

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESPÉCIES DE
Staphylococcus **ISOLADOS DAS CIDADES DE MANAUS E PORTO VELHO**



MIRNA SAYURI FARIAS MIYAMOTO

MANAUS - AM

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

MIRNA SAYURI FARIAS MIYAMOTO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESPÉCIES DE
Staphylococcus **ISOLADOS DAS CIDADES DE MANAUS E PORTO VELHO**

Orientadora: Dra. Luciana Leomil

Co-orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Dissertação apresentada ao
Programa Multi-Institucional de
Pós-Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal do
Amazonas, para obtenção do
Título de Mestre em
Biotecnologia.

MANAUS - AM

2010

MIRNA SAYURI FARIAS MIYAMOTO

Título: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESPÉCIES DE
Staphylococcus **ISOLADOS DAS CIDADES DE MANAUS E PORTO VELHO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana Leomil

Presidente e Orientadora

UFAM - Manaus

Profa. Dra. Thania Verginia Guaycurus

Membro

FIOCRUZ – Rio de Janeiro

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca

Membro

FIOCRUZ – Manaus

Data da Defesa: 30 de junho de 2010.

DEDICATÓRIA

*“Dedico, a Minha Família e
amigos, que nos momentos de
minha ausência destinada ao
mestrado, sempre fizeram
entender que o futuro, é feito a
partir da constante dedicação
no presente, obrigada a todos
por tudo!!!”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado em cada decisão, para a melhor escolha e por ajudar a encontrar soluções para as dificuldades que existiram durante esta etapa.

A uma pessoa muito especial, Profa Dra. Luciana Leomil, que sempre esteve presente em toda minha vida acadêmica, foi minha progenitora na pesquisa científica e me acompanhou também na obtenção de mais um título, te considero minha primeira orientadora, Tia e Mãe, obrigada por tanta paciência, compreensão, desafios, ensinamentos e “chamadas de atenção”, como você já sabe... Funciono melhor “sob pressão”! Saiba também que estas me ajudaram muito a amadurecer e a fortificar o lado científico e profissional. Assim, jamais esquecerei o que você me ensinou, os conselhos e até as “broncas”! Fico te devendo 85,99% do que eu aprendi em microbiologia.

Ao meu grandioso e exemplar Prof Dr. Edmar Var de Andrade, mesmo você não querendo, já te considero e sempre te considerarei um Pai. Muito obrigada por me aturar, me ensinar, por seus conselhos que sempre me ajudaram a tomar decisões importantes e por você sempre estar disposto a responder minhas dúvidas. Admiro-te muito!

A minha co-orientadora Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi por fornecer o apoio que necessitávamos para esta pesquisa ser realizada. Sem sua ajuda esse trabalho não teria sido realizado. Obrigada!

Ao Dr. Spartaco Astolfi-Filho por sempre me acolher, apoiar e incentivar. Você também contribuiu muito para na minha vida científica. Obrigada!

Ao Dr. José Odair Pereira que com sua simpatia e serenidade sempre esteve disposto a solucionar qualquer problema.

À Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes pelas sugestões engrandecedoras e incentivadoras para este trabalho. Memé obrigada por me incentivar à conquista deste título desde a graduação!

As minhas amigas e irmãs Ciça, Carolzinha, Fabíola, Juliana, Isabelle e Luna, cada uma com uma peculiaridade inesquecível... Pelos momentos de alegrias, diversões e ao mesmo tempo apoio, incentivo, motivação, e sempre prontas para ajudar em qualquer necessidade, dentro e fora do “PORTAL”. Vocês me ensinaram a fazer pesquisa de uma forma divertida e prazerosa, mesmo quando ficávamos trabalhando até altas horas dentro de um laboratório. Não esquecerei as mais hilárias situações... OBRIGADA!!!

A minha turma de mestrado Anita, Beto, Cris, Dina, Janaína, Lu Falcão, Tati e aos doutorandos que também estavam presentes tanto nas disciplinas, como em laboratório.

A Dra. Aya Sadahiro por ajudar na avaliação do Comitê de Ética e sempre estar disposta a responder qualquer questão.

A Dra. Thania Verginia Guaycurus por seus conselhos, momentos de diversões e sempre estar disposta a ajudar. Tuka você sempre me incentivou a lutar pelas conquistas!!!

Aos meus amigos Cleiton, Laura, Ely, Maura, Lili e Henriette por sempre estarem envolvidos em TODOS os meus momentos de diversões, incentivando e sempre dispostos a ouvirem minhas reclamações. Vocês foram fundamentais, sempre me ajudando de forma indireta neste trabalho!

Aos amigos de laboratório Marcos Pessoa, Edson, Dani, Robertinho e André por estarem sempre dispostos a ajudar e pelo companheirismo até tarde no laboratório. Vocês são pessoas que têm tudo para brilhar.

A todos os amigos da UFAM, *in memoriam* ao Oto e Anilton, pelo companheirismo, amizade e podem ter certeza que cada um teve uma contribuição especial e necessária para a realização desta pesquisa.

Aos Técnicos e amigos Dina, Elza, Jonso, Patrícia e Rogério pela paciência, por sempre estarem dispostos a ajudar, pela colaboração com preparo de materiais e organização do ambiente de trabalho.

As meninas da limpeza Tia Regina e Luciana obrigada por contribuírem na organização do laboratório e amizade nos momentos de descontração nos corredores.

Às secretárias Elzimar, Joelma e Nubiane por sempre me ajudarem com documentos em cima da hora e a incentivarem a realização desta pesquisa.

À FIOCRUZ, por pessoas que incríveis conheci e me apoiaram de forma direta e indiretamente, obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar e a colaborar com a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos, familiares e amigos por aturarem minha impaciência e acima de tudo minha ausência em momentos de comemorações especiais. Vocês sempre me incentivam de forma indireta pelo carinho e compreensão. Amo todos vocês!

A todos que contribuíram de forma direta e indiretamente para a realização deste trabalho. Muitíssimo obrigada!!!

A você que confiou e vai iniciar a leitura desta dissertação, e que pela quantidade de pessoas em que agradei, tenha dado para perceber o quanto foi especial a realização desta pesquisa. Espero ter instigado você a ler esta até o final. Sua leitura é essencial para engrandecer e valorizar este trabalho. Sempre divulgue para mais uma pessoa. Obrigada!

EPÍGRAFE

*“Cada momento é único... Portanto,
aproveite-o da melhor forma... que
dará tudo certo no final!!!”*

RESUMO

Staphylococcus aureus é um patógeno em potencial, sendo responsável por 60% das infecções nos CTIs, podendo ser encontrado na região da nasofaringe e também nas fossas nasais, principalmente em profissionais da saúde que se tornam fontes de disseminação desses micro-organismos no ambiente hospitalar. No entanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos no combate desses patógenos, tem ocasionado o surgimento de bactérias possuidoras de genes de resistência, como o gene *mecA*, entre as quais, cerca de 30 a 50% das cepas de *S. aureus* e mais de 50% são de estafilococos coagulase-negativos são portadores deste gene. Os CONS estão cada vez mais se tornando alvo de preocupação nos ambientes hospitalares, aumentando a necessidade de rastreamento, prevenção e controle das cepas resistentes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização de *Staphylococcus* sp., quanto a presença do gene de resistência e mapeamento genético de *S. aureus* em amostras clínicas das cidades de Manaus e Porto Velho. As técnicas aplicadas foram testes bioquímicos, antibiograma, PCR (para gene 16S rRNA e gene *mecA*) e MLST. Neste trabalho, encontramos quatro cepas de CONS, três de *Staphylococcus sciuri* e um *S. epidermidis*, caracterizados por testes fenotípicos e genotípicos, sendo estas possuidoras do gene de resistência a metilicina *mecA*. Quanto aos *S. aureus* estudados, não se detectou a presença do gene *mecA*, mas foi realizado o mapeamento gênico destas amostras com a técnica de MLST, utilizando cinco genes constitutivos. Nesta análise, foi observada a formação de dois grandes agrupamentos principais (*clusters*) entre as cidades de Manaus e Porto Velho, e duas amostras apresentaram divergência gênica das outras, demonstrando assim, variabilidade genética entre essas cidades da Região Norte do Brasil. Diante das evidências científicas na literatura, escassas pesquisas relacionadas ao conhecimento epidemiológico e caracterização das linhagens existentes na região Amazônica, nesta pesquisa, foram discutidas algumas questões de análise fenotípica, caracterizações de novas cepas resistentes e elaboração de banco de dados para futuro desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas.

Palavras-chave: *Staphylococcus* metilicina-resistente. *Staphylococcus* coagulase-negativo. PCR. MLST. Manaus. Porto Velho.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a potential pathogen, accounting for 60% of infections in ICU's and can be found in the nasopharyngeal region and also in the nasal cavity, especially in health care workers who become sources of dissemination of these micro-organisms in hospital. However, the indiscriminate use of antibiotics to combat these pathogens, has caused the emergence of bacteria possessing resistance genes such as *mecA*. Of which are about 30 to 50% of the strains of *S. aureus* and more than 50% of coagulase-negative staphylococci. The CONS are increasingly becoming the target of concern in hospital environments, increasing the need for screening, prevention and control of resistant strains. Therefore, the objective of this work was the characterization of *Staphylococcus sp.*, looking for the resistance gene and genetic mapping of *S. aureus* in clinical samples from the cities of Manaus and Porto Velho. The techniques used were biochemical tests, antibiogram, PCR (for 16 rRNA gene and *mecA*) and MLST. The four strains of CONS were found, three of *Staphylococcus sciuri* and *S. epidermidis*, characterized by phenotypic and genotypic tests. They were possessed of the methicillin resistance gene *mecA*. As for *S. aureus* studied, failed to detect the presence of the *mecA* gene, but gene mapping was performed from these samples with the technique of MLST, using five housekeeping genes. In this analysis we observed the formation of two large clusters between the cities of Manaus and Porto Velho, and two samples showed genetic divergence from other, thus demonstrating genetic variability between the cities of northern Brazil. The evidence related in the scientific literature, little research related to knowledge and epidemiological characterization of strains existing in the Amazon region, in this research, we discussed some questions of phenotypic analysis, characterization of new resistant strains and preparation of database for future development of biotechnological tools.

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus*. Coagulase-negative *Staphylococcus*. PCR. MLST. Manaus. Porto Velho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** representação esquemática dos tipos de coagulase 20
- Figura 2.** representação esquemática da superfície das cepas de *S. aureus*, adaptada de Murray et al. (2006) 20
- Figura 3.** Genes de resistência do *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (LOWY, 2003) 25
- Figura 4.** Representação esquemática da região cassette cromossomal estafilocócica *mec* – *SCCmec* 25
- Figura 5.** representação esquemática da aquisição e excisão do gene *mecA*. Fonte: SCCmec (www.staphylococcus.net) 26
- Figura 6.** Mecanismo de resistência do VRSA (LOWY, 2003) 28
- Figura 7.** Distribuição de *S. aureus* no Brasil, do banco de dados do site: <http://saureus.mlst.net> 30
- Figura 8.** Sistema de identificação (ID) de Gram-positivos (GP) BBL Crystal 39
- Figura 9 – A.** Placa com Ágar Chapman com cultivo de bactéria fermentadora de manitol (*S. aureus*); **B.** Placa com Ágar Chapman com cultivo de bactéria não fermentadora de manitol (*Staphylococcus* sp.) 42
- Figura 10.** Método de coloração de Gram 42
- Figura 11:** Teste de coagulase para confirmação da espécie *S. aureus* (seta aponta o coágulo formado) 43
- Figura 12.** Foto da extração Fenol-Clorofórmio do DNA genômico em gel de agarose a 0,8%. Marcador de 1kb Promega 43
- Figura 13.** Foto da amplificação do gene 16S rRNA por PCR em gel de agarose a 0,8%, mostrando o tamanho do fragmento de 1,000 pb. Controle positivo (C+): MSSA ATCC 25923; Controle negativo (C-): água deionizada. Marcador de 1kb Fermentas 43
- Figura 14.** Foto da amplificação do gene *mecA* com os iniciadores *mecA* F e *mecA* R, na altura esperada de aproximadamente 500pb para as amostras 319, 320, 325, P3-1(33), P20-31, P5-11 e P6-11, C+ (MRSA ATCC33591) e C- (água deionizada) em gel de agarose a 2% e M (marcador 100pb da Bio-Rad) 45
- Figura 15.** Foto da amplificação do gene *mecA* com os iniciadores *mecA* F e *mecA* R, na altura esperada de aproximadamente 500pb para o C+ (MRSA ATCC33591) e sem amplificação para o C- (água deionizada). As amostras 1 (P15-31 3D) e 2 (P15-33 3D) apresentaram bandas fracas para esse gene, sendo consideradas negativas. Gel de agarose a 2% e M (marcador 100pb da Bio-Rad) 46

Figura 16. Resultado do teste antibiograma para duas amostras positivas para o gene *mecA*. 1- amostra P3-1(33), 2- amostra P20-31

Figura 17. Dendograma do MLST das 18 amostras de *Staphylococcus aureus* por meio do Software S.T.A.R.T. Perfil I amostras clínicas coletadas na cidade de Manaus e Perfis II, III, VI e V são amostras clínicas coletadas na cidade de Porto Velho

Figura 18. Foto de *S. sciuri* demonstrando a característica bicolor

54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes de resistência	37
Tabela 2: Seqüências de iniciadores utilizadas para MLST (ENRIGHT et al., 2000)	40
Tabela 3. Perfil térmico dos iniciadores para MLST	40
Tabela 4. Identificação das amostras bacterianas em testes fenotípicos e genotípicos	44
Tabela 5. Resultado da PCR e teste de triagem das 56 amostras isoladas	46
Tabela 6. Resultado dos testes de sensibilidade das amostras pesquisadas	48
Tabela 7. Resultado dos testes fenotípicos para resistência das amostras resistentes	49
Tabela 8. Resultado dos testes fenotípicos para resistência	49
Tabela 9. Resultado da identificação pelo sistema de identificação para Gram-positivas	50
Tabela 10. Perfil dos alelos associados com amostras de <i>S. aureus</i>	50

SUMÁRIO

1. OBJETIVOS	15
1.1 Geral	15
1.2 Específicos	15
2. JUSTIFICATIVA	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Estafilococos Coagulase-Positivo	19
3.2 Estafilococos Coagulase – Negativo	22
3.2.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	23
3.2.2 <i>Staphylococcus sciuri</i>	23
3.3 Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> relacionados à resistência bacteriana	24
3.3.1 Gene <i>mecA</i>	24
3.3.2 Gene <i>vanA</i>	26
3.4 Técnicas moleculares aplicadas na caracterização de <i>Staphylococcus</i>	27
3.4.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) na detecção de genes de espécies de <i>Staphylococcus</i>	28
3.4.2 Tipagem de Sequências de MultiLocus (MLST) na caracterização de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.5 Epidemiologia de <i>S. aureus</i>	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Amostra bacteriana	31
4.2 Isolamento bacteriano	31
4.3 Identificação fenotípica bacteriana	31
4.3.1 Coloração de Gram	32
4.3.2 Teste do crescimento em Ágar Chapman	32
4.3.3 Prova de catalase	32
4.3.4 Teste de coagulase em tubo	33
4.4 Identificação molecular bacteriana	33
4.4.1 Extração de DNA genômico	33
4.4.2 Identificação bacteriana por PCR do gene 16S rRNA	34
4.4.3 Purificação das amostras	34
4.4.4 Sequenciamento e análise das seqüências	35
4.5 Caracterização molecular dos genes de resistência	35
4.5.1 Detecção dos genes de resistência por PCR	35
4.5.1.1 Gene <i>mecA</i>	35
4.6 Caracterização fenotípica dos genes de resistência	37
4.6.1 Teste de triagem em ágar com oxacilina	37
4.6.2 Teste de sensibilidade Antimicrobiana	37
4.6.3 Sistema de identificação (ID) de Gram-Positivos (GP) BBL Crystal	38
4.7 Tipagem de Sequências de Multilocus (MLST)	39
4.8 Aspectos Éticos	40
5. RESULTADOS	42
5.1 Isolamento bacteriano por cultivo em Ágar Chapman	42

5.2 Coloração de Gram	42
5.3 Testes bioquímicos (catalase e coagulase)	42
5.4 Extração de DNA genômico e amplificação do gene 16S rRNA	43
5.5 Análises por bioinformática das seqüências do gene 16S rRNA	44
5.6 Detecção dos genes de resistência <i>mecA</i> por PCR e teste de triagem	45
5.7 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	47
5.8 Sistema de identificação (ID) de Gram-positivos (GP) BBL Crystal	50
5.9 Tipagem de Sequências de Multilocus (MLST)	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	58
8. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	59
9. ORÇAMENTO	60
9.1 Despesas de capital	60
9.2 Despesas de custeio	60
10. FONTES DE RECURSOS	62
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	71
Anexo 1	72
Anexo 2	73
Anexo 3	74

1. OBJETIVOS

1.1 GERAL

Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente espécies de *Staphylococcus* provenientes de amostras clínicas das cidades Manaus e Porto Velho.

1.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar o perfil fenotípico das amostras de *Staphylococcus* sp. por métodos bioquímicos e determinar a resistência antimicrobiana das amostras isoladas;
2. Investigar a presença do gene *mecA* nas amostras de espécies de *Staphylococcus*;
3. Determinar o perfil molecular das amostras de *Staphylococcus aureus* pela técnica de MLST;
4. Comparar as espécies de *Staphylococcus aureus* dos Estados de Amazonas e Rondônia.

2. JUSTIFICATIVA

O gênero *Staphylococcus* é formado por cocos Gram-positivos, da família *Micrococaceae*, imóveis e anaeróbios facultativos, possuindo de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro. O nome *Staphylococcus* é derivado do termo grego *Staphylé* (“um cacho de uva”), devido a sua morfologia. Os estafilococos podem ser patógenos importantes para os seres humanos e causam um amplo espectro de doenças que ameaçam a vida, incluindo doenças de pele, tecidos moles, ossos e trato urinário, além de infecções oportunistas.

As espécies que freqüentemente se associam a doenças humanas são *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* (MURRAY et al., 2006). *S. aureus* é um dos maiores causadores de patologias, como: pneumonia, impetigo, foliculite, endocardite, osteomielite, furúnculo, meningite, infecções urinárias, intoxicação alimentar, sepse e síndrome do choque tóxico (LOWY, 1998).

Atualmente, 30 a 50% das cepas de *S. aureus* e mais de 50% dos estafilococos coagulase-negativos são resistentes a penicilinas semi-sintéticas. Por isso, a resistência a antimicrobianos é alvo de grande preocupação, tendo esta se tornado um importante motivo dos focos de infecções. A maior causa de infecções nosocomiais e adquiridas em comunidades está associada às espécies de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) (ROSS et al., 2005; MURRAY et al., 2006), sendo responsável por 60% das infecções nosocomiais entre os pacientes dos Centros de Terapias Intensivas (CTIs) de Nova Iorque (CDC, 2004).

As cepas de MRSA e a outros β -lactâmicos emergiram em 1961, em um período curto após a introdução na prática clínica da meticilina (JEVONS, 1961). Desde então, os casos de infecções causadas por estas bactérias vêm aumentando gradativamente, ocasionando um aumento nos casos clínicos devido à sua múltipla resistência a antibióticos, e estes micro-organismos não se restringem apenas ao ambiente hospitalar (COOKE et al., 1985; TOWNSEND et al., 1987).

A presença das amostras resistentes tem sido detectada pelo método de sensibilidade de difusão em disco e testes como macrodiluição, microdiluição ou em placa para detectar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Estes métodos são utilizados na maioria dos laboratórios como parte de identificação de rotina de uma

amostra. No entanto, os testes não são altamente discriminatórios e do ponto de vista epidemiológico, se duas amostras tiverem padrões de suscetibilidade aos antibióticos ou perfis bioquímicos diferentes (MURRAY et al., 2006).

Tais métodos mostram-se insatisfatórios para a diferenciação de isolados do tipo MRSA, que se tornaram resistentes a numerosos outros antibióticos ao lado dos β -lactâmicos, conhecidos como, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina e gentamicina (HANIFAH et al., 1994). Contudo, uma solução encontrada para os laboratórios de análises clínicas para a detecção dos genes de resistência é a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), técnica freqüentemente usada por ser rápida e bastante difundida entre o meio científico.

Variações nas seqüências que codificam duas proteínas espécies-específicas, coagulase (*coa*) e proteína A (*spa*) têm sido a base para a forma mais amplamente usada em tipagens por PCR para *S. aureus* (WALKER et al., 1998; HOOKEY et al., 1999). A PCR foi utilizada por Shekeri et al. (2010), para estabelecer a diversidade do gene *spa* em isolados clínicos de *S. aureus* e comparar a diversidade existente entre as amostras de MRSA e MSSA.

Outra técnica molecular muito utilizada para caracterização das espécies de *Staphylococcus* é a Tipagem de Sequências de Multilocus (MLST), desenvolvida para interpretar expressões de genes por análise dos nucleotídeos por sequenciamento. O MLST é uma excelente ferramenta para discriminação das amostras de *Staphylococcus* resistentes a antibióticos, baseando-se na análise de seqüências de fragmentos de 0.5 Kb de sete genes constitutivos, conhecidos como “housekeeping”, porém é muito oneroso para ser utilizado em análises clínicas.

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de doenças dos EUA (CDC), 5 a 10% dos pacientes hospitalizados adquirem algum tipo de infecção. E mais, outros dados revelam que mesmo com a utilização de materiais descartáveis e técnicas de esterilização as taxas de infecção hospitalar cresceram em 36% nos últimos 20 anos. Dados recentes, obtidos do Programa de vigilância antimicrobiana – SENTRY, mostram que o *S. aureus* permanece como um dos principais agentes causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde, independente do período analisado, e o principal patógeno obtido de infecções de pele e tecidos moles em centros médicos localizados na América do Norte, América Latina e Europa, nos anos de 1998 a 2004 (MOET et al., 2007).

Com o crescente aumento de *Staphylococcus* resistentes a antibióticos e a escassez de estudos referentes à ambientes hospitalares da Região Amazônica, percebe-se a necessidade de se caracterizar as novas linhagens clínicas, com a finalidade de compreender surtos ou epidemias nas Unidades Hospitalares dos Estados do Amazonas e de Rondônia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estafilococos Coagulase-Positivo

Um dos representantes deste grupo é o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que é considerada da microbiota e é encontrada no ambiente externo nasal e nas narinas anteriores de 20 a 40% dos adultos. Outros sítios de colonização incluem dobras cutâneas, períneo, axilas e vagina (KONEMAN et al., 2001). Embora esse microrganismo faça parte da microbiota humana normal, pode vir a ocasionar infecções oportunistas importantes em condições apropriadas (PFALLER et al., 1988).

O principal hospedeiro do *S. aureus* é o Homem, e devido a sua alta incidência na microbiota natural das fossas nasais, esta é considerada como uma importante via de disseminação do micro-organismo, principalmente por profissionais da saúde no ambiente hospitalar (TELLAROLLI et al., 2003).

As infecções por *S. aureus* incluem foliculite simples, impetigo, furúnculos, carbúnculos, broncopneumonia, pneumonia nosocomial, endocardite, osteomielite, piodartrite, formação de abscessos metastáticos, meningite estafilocócica, necrose epidérmica tóxica, síndrome do choque tóxico e também podem produzir intoxicações devido à elaboração de exotoxinas durante o crescimento em alimentos contaminados (KONEMAN et al., 2001).

Esse micro-organismo é produtor de catalase (enzima que catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água); fibrolisina (também chamada de estafiloquinase que dissolve coágulos de fibrina); e hialuronidase (hidrolisa os ácidos hialurônicos, os mucopolissacarídeos ácidos presentes na matriz celular do tecido conjuntivo); entre outros fatores de virulência (MURRAY et al., 2006).

As cepas de *S. aureus* possuem duas formas de coagulase: ligada e livre, sendo que a coagulase ligada à parede celular do estafilococo pode converter diretamente fibrinogênio em fibrina insolúvel e causar o agrupamento dos estafilococos. A coagulase livre reage com um fator globulina do plasma que reage com a coagulase para formar estafilotrombina, que por sua vez, é semelhante à trombina. Além disso, a estafilotrombina catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina insolúvel (MURRAY et al., 2006).

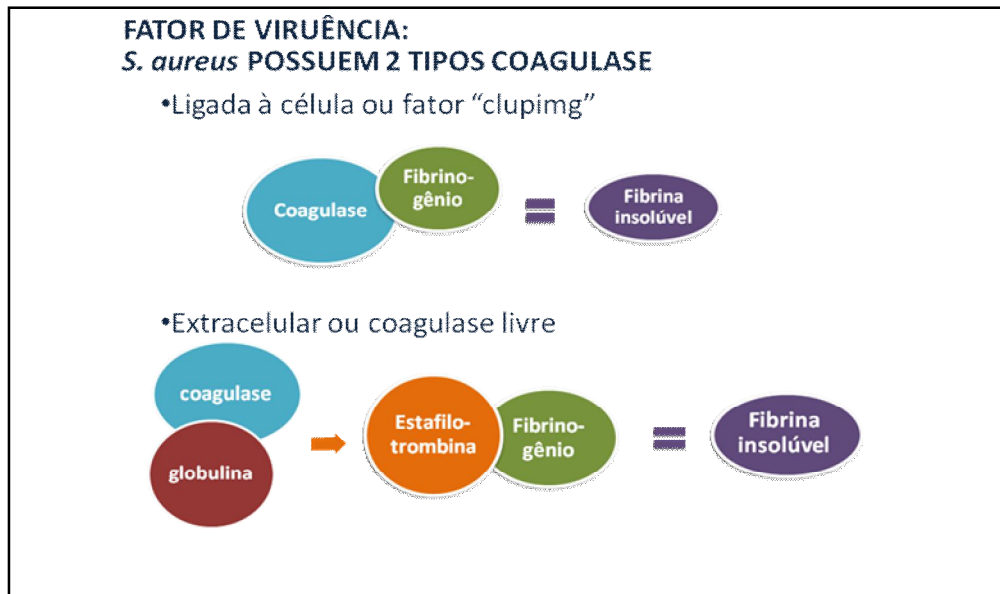


Figura 1. representação esquemática dos tipos de coagulase

Essa bactéria atua como agente de uma grande quantidade de infecções, variando desde as localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). A superfície das cepas de *S. aureus* é coberta com proteína A, que está ligada à camada de peptidoglicano ou à membrana citoplasmática e apresenta uma afinidade única por se ligar a receptores Fc de imunoglobulina G₁, G₂, e G₄.

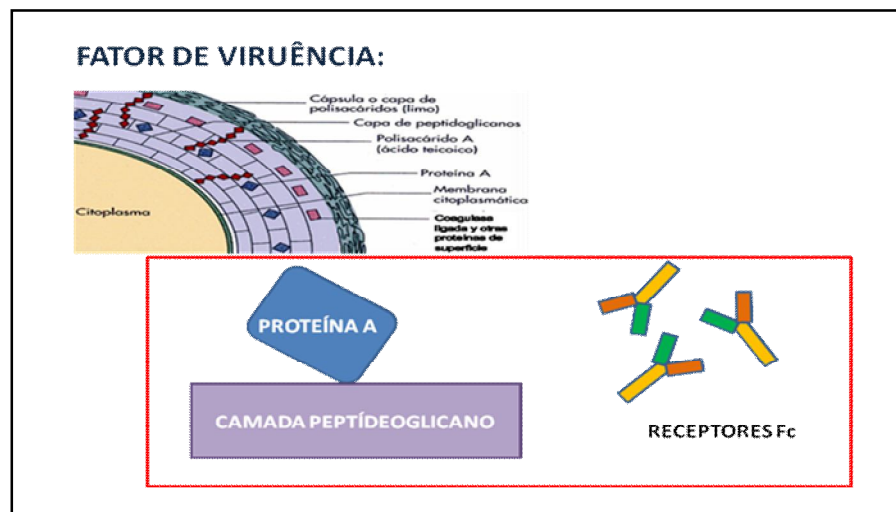


Figura 2. representação esquemática da superfície das cepas de *S. aureus*, adaptada de Murray et al. (2006)

Aproximadamente em 1940, as infecções de *S. aureus* começaram a ser tratadas com penicilina (antes da introdução da penicilina a taxa de mortalidade dos pacientes infectados com *S. aureus* era de 80%), porém em 1942, a primeira linhagem resistente a esse antibiótico foi isolada. Essa resistência resultava da aquisição de um plasmídeo que codifica uma enzima que hidrolisa penicilina (penicilinase). Desde 1960, cerca de 80% de todos os isolados de *S. aureus* vêm apresentando resistência a penicilina (DEURENBERG et al., 2006).

Em 1961, surgiram as primeiras cepas resistentes às novas drogas, sendo denominada na língua inglesa de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA). No Brasil, devido à inexistência comercial da meticilina, essas cepas resistentes eram chamadas de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (oxacilin-resistant *Staphylococcus aureus* - ORSA), pois nos testes de antibiograma, o antibiótico meticilina era substituído por oxacilina (SPIANDORELLO et al., 2000). Em 1980, as Fluoroquilonas foram inicialmente introduzidas para o tratamento de infecções bacterianas Gram-positivas, após algum tempo amostras de *S. aureus* com resistência às quilonas emergiram (LOWY, 2003).

Nos anos 90, houve um aumento na utilização da vancomicina, e conseqüentemente, o surgimento dos *S. aureus* vancomicina-resistentes (VRSA), sendo que o primeiro relato da linhagem de VRSA ocorreu no Japão (HIRAMATSU et al., 1997), depois nos Estados Unidos (CDC, 2002), e somente, em 2005, o primeiro relato de VRSA no Brasil (PALAZZO et al., 2005).

Até recentemente, as cepas de MRSA existiam quase que exclusivamente nos hospitais, porém, surtos de infecção por este microrganismo fora do ambiente hospitalar, já foram relatados. Apesar da diversidade geográfica dos surtos, as cepas MRSA de comunidades parecem ter relações clonais e distintas de outras cepas da mesma espécie que circulam nos hospitais. A maioria das cepas de MRSA de comunidade produz a toxina leucocidina de P-V (Panton-Valentine) e tem sido associada a doenças graves, como pneumonia necrosante (MURRAY et al., 2006).

Em um estudo realizado em Manaus por Egido e Barros (2003), com amostras de pacientes na faixa de 1 a 49 anos, com infecções por *S. aureus* adquiridas em comunidades, foram encontradas as frequências de 62,5% de *S. aureus* resistentes à oxacilina e 25% de *Staphylococcus epidermidis*. Em 2009, Ferreira e colaboradores realizaram estudo da prevalência de MRSA em pacientes atendidos em ambulatório de

dermatologia geral em Manaus, no Estado do Amazonas e identificaram uma taxa de prevalência de 15,5% de MRSA, com 44% de resistência no teste de suscetibilidade à oxacilina.

3.2 Estafilococos Coagulase – Negativo

As espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo (CONS) recebem esta denominação por não produzirem a proteína coagulase. Os CONS fazem parte da microbiota normal humana, sendo encontrado em várias partes do corpo (pele e mucosa) e pode servir como fonte de infecções, por associações de doenças, quando as defesas normais do organismo hospedeiro estão debilitadas, por exemplo, terapia imunossupressiva, dispositivos invasivo ou quando a microbiota normal está alterada por terapia antimicrobiana (PALAZZO et al., 2005).

Os tipos de infecções associadas aos *Staphylococcus* coagulase-negativos são: urinárias, nosocomiais e adquiridas em comunidades, associadas a dispositivos permanentes (válvulas cardíacas protéticas, cateteres endovenosos, próteses articulares, entre outros), bacteremia em hospedeiros comprometidos (prematturos, receptores de transplantes, paciente com doença cardioneoplásicas ou cardiovasculares), endocardite de causas naturais e protéticas, osteomielite e endoftalmite cirúrgica (KONEMAN et al., 2001).

Os estafilococos coagulase-negativo são considerados os terceiros maiores causadores de infecções e os causadores mais freqüentes de infecções sanguíneas nosocomial. A espécie *S. epidermidis* representa 50 a 80% dos isolados de amostras clínicas, causando infecções relacionadas a cateteres devido a propriedades específicas de adesão ao biomaterial, como cateteres intravascular e formação de biofilme (AGVALD-ÖHMAN et al., 2004).

As espécies de *Staphylococcus haemolyticus* representam a segunda espécie mais freqüente em infecções relacionadas a cateter, septicemia e endocardites, enquanto que os *Staphylococcus saprophyticus* apresentam-se como importantes agentes causadores de infecções do trato urinário em mulheres jovens (HEIKENS, 2005).

No Brasil, pesquisas realizadas por Cunha e Lopes (2002) analisaram linhagens de *Staphylococcus* coagulase-negativo isolados de recém-nascidos, e observaram que 71,8% dos isolados foram produtores de β -lactamase e cerca de 50% dessas linhagens foram resistentes à oxacilina. Em relatos de diferentes partes da Europa, a resistência à

oxacilina por CONS varia entre 70 e 80%, e uma taxa similar de resistência é relatada nos Estados Unidos, Canadá e América Latina (DIEKEMA et al., 2001).

3.2.1 *Staphylococcus epidermidis*

São espécies caracterizadas por serem coagulase negativa, catalase positiva, não fermentam manitol e são sensíveis à novobiocina. Infecções ocasionadas por *S. epidermidis* incluem endocardite de válvulas cardíacas naturais e protéticas, infecções produzidas por cateteres endovenosos, infecções de derivações para líquido cefalorraquidiano - LCR, peritonite associada a cateteres para diálise peritoneal, bacteremia, osteomielite, infecções de feridas, infecções de enxertos vasculares, infecções de próteses articulares, mediastinite e infecções das vias urinárias (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2008). Estudos com *S. epidermidis* isolados de infecções de dispositivos médicos permanentes relatam que essa bactéria produz macromoléculas extracelulares, iniciando na superfície celular e depois aumentam a aderência bacteriana às superfícies plásticas dos corpos estranhos (KONEMAN et al., 2001).

A prevalência de CONS resistentes à oxacilina é elevada na maior parte dos hospitais no Brasil e no mundo e a identificação das espécies desse grupo é de extrema importância, pois a interpretação dos halos de inibição de oxacilina para *S. epidermidis* é diferente das outras espécies. Um fator a ser considerado, são os resultados discrepantes entre oxacilina e cefoxitina podem ser encontrados quando os CONS são avaliados pelo teste de difusão em disco (FRIGATTO et al., 2005).

Também no Brasil, Rosa et al., em 2009, analisaram amostras de saliva de profissionais de enfermagem, nas quais foram isoladas 41% de *S. epidermidis*, 25% *S. saprophyticus*, 18% *S. haemolyticus*, 8% *S. cohnii*, 4% *S. lugdunenses*, 3% *S. capitis* e 1% *S. simulans*. Além disso, dentre 20 cepas de *S. epidermidis*, 15 (62,5%) apresentaram o gene para resistência a meticilina (gene *mecA*).

3.2.2 *Staphylococcus sciuri*

Esses micro-organismos são cocos Gram-positivos, catalase e oxidase positiva, não produzem coagulase, fermentadores de manitol e são resistentes ao antibiótico novobiocina (COUTO et al., 2003). São considerados uns dos maiores ancestrais estafilocócico, e uma das espécies mais dispersas, com uma ampla taxa de habitats,

incluindo a pele de diversos animais, tanto domésticos quanto selvagens e também, reservatórios ambientais, como solo, areia e água (KLOOS et al., 1994; 1997). Porém, pesquisas relatam que este organismo pode causar graves infecções humanas, como endocardite, peritonite, trato urinário, entre outras (HEDIN, 1998; WALLET, 2000; STEPANOVIC, 2002). A ampla taxa da atividade bioquímica do *S. sciuri*, inclui a habilidade do uso de sais inorgânico de nitrogênio como única fonte de nitrogênio, que é usualmente considerado nas reações para ampla taxa de organismo hospedeiro e habitats dessa bactéria (COUTO et al., 1996; KLOOS et al., 1997). Estudos prévios evidenciaram que o gene heterólogo de resistência a β -lactâmicos, *mecA*, que é residente em todas as linhagens de MRSA, podem ter origem evolucionária de um gene homólogo presente em espécies *Staphylococcus sciuri* de animais comensais que se apresentam tanto em, isolados suscetíveis a β -lactâmicos quanto a isolados resistentes (COUTO, 1996; 2000).

Em estudos realizados por Zhou et al. (2008) com caracterização das proteínas ligantes de penicilina (PBPs) de *S. sciuri*, ficou relatado que o gene *pbpD* desta bactéria (gene homólogo ao *mecA* de *S. aureus*), é o determinante genético da PBP4, uma das seis PBPs recentemente identificada nessa espécie.

Antignac e Tomaz (2009), em estudos comprovaram que a *pbpD* de *S. sciuri* pode funcionar como um componente efetivo do mecanismo de resistência em *S. aureus* heterólogos. E que a PBP4 de *S. sciuri* pode funcionar como a enzima de síntese da parede celular em *S. aureus* e cooperar com os outros PBPs e transglicosilases monofuncionais de hospedeiros para construir a parede celular peptídeoglicana. Fornecendo assim, mais apoio para a proposição de que a resistência dos β -lactâmicos de amplo espectro determinada pelo gene *mecA* presentes em todas as cepas de MRSA evoluiu a partir do gene *pbpD* de *S. sciuri*.

3.3 Fatores de virulência de *Staphylococcus* relacionados à resistência bacteriana

3.3.1 Gene *mecA*

As linhagens de MRSA desenvolvem resistência à metilicina por meio da aquisição do gene *mecA* que codifica uma PBP2a ou PBP2', e a atuação desse gene é regulada por dois outros genes chamados de *mecI* e *mecR1* (Figura1).

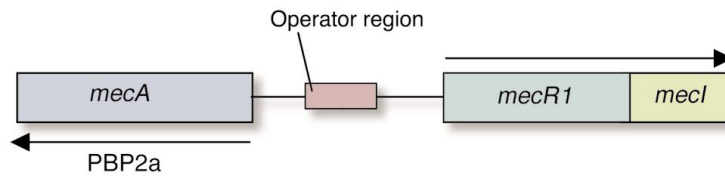
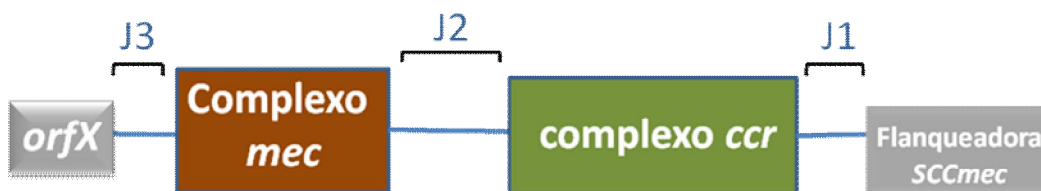


Figura 3. Genes de resistência do *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (LOWY, 2003)

Os antibióticos β -Lactâmicos normalmente ligam-se às PBPs na parede celular, resultando na ruptura da síntese da camada peptidoglicana e morte da bactéria. Porém, os β -Lactâmicos não podem se ligar a PBP2a, assim, não ocorre a interrupção da síntese da camada peptidoglicana e a síntese da parede celular (DEURENBERG et al., 2006).

O gene *mecA* está inserido em uma porção genômica designada em um complexo da região cassette cromossomal estafilocócica *mec* (“Staphylococcal Chromosome Cassete *mec*” - SCC*mec*) (LOWY, 2003). O elemento SCC*mec* é um elemento genético móvel composto de dois outros elementos genéticos: *mec* (responsável pela resistência a metilina) e o complexo *ccr* (responsável pela integração e excisão do cassette no genoma bacteriano (KATAYAMA et al., 2000; ZHANG et al., 2005). O SCC*mec* tem sido caracterizado em seis tipos diferentes, SCC*mec* I, II, III, IV, V e VI (BERGLUND et al., 2008).

CASSETE CROMOSSOMAL ESTAFILOCÓCICO *mec* - SCC*mec*



Região J: “Junkyard” (sobras)

Figura 4. Representação esquemática da região cassette cromossomal estafilocócica *mec* – SCC*mec*

Além do MRSA, os estafilococos coagulase-negativos resistentes à metilina também podem abrigar SCC*mec*, e esses dados foram corroborados em estudos feitos por Wisplinghoff et al. (2003), com amostras coletadas em 1970 de sangue de válvulas

protéticas, no qual relatam a existência de *Staphylococcus* coagulase-negativo resistentes à meticilina abrigando SCCmec tipos I-IV.

O gene *mecA* foi identificado primeiramente em *Staphylococcus sciuri* sensível à meticilina com 88% de identidade para MRSA. A transdução do gene *mecA* do *S. sciuri* para um *S. aureus* sensível-meticilina (Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* - MSSA), resulta em um aumento na resistência à meticilina quando acoplado com a detecção de PBP2a (COUTO et al., 1996; 2003).

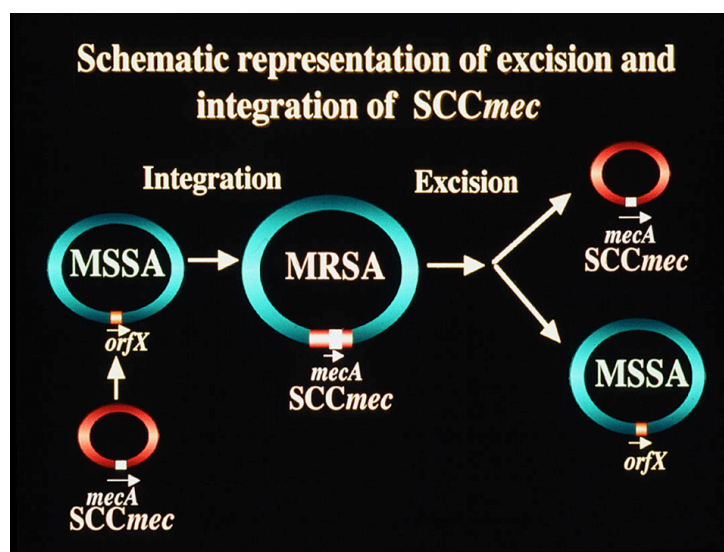


Figura 5. representação esquemática da aquisição e excisão do gene *mecA*. Fonte: SCCmec (www.staphylococcus.net)

3.3.2 Gene *vanA*

Vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo que age somente contra bactérias Gram-positiva inibindo a incorporação do NAM-NAG-polipeptídeo ao crescimento da cadeia peptídeoglicana. Essa inibição do processo acontece pela reação com D-Ala-D-Ala, que conseqüentemente libera o bloco D-Ala terminal e a formação intracadeia (SAHA et al., 2008). A resistência da VRSA é causada por uma alteração do peptídeo terminal para D-Ala-D-Lac, em vez de D-Ala-D-Ala (Figura 2) (LOWY, 2003).

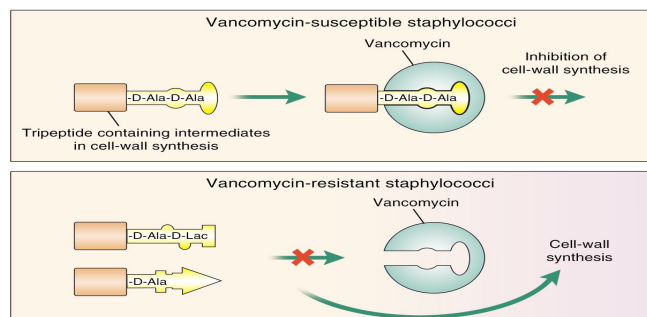


Figura 6. Mecanismo de resistência do VRSA (LOWY, 2003)

O aumento da administração de vancomicina para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* metilina-resistente (tanto coagulase-positiva, quanto coagulase-negativa), *Clostridium difficile*, e infecções enterocócicas precedeu o surgimento de *Staphylococcus* vancomicina-resistentes (KIRST et al., 1998). A primeira resistência estafilocócica a vancomicina em isolados clínicos foi relatada em uma linhagem de *Staphylococcus haemolyticus* (SCHWALBE et al., 1987).

Pesquisas relatam infecções causadas por VRSA de grande importância, porque possuem resistências completas e diferentes mecanismos de disseminação. Esta bactéria adquiriu resistência por transferência conjugal do “operon” *vanA* de *Enterococcus faecalis*, aumentando o espectro de eficiência para os meios de disseminação dos genes de resistência das linhagens de *Staphylococcus* (CDC, 2002; 2004). Segundo pesquisas realizadas em Unidades de Terapias Intensivas (UTI) neonatais, observou-se uma redução na sensibilidade à vancomicina em 3,9% dos isolados, com 75% sendo identificados como *S. warneri* (CENTER et al., 2003).

3.4 Técnicas moleculares aplicadas na caracterização de *Staphylococcus*

As rotinas laboratoriais baseiam-se na identificação estafilocócica apenas nos aspectos morfológicos das colônias, na coloração de Gram, catalase e produção de coagulase, o que permite apenas classificar esses estafilococos em coagulase negativa ou em *S. aureus* (CUNHA et al., 2002).

Devido o aumento das linhagens de *Staphylococcus* com resistência a antibióticos, surgiu a necessidade do desenvolvimento de estratégia objetivando a prevenção e controle através do conhecimento da epidemiologia e disseminação das linhagens resistentes (TRINDADE et al., 2003).

As estratégias de tipagem seguem dois critérios de evolução, critério de desempenho (eficácia) e critério de conveniência (eficiência). Os critérios de desempenho incluem tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório. Já o critério de conveniência inclui-se a versatilidade, rapidez, facilidade de execução e interpretação (TRINDADE et al., 2003).

Quanto às variadas técnicas aplicadas para estudos epidemiológicos de estafilococos cita-se a tipagem capsular, tipagem de fago, tipagem de coagulase, tipagem de plasmídeo, ribotipagem, Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), Tipagem de Sequenciamento de Multilocus (MLST), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tipagem *SCCmec* e tipagem de variáveis repetições da região da proteína A (tipagem *spa*) (ARCHER et al., 1983; HANIFAH et al., 1992; SCHLICHTING et al., 1993; de SOUSA et al., 2004).

3.4.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) na detecção de genes de espécie de *Staphylococcus*

Essa técnica cada vez mais tem sido usada em estudos epidemiológicos e rotinas laboratoriais, para a identificação dos genes resistentes a meticilina e vancomicina, com resultados satisfatórios.

Vários estudos descrevem o uso da PCR para a identificação do elemento *SCCmec* (MARTINS e CUNHA, 2007). Os métodos baseados em PCR são atrativos porque muitos laboratórios com capacidade molecular já possuem os equipamentos necessários, pessoas treinadas e reagentes disponíveis (ROSS et al., 2005).

A detecção do gene *mecA* por métodos moleculares é considerada o método *gold standard* para avaliação qualitativa da resistência à oxacilina (MIMICA et al., 2007). Couto et al. (2003) realizaram a técnica em suas pesquisas para a identificação de meticilina resistente em isolados clínicos de *S. sciuri*. Wellinghausen et al. (2009) utilizaram PCR em suas pesquisas para uma rápida detecção de bacteremia de *S. aureus* resistentes a meticilina em amostras de sangue.

3.4.2 Tipagem de Sequências de MultiLocus (MLST) na caracterização de *Staphylococcus aureus*

É uma técnica derivada da Eletroforese de Enzimas de Multilocus (MLEE), a qual analisava por tipagem fenotípica as proteínas por eletroforese, que eram coradas

seletivamente. Uma desvantagem do MLEE estava na base de sequências (genótipo) de um locus particular que não poderia ser inferida diretamente na análise de expressão (uma proteína). Isso acontece porque duas diferentes bases de sequências podem expressar a mesma proteína, ou sempre duas proteínas com a mesma mobilidade eletroforética, seriam detectadas como a mesma banda em MLEE (TRINDADE et al., 2003).

A técnica de MLST foi desenvolvida para resolver esse problema, ao invés de analisar a expressão dos genes, a análise é realizada por meio de seqüenciamento nucleotídico. O número de locus varia de acordo com cada espécie, geralmente é um fragmento interno dos genes constitutivos (conhecidos também como “housekeeping”), produzindo seqüências de aproximadamente 500 pb para cada locus (MAIDEN et al., 1998; ENRIGHT et al., 2000).

Para as amostras de *S. aureus* são utilizados sete loci representando os fragmentos internos de genes constitutivos, como, carbamato quinase (*arcC*), “shikimate dehydrogenase” (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilato quinase (*gmK*), fosfato acetiltransferase (*pta*), triosefosfato isomerase (*tpi*) e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*). Cada locus é amplificado por PCR usando iniciadores que hibridizam as regiões presentes nos genes que são altamente conservadas, e flanqueiam as regiões variáveis entre eles. O produto da PCR é seqüenciado e com base na seqüência obtida, um número representando um alelo previamente descrito (ou uma nova seqüência) é atribuído ao locus (ENRIGHT et al., 2000; TRINDADE et al., 2003).

Um problema da técnica é o alto custo e a necessidade de equipamentos específicos para execução, tornando-a desvantajosa, restringindo assim, o uso nos centros em que envolvem estudos globais. Entretanto, tornou-se muito conhecida entre o meio científico devido a sua reprodutibilidade e padronização, aliada ao poder de discriminação e facilidade de interpretação (TRINDADE et al., 2003).

3.5 Epidemiologia de *S. aureus*

Na página da internet MLST (Multi Locus Sequence Typing - <http://saureus.mlst.net>, dados acessados em 21 de setembro de 2010), possui um banco de dados das amostras depositadas de todas as partes do mundo e analisadas por esta técnica. Para a espécie de *S. aureus* há um depósito de 36 amostras brasileiras, sendo a maioria relatada da Região Sudeste do Brasil. Foram descritas doze (33,3%) amostras

clínicas isoladas de patogenias, como abscesso, pneumonia, insuficiência renal crônica, infecções sanguíneas, artrites sépticas e feridas operatórias, doze (33,3%) amostras isoladas de animais que apresentaram mastite, três (8,3%) amostras isoladas de epidemiologias adquiridas em comunidades, como, pneumonia, peritonites e abscessos de e nove (25%) foram de sítios cirúrgicos, secreções de próteses e de leite bovino, porém sem informações das patogenias ocasionadas. Ainda sobre estas amostras, nove foram classificadas como MRSA de fontes clínicas e uma amostra de MRSA adquirido em comunidade. Esses dados são datados de 1993 a 2008.



Figura 7. Distribuição de *S. aureus* no Brasil, do banco de dados do site: <http://saureus.mlst.net>

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra bacteriana

Para o seguinte estudo foram analisadas no total 99 amostras sendo, 56 colônias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, das quais vinte e duas amostras foram coletadas de biofilme oral de pacientes de CTIs do Hospital e Pronto-Socorro 28 de Agosto, localizado na cidade de Manaus, as quais estavam armazenadas no Laboratório de Tecnologias de DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Vinte e quatro amostras isoladas de secreção uretral, labial, ouvido, traqueal, cateter, sangue e urina, de pacientes com infecções hospitalares internados no Hospital Cemetron de Porto Velho (RO), especializado em doenças tropicais, armazenadas no Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/AM), em Manaus e cedidas pela Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi. E mais dez amostras isoladas de material clínico e lavado de mãos de pacientes da cidade de Manaus, cedidas pela Coleção de Bactérias da Amazônia do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz (AM). Veja o anexo 2.

4.2 Isolamento bacteriano

As amostras foram inoculadas em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) e incubadas na estufa a 37°C por 24 horas, seguido por cultivo em ágar BHI e incubadas na mesma temperatura e tempo. Depois de isoladas, as amostras foram semeadas em meio seletivo Champman ou ágar Manitol Salgado, considerado também um meio indicador. Este ágar, devido ao seu alto teor de cloreto de sódio estimula o desenvolvimento de estafilococos e inibe o crescimento de outros grupos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Quanto à ação indicadora, as bactérias atuam fermentando manitol, o qual é fermentado principalmente pelo *S. aureus*. As amostras foram armazenadas em meio “Lignières” a temperatura ambiente para posteriores testes.

4.3 Identificação fenotípica bacteriana

A identificação fenotípica bacteriana foi realizada de acordo com informações do módulo V do Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecções de Serviços de Saúde, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004), como descrita a seguir:

4.3.1 Coloração de Gram

A identificação da morfologia bacteriana foi realizada pela técnica de coloração de Gram. Esse é um método que possui o nome de quem a descreveu, o médico dinamarquês Hans Christian Joaquim Gram, em 1884, o qual observou que as bactérias adquiriram cores diferentes, quando tratadas com corantes diversificados. Isso permitiu classificá-las em dois grupos distintos: as que ficavam roxas, que foram chamadas de Gram-positivas, e as que ficavam vermelhas, chamadas de Gram-negativas (identificação morfotintorial) (BRASIL, 1997).

Para a realização deste teste, foi adicionada uma gota de 10 µL de água destilada em uma lâmina de vidro e com o auxílio de uma alça bacteriológica, a colônia bacteriana foi homogeneizada por esfregaço na lâmina e fixada por aquecimento no bico de Bunsen. Depois disso, a lâmina foi tratada com o reagente cristal violeta por 1 minuto, seguido de lavagem com água corrente e adicionado o reagente Lugol por 1 minuto. Passado 1 minuto, a lâmina foi descorada com álcool-cetona. E finalizando o processo, adição de Fucsina básica por 30 segundos, depois as lâminas foram lavadas em água corrente, secadas a temperatura ambiente e visualizadas em microscópio.

4.3.2 Teste do crescimento em Ágar Chapman

O Ágar Chapman ou Manitol Salgado é seletivo para o isolamento e contagem de estafilococos em alimentos e amostras clínicas. Quando inoculado no meio o *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio. O indicador de pH é o vermelho de fenol, que indica uma reação positiva quando o meio ao redor das colônias se torna amarelo, e negativa quando permanece avermelhado. Assim, com o intuito de confirmação do gênero *Staphylococcus* as amostras foram re-isoladas em Ágar Chapman.

4.3.3 Prova da catalase

Com auxílio de uma alça bacteriológica foi coletada uma colônia isolada e esfregada em uma lâmina de vidro. Sobre o esfregaço foi colocada uma gota de água oxigenada a 3% e observada a formação de bolhas, sendo que para os estafilococos a prova é geralmente positiva.

4.3.4 Teste de coagulase em tubo

Este teste baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina. Para o seguinte teste, foi inoculada uma colônia isolada em caldo BHI e incubada por 24 horas a 37°C. Após o crescimento bacteriano, foi retirado 0,1 mL dessa suspensão e adicionado a um tubo de ensaio com 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA, incubado por 18 - 24 horas a 35°C em estufa ou banho seco. O resultado positivo para este, foi observada pela formação do coágulo para *S. aureus*, cujo tubo de ensaio foi inclinado suavemente a 90° para visualização.

4.4 Identificação molecular bacteriana

4.4.1 Extração de DNA genômico

As amostras isoladas e identificadas foram inoculadas em 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB), e incubadas a 37°C por 18 horas na estufa, seguido de extração de DNA genômico (de acordo com o método de extração Fenol-Clorofórmio). Após, o cultivo foi centrifugado a 13400 rpm por 3 minutos, a fim de concentrar as células em sedimento (foi centrifugado 3 vezes para concentrar 5 mL de cultivo), este foi ressuspensionado com 300 µL de tampão TEN (0,05M Tris-HCl, 0,05M EDTA, 0,1M NaCl) e 30 µL de Lisozima (20 mg/mL), seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois, foi adicionado 50 µL de Triton X-100 10% e 20 µL de NaCl 3M e incubado a 60°C por 5 minutos, resfriando logo em seguida a temperatura ambiente. Após a incubação, foi acrescentado 10 µL de RNase A (10 mg/mL) e incubado por 30 minutos a 37°C. Seguido, foi adicionado 50 µL de SDS 10% (homogeneizar), e adicionado 3 µL de proteinase K (10 mg/mL), a amostra foi incubada por 15 minutos a 37°C. Na próxima etapa, foi acrescentado 450 µL de Fenol (para romper as células), e as amostras foram agitadas gentilmente por 5 minutos, e centrifugadas a 13400 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a formação de duas fases, foi recuperada a fase superior e acrescentado 450 µL de Clorofórmio (agitar gentilmente por 5 minutos), em seguida foi centrifugado a 13400 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a precipitação do DNA, foi acrescentado 40 µL de NaCl 3M e vagarosamente 1 mL de etanol 100% a -20°C (misturar 30 vezes por inversão). Seguido, as amostras foram centrifugadas a 13400 rpm por 10 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante e o DNA foi hidratado acrescentando 1 mL de etanol 70%, centrifugado por 13400 rpm durante 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi

descartado e o DNA foi secado em “speed vacuum” por 15 minutos. Após, o sedimentado foi ressuspendido com 100 µl de tampão TE (Tris-HCl 0,01M; EDTA 0,01M; pH 8,0), e incubado a 56°C por 15 minutos e armazenado por 18 horas a - 20°C. O DNA foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml).

4.4.2 Identificação bacteriana por PCR do gene 16S rRNA

Para a amplificação com o gene 16S rRNA (gene de uma região conservada de bactérias), foram utilizadas as seguintes seqüências dos oligonucleotídeos, de acordo com Borneman e Triplett (1997): 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3') e 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3'), e como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de *S. aureus* ATCC 33591. A reação de PCR teve um volume de 50 µL (2,5mM de MgCl₂; 0,25mM de dNTPs; 0,2 pmol/µL de cada iniciador; 0,06U/µL de *Taq* DNA polimerase; e tampão 1X). O sistema de amplificação foi realizado em termociclador Biocycle, e o perfil térmico de PCR foi de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos como segue: desnaturação das fitas-molde a 95°C por 1 min e 40 seg, pareamento dos iniciadores a 58°C por 40 seg e extensão a 72°C por 2 min. E, enfim, um ciclo final de extensão a 72°C por 5 min. Ao termino das ciclagens, os fragmentos amplificados foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml).

4.4.3 Purificação das amostras

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados pelo “illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit – GE Healthcare”, de acordo com o protocolo do fabricante ou por Purificação de PCR utilizando PEG 8000, no qual foi adicionado ao produto de PCR um igual volume de solução de PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M), incubado a 37°C por 30 minutos, seguido de centrifugação a 13400 rpm por 20 minutos. Os tubos fechados foram colocados com a alça da tampa voltada para a parte externa do rotor (para saber onde sedimentou o pellet já que não era possível vê-los), após foi retirado o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador, adicionado 125µl de etanol 80% gelado. Incubado por 1 minuto e centrifugado por 2 minutos a 13400 rpm. O sobrenadante com o auxílio de um micropipetador foi descartado e acrescentado

novamente 125µl de etanol 80% gelado, incubado por 1 minuto e centrifugado por 2 minutos a 13400 rpm. Após, foi deixado evaporar o etanol residual utilizando o banho seco, estufa ou sobre a bancada. Depois de seco, o sedimento foi ressuspensionado com água deionizada em um volume igual ao inicial de amostra. Incubou-se a amostra por 18 horas a - 20°C. O produto purificado foi quantificado em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml).

4.4.4 Seqüenciamento e análise das seqüências

O DNA extraído, amplificado e purificado foi seqüenciado pelo ABI 3100 “Genetic Analyser”, da “Applied Biosystems”, pela Plataforma de Seqüenciamento de DNA (RPT 01B) - CPqGM / FIOCRUZ da Bahia com a Dra Silvana Sousa da Paz pelo programa “Programa em Desenvolvidos Tecnológicos em Ferramentas para a Saúde - PDTIS” e algumas pelo “MegaBACE” 1000 da “Amersham Bioscience”, pelo Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM/UFAM, e posteriormente, as seqüências encontradas foram trimadas pelo programa “Pipeline Harpia” do Laboratório de Biotecnologia da UFAM, para a exclusão das seqüências de baixa qualidade (<https://www.bioinformatica.ufam.edu.br/harpia/harpia.html>) e comparadas com seqüências homólogas dos genomas depositados no banco de dados “GeneBank”, utilizando a ferramenta BLASTN do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) e “Ribosomal Database Project” (RDP).

4.5 Caracterização molecular dos genes de resistência

4.5.1 Detecção dos genes de resistência por PCR

O gene de resistência foi amplificado utilizando seqüência específica do gene *mecA* (para espécies *Staphylococcus* meticilina-resistente).

4.5.1.1 Gene *mecA*

Para a detecção do gene de resistência (Tabela 1) foram testadas duas condições com o propósito de verificar o método que melhor se ajustaria. Como controle positivo, para as duas condições, foi utilizada cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) ATCC 33591 e como controle negativo foi utilizado uma cepa que não havia a presença do gene *mecA*, *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) ATCC 25923. A reação de PCR consistiu de um volume de 25 µL (1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTPs; 5,0

pMol/ μ L de cada iniciador; 2 U/ μ L de *Taq* DNA polimerase; e tampão 1X). O sistema de amplificação foi realizado no termociclador Biocycle. Ao término das ciclagens, os fragmentos amplificados foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 2%.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes de resistência

Gene	Sequência (5' - 3')	Tamanho do Amplicon (pb)	Ciclos	Referência
<i>mecA1</i>	5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C -3'	533 pb	94°C – 5 min 94°C – 2 min 68,6°C – 2 min 72°C – 1 min 72°C – 7 min	MURAKAMI et al., 1991; ALVAREZ et al., 2003
<i>mecA2</i>	5'- AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C -3'			
<i>mecA F</i>	5'- GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATG A -3'	310 pb.	94°C – 4 min 94°C – 45 seg 65,8°C – 45seg 72°C – 30 seg 72°C – 2 min	GEHA et al., 1994; TIWARI e SEN, 2006
<i>mecA R</i>	5'- CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A -3'			

4.6 Caracterização fenotípica do gene de resistência

4.6.1 Teste de Triagem em ágar com oxacilina

O teste de triagem em ágar com oxacilina é um método que apresenta melhor combinação entre sensibilidade (95 a 100%) e especificidade (97%) pelos leitores do teste que utilizarem uma ponteira de 1 µl. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que o uso de um inóculo maior que 1 µl ou inóculo maior que aquele alcançado com um suabe não é recomendado, pois diminui muito a especificidade do teste para detecção da resistência a oxacilina (SWENSON et al., 2001). Este foi realizado semeando a bactéria padronizada no espectrofotômetro na escala 0,5 de MacFarland (0,08 a 0,1 nm), com o auxílio de um suabe, em placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 µg de oxacilina por mililitro, seguido de incubação a 35°C (CLSI, 2007), e a leitura foi realizada após 48 horas. A presença de até mesmo uma colônia foi considerada positiva (De GIUSTI, 1999).

4.6.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Os microrganismos, cujo gene de resistência foi amplificado, foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro*, utilizando a técnica de difusão em discos (Kirby-Bauer), utilizando o meio de cultura ágar Müeller-Hinton. Os discos antimicrobianos utilizados: Penicilina (10 UI), Oxacilina (1 µg), Meticilina 5 µg, Clindamicina (2 µg) e Vancomicina (30 µg). As bactérias foram crescidas em caldo Müeller-Hinton, a 37°C por 18 horas. Seguido de padronização da escala de McFarland 0,5%, as mesmas foram

semeadas na placa de Petri contendo Ágar Müller-Hinton com auxílio de suabe. Em seguida, os discos de antibióticos foram distribuídos na placa e incubados a 37°C por 18 horas. Após esse período, foi realizada a leitura das placas com medição com régua dos diâmetros dos halos formados ao redor dos discos de antibióticos, seguido de comparação com a tabela do antibiograma, como recomendado pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2004).

4.6.3 Sistema de identificação (ID) de Gram-positivos (GP) BBL Crystal

O Sistema consiste em um método de identificação miniaturizado que utiliza substratos convencionais, fluorogênicos e cromogênicos modificados, cedidos pela assessora científica Angela Bueno Hidalgo da Interlab (Distribuidora de Produtos Científicos). Destina-se à identificação de bactérias isoladas aeróbias Gram-positivas (BALOWS et al., 1991; BARON et al., 1994; MURRAY et al., 1995). Esse sistema é composto de 29 substratos bioquímicos e enzimáticos secos, aos quais é adicionada uma suspensão bacteriana presente no líquido dos inóculos para reidratar os substratos. Os testes usados no sistema baseiam-se na utilização e degradação enzimática de substratos fluorogênicos contendo os derivados cumarínicos 4-metillumbeliferona (4-MU) ou 7-amino-4-metilcumarina (7-AMC), provocando um aumento da fluorescência, facilmente detectável por meios visuais utilizando uma fonte de luz UV (MOCLA et al., 1991). Após hidrólise, os substratos cromogênicos provocam alterações de cor que podem ser detectadas visualmente.

Este experimento foi realizado para oito amostras bacterianas, sendo quatro amostras que apresentaram o gene *mecA* e resistência no antibiograma para os antibióticos penicilina, oxacilina e meticilina, e outras quatro amostras com perfis variados. As amostras isoladas e puras foram inoculadas em meio LB e incubadas a 37°C. No dia seguinte, foram padronizadas na escala 0,5 de MacFarland em tubos do Kit com solução para inóculo. Em seguida, houve adição dessa solução nas bases dos tabuleiros de incubação, com uma leve agitação do líquido para cobrir todos os substratos do tabuleiro, e incubação a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi realizada a leitura dos substratos coloridos, com o auxílio do caderno de relatório, e chave bacteriana em programa computacional da BBL Crystal.



Figura 8. Sistema de identificação (ID) de Gram-positivos (GP) BBL Crystal

4.7 Tipagem de Sequências de Multilocus (MLST)

Para as amostras de *Staphylococcus aureus* foi realizada a técnica de MLST, onde as amostras são caracterizadas quanto às sequências dos genes constitutivos. Para a realização desta técnica, o DNA genômico foi amplificado por PCR, utilizando cinco genes constitutivos (Tabela 2), e em seguida foi realizado o sequenciamento das amostras amplificadas. Depois, as sequências nucleotídicas foram analisadas por ferramentas específicas de bioinformática, como o software BioEdit, versão 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), convertido em arquivos FASTA através do software de Jolley et al. (2001), “Sequence Type Analysis and Recombinal Tests” (S.T.A.R.T., <http://www.medawar.ox.ac.uk/maiden/software.html>). E foi montado um dendograma compilado do S.T.A.R.T. pelo método “Unweighted pair group method with arithmetic mean” (UPGMA), construindo uma árvore filogenética com base nos alelos encontrados. As sequências das 18 amostras de *S. aureus* foram comparadas as amostras padrões de *S. aureus* de Enright et al. (2000) pelo site www.mlst.net; e as amostras de *S. aureus* com número de acesso NC_CP001844, do site www.ncbi.nlm.nih.gov.

Tabela 2: Sequências de iniciadores utilizadas para MLST (ENRIGHT et al., 2000)

Gene	Iniciadores	Sequência (5' - 3')
Carbonato quinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC
	<i>arcC</i> -Dn	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG
Shikimate dehidrogrnase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Dn	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC
	<i>aroE</i> -Up	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC
Glicerol quinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C
	<i>glpF</i> -Dn	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC
Fosfato acetiltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG
	<i>pta</i> -Dn	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA
Triosefosfato isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -Up	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA
	<i>tpi</i> -Dn	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC

Para a PCR o perfil térmico dos ciclos foi o mesmo para os cinco pares de iniciadores, porém com alteração na temperatura de anelamento, de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 3. Perfil térmico dos iniciadores para MLST

Perfil térmico	Iniciadores	T*= Temperatura de anelamento
95°C--- 5 min	<i>Tpi</i>	58°C
55°C--- 1 min	<i>glpF</i>	60,8°C
T*°C--- 1 min	<i>aroE</i>	60,8°C
95°C--- 1 min	<i>arcC</i>	68°C
72°C--- 5 min	<i>Pta</i>	72°C

A reação de PCR consistiu de um volume de 50 µL (1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTPs; 0,2 pMol/µL de cada iniciador; 0,04 U/µL de *Taq* DNA polimerase; e tampão 1X). O sistema de amplificação foi realizado no termociclador Biocycle, e ao término das ciclagens, os fragmentos amplificados foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 2%.

4.8 Aspectos Éticos

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou o projeto de pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0233.0.115.000-09, intitulado: **“Caracterização fenotípica e genotípica de espécies de *Staphylococcus* resistentes a antibióticos pela técnica de PCR e MLST”**, tendo como Pesquisadora Responsável Mirna Sayuri Farias Miyamoto, no dia 06 de agosto de 2009 (Anexo 1). As

amostras de Porto Velho foram aprovadas pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Região de Rondônia, com o protocolo nº 463/CEP.

Retificando que o título deste Projeto de Pesquisa foi alterado, de comum acordo com a banca examinadora de qualificação, para **“Caracterização fenotípica e genotípica de espécies de *Staphylococcus* isolados das cidades de Manaus e Porto velho”**, esclarecendo também que não houve modificações das espécies envolvidas e dos métodos propostos.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento bacteriano por cultivo em Ágar Chapman

De um total de 99 amostras, 56 foram caracterizadas como do gênero de *Staphylococcus* isoladas de amostras clínicas provenientes das cidades de Manaus e Porto Velho, quando semeadas em Ágar Chapman 43 amostras fermentaram manitol, como observado na Figura 9 (A), e 13 amostras cresceram, porém não fermentaram manitol (indicando ser *Staphylococcus* de outra espécie), como observado na Figura 9 (B).

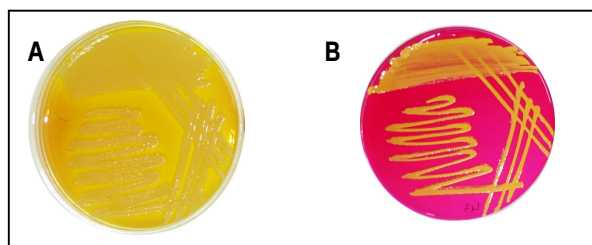


Figura 9 - **A.** Placa com Ágar Chapman com cultivo de bactéria fermentadora de manitol (*S. aureus*); **B.** Placa com Ágar Chapman com cultivo de bactéria não fermentadora de manitol (*Staphylococcus* sp.)

5.2 Coloração de Gram

Para a visualização da morfologia bacteriana (Figura 10), foi realizada a técnica de coloração de Gram, na qual, das 99 amostras totais, 56 possuíam a forma de cocos agrupados, de coloração roxa (Gram-positivo), identificando ser estafilococos. E as outras 43 amostras ou não possuíam forma de cocos ou não cresceram em manitol (indicando ser de outro grupo bacteriano, portanto não foram sujeitos desta pesquisa).

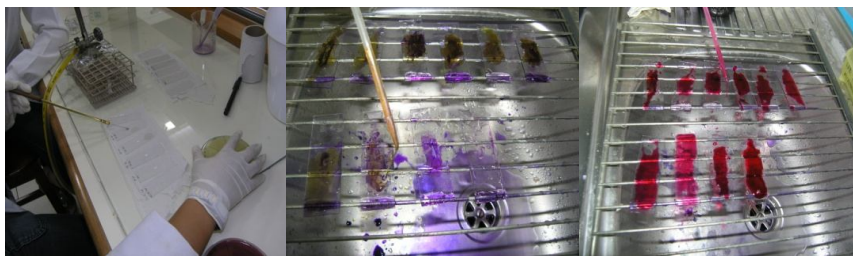


Figura 10. Método de coloração de Gram

5.3 Testes bioquímicos (catalase e coagulase)

Para as espécies de *Staphylococcus* foram realizados os testes de catalase e coagulase (Figura 5), sendo que para catalase as 56 amostras foram positivas.

Analisando o teste de coagulase com plasma de coelho, 20 amostras formaram coágulo, mostrando ser o teste positivo, logo, as amostras são *S. aureus* e 36 amostras não formaram coágulo, indicando ser *Staphylococcus* coagulase-negativo.

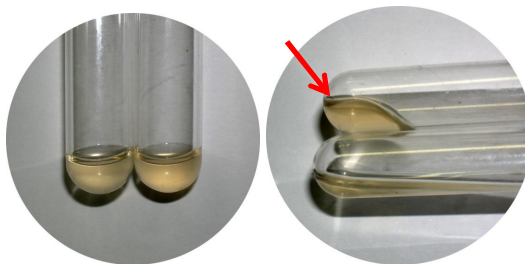


Figura 11: Teste de coagulase para confirmação da espécie *S. aureus* (seta aponta o coágulo formado)

5.4 Extração de DNA genômico e amplificação do gene 16S rRNA

Para as 56 amostras positivas para catalase, foi realizada a extração de DNA genômico pelo método Fenol - Clorofórmio e as mesmas foram visualizadas em gel de agarose 0,8% (Figura 12). Em seguida, foi realizado PCR para o gene 16S rRNA, com o fragmento de massa molecular na altura de 1,000 pb (Figura 13), e foi realizado a purificação das amostras (Figura 8), e seguido de seqüenciamento pelo MegaBACE 1000 da Amersham Bioscience.

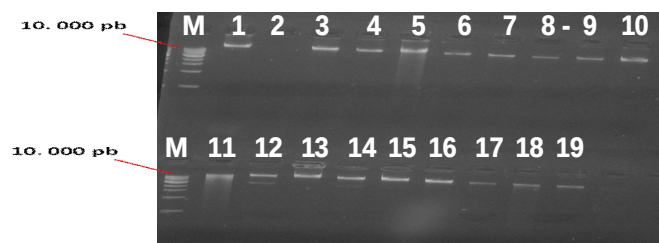


Figura 12. Foto da extração Fenol-Clorofórmio do DNA genômico em gel de agarose a 0,8%. Marcador de 1kb Promega

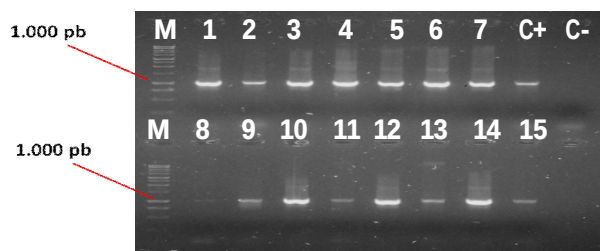


Figura 13. Foto da amplificação do gene 16S rRNA por PCR em gel de agarose a 0,8%, mostrando o tamanho do fragmento de 1,000 pb. Controle positivo (C+): MSSA ATCC 25923; Controle negativo (C-): água deionizada. Marcador de 1kb Fermentas

5.5 Análises por bioinformática das seqüências do gene 16S rRNA

Como resultado das análises do seqüenciamento e comparação em banco de dados, de 56 amostras isoladas, foram encontradas 20 (36%) amostras *S. aureus*, 10 (18%) *S. sciuri*, 4 (7%) *S. saprophyticus*, 1 (2%) *S. epidermidis* e 21 (37%) amostras não obtiveram seqüências de boa qualidade na leitura do eletroferograma, assim identificou-se apenas o gênero *Staphylococcus*.

Tabela 4. Identificação das amostras bacterianas em testes fenotípicos e genotípicos

Amostras	Coloração de Gram	Ágar Manitol	Coagulase	Catalase	Sequenciamento
P18-23	Cocos	+	-	+	<i>S. saprophyticus</i>
P2-43	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P12-33 3D	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P3-1 (33)	Cocos	-	-	+	<i>S. epidermidis</i>
P36-35	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P27-31	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P28-47	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P5-25	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P7 (31)	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P15-31 3D	Cocos	+	-	+	<i>S. saprophyticus</i>
P15-33 3D	Cocos	+	-	+	<i>S. saprophyticus</i>
P26-34	Cocos	+	-	+	<i>S. saprophyticus</i>
P24-46	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P22-34	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P20-31	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
P13-45	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P5-11	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
P13-11	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P6-11	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
P14-3	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
P3-3(32) A	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
1107	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
1109	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
1113	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
1114	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
1117	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
1122	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
1130	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
1131	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
1135	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
1106	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
1102	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
1104	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
1105	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
1112	Cocos	+	-	+	<i>S. sciuri</i>
1118	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
1121	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
1125A	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
1125B	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
1125C	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
1126	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
1116	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>

Amostras	Coloração de Gram	Ágar Manitol	Coagulase	Catalase	Sequenciamento
1120	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
1124	Cocos	+	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>
1128	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
318 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
319 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
320 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
321 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
323 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
324 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
325 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
326 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
327 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
274 S.A.	Cocos	+	+	+	<i>S. aureus</i>
4B	Cocos	-	-	+	<i>Staphylococcus sp.</i>

5.6 Detecção dos genes de resistência *mecA* por PCR e teste de triagem

Para as 56 amostras de *Staphylococcus* foi realizada a PCR para a detecção do gene de resistência *mecA* (Figura 14). Apenas quatro amostras amplificaram para o gene de resistência, dez amostras apresentaram bandas fracas para um dos genes e não amplificaram para o outro, sendo consideradas negativas. Assim, 52 amostras não amplificaram para os dois genes de resistência, portanto são sensíveis. E as mesmas 56 amostras, a fim de se confirmar a resistência foram semeadas em placas de Petri contendo ágar com oxacilina e NaCl, para teste de triagem, sendo que apenas as 4 amostras positivas para o gene *mecA*, cresceram neste meio, portanto, essas amostras são resistentes (Tabela 5).

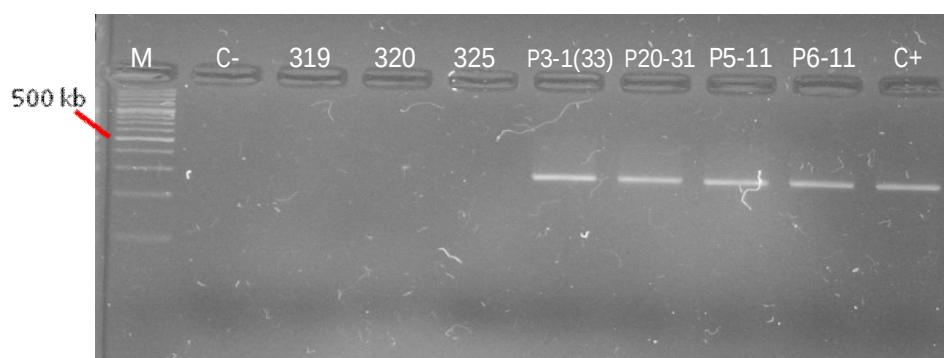


Figura 14. Foto da amplificação do gene *mecA* com os iniciadores *mecA* F e *mecA* R, na altura espera de aproximadamente 500pb para as amostras 319, 320, 325, P3-1(33), P20-31, P5-11 e P6-11, C+ (MRSA ATCC33591) e C- (água deionizada) em gel de agarose a 2% e M (marcador 100pb da Bio-Rad)

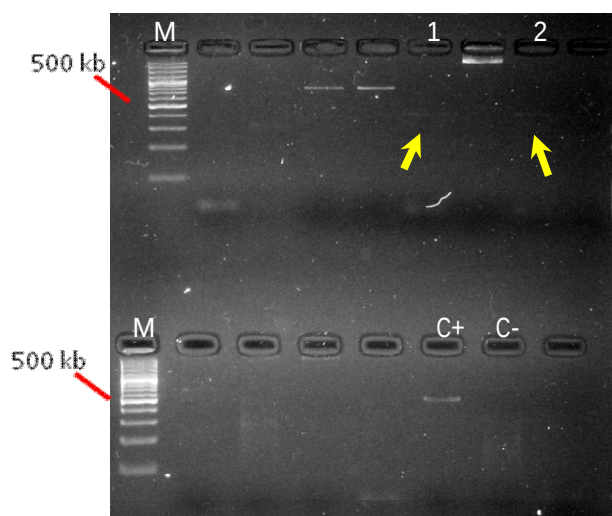


Figura 15. Foto da amplificação do gene *mecA* com os iniciadores *mecA* F e *mecA* R, na altura esperada de aproximadamente 500pb para o C+ (MRSA ATCC33591) e sem amplificação para o C- (água deionizada). As amostras 1 (P15-31 3D) e 2 (P15-33 3D) apresentaram bandas fracas para esse gene, sendo consideradas negativas. Gel de agarose a 2% e M (marcador 100pb da Bio-Rad)

Tabela 5. Resultado da PCR e teste de triagem das 56 amostras isoladas

Amostras	<i>mec A</i>	Teste de Triagem	Amostras	<i>mec A</i>	Teste de Triagem
P18-23	-	-	1131	-	-
P2-43	-	-	1135	-	-
P12-33 3D	-	-	1106	-	-
P3-1 (33)	+	+	1102	-	-
P36-35	-	-	1104	-	-
P27-31	-	-	1105	-	-
P28-47	-	-	1112	-	-
P5-25	-	-	1118	-	-
P7 (31)	-	-	1121	-	-
P15-31 3D	-	-	1125A	-	-
P15-33 3D	-	-	1125B	-	-
P26-34	-	-	1125C	-	-
P24-46	-	-	1126	-	-
P22-34	-	-	1116	-	-
P20-31	+	+	1120	-	-
P13-45	-	-	1124	-	-
P5-11	+	+	1128	-	-
P13-11	-	-	318 S.A.	-	-
P6-11	+	+	319 S.A.	-	-
P14-3	-	-	320 S.A.	-	-

Amostras	mec A	Teste de Triagem	Amostras	mec A	Teste de Triagem
P3-3(32) A	-	-	321 S.A.	-	-
1107	-	-	323 S.A.	-	-
1109	-	-	324 S.A.	-	-
1113	-	-	325 S.A.	-	-
1114	-	-	326 S.A.	-	-
1117	-	-	327 S.A.	-	-
1122	-	-	274 S.A.	-	-
1130	-	-	4B	-	-

5.7 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para verificar a resistência aos antibióticos, as amostras que cresceram no teste de triagem e aquelas que amplificaram fracamente na PCR, foram submetidas a teste de sensibilidade antimicrobiana, totalizando 31 amostras. Sendo as 4 amostras que foram positivas para triagem à oxacilina apresentaram resistência a mais de um antibiótico, com exceção da vancomicina, à qual nenhuma apresentou resistência.

Destas quatro amostras, uma apresentou resistência para quatro antibióticos (PEN, MET, CLI e OXA), duas apresentaram resistência para três antibióticos (PEN, MET, e OXA) e uma amostra apresentou resistência para dois antibióticos (PEN e OXA), sendo intermediária para meticilina.

Das 27 amostras, das quais 10 na primeira PCR apresentaram baixa amplificação e não apresentaram resistência no teste de triagem, quando submetidas ao antibiograma uma foi resistente a 3 antibióticos (PEN, MET e OXA), uma amostra foi resistente a 2 antibióticos (PEN e OXA) e intermediária a 1 antibiótico (MET), duas foram resistentes a 2 antibióticos (PEN e OXA), uma foi resistente a 1 antibiótico (OXA) e intermediária a 2 antibióticos (MET e CLI), duas foram resistentes a 1 antibiótico (OXA) e intermediária a 1 antibiótico (MET) sendo intermediária para 1 antibiótico (CLI) e três amostras foram sensíveis a todos antibióticos. Oito amostras escolhidas de forma aleatória apresentaram os seguintes resultados, duas amostras foram resistentes a 2 antibióticos (PEN e OXA), uma amostra foi intermediária para 1 antibiótico (MET) e cinco amostras foram sensíveis a todos antibióticos. As outras nove amostras que são da espécie de *S. aureus* e foram submetidas a MLST, apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos, com exceção da amostra 319 S.A. que foi intermediária para 1 antibiótico (MET).

Tabela 6. Resultado dos testes de sensibilidade das amostras pesquisadas

Amostras	Penicilina	Meticilina	Clindamicina	Oxacilina	Vancomicina
P2-43	R	S	S	R	S
P3-1 (33)	R	R	R	R	S
P27-31	R	S	S	R	S
P5-25	R	S	S	R	S
P7 (31)	R	S	S	R	S
P15-31 3D	R	I	S	R	S
P15-33 3D	S	I	I	R	S
P20-31	R	I	S	R	S
P13-45	S	I	S	S	S
P5-11	R	R	S	R	S
P6-11	R	R	S	R	S
P14-3	S	I	S	R	S
1107	R	R	I	R	S
1117	S	S	S	S	S
1122	S	S	S	S	S
1130	S	S	S	S	S
1131	S	S	S	S	S
1135	S	I	S	R	S
1125A	S	S	S	S	S
1125B	S	S	S	S	S
1126	S	S	S	S	S
1116	S	S	S	S	S
318 S.A.	S	S	S	S	S
319 S.A.	S	I	S	S	S
320 S.A.	S	S	S	S	S
323 S.A.	S	S	S	S	S
324 S.A.	S	S	S	S	S
325 S.A.	S	S	S	S	S
326 S.A.	S	S	S	S	S
327 S.A.	S	S	S	S	S
274 S.A.	S	S	S	S	S
MRSA	R	R	R	R	S

Legenda: R= resistência, I= intermediário e S= sensível

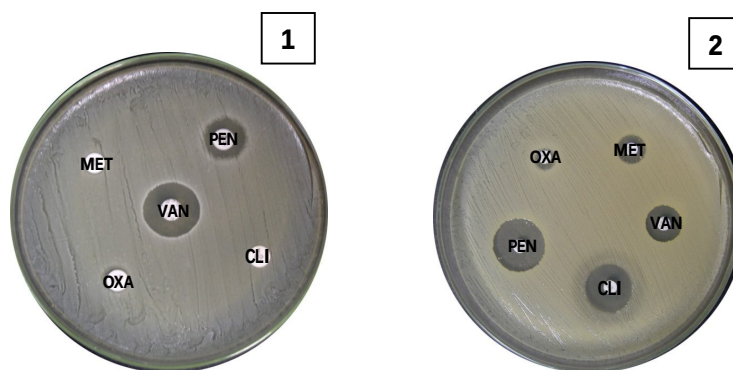


Figura 16. Resultado do teste antibiograma para duas amostras positivas para o gene *mecA*. 1- amostra P3-1(33), 2- amostra P20-31

Tabela 7. Resultado dos testes fenotípicos para resistência das amostras resistentes

Amostras positivas em PCR (<i>mecA</i>) e teste de triagem					
Amostras	PEN	MET	CLI	OXA	VAN
P3-1 (33)	R	R	R	R	S
P20-31	R	I	S	R	S
P5-11	R	R	S	R	S
P6-11	R	R	S	R	S

Tabela 8. Resultado dos testes fenotípicos para resistência

Tabela das amostras caracterizadas por MLST					
Amostras	PEN	MET	CLI	OXA	VAN
1117	S	S	S	S	S
1122	S	S	S	S	S
1130	S	S	S	S	S
1131	S	S	S	S	S
1135	S	I	S	R	S
1125A	S	S	S	S	S
1125B	S	S	S	S	S
1126	S	S	S	S	S
1116	S	S	S	S	S
318 S.A.	S	S	S	S	S
319 S.A.	S	I	S	S	S
320 S.A.	S	S	S	S	S
323 S.A.	S	S	S	S	S
324 S.A.	S	S	S	S	S
325 S.A.	S	S	S	S	S
326 S.A.	S	S	S	S	S
327 S.A.	S	S	S	S	S
274 S.A.	S	S	S	S	S

5.8 Sistema de identificação (ID) de Gram-positivos (GP) BBL Crystal

Por esta técnica, foram testadas oito amostras: uma amostra controle positivo MSSA ATCC25923, três amostras escolhidas ao acaso e as quatro amostras que confirmaram resistência a meticilina. Na tabela abaixo estão descritos os resultados encontrados.

Tabela 9. Resultado da identificação pelo sistema de identificação para Gram-positivas

Amostra	Espécie
P3-1 (33)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
P15-31 3D	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
P20-31	<i>Staphylococcus sciuri</i>
P5-11 S.A.	<i>Staphylococcus sciuri</i>
P6-11	<i>Staphylococcus sciuri</i>
1122	<i>Staphylococcus aureus</i>
1135	<i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA ATCC25923	<i>Staphylococcus aureus</i>

5.9 Tipagem de Sequências de Multilocus (MLST)

Para o MLST, por meio dos cinco genes constitutivos, foram obtidos diferentes alelos numerados ao acaso, sendo descritos 6 perfis nomeados por números romanos (I a VI) (Tabela 8). Ao analisar o dendograma do MLST das amostras de *S. aureus* (Figura 16), foram encontrados dois grandes agrupamentos principais, também chamados de “clusters”. Os agrupamentos apresentaram a distância de 0,95 cada um das outras amostras, sendo chamado de MLST 1 (8 amostras com perfil I) e MLST 2 (10 amostras com perfis II, III, VI, Padrão A e Padrão B), dentro deste agrupamento foram formados dois agrupamentos menores, com distância de 0,2 cada um, nomeados de MLST 2A (perfil II) e MLST 2B (perfil III). Duas amostras apresentaram uma distância das outras amostras de 0,8 cada uma, sendo 1 amostra com perfil IV e 1 com perfil V, esta possui a mesma sequência do gene *aroE* da amostra de perfil IV e 1 amostra com distância de 0,6 possui o perfil VI. As sequências analisadas podem ser observados no anexo 3.

Tabela 10. Perfil dos alelos associados com amostras de *S. aureus*

Perfil dos alelos (<i>aroE</i> , <i>glpF</i> , <i>arcC</i> , <i>pta</i> , <i>tpi</i>)	Designação do Perfil alélico	Frequência Relativa
2, 2, 2, 3, 2	I	8
3, 3, 2, 2, 3	II	5
3, 3, 2, 2, 7	III	2
1, 1, 1, 1, 1	IV	1
1, 5, 4, 6, 6	V	1
4, 3, 3, 5, 4	VI	1
6, 3, 6, 5, 9	Padrão A	1
3, 3, 7, 7, 7	Padrão B	1

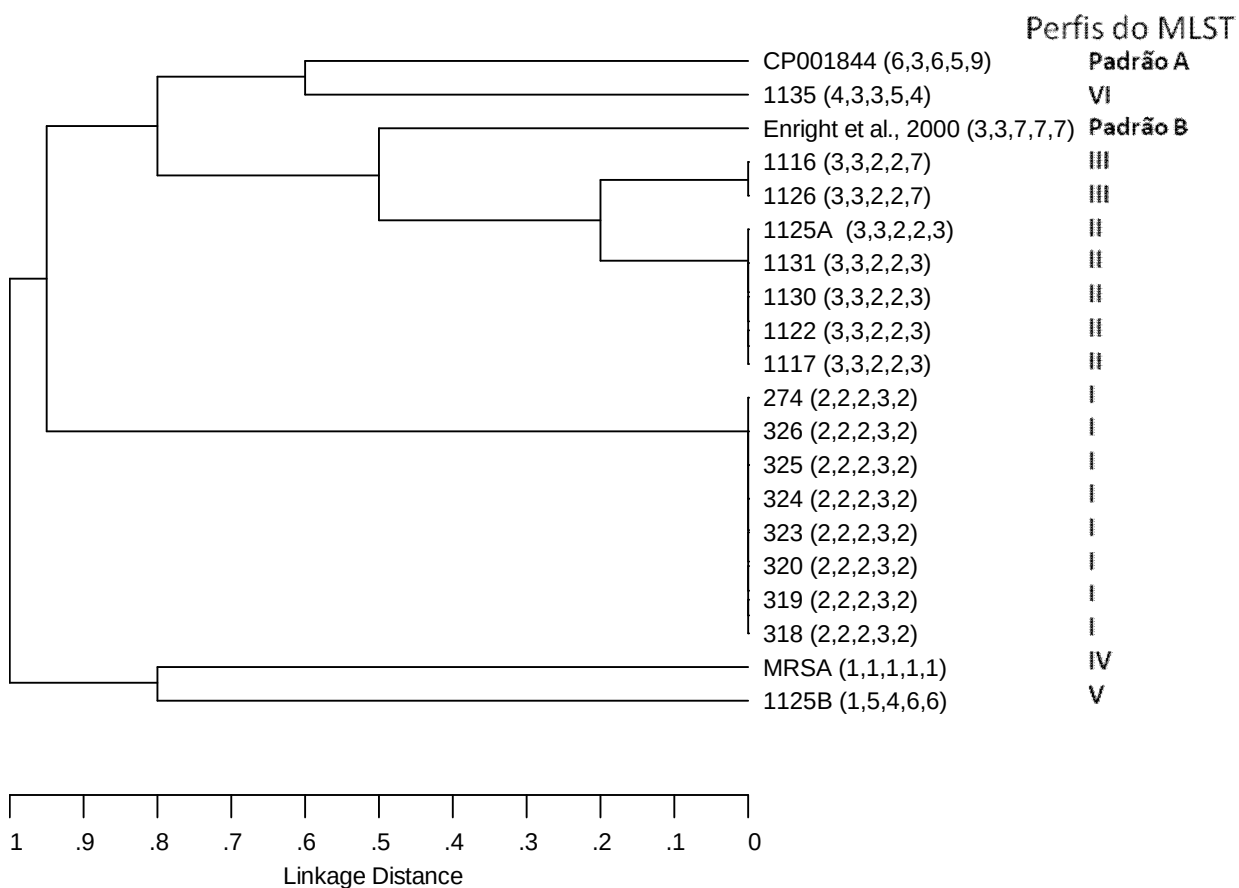


Figura 17. Dendrograma do MLST das 18 amostras de *Staphylococcus aureus* por meio do Software S.T.A.R.T. Perfil I amostras clínicas coletadas na cidade de Manaus e Perfis II, III, Ve VI são amostras clínicas coletadas na cidade de Porto Velho

6. DISCUSSÃO

Todas as amostras que vieram da coleção bacteriana da UFAM e FIOCRUZ foram reativadas e procurou-se obter culturas puras, para viabilidade nesta pesquisa, das quais, os testes bioquímicos, para as 56 amostras estavam dentro dos padrões citados na literatura, nos quais os *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas, em forma de cocos e catalase positivas. A espécie *S. aureus* possui coloração amarelo-dourada devido à presença de pigmentos carotenóides na membrana citoplasmática, essa é a sua característica macroscópica (LOWY, 1998; KONEMAN et al, 2001).

Em ágar Champman a espécie *S. aureus* pode ser detectado pela presença de um halo amarelo ao redor das colônias isoladas, o que indica a produção de ácido a partir do manitol, e assim são classificadas como fermentadoras de manitol. Entretanto, outras espécies de estafilococos isoladas com pouca frequência também podem produzir ácidos a partir do manitol. Em consequência desses micro-organismos manitol-positivo, deve-se realizar teste quanto à produção de coagulase (KONEMAN et al., 2001), fato que diferencia os grupos em coagulase positivos e negativos. Um exemplo é a bactéria *S. sciuri*, as quais são fermentadores de manitol e são coagulase negativos (COUTO et al., 2003).

Assim, neste trabalho, esses testes resultaram em 43 amostras que fermentaram o manitol e 13 amostras não eram fermentadoras de manitol. Dentre as 43 amostras, 20 apresentaram resultado positivo para o teste de coagulase, indicando ser *Staphylococcus aureus*. E as outras 23 amostras fermentadoras de manitol e as 13 não fermentadoras foram coagulase negativa.

Os métodos convencionais para identificação bacteriana são trabalhosos, requerem muito tempo para realização e não é considerado adequado para ser implantado como procedimento de rotina nos laboratórios clínicos (KONEMAN et al., 2001). Logo, para a confirmação da caracterização fenotípica e diferenciação das espécies, foram realizados testes moleculares como, análise por PCR com amplificação da região codificadora da região 16S RNA ribossômico (16S rRNA). Essa é uma região específica para identificar bactérias, devido à atuação de anelamento das regiões conservadas destes micro-organismos.

A identificação de organismos por amplificação e seqüenciamento do gene 16S rRNA tem sido descrita em relatos específicos, desde enfocar um filo ou gênero bacteriano particular, como espécies de *Mycobacterium* (CLOUD et al., 2002), bacilos

aeróbios Gram-negativos (FERRONI et al., 2002) e aeróbios Gram-positivos (BOSSHARD et al., 2002); até identificar isolados diversos, como coleções de isolados bacterianos não identificados de amostras clínicas e ambientais (DRANCOURT et al., 2000) e identificação de novas bactérias de isolados clínicos atípicos (DRANCOURT et al., 2004).

Portanto, os resultados das análises com 16S rRNA desta pesquisa, ajudaram no esclarecimento da interpretação dos resultados dos testes bioquímicos, levando até a identificação da espécie bacteriana, encontrando assim, 20 (35,71%) espécies de *S. aureus*, 10 (17,54%) de *S. sciuri*, 4 (7,01%) de *S. saprophyticus*, 1 (1,75%) de *S. epidermidis* e 21 (36,85%) de *Staphylococcus* sp. Estas ultimas amostras não apresentaram bons resultados na análise do eletroferograma, assim não tinham boas seqüências para análises com 16S rRNA, e não foi possível diferenciar as espécies somente pelos testes fenotípicos. Segundo Granda et al. (2008), ao comparar as técnicas microbiológicas tradicionalmente utilizadas (fenotípicas) e as técnicas moleculares, pode-se inferir que depois de estabelecida a estrutura laboratorial para ambas as técnicas, o tempo de análise requerido é menor para a baseada em características genotípicas, principalmente quando se utiliza PCR.

Embora a análise com o gene 16S rRNA seja mais prática e rápida que as análises com testes fenotípicos, foram encontradas algumas dificuldades, como, encontrar um local com equipamento para seqüenciar as amostras e também a obtenção de seqüências de boa qualidade na leitura do eletroferograma. Pois, com o gene 16S rRNA nem sempre se conseguiu identificar a espécie bacteriana, para que isso aconteça é necessário que as amostras seqüenciadas tenham seqüências grandes mesmo após serem trimadas, essa eficiência pode ser prevista ao se observar a qualidade do eletroferograma. Caso contrário, não há possibilidade de chegar taxonomicamente a uma única espécie e sim em várias espécies deixando dúvidas na identificação. Isso acontece tanto para análises comparativas com o banco de dados do “GeneBank”, utilizando a ferramenta BLASTN do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), como para o “Ribosomal Database Project” (RDP). Este último ainda exige maior qualidade nas seqüências para se chegar a uma única espécie bacteriana. (BOUDEWIJNS et al., 2006).

Das amostras isoladas foi observado que em três amostras ao serem inoculadas, essas colônias bacterianas apresentavam características fenotípicas peculiares, por estas

apresentarem em uma mesma colônia duas cores (amarela e branca), fato que se tornava intrigante para a confiabilidade da pureza bacteriana. Porém, após várias buscas na literatura, encontrou-se que Couto et al. (2003) ao analisar o desenvolvimento de resistência a meticilina em isolados clínicos de *S. sciuri* observava fenotipicamente, que ao semear uma colônia em Ágar Soja Tripicase (trypticase soy Agar – TSA) de *S. sciuri*, denominada de K3, havia uma predominância de colônias amarelas com ocasionais misturas de colônias brancas. Isso também gerava dúvida.

A fim de esclarecer a dúvida se havia contaminação ou não, Couto et al. (2003) semearam uma colônia da amostra original K3 e também cultivou duas colônias distintas: uma amarela (K3y) e uma branca (K3w), como resultado, analisou que a colônia K3y segregava-se em amarelas e brancas, e a colônia K3w produziam somente colônias brancas. Assim, algumas das amostras de *S. sciuri*, trabalhadas nesta pesquisa, apresentam também esta peculiaridade (Figura 18).

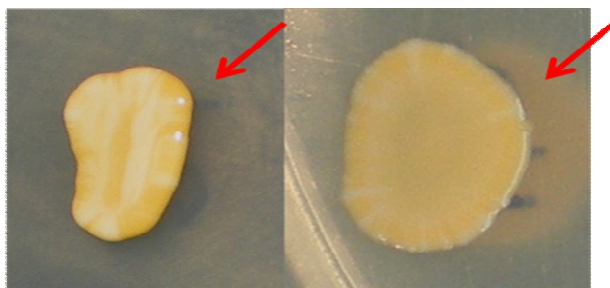


Figura 18. Foto de *S. sciuri* demonstrando a característica bicolor

Todas as amostras foram submetidas a teste amplificação do gene *mecA* por PCR. Segundo Frebourg et al. (1998) e Unal et al. (1992), os métodos convencionais usados para a identificação de isolados de MRSA são demorados e possuem um índice de 80-95% de confiabilidade, assim as alternativas moleculares, baseadas principalmente em PCR para amplificação do gene específico para *mecA* na identificação de amostras meticilina resistentes tem sido relatado por ser uma detecção rápida e específica.

O gene *mecA* é o gene estrutural para uma proteína fixadora de penicilina de baixa afinidade (PBP 2' ou PBP 2a) que é encontrada em cepas de *S. aureus* resistente à oxacilina. Entretanto, a presença do gene *mecA* não é específica de MRSA, como também há presença em cepas de várias espécies coagulase-negativas resistentes à

oxacilina (MURAKAMI et al., 1991). Os dados deste trabalho corroboram com essa afirmação, pois como resultado das análises das amplificações com o gene *mecA* foi encontrado quatro amostras coagulase-negativas resistentes a meticilina, sendo 3 (5,35%) amostras de *S. sciuri* e 1 (1,78%) amostra de *S. epidermidis*. Essas amostras eram de pacientes do Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto de Manaus.

Guirguitzova et al. (2002) observaram, no período de 1997 a 1999, na Bulgária, a presença de 229 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativas com significância clínica em infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados. As cepas isoladas corresponderam ao *Staphylococcus haemolyticus* (47,9%), *Staphylococcus saprophyticus* (20,5%), *Staphylococcus epidermidis* (7,9%), *Staphylococcus simulans* (7,4%), *Staphylococcus sciuri* (4,4%), *Staphylococcus capitis* (4,4%), *Staphylococcus xylosus* (2,2%), *Staphylococcus warneri* (2,2%), *Staphylococcus cohnii* (1,3%), *Staphylococcus lentus* (0,9%) e *Staphylococcus hominis* (0,9%).

Os *S. sciuri* estão difundidos na natureza, podendo ser isolados de uma variedade de animais de fazenda, animais de estimação, animais selvagens e bem como uma série de produtos de origens animais (WEBSTER et al., 1994; KLOOS et al., 1997). No entanto, recentemente *S. sciuri* tem sido isolado repetidas vezes de espécimes clínicos humanos, e também a CIM destas espécies para os antibióticos β -lactâmicos têm aumentado (CHESNEAU et al., 1992).

De acordo com Koneman et al. (2001) e Donlan et al. (2002) as cepas de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* são os mais freqüentemente isolados em espécimes de humanos, passando a apresentar resistência à oxacilina e a outros antimicrobianos como macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima e fluoroquinolonas.

Dez amostras, sendo quatro coagulase positivas e seis coagulase negativas, tiveram uma amplificação muito baixa em uma das PCRs, deixando o resultado duvidoso quanto a existência do gene *mecA*. Assim, esses resultados foram confirmados, através de nova extração, amplificação e pelo teste de triagem para oxacilina, no qual as amostras que tiveram qualidade na amplificação da PCR para o gene *mecA*, quando semeadas no ágar seletivo para oxacilina (4% de NaCl e 6 μ g de oxacilina) apresentaram resultados positivos, enquanto todas as outras amostras foram negativas.

A fim de comparar os resultados, foram realizados testes de disco-difusão com essas amostras e com os *S. aureus* que foram amplificados e seqüenciados para análise de MLST. Como resultado, as quatro amostras CONS que se apresentaram positivas para os dois testes, também apresentaram resistência aos antibióticos testados, com exceção do antibiótico vancomicina. No teste com difusão em disco foram testadas também outras amostras de CONS escolhidas de forma aleatória, porém só consideramos resistentes aquelas amostras que demonstraram resistência nos testes de triagem, difusão em disco e amplificaram com boa qualidade o gene *mecA*.

A presença do gene de resistência *mecA* em amostras CONS é um fato importante e também preocupante, pois demonstra, a necessidade de se estudar também as outras espécies de *Staphylococcus*. Tornando assim, alvo de maior preocupação uma vez que as outras espécies de *Staphylococcus* apresentam-se com maior facilidade na pele. Enquanto, nas amostras de *S. aureus* que são os maiores focos de preocupação nos ambientes hospitalares, não foram detectadas a presença deste gene de resistência e também não apresentaram nenhuma atividade significativa contra os antibióticos.

O critério para analisar esses resultados foi baseado em críticas da literatura, a qual relata que resistência fenotípica à oxacilina é variável e depende da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é reconhecida como heterorresistência fenotípica, e se caracteriza pelo fato de que toda população bacteriana é heterogeneamente resistente, assim como todas as células, carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma (MIMICA et al., 2007). Assim, pode-se analisar que em laboratórios que utilizam apenas um dos métodos para diagnósticos podem estar liberando resultados errôneos.

Colli et al. (2009) ao aceitar o desafio de determinar a resistência de *S. aureus* analisou que os testes fenotípicos para o diagnóstico da resistência à oxacilina em estafilococos apresentaram um índice não desprezível de erro (5,6%), isso foi demonstrado empregando os métodos de rotina.

Porém, os métodos com maiores acurácias ainda não são de fáceis acessos em laboratórios de diagnósticos. Um método com acurácia próxima a 100% é a detecção do produto do gene *mecA*, a PBP2a, por meio de métodos de aglutinação em látex (CAVASSINI et al., 1999; FELTEN et al., 2002). Contudo, esses testes ainda são pouco difundidos e utilizados, principalmente devido ao seu custo (FERNANDES et al., 2005; VELASCO et al., 2005).

Das amostras foram escolhidas oito amostras, sendo as quatro resistentes, uma amostra controle de MSSA e três amostras aleatórias para serem testadas no Sistema de identificação (ID) de Gram-positivos (GP) BBL Crystal, demonstrando excelentes resultados na identificação da espécie bacteriana, confirmando para as três amostras com colônias que apresentaram duas cores serem *S. sciuri*. Couto et al. (2003) ao determinarem por análise de população a resistência das colônias variantes K3y e K3w, mostraram que eram resistentes a meticilina e havia retido a estrutura da população heterogênea da cepa original K3, enquanto as culturas de K3w a maioria das células haviam perdido a resistência.

Quanto às amostras de *S. aureus* confirmaram ser sensíveis a oxacilina nos testes de difusão de disco, com exceção das amostras 319 que foi intermediária a meticilina e a 1135 que apresentou resistência a oxacilina e foi intermediária a meticilina.

Com relação à técnica do MLST, embora esta exija um alto custo e equipamentos específicos, ela é uma técnica altamente discriminatória. Como resultado desta técnica pode-se observar um fato muito interessante, o qual as amostras, da região Norte, das cidades de Manaus (MLST 1) e Porto Velho (MLST 2) apresentaram perfis moleculares diferentes, demonstrando a importância do mapeamento gênico em cada local da região. Todas as amostras do agrupamento MLST 1 apresentaram perfis iguais, porém as amostras do agrupamento MLST 2 apresentaram uma variação nos perfis, por isso foi subdividido em dois agrupamentos menores MLST 2A e MLST 2B, mostrando que numa mesma cidade as espécies podem adquirir mudanças gênicas, seja por motivo de alterações no próprio meio ou levadas de outras áreas para o local. As exceções observadas foram na linhagem 1125B, a qual não apresentou resistência em nenhum dos testes realizados, e a amostra 1135 que apresentou resistência a oxacilina e teve ação intermediária com a meticilina em testes de difusão em disco.

Assim, essas informações contribuem para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas e epidemiológicas como, desenvolvimento de Kits de identificação bacteriana, produção de vacinas estafilocócica, prevenção e controle de surtos, e mapeamento estafilocócico das regiões.

7. CONCLUSÕES

1. Testes fenotípicos e genotípicos proporcionam melhores resultados quando analisados juntos, pois uma análise individual pode ocasionar resultados errôneos;
2. Algumas espécies de *Staphylococcus sciuri*, além de possuírem peculiaridade fenotípica podem sim ser encontradas em amostras clínicas, como observados nesses resultados;
3. O gene *mecA* pode estar presente também em estafilococos coagulase negativa, como confirmado nessas análises, merecendo também ser motivo de atenção nas unidades hospitalares;
4. A técnica do MLST, apesar de ser mais dispendioso, é altamente discriminatória, e oferece dados de mapeamentos gênicos para pesquisas posteriores;
5. As amostras das cidades de Manaus e Porto Velho possuem perfis moleculares diferentes.

9. ORÇAMENTO

9.1 Despesas de capital

Qtde	DESCRIÇÃO DOS ITENS Capital (Equipamentos e material permanente)	Individual R\$	Valor total R\$
01	Agitador Vórtex com velocidade regulável e plataforma para agitação. Voltagem de 220V ou Bivolt:220/110V.	1.200,00	1.200,00
01	Sistema de eletroforese horizontal composto de fonte de eletroforese capaz de operar pelo menos entre 10 a 250V, 1 a 500mA e 1 a 150V, com temporização. Com três cubas de eletroforese de dimensões de 7 x 8 cm (minicuba), de 12 x 14 cm (minicuba) e 20 x 25 cm (maxicuba). Com demais acessórios para perfeito e completo funcionamento.	6.000,00	6.000,00
01	Balança Analítica - Precisão de leitura de 0,1 mg, com tara, tempo de estabilização de aproximadamente 3 seg funções internas controladas por microprocessadores.	5.000,00	5.000,00
01	SHAKER: Estufa de bancada com agitação e temperatura controladas. Capaz de atuar no mínimo de 0 a 200 rpm, e temperatura até 60°C. Com plataforma universal para frascos erlenmeyers de 100, 250, 500 e 1000 ml.	15.000,00	15.000,00
01	Agitador Magnético - Velocidade regulável entre 50 e 2500 rpm, controle eletrônico de velocidade, agitação de até 2 litros de substâncias líquidas. Dimensões de 8 x 10 x 12 cm (no mínimo).	1.500,00	1.500,00
03	Micropipetas Monocanais Automáticas de 0,5 - 10ul; 10 - 1000ul; 100 - 1000 ul..	1.500,00	4.500,00
TOTAL GERAL			33.200,00

9.2 Despesas de custeio

Qtde	DESCRIÇÃO DOS ITENS Itens de Custeio – Passagens aéreas (discriminada por trechos)	Valor do trecho	Total
01	Manaus - São Paulo - Manaus	1.400,00	1.400,00
	SUBTOTAL – PASSAGENS AÉREAS		1.400,00
Qtde	DESCRIÇÃO DOS ITENS Itens de Custeio – Diárias	Valor individual	Valor total
6	Diárias	200,00	1.200,00
	SUBTOTAL – DIÁRIAS		1.200,00
Qtde	DESCRIÇÃO DOS ITENS – Custeio Material de Consumo (Plásticos) (descrição detalhada de cada item)	Valor individual	Valor total
3	- Microtubo Safe-Lock, grad. - 0,5ml pacote c/ 1000	100,98	302,94
3	- Microtubo Safe-Lock, graduado, 0,2ml, pacote c/ 500	100,98	302,94
3	- Microtubo Safe-Lock, graduado, 2,0ml, pacote c/ 1000	100,98	302,94
5	- Ponteiras P1000 universal, pct c/1000 – AZUIS	89,90	449,50
5	- Ponteira de 0 a 200, pct c/1000 – AMARELAS	89,90	449,50
5	- Ponteira de 0 a 10 ul, pct cx c/ 200 und. – BRANCAS	109,00	449,50
10	- Placas Petri, tam. grande, plástico, estéreis, pct com 20 und.	42,00	420,00
10	- Tubo de polipropileno com tampa de rosca, cap. 50ml	42,00	420,00
1	- Parafilm, rolo com 3,0 metros transparente.	130,00	130,00

1	- Filmito (Filme PVC), rolo contendo 20 metros.	150,00	150,00
1	- pacote de selos para microplacas de 96 poços.	70,00	70,00
3	- Criotubos 1,2ml c/100u	100,00	300,00
100	- Suporte p/ micropipetas multicanal (p/ 1 micropipeta)	1,01	101,00
1	- Suporte p/ pipetas monocal (p/ 6 micropipetas)	68,30	68,30
1	- Rack 80 microtubos 1,5 - 2,0ml	68,50	68,50
10	- Microplaca com 96 poços fundo U, estéril, pct com 20 und.	8,09	80,90
2	- Cx. de Luvas descartável em látex tamanhos P	8,00	16,00
	SUBTOTAL – PLÁSTICOS		4.082,02
Qtde	DESCRIÇÃO DOS ITENS – Custeio (Enzima, iniciadores e Kits para Biologia Molecular)	Valor individual	Valor total
1	- Low DNA Mass-Ladder 200ug	300,00	600,00
5	- Pares de oligonucleotídeos sintéticos p/ PCR – Primers <i>mecA, vanA, arcC, aroE, glpF, gmK, pta, tpi</i> e <i>yqiL</i> (forward' e reverse').	500,00	9.500,00
1	- 1Kb plus DNA Ladder 100ug	300,00	300,00
3	- Enzima Taq DNA polimerase - kit com enzima, tp10X, MgCl ₂	500,00	1.500,00
1	- Enzima de restrição <i>SmaI</i>	600,00	600,00
01	- Kit “GFX™ PCR - DNA and GEL BAND PURIFICATION KIT”, AMERSHAM BIOSCIENCE®	1.500,00	1.500,00
01	- DNTPs	500,00	500,00
01	- Kit seqüenciamento	2.500,00	2.500,00
	SUBTOTAL – ENZIMA, INICIADORES E KITS P BIOL MOL		17.000,00
	TOTAL GERAL		23.682,02

10. FONTES DE RECURSOS:

Este projeto foi financiado pelas seguintes instituições com recursos dos projetos aprovados pelos programas da FAPEAM: PPSUS e PIPT, coordenado pela Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ/AM e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com apoio financeiro da bolsa de Mestrado.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecções de Serviços de Saúde**. Módulo V, p. 1-5, 2004.

ANTINAC, A E TOMASZ, A. **Reconstruction of the Phenotypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Replacement of the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* with a Plasmid-Borne Copy of *Staphylococcus sciuri* *pbpD* Gene**. Antimicrob. Agents Chemother. 53:435–441. 2009.

ARCHER, G. L.; MAYHALL, C. G. **Comparison of epidemiological markers used in the investigation of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections**. J Clin Microbiol, v. 18, p. 395- 399, 1983.

AGVALD-ÖHMAN, C.; LUND, B.; EDLUND, C. **Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit**. Critical Care - Open access, v. 8, p. r42-r47, 2003.

BALOWS, A., W. J. HAUSTER, JR., K.L. HERRMANN, H.D. ISENBERG, E H.J. SHADOMY (ed.) **Manual of clinical microbiology**, 5ª ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1991.

BARON, E.J., L.R. PETERSON, E S.M. FINEGOLD. Bailey e Scott's **diagnostic microbiology**. 9ª ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis. 1994.

BERGLUND, C.; TERUYO, I; IKEDA, M.; MA, X. X.; SÖDERQUIST, B.; HIRAMATSU, K. **Novel Type Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Sweden**. Antimicrob. Agents and Chemother, v. 52, p. 3512-3516, 2008.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. **Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation**. Appl. Environ. Microbiol. v.63(7), p. 2647–2653, 1997.

BOSSHARD, P. P., S. ABELS, R. ZBINDEN, E. C. BOTTGER, . ALTWEGG. **Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation)**. J. Clin. Microbiol. 41: 4134–4140, 2003.

BOUDEWIJNS, M; BAKKERS, J.M.; STURM, P.D.J.; MELCHERS, W.J.G. **16S rRNA Gene Sequencing and the Routine Clinical Microbiology Laboratory: a Perfect Marriage?** . J. Clin. Microbiol. V. 40(3), p.3469-3470, 2006.

CENTER, K. J.; REBOLI, A. C.; HUBLE, R.; RODGERS, G. L.; LONG, S. S. **Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri***. J. Clin. Microbiol. V. 41, p. 4660-4665, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: ***Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States**. Morb Mortal Wkly Rep MMWR, v. 51, p. 565-567, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*– United States**. Morb Mortal Wkly Rep MMWR , v. 53, p. 322-323, 2004.

CHAMBERS, HF. **Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications.** In: MIMICA, JM; MENDES, CMF. **Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*.** J Bras Pato Med Lab v 43 n 6, p. 399-406, 2007.

CHESNEAU, O., S. AUBERT, A. MORVAN, J. L. GUESDON, AND N. EL SOLH. **Usefulness of the ID32 staph system and a method based on rRNA gene restriction site polymorphism analysis for species and subspecies identification of staphylococcal clinical isolates.** J. Clin. Microbiol. 30:2346–2352, 1992.

CLARK, N. C.; COOKSEY, R. C.; HILL, B. C.; SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C. **Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U. S. hospitals.** *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, p. 2311-2317, 1993.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement,** document M100-S17. Wayne, PA, USA: CLSI, 2007.

CLOUD, J. L., H. NEAL, R. ROSENBERY, C. Y. TURENNE, M. JAMA, D. R. HILLYARD, K. C. CARROLL. **Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries.** J. Clin. Microbiol. 40:400–406, 2002.

COOKE, E. M.; MARPLES, R. R. **Outbreaks of nosocomial infection due to *Staphylococcus aureus*.** J Hosp Infect, v. 6, p. 241-244, 1985.

COUTO, I.; DE LENCASTRE, H.; SEVERINA, E.; KLOOS, W.; WEBSTER, J.; SANTOS SANCHES, I.; TOMASZ, A. **Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*.** *Microb. Drug Resist.* v. 2, p. 377–391, 1996.

COUTO, I., WU, S. W., TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. **Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species.** *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 645–653, 2003.

CUNHA, M. L. R. S. & LOPES, C. A. M. **Estudos da produção de β -lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos.** J. Bras. Patol. Med. Lab. V. 38, p. 281-290, 2002.

CUNHA L, LOPES CA, RUGOLO LM, CHALITA LV. **CLINICAL significance of coagulase-negative *staphylococci* isolated from neonates.** Journal de Pediatria 78:279-288, 2002.

DE GIUSTI, M.; PACIFICO, L; TUFI, D; PANERO, A; BOCCIA, A AND C. CHIESA. **Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 44, p. 351-358, 1999.

DE SOUSA, M. A.; DE LENCASTRE, H. **Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones.** FEMS Immunol Med Microbiol. v. 40, p. 101–111, 2004.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SCHMITZ, F. J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J; JONES, R. N.; BEACH, M.; GROUP S. P. **Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United**

States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis*, v. 32, p.S114-S132, 2001.

DEURENBERG, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A.; STOBBERINGH, E. E. **The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Clin Microbiol and Infect. Diseases. Review*. V. 13, p. 222–235, 2006.

DRANCOURT, M., C. BOLLET, A. CARLIOZ, R. MARTELIN, J. P. GAYRAL, D. RAOULT. **16S ribosomal sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates.** *J. Clin. Microbiol.* 38:3623–3630, 2000.

EGIDO, J. M. e BARROS, M. L. **Preliminary study of community-acquired *Staphylococcus aureus* infection in Manaus Hospital, Amazonia Region, Brazil.** *Rev Soc Bra Medicina Tropical.* 36(6):707-709, nov-dez, 2003.

ENRIGHT, M. C.; DAY, N. P.; DAVIES, C. E.; PEACOCK, S. J.; SPRATT, B. G. **Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 1008-15, 2000.

FELTEN, A. et al. **Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system and the MRSA-screen latex agglutination test.** *J Clin Microbiol*, v. 40, p. 2766-71, 2002.

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

FERREIRA, WA.; VASCONCELOS, WS; FERREIRA,CM; SILVA, MFP; GOMES, JS e ALECRIM, MGC. **Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas.** *Artigo Original.* V.38(2):83-92. Abr.-jun. 2009.

FERRONI, A., I. SERMET-GAUDELUS, E. ABACHIN, G. QUESNE, G. LENOIR, P. BERCHE, J. L. GAILLARD. **Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center.** *J. Clin. Microbiol.* 40:3793– 3797, 2002.

FREBOURG NB, NOUET D, LEMÉE L, MARTIN E, LEMELAND JF. **Comparison of ATB staph, rapid ATB staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing mecA.** *J Clin Microbiol*, 36: 52- 57, 1998.

FRIGATTO EA, MACHADO AM, PIGNATARI AC, GALES AC. **Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase negative staphylococci?** *J Clin Microbiol* 43:2028-2029, 2005.

GANDRA EA, GANDRA TKV, MELLO WS DE, GODOI HS. **Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos.** *Acta Sci. Technol. Maringá*, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GEHA, D. J.; UHL, J. R.; GUSTAFERRO, C. A.; PERSING, D. H. **Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory.** *J Clin Microbiol*, v. 32, p. 1768-1772, 1994.

GUIRGUITZOVA B, CHANCOVA D, ZOZIKOV B. **The Staphylococci as uropathogens, frequency of isolation in hospitalized patients and sensitivity to antimicrobiol agents.** Ann Urol. Oct;36(5):341-7, 2002.

HALLIN, M.; DEPLANO, A.; DENIS, O.; MENDONÇA, R. de; RYCK, R. de; STRUELENS, M.J.. **Validation of Pulsed-field Gel Eletrophoresis and spa Typing for Long-Term, Nationwide Epidemiological Surveillance Studies of *Staphylococcus aureus* Infections.** J Clin Microbiol. January, v. 45, p. 127-133, 2007.

HANIFAH, Y. A.; HIRAMATSU, K.; YOKOTA, T. **Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with nosocomial infections in the University Hospital, Kuala Lumpur.** J Hosp Infect. v. 21, p. 15-28, 1992.

HANIFAH, Y.A.; HIRAMATSU, K. **Pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with nosocomial infections.** Malaysian J Pathol. V. 16(2), p. 151-156, 1994.

HEDIN G, WIDERSTRM M. **Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis;17:673-5 1998.

HEIKENS E, FLEER A, PAAUW A, FLORIJN A, FLUIT AC. **Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci.** Journal of Clinical Microbiology 43:2286-2290, 2005.

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

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. **Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of coagulase gene.** J. Clin. Microbiol. v. 36, p.1083–1089, 1998.

HOOKEY, J. V.; EDWARDS, V.; COOKSON, B. D.; RICHARDSON, J. F. **PCR-RFLP analysis of the coagulase gen of *Staphylococcus aureus*: application to the differentiation of epidemic and sporadic methicillin-resistant strains.** J. Hosp. Infect., v. 42, p.205–212, 1999.

JEVONS, M. P. **‘Celbenin’-resistant Staphylococci.** Br. Med. J. v. 1, p. 124–125, 1961.

JOLLEY KA, FEIL EJ, CHAN MS, MAIDEN MC. **Bioinformatics**, 17, 1230-1231, 2001.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRATSU, K. **A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromossome mec, encodes methicilin resistance in *Staphylococcus aureus*.** Agents Chemother. v. 48, p. 2637 – 2651, 2000.

KIRST, H. A.; THOMPSON, D. G.; NICAS, T. I. **Historical yearly usage of vancomycin.** Antimicrob. Agents Chemother. v. 42, p.1303–1304, 1998.

KLOOS, W. E., AND T. L. BANNERMAN. **Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci.** Clin. Microbiol. Rev. 7:117–140. 1994.

KLOOS, W. E., D. N. BALLARD, J. A. WEBSTER, R. J. HUBNER, A. TOMASZ, I. COUTO, G. L. SLOAN, H. P. DEHART, F. FIEDLER, K. SCHUBERT, H. DE LENCASTRE, I. S.SANCHES, H. F. HEATH, P. A. LEBLANC, AND A. LJUNGH. **Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of**

methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:313–323. 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, Jr. W.C. **DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO - Texto e Atlas Colorido** – 5ª ed. Rio de Janeiro-RJ Guanabara Koogan S.A., 1465p, 2001.

LOWY, F. D. **Staphylococcus aureus infections.** N. Engl. J. Med. v. 339, p. 520–532, 1998.

LOWY, F. D. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** J. Clin. Invest. v. (9)111, p. 1265-1273, 2003.

MAIDEN, M.C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. **Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 95, p. 3140-5, 1998.

MARANAN, M.C. et al. **Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance.** In: MIMICA, JM; MENDES, CMF. **Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*.** J Bras Pato Med Lab v 43 n 6, p. 399-406, 2007.

MARTINS, A. & CUNHA, M. L. R. S. **Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects.** Microbiol. Immunol., Botucatu- SP., v. 51 (9), p. 787-795, 2007.

MCCLURE JA, CONLY JM, LAU V, ELSAYED S, LOUIE T, HUTCHINS W, et al. **Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci.** J Clin Microbiol; 44: 1141- 1144, 2006.

MINISTERIO DA SAÚDE, Técnica de Coloração de Gram. **Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS**, 1997. 63 p.. Brasília (Série TELELAB)

MONCLA, B.J., P. BRAHAM, L.K. RABE, E S.L. HILLER. **Rapid presumptive identification of Black-pigmented gram-negative anaerobic bacteria by using 4-methylumbelliferone derivatives.** J. Clin. Microbiol. 29:1955-1958. 1991.

MUNDIM, G.J.; DEZENA, R. A.; OLIVEIRA, A. C. S; SILVA, P. R.; CARDOSO, M.; PEREIRA, G. A.; MORAIS, C. A.; TERRA, A. P. S. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** V. 36(6), p. 685-688, 2003.

MURAKAMI K, MINAMIDE W, WADA K et al. **Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction.** J Clin Microbiol 29: 2240-2244, 1991.

MURRAY, P.R., E.J. BARON, M.A. PFALLER, F.C. TENOVER, E R.H. YOLKEN (ed.). **Manual of clinical microbiology**, 6ª ed.American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** Tradução da 5ª Edição. Rio de Janeiro-RJ. Elsevier, 979 p, 2006.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004.** Am. J. Infect. Control, v. 32, p. 470–485, 2004.

PALAZZO, I. C. V.; ARAUJO, M. L. C.; DARINI, A. L. C. **First Report of Vancomycin-Resistant Staphylococci Isolated from Healthy Carriers in Brazil.** *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 179-185, 2005.

PFALLER, M.; DAVENPORT, D.; BALE, M.; BARRETT, M.; KOONTZ, F.; MASSANARI, R. M. **Development of the quantitative microtest for slime production by coagulase-negative staphylococci.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. v. 7, p. 30-33, 1988.

RIFFON R, SAYASITH K, KHALIL H, DUBREUIL P, DROLET M, LAGACE J. **Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR.** J Clin Microbiol; 39: 2584-2589, 2001.

ROSA, JO; MOURA, PALOS, MAP; GIR, E.; REIS, C.; KIPNIS, A.; CANINI, SRMS.; BELLISSIMI-RODRIGUES; PIMENTA, F.C. **Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes à oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop.v.42(4):398-403, jul-ago, 2009.

ROSS, T.L.; MERZ, W.G.; FARKOSH, M.; CARROLL, K. C. **Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to Pulsed-field Gel electrophoresis for analysis of Outbreaks of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J Clin Microbiol., v. 43, p. 5642-5647, 2005.

SAHA, B.; SINGH, A.K.; GHOSH, A.; BAL, M. **Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia).** Journal of Microbiology. v. 57, p. 72-79. 2008.

SCHLICHTING, C.; BRANGER, C.; FOUMIER, J. M.; WITTE, W.; BOUTONNIER, A.; WOLZ, C.; GOULLET, P.; DORING, G. **Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: Resolution of clonal relationships.** J Clin Microbiol, v. 31, p. 227-32, 1993.

SCHWALBE, R. S.; STAPLETON, J. T.; GILLIGAN, P. H. **Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative *Staphylococci*.** N. Engl. J Med., v. 316, p.927-931, 1987.

SCHWARTZ, D. C. & CANTOR, C. R. **Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.** Cell. v. 37, p. 67-75. 1984.

SHAKERI, F. ,SHOJAI A., GOLALIPOUR M., ALANG S. R., VAEZ H., GHAEMI E. A. **Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran.** *International Journal of Microbiology*, vol. 2010, Article ID 351397, 5 pages, 2010.

SPIANDORELLO, W. P.; MORSH, F.; SEBBEN, S.; SPIANDORELLO, F. S. A. **A resistência do *Staphylococcus aureus* à oxacilina em hospital de Caxias do Sul.** Revista AMRIGS, Porto Alegre, v. 44 (3,4), p. 120-125, jul.-dez., 2000.

STEPANOVIC S., DAKIC I., MORRISON D., HAUSCHILD T., JEZEK P., PETRAS P., MARTEL A., VUKOVIC D., SHITTU A., L. A. DEVRIESE. **Identification and characterization of clinical isolates of members of the *Staphylococcus sciuri* group.** J. Clin. Microbiol. 43:956–958, 2005.

STEPANOVIC S, DAKIC I, DJUKIC S, LOZUK B, SVABIC-VLAHOVIC M. **Surgical wound infection associated with *Staphylococcus sciuri***. Scand J Infect Dis;34:685-6. 2002.

SWENSON, JM; WILLIAMS , PP; KILLGORE, G; O'HARA, CM E FC, TENOVER. **Performance of eighth methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms**. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 3785-8, 2001.

TELLAROLLI, D. N.; FERREIRA, N. C.; RADDI, M. S. G.; SOARES, C. P. **Avaliação citológica da mucosa nasal de portadores de *Staphylococcus aureus***. R. Brasil. Anal. Clin. v. 35, n. 3, p. 151-153, 2003.

TIWARI, H. K. & SEM, M. R. **Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of Indian**. BMC Infectious Diseases. v. (6):156, p. 1-6, 2006.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. Ed.5ª, São Paulo. Atheneu, 760 p, 2008.

TRINDADE, P. A.; McCULLOCH, J. A.; OLIVEIRA, G. A.; MAMIZUKA, E. M. **Molecular techniques for MRSA typing: Current Issues and Perspectives**. *The Brazilian Journal of Infections Diseases*. v. 7(1), p. 32-43. São Paulo-SP, 2003.

TOWNSEND, D. E.; ASHDOWN, N.; BOLTON, S.; BRADLEY, J; DUCKWORTH, G.; MOORHOUSE, E. C.; GRUBB, W. B.. **The international spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *J Hosp Infect.*, v. 9, p. 60-71, 1987;

WALLET F, STUIT L, BOULANGER E, ROUSSEL-DELVALLEZ M, DEQUIEDT P, COURCOL RJ. **Peritonitis due to *Staphylococcus sciuri* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis**. Scand J Infect Dis;32:697-8. 2000.

UNAL S, HOSKINS J, FLOKOWITSCH JE, WU CY, PRESTON DA, SKATRUD PL. **Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction**. *J Clin Microbiol*; 30: 1685-1691, 1992.

VELASCO, D. et al. **Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus***. *J Antimicrob Chemother*, v. 55, p. 379-82, 2005.

WELLINGHAUSEN, N; SIEGEL, D; GEBERT, S.; WINTER, J. **Rapid detection of *Staphylococcus aureus* bacteremia and methicillin resistance by real-time PCR in whole blood samples**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Brief report, 2009.

WISPLINGHOFF, H.; ROSATO, A. E.; ENRIGHT, M. C.; NOTO, M.; CRAIG, W.; ARCHER, G. L. **Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates**. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 3574–3579, 2003.

WALKER, J.; BORROW, R.; EDWARDS-JONES, V.; OPPENHEIM, B. A.; FOX, A. J. **Epidemiological characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in the North West of England by protein A (*spa*) and coagulase (*coa*) gen polymorphisms**. *Epidemiol. Infect.*, v. 121, p. 507–514, 1998.

WEBSTER, J. A., T. L. BANNERMAN, R. J. HUBNER, D. N. BALLARD, E. M. COLE, J. L. BRUCE, F. FIEDLER, K. SCHUBERT, AND W. E. KLOOS. **Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov.** Int. J. Syst. Bacteriol. 44:454–460, 1994.

ZHANG, K.; McCLURE, J. A.; ELSAYED, S.; LOUIE, T. **Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to v in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*.** J. Clin. Microbiol., v. 43, p. 5026–5033, 2005.

ZHOU, Y., A. ANTIGNAC, S. W. WU, AND A. TOMASZ. **Penicillin-binding proteins and cell wall composition in beta-lactam-sensitive and –resistant strains of *Staphylococcus sciuri*.** J. Bacteriol. 190:508–514. 2008.

ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de ética e Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0233.0.115.000-09, intitulado: **“Caracterização fenotípica e genotípica de espécies de Staphylococcus resistentes a antibióticos pela técnica de PCR e MLST”**, tendo como Pesquisadora Responsável Mirna Sayuri Farias Miyamoto.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 06 de agosto de 2009.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "David", is written over the printed name.

Prof. Dr. David Lopes Neto
Coordenador do CEP/UFAM

Anexo 2. Tabela com os locais de coleta das amostras.

Amostras	Local de coleta	Amostras	Local de coleta
P18-23	Biofilme oral	1131	Urina
P2-43	Biofilme oral	1135	Escarro
P12-33 3D	Biofilme oral	1106	Cateter
P3-1 (33)	Biofilme oral	1102	Escarro
P36-35	Biofilme oral	1104	Urina
P27-31	Biofilme oral	1105	Urina
P28-47	Biofilme oral	1112	Sangue
P5-25	Biofilme oral	1118	Liq. Pleural
P7 (31)	Biofilme oral	1121	Urina
P15-31 3D	Biofilme oral	1125A	Sec. Traqueal
P15-33 3D	Biofilme oral	1125B	Sec. Traqueal
P26-34	Biofilme oral	1125C	Sec. Traqueal
P24-46	Biofilme oral	1126	Sec. Ferida
P22-34	Biofilme oral	1116	Sangue
P20-31	Biofilme oral	1120	Liq. Pleural
P13-45	Biofilme oral	1124	Escarro
P5-11	Biofilme oral	1128	Ponta cateter
P13-11	Biofilme oral	318 S.A.	Material clínico
P6-11	Biofilme oral	319 S.A.	Material clínico
P14-3	Biofilme oral	320 S.A.	Material clínico
P3-3(32) A	Biofilme oral	321 S.A.	Material clínico
1107	sec traqueal	323 S.A.	Lavado de mãos
1109	liq. Pleural	324 S.A.	Lavado de mãos
1113	Urina	325 S.A.	Material clínico
1114	Urina	326 S.A.	Lavado de mãos
1117	Sangue	327 S.A.	Lavado de mãos
1122	Urina	274 S.A.	Lavado de mãos
1130	Urina	4B	Biofilme oral

Anexo 3. Sequências das amostras analisadas por MLST

Gene *aroE* (Shikimate dehidrogenase)

>GB_CP0018441_aroE.seq

```
TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTGAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATTATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA
```

>Enright et al, 2000_aroE.seq

```
TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTGAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATTATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA
```

>MRSA_aroE.seq

```
TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTGAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATTATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA
```

>274_aroE.seq

```
TTTAATTCCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATTATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGAGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA
```

>318_aroE.seq

```
TTTAATTCCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATTATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGAGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA
```

>319_aroE.seq

```
TTTAATTCCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATTATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGAGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA
```

>320_aroE.seq

```
TTTAATTCCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATTATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGAGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA
```

>323_aroE.seq

TTTAATTCCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTAAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGAGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>324_aroE.seq

TTTAATTCCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTAAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGAGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>325_aroE.seq

TTTAATTCCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTAAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGAGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>326_aroE.seq

TTTAATTCCTTTGGGATTAGATGATAGTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAGCGTATCATACCGTATTTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAATACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTAAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGAGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1116_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTAAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1117_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTAAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1122_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTAAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1125A_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAATT
ATTTCAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTTAGATCATGTT

GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1125B_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAAT
ATTTGAAAAAAGAATTAGAAAGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTAGATTATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1126_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAAT
ATTTGAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1130_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAAT
ATTTGAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1131_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGATGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAAT
ATTTGAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATACCGTATTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGACAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGTATTGCTTATGAATTAGCAAA

>1135_aroE.seq

TTTAATTCCTTTAGGATTAGCTGATACTTATGAAGCTTTAAATATTCCAATTGAAGATTTTCATTTAATTAAGAAAT
ATTTCAAAAAAAGAATTAGATGGCTTTAATATCACAAATTCCTCATAAAGAACGTATCATATCGTATTAGATCATGTT
GATGAACAAGCGATTAATGCAGGTGCAGTTAACACTGTTTTGATAAAAGATGGCAAGTGGATAGGGTATAATACAGAT
GGTATTGGTTATGTTAAAGGATTGCACAGCGTTTATCCAGATTTAGAAAATGCATACATTTTAATTTGGGCGCAGGT
GGTGCAAGTAAAGGCATTGCTTATGAATTAGCAAA

Gene glpf (Glicerol quinase)

>GB_glpf_CP001844.seq

TAACCAAGTAGCACCACCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAAGGATTTAAACCATCGGCA
ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
TAATTCCTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAAGGAACCTAATGACCAA
TCAAAACTTCCGCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAAC
ACACCATTTGTAACCGCTAATCCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>Enright et al, 2000_glpf.seq

TAACCCAGTAGCACC GCCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>MRSA_glpf.seq

TAACCCAGTAGCACC GCCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>274_GLPF.seq

TAACCCAGTAGCACC GCCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCTGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>318_glpf.seq

TAACCCAGTAGCACC GCCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCTGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>319_glpf.seq

TAACCCAGTAGCACC GCCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCTGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>320_glpf.seq

TAACCCAGTAGCACC GCCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCTGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>323_glpf.seq

TAACCCAGTAGCACC GCCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCTGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA

TCAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>324_glpf.seq

TAACCAAGTAGCACCGCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
TAATTCCTAATAGCTGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAAG
TACATTAACCATACAATTTGTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAAGGAACTAATGACCAA
TCAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>325_GLPF.seq

TAACCAAGTAGCACCGCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
TAATTCCTAATAGCTGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAAG
TACATTAACCATACAATTTGTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAAGGAACTAATGACCAA
TCAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>326_glpf.seq

TAACCAAGTAGCACCGCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
TAATTCCTAATAGCTGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAAG
TACATTAACCATACAATTTGTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAAGGAACTAATGACCAA
TCAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>1116_glpf.seq

TAACCAAGTAGCACCGCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
TAATTCCTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAAG
TACATTAACCATACAATTTGTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAAGGAACTAATGACCAA
TCAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAAC
ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>1117_glpf.seq

TAACCAAGTAGCACCGCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
TAATTCCTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAAG
TACATTAACCATACAATTTGTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAAGGAACTAATGACCAA
TCAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAAC
ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>1122_glpf.seq

TAACCAAGTAGCACCGCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
TAATTCCTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTCGCGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAAG
TACATTAACCATACAATTTGTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAAGGAACTAATGACCAA
TCAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAAC
ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>1125A_GLPF.seq

TAACCACTAGCACCACCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTTGCGGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>1125B _glpf.ab1

TAACCTGTTGCGCCACCTAACTTAACCAATTGCTACAATTAATGCGCCTACGATTAAGGATTTAATCCATCAGCA
 ATTTTGTTTACACCAATAAAATAAAATACCTAAAGTTAACGCCATTGTACCAATAATCTCACTTAAAAAGTTTGCAAAA
 TAGTTCTTAATTGCTGGCGCAGTTGAGAATACACCTAATTTGCGCCCGCTTCTCTGTTGCTTTCCAATGTGGTAAG
 TACATTAACCATACAATCGTTGCTCCGACAATCGCACCTAACATTTGTGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGCCCAA
 TCGAAACTTCCATCTAATGCAAGTGCTAAAGATACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCATAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATAACGATCCAA

>1126_glpf.seq

TAACCACTAGCACCACCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTTGCGGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>1130_glpf.seq

TAACCACTAGCACCACCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTTGCGGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>1131_glpf.seq

TAACCACTAGCACCACCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTTGCGGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

>1135_glpf.seq

TAACCACTAGCACCACCTAACTTAATCCGATTGCAACAATTAATGCTCCGACAATTAAGGATTTAAACCATCGGCA
 ATTTTGTTTACACCGATAAAATAAAATACCTAAAGTTAATGCCATTGTTCCGATAATCTCACTTAAAAAGTTGGCAAAG
 TAATTCCTTAATAGCCGGTGCTGTAGAGAAAACACCTAATTTGCGGCCAGCTTCTTCTGTCGCTTTCCAATGTGGCAAG
 TACATTAACCATACAATTGTTGCTCCGACAATTGCACCTAACATTTGAGCAACAATATAACCAGGAACCTAATGACCAA
 TCAAAACTTCCGTCTAATGCAAGAGCTAAAGACACCGCTGGGTTTAAATGTGCACCTGAGAATTGACCGACAGCAAAC
 ACACCCATTGTAACCGCTAATCCCATCCAGCTGTGATGACAATCCAA

Gene arcC (Carbonato quinase)

>GB_arcC_CP001844.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
 ACCGTCTGCTAAAGTTTGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
 ACGTCTGTCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAAATCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAGG

ACCAATTGGTTTGGTTGGGTATTGAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCATTTTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGCTACTGTTTCGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>Enright et al, 2000 arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTTGAATTAAGTGGTGTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCTGTCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAAATCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTGGTTGGGTATTGAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCATTTTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGCTACTGTTTCGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>MRSA_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTTGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCTGTCATCTTCTTTAAAGACTGAGCTGGCTGTTCTTTTGTAAATCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTTACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCATTTTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGCTACTGTTTCGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>274_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTTGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCTGTCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAAATCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCATTTTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGCTACTGTTTCGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>318_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTTGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCTGTCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAAATCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCATTTTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGCTACTGTTTCGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>319_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTTGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCTGTCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAAATCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCATTTTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGCTACTGTTTCGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>320_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTTGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCTGTCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAAATCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCATTTTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGCTACTGTTTCGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>323_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAATGCGATTGATTTAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCACTGTTGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>324_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTC

TTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGGACCAATTGGTTAGT
TGGGTTATCAAATCGTGGATCATCTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGTTCTATCACTATTTCAT
TTCAGTTAAATGCGATTGATTTAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGCACCACAAGTATCCAA
TGGCATTGCCGGCGTTGTGTCACTGTTGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>325_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAATGCGATTGATTTAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCACTGTTGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>326_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAATGCGATTGATTTAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCACTGTTGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>1116_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAATGCGATTGATTTAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCACTGTTGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>1117_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAATGCGATTGATTTAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCACTGTTGATTTAGCTTGTGGATTAATAA

>1122_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAAGTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC

ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAACTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCAGTTCGATTAGCTTGTGGATTAATAA

>1125A_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAACCTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAACTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCAGTTCGATTAGCTTGTGGATTAATAA

>1125B_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACGATATCTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAACCTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGATGCGACCACTTTTCTATAACC
GCGACCTGCATCTTCTTTAAAGACTGACTCAGGTTGTTCTTTTGTAACTTCAACTTCATCCTTAGTATAAAATGG
GCCAATTGGCTTTGTTGGATTATCAAATCGCGGATCATCTTTATCTACTTCTACACGAGTAACAATCGTCCCAACCGT
CCTATCACTATTCAATTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGCGACATAGC
ACCACAAGTATCAAGGGGCATTGCTGGTGTGTGTCAGTTCGATTAGCTTGTGTATTAATAA

>1126_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAACCTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCAGTTCGATTAGCTTGTGGATTAATAA

>1130_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAACCTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCAGTTCGATTAGCTTGTGGATTAATAA

>1131_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAACCTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATCAAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCAGTTCGATTAGCTTGTGGATTAATAA

>1135_arcC.seq

CGCTTCAACACCTTCATAGGTATTTTCTTTTTTATAACTGGAATACCGCCACCACCGCATGCAATGACAATATTTT
ACCGTCTGCTAAAGTTCGAATTAACCTGGTGTCTAGTATAGATTGAGGTAGTGGTGACGCAACTACTTTTCTATAACC
ACGTCCTGCATCTTCTTTAAAGACTGAGTCTGGCTGTTCTTTTGTAACTTCTTCAACTTCTTCTTCGTATAAAAAGG
ACCAATTGGTTTAGTTGGGTATTGAATCGTGGATCATCTTTATCTACTTCCACACGTGTAACGATTGTGCCTACAGT
TCTATCACTATTCAATTCAGTTAAAATGCGATTGATTTTCAGTTTCCAACCAATAGCCTATCATACCCTGTGACATTGC
ACCACAAGTATCCAATGGCATTGCCGGCGTTGTGTCAGTTCGATTAGCTTGTGGATTAATAA

Gene pta (Fosfato acetiltransferase)

>GB_pta_CP001844.seq

```
GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGTGCTTGTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGC
```

>Enright et al, 2000_pta.seq

```
GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
ACATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGTGCTTGTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTgG
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGC
```

>MRSA_pta.seq

```
GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGTGCTTGTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGC
```

>274_pta.seq

```
GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAATGCTGGA
CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAGCCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGTGCTTGTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATTAAGTTTTTGC
```

>318_pta.seq

```
GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAATGCTGGA
CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAGCCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGTGCTTGTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATTAAGTTTTTGC
```

>319_pta.seq

```
GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAATGCTGGA
CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAGCCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGTGCTTGTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATTAAGTTTTTGC
```

>320_pta.seq

```
GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAATGCTGGA
```

CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAGCCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATTAAGTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAACATAATCTGTT

>323_pta.seq

GCACTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTGTAAATGCTGGA
CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAGCCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATTAAGTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAACATAATCTGTT

>324_pta.seq

GCACTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTGTAAATGCTGGA
CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAGCCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATTAAGTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAACATAATCTGTT

>325_pta.seq

GCACTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTGTAAATGCTGGA
CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAGCCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATTAAGTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAACATAATCTGTT

>326_pta.seq

GCACTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTGTAAATGCTGGA
CGCACAGTGTGCGCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAGCCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATTAAGTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAACATAATCTGTT

>1116_pta.seq

GCACTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
ACATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAACATAATCTGTT

>1117_pta.seq

GCACTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
ACATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTCGCAGGATTAATTAATTCATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAACATAATCTGTT

>1122_pta.seq

GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
ACATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGAGGATTAATTAATTCAATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAAACATAATCTGTT

>1125A_pta.seq

GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
ACATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGAGGATTAATTAATTCAATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAAACATAATCTGTT

>1125B_pta.seq

GCACCTTTCTACTGCAATTTCCGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGTACAGTATCACCAAGTTGAATGTGCTGCACCACTTACTAAGCCATCAGCTTTACCGGCATATACTAACATCGTTCCG
AAGTAATTTACATTATTTAGTAATTTGCGCTTGTTCTTCAGTAGCTTTACCTTTACGACGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTTAACTCCTTGTGACAGGTTAATTAATTCAATATTAGTAATATCAAGGTTTAAATTTTTGCGCT
AGAGATTGAACCTTTgTCTCATCACCAACACGATTGGTGTAAACGTAATCTGTT

>1126_pta.seq

GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
ACATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTTAACTCCTTGTGCGAGGATTAATTAATTCAATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAAACATAATCTGTT

>1130_pta.seq

GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
ACATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGAGGATTAATTAATTCAATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAAACATAATCTGTT

>1131_pta.seq

GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
ACATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGAGGATTAATTAATTCAATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAAACATAATCTGTT

>1135_pta.seq

GCACCTTTCTACTGCAATTTCTGCAAGTCCTTGTGAATCAAGTTCTGGATTGATTGCACAATCACCAAAGATGTATTGT
TCATCACCTTTAATCATAAAGAAGATACCTGATGTTCTTGATACACCTGGTTTCGTTTTGATGATTTGTAAAGCTGGA
CGCACAGTGTCTCCTGTTGAATGTGCTGCACCACTAACTAAACCATCTGCTTTACCAGCATAAACAAGCATTGTACCG
AAGTAGTTCACATTGTTTAATAATTCTTGCTTGTTCTTCAGTCGCTTTACCTTTACGTCGTTCAACAAATGATTGA
ACTAATTCAGCTTTCAATTCACCTTGTGCGAGGATTAATTAATTCAATATTAGAAATATCAAGATCAAGTTTTTGCGCT
AAAGATTGAACCTTAGTCTCATCACCTAACACGATTGGTGTAAACATAATCTGTT

Gene tpi (Triosefosfato isomerase)

>GB_tpi__CP001844.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGCTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGATCTTCAGATAAGC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCGTCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGAGTCATTCCATGTTTGAAAATAGCGTGCCTTTTTGTTAATTTTC

>Enright et al, 2000_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGCTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGATCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCGTCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGAGTCATTCCATGTTTGAAAATAGCGTGCCTTTTTGTTAATTTTC

>MRSA_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGATCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCGTCTGTTTCACCAA
CACATATAATTGGAGTCATTCCATGTTTGAAAATAGCGTGCCTTTTTGTTAATTTTC

>274_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCATCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGTGTACATACCATGTTTGAAAATAGCATGCGCTTTTTGTTAATTTTC

>318_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCATCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGTGTACATACCATGTTTGAAAATAGCATGCGCTTTTTGTTAATTTTC

>319_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCATCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGTGTCTACCATGTTTGAAAATAGCATGCGCTTTTTGTTAATTTTC

>320_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCATCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGTGTCTACCATGTTTGAAAATAGCATGCGCTTTTTGTTAATTTTC

>323_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTTCATTTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCATCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGTGTACATACCATGTTTGAAAATAGCATGCGCTTTTTTGTAAATTC

>325_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTTCATTTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCATCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGTGTACATACCATGTTTGAAAATAGCATGCGCTTTTTTGTAAATTC

>326_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTTCATTTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCATCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGTGTACATACCATGTTTGAAAATAGCATGCGCTTTTTTGTAAATTC

>1117_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTTCATTTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTTAAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCGCTGTTTCACCAA
CACATATAATTGGAGTCATTCCATGTTTGAAAATAGCGTGCGCTTTTTTGTAAATTC

>1122_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTTCATTTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTTAAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCGCTGTTTCACCAA
CACATATAATTGGAGTCATTCCATGTTTGAAAATAGCGTGCGCTTTTTTGTAAATTC

>1125A_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTTCATTTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACGATTTTAAAGTTGCTCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTCACGCTCTTCGCTGTTTCACCAA
CACATATAATTGGAGTCATTCCATGTTTGAAAATAGCGTGCGCTTTTTTGTAAATTC

>1125B_tpi.seq

TGCACCATCGATATCAGTTTGTGCCATATATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
AGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAGGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTTCATTTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCAGATTGGCTCATAAGCAATCACAGTTGCTTTAAGTTGATCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACCTGTTTACCTACAACATCGTTAGCTTTGCCGCTCTCACGTTCTTCATCAGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGAGTCATACCATGTTTGAAAATCGCGTGCGCTTTTTTGTGATTC

>1130_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTTCATTTCGCATCTTCAGATG

TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACCTGATTTTAGTTGATTTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACTTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTACGCTCTTCGTCTGTTTCACCAA
CACATATAATTGGAGTCATTCCATGTTTGAAAATAGCGTGCCTTTTTGTAAATTC

>1131_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCCAGATTGGTTCATAAGCAATTACAACCTGATTTTAGTTGATTTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACTTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTACGCTCTTCGTCTGTTTCACCAA
CACATATAATTGGAGTCATTCCATGTTTGAAAATAGCGTGCCTTTTTGTAAATTC

>1135_tpi.seq

TGCCCCATCAATATCAGTTTGTGCCATGTATTCTTTAATGTTGTTAGGTTTAACACTACCACCATATTGAATACGAGT
TGCCTGATACTTCTTTGCTTGATAAGTCAGCAATAGTTTGACGTACAAATGCACACATTTCAATTCGCATCTTCAGATG
TTGATGATTTACCAGTTCGGATTGCCCAGATTGGCTCATAAGCAATTACAACCTGATTTAAGTTGATCTTCAGATAAAC
CTGCAACAGCTTTCTTAACTTGCTCACCTACAACATCGTTAGCTTTACCACTTTACGCTCTTCGTCTGTTTCACCAA
CACAAATAATTGGAGTCATTCCATATTTGAAAATAGCGTGCCTTTTTGTAAATTC