should make a substantial intellectual contribution to the publication, the guidelines warn against authorship abuse, and list common types of abuse.

Authorship is an important aspect of research publication, and all involved authors should agree whole contents of the document including authorship. Contributors should be differentiated from authors as recommended by the ICMJE. The J Vet Sci does not correct authorship after publication unless any mistake has been made by the editorial staff. Authorship may be changed before publication but after submission when an authorship correction is requested by all authors involved.

Research and publication ethics

For the policies on the research and publication ethics not stated in this instructions, 'Good Publication Practice Guidelines for Medical Journals (http://kamje.or.kr/publishing_ethics.html)', 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (www.icmje.org)' or 'Guidelines on good publication (www.publicationethics.org.uk)' can be applied.

Submission of manuscript

One original manuscript with one set of original figure(s) or table(s) should be submitted by online submission system. This submission should be completed by corresponding author.

If there is any query concerning manuscript submission, contact by e-mail or fax on the below.

Manuscript Checklist

