



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



CARACTERIZAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-
NEGATIVA DE ORIGEM HOSPITALAR E COMUNITÁRIA
QUANTO À DIVERSIDADE CLONAL E A
DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

LUIZA PINHEIRO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de parasitas e micro-organismos.

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU – SP
2018**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-
NEGATIVA DE ORIGEM HOSPITALAR E COMUNITÁRIA
QUANTO À DIVERSIDADE CLONAL E A
DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

LUIZA PINHEIRO

MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração Biologia de parasitas e
micro-organismos.

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU – SP
2018**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pinheiro, Luiza.

Caracterização de estafilococos coagulase-negativa de origem hospitalar e comunitária quanto à diversidade clonal e a determinantes de resistência antimicrobiana / Luiza Pinheiro. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Sousa da Cunha
Capes: 21202010

1. Estafilococos. 2. Drogas - Resistência em microorganismos. 3. Oxacilina. 4. Vancomicina. 5. Resistência microbiana a medicamentos. 6. Células clonais.
Palavras-chave: Estafilococos Coagulase-Negative; SCCmec; perfil clonal; resistência à oxacilina; susceptibilidade reduzida à vancomicina.

*Só é verdadeiramente digno da liberdade, bem
como da vida, aquele que se empenha em
conquistá-la.
(Johann Goethe)*

Dedicatória

A Deus, por me abençoar, me proteger e me guiar de todas as formas possíveis.

A meu sobrinho e afilhado, João, por trazer tanta alegria e luz para minha vida.

Agradecimentos

À minha família, meus pais e irmãos, avós e tios, por ser minha base, pelo apoio e amor incondicional durante todos esses anos. Amo vocês.

Especialmente à minha mãe, Leda, que muitas vezes sacrificou tanto para que eu pudesse chegar até aqui. Todo o meu amor e gratidão. Amo você.

Ao meu amor, Danilo, pelo companheirismo, apoio e dedicação. Amo você.

À minha orientadora, Prof. Maria de Lourdes, por me dar a oportunidade de fazer parte desta equipe, por acreditar em mim e no meu trabalho, e me acompanhar durante todos esses anos. Minha admiração e reconhecimento.

À amiga e colega de trabalho Priscila Mello, pelo auxílio na realização deste projeto, pela amizade e confiança.

Aos amigos e colegas de trabalho Danilo Riboli e Lígia Abraão, pelo companheirismo e auxílio na execução do projeto.

Aos amigos e colegas de trabalho, Thais, Natália, Lucas e Ana, pelas boas risadas e convivência no laboratório.

Aos amigos e colegas de trabalho, Valéria Cataneli, Adilson de Oliveira e Carlos Camargo pela colaboração e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Aline, Ana, Ivana, Larissa, Luiz e Lula, pelo auxílio prestado.

A Andrea Belone e Patrícia Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo apoio e compreensão durante esse período.

Aos colegas de trabalho do Instituto Lauro de Souza Lima pela convivência e amizade durante esses últimos anos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste projeto.

SUMÁRIO

<i>RESUMO GERAL</i>	9
<i>GENERAL ABSTRACT</i>	11
<i>1. INTRODUÇÃO</i>	13
<i>2. OBJETIVO</i>	20
<i>2.1 Objetivo Geral</i>	20
<i>2.2 Objetivos específicos</i>	20
<i>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	21
<i>4. APRESENTAÇÃO DA TESE</i>	28
<i>ARTIGO I</i>	29
<i>ARTIGO II</i>	58
<i>ARTIGO III</i>	93
<i>5. CONCLUSÕES</i>	116

RESUMO GERAL

A alta frequência de Estafilococos Coagulase-Negativa (CoNS) na pele de indivíduos saudáveis e em doenças associadas ao sangue, associados à seleção de cepas resistentes devido a uso indiscriminado de antimicrobianos, tornou mais estreitos os limites entre o ambiente hospitalar e o comunitário quanto à distribuição de cepas. Objetivou-se, com este estudo, caracterizar isolados de CoNS de origem hospitalar e comunitária da cidade de Botucatu-SP quanto ao perfil clonal, analisar os aspectos de resistência à oxacilina pela aferição de metodologia de detecção, e investigar os determinantes de heterorresistência à vancomicina nessas cepas. As espécies estudadas incluíram *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. pasteurii*, *S. simulans* e *S. xyloso*. O teste de disco-difusão (TDD) com discos de oxacilina e cefoxitina, fitas de Etest impregnadas com oxacilina e pesquisa do gene *mecA* por PCR em tempo real foram realizadas. A triagem em ágar com 6 e 8 µg/ml de vancomicina, microdiluição em caldo para aferição da Concentração Inibitória Mínima (MIC), microscopia eletrônica de transmissão para verificar espessamento da parede celular e alterações fenotípicas por testes bioquímicos foram realizadas. O perfil clonal foi determinado por PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) e para clones de *S. epidermidis*, o MLST (*Multilocus Sequence Typing*). *S. epidermidis* apresentou alta diversidade clonal, mas presença de clusters no ambiente hospitalar e na comunidade. Clones hospitalares pertenciam aos STs (*sequence-types*) 2, 6 e 23. *S. haemolyticus* revelou pequenos clones circulando separadamente nos ambientes, enquanto *S. saprophyticus* mostrou altíssima diversidade clonal. Clusters grandes circulando no hospital e comunidade foram encontrados em isolados de *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. capitis*, demonstrando que provavelmente, nestas espécies, há baixa taxa de eventos de diversidade ou certos clones podem estar se sobressaindo em detrimento de outros. A variedade dos tipos de SCC*mec* foi bem elevada, sendo que isolados do mesmo cluster possuíam tipos distintos. *S. epidermidis* teve alta prevalência dos tipos I e III, *S. haemolyticus* dos tipos I e II, *S. capitis* do tipo V, *S. hominis* esteve associado ao complexo *mec* do tipo A e *ccrI*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* ao SCC*mec* tipo I. A geração de elementos e combinações novas dos genes do cassete se mostrou altamente relacionada às cepas de CoNS, sugerindo que o SCC*mec* não é um bom marcador para clonalidade nessas bactérias. A concordância entre as técnicas da susceptibilidade à oxacilina foi observada em 65,7% dos casos; bem como, dos isolados resistentes pelo

Etest, 93,8% possuíam o gene *mecA*. A maior discrepância entre *mecA*/Etest sensível foi em espécies não-*epidermidis*. Utilizando-se um ponto de corte de ≤ 19 mm no disco de oxacilina para resistência classificou-se melhor o total de CoNS. Para *S. epidermidis* separadamente, halos ≤ 19 e 27 mm, respectivamente, classificaram melhor nos discos de oxacilina e cefoxitina. Para *S. haemolyticus* e *S. capitis*, respectivamente, diâmetros ≤ 21 mm e ≤ 18 mm no disco de oxacilina, e MICs $\geq 0,75$ $\mu\text{g/ml}$ para *S. warneri* para resistência se adequaram melhor à avaliação de resistência à oxacilina nessas espécies. *S. saprophyticus* mostrou resultados altamente discrepantes, necessitando de uma revisão profunda nos valores de referência. Apesar de o disco de oxacilina não ser mais recomendado pelo CLSI para TDD, observamos alguns casos em que apenas este disco detectou resistência. A discrepância dos testes fenotípicos quando comparada à positividade do gene *mecA* foi provavelmente devida à característica heterogênea dessa resistência, e ao mecanismo de resistência *borderline*. De 291 isolados, 12,4% apresentaram crescimento nas placas com 6 ou 8 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina: 8,3% de swab nasal e 19% de hemoculturas. Os MICs de vancomicina estiveram em valores maiores ou iguais a 4 $\mu\text{g/ml}$ em 10 isolados parentais e em 22 colônias heterorresistentes. Colônias crescidas na triagem de isolados selecionados de *S. warneri*, *S. haemolyticus* e *S. capitis* mostraram espessamento de parede celular significativo quando comparado à cepa parental e diâmetro reduzido nos isolados heterorresistentes de *S. haemolyticus* e *S. warneri*. Observou-se que 60% das subpopulações apresentaram alteração macroscópica no aspecto das colônias, incluindo diferença de tamanho (27%), e a variação dentro do mesmo isolado (38%). A alteração na fermentação dos açúcares e ornitina foi encontrada, mas não seguiu um padrão. A presença de colônias mistas com características distintas demonstra a necessidade de testar todas quanto à susceptibilidade e identificação fenotípica. Os resultados enfatizam que a subpopulação heterorresistente necessita estar em um número suficiente de células para se expressar nos testes de susceptibilidade e possui natureza instável. O mecanismo de espessamento da parede celular parece ser a causa mais provável de heterorresistência em *S. capitis*, *S. warneri* e *S. haemolyticus*.

Palavras-chave: Oxacilina; teste de disco-difusão; cefoxitina; Etest; gene *mecA*; vancomicina; espessamento de parede celular; alterações morfo-bioquímicas; PFGE; SCC*mec*; MLST.

GENERAL ABSTRACT

The high frequency of Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) on the skin of healthy individuals and in bloodstream infections, together with the selection of resistant strains, has narrowed the boundaries between the hospital and the community environment for the distribution of strains. This study aimed to characterize CoNS isolated from clinical and colonization specimens of patients and individuals from Botucatu-SP, to compare their clonal profile, to analyze the determination of oxacillin resistance by the evaluation of the methodology of detection, and to investigate the determinants of reduced susceptibility to vancomycin in those strains. CoNS species included *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. pasteurii*, *S. simulans* and *S. xylosum*. The disc diffusion test (DDT) using oxacillin and ceftiofuran discs was employed, Etest strips impregnated with oxacillin and *mecA* gene detection by real-time PCR were used. An agar screening with 6 and 8 µg/ml of vancomycin, the broth microdilution method for the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), the transmission electronic microscopy for evaluation of cellwall thickening and phenotypic modifications by biochemical tests were performed. Clonal profile was determined by PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) and, for *S. epidermidis* clones, MLST (*Multilocus Sequence Typing*). *S. epidermidis* presented high clonal diversity, despite some clusters circulating within hospital and community. Hospital clones belonged to STs (*sequence-types*) 2, 6 and 23. *S. haemolyticus* revealed small clones circulating separately in the environments, and *S. saprophyticus* showed high clonal diversity. Large clusters circulating in hospital and community were found for *S. lugdunensis*, *S. warneri* and *S. capitis*, demonstrating that those species probably have a low rate of diversity events or some clones may be standing out to the detriment of others. The variety of SCC*mec* types were high, and isolates from the same cluster held different types. *S. epidermidis* showed high prevalence of types I and III, *S. haemolyticus* of types I and II, *S. capitis* type V, *S. hominis* was associated to *mec* complex A and *ccrI*, *S. warneri* and *S. saprophyticus* to SCC*mec* type I. The generation of elements and novel combinations of cassette genes has shown to be highly related to CoNS strains, suggesting that SCC*mec* is not a good marker for clonality on those bacteria. Agreement between all techniques was observed in 65.7% of cases. Among isolates identified as resistant by the E-test, 93.8% carried *mecA*. The greatest discrepancy between *mecA*/susceptible E-test was observed for non-*epidermidis* species,

particularly *S. warneri*. A resistance breakpoint ≤ 19 mm using the oxacillin disc was found to best classify all CoNS isolates. For *S. epidermidis*, diameters ≤ 19 mm and ≤ 27 mm provided the best classification using oxacillin and cefoxitin discs, respectively. For *S. haemolyticus* and *S. capitis*, oxacillin zone diameters ≤ 21 mm and ≤ 18 mm, respectively, and, for *S. warneri*, MICs for resistance ≥ 0.75 mg/L best represented susceptibility of the strains. Discrepant results between DDTs and between E-test and *mecA* were obtained for *S. saprophyticus*, a fact indicating the need for a critical revision of the reference values. Although the oxacillin DDT is no longer recommended by the CLSI, we observed some cases in which only this test detected resistance. The discrepancy between phenotypic tests and *mecA* gene detection is probably due to the heterogeneity of this resistance, with the phenomenon of borderline resistance being very common. Among 291 isolates, 12.4% grew on plates with 6 or 8 mg/L vancomycin; of these, 8.3% were isolated from nasal swabs and 19% from blood cultures. The vancomycin MIC was ≥ 4 mg/L in 10 parental isolates and in 22 heteroresistant colonies. Colonies recovered by screening from selected isolates of *S. warneri*, *S. haemolyticus* and *S. capitis* exhibited significant cell wall thickening when compared to the parental strain, and reduction in cell diameter in heteroresistant *S. haemolyticus* and *S. warneri* isolates. Macroscopic alterations in colony appearance were found in 60% of the subpopulations, including size variations (27%) which were also observed within the same isolate (38%). Sugar and ornithine fermentation was found to be altered but did not follow a pattern. The presence of mixed colonies with distinct characteristics highlights the need to test all colonies for susceptibility and phenotypic identification. The results demonstrate the unstable nature of the heteroresistant subpopulation and that the expression of this phenotype in susceptibility tests requires the presence of a sufficient number of cells. The mechanism of cell wall thickening appears to be the most likely cause of heteroresistance in *S. capitis*, *S. warneri* and *S. haemolyticus*.

Keywords: Oxacillin; disc-diffusion test; cefoxitin; Etest; *mecA* gene; vancomycin; cellwall thickening; morpho-biochemical alterations; PFGE; SCC*mec*; MLST.

1. INTRODUÇÃO

Os estafilococos são colonizadores bacterianos comuns da pele e mucosas de humanos e outros mamíferos (Kloos e Schleifer, 1986; Otto, 2010). O gênero *Staphylococcus*, no total de 52 espécies e 28 subespécies (www.bacterio.net), é dividido em dois grandes grupos, de acordo com a capacidade de produzir a enzima coagulase. O primeiro grupo, conhecido como coagulase positiva, tem como principais representantes *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, e *S. lutrae* (Euzéby, 2018). O segundo grupo, conhecido como estafilococos coagulase- negativa (CoNS), é formado pelas demais espécies, sendo as mais estudadas *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (Kloos e Bannerman, 1999; Euzéby, 2018).

A definição do grupo heterogêneo de estafilococos coagulase-negativa é ainda baseada em procedimentos diagnósticos que preenchem a necessidade clínica de diferenciar *S. aureus* e estafilococos classificados historicamente como menos ou não-patogênicos. Devido a mudanças associadas ao paciente e a procedimentos, os CoNS agora representam alguns dos principais patógenos nosocomiais, com *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* sendo as espécies mais relevantes (Becker et al, 2014).

Estima-se que adultos saudáveis possuam de 10 a 24 isolados distintas de *S. epidermidis* (Kloos e Musselwhite, 1975), e o número de CoNS na pele humana varia de 10 a 10^5 unidades formadoras de colônia (CFU)/cm² em adultos saudáveis da comunidade (Kloos, 1980). Há evidência crescente de que a microbiota mucocutânea em geral possui um impacto relevante no sistema imune (Belkaid and Tamoutounour, 2016). Apesar de os CoNS estarem entre os colonizadores mais importantes, estudos específicos envolvendo a resposta imune do hospedeiro à colonização e estabelecimento são limitados. O papel benéfico da colonização por *S. epidermidis* na prevenção do supercrescimento de patógenos na pele, baseando-se em experimentos com camundongos, foi atribuído à estimulação da resposta imune (Nguyen et al, 2017).

Apesar de viverem de forma simbiótica com seu hospedeiro, em caso de rompimento da barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implante de dispositivos médicos (cateteres, próteses ou válvulas), os CoNS expressam fatores de patogenicidade e podem causar sérias infecções (Heikens et al, 2005). Assim, são reconhecidos como micro-organismos essencialmente oportunistas, que se utilizam de inúmeras situações

orgânicas para produzir graves infecções (Kloos e Bannerman, 1999). De forma geral, são associados a doenças crônicas, diferentemente de *S. aureus*, espécie considerada um dos principais causadores de infecções graves e agudas, com alta probabilidade de levar o paciente a óbito.

Os CoNS são considerados uma das maiores causas de infecções sanguíneas adquiridas no ambiente hospitalar (Emori e Gaynes, 1993; Rogers et al, 2009; Marra et al, 2011). As doenças causadas por esses micro-organismos estão frequentemente associadas a dispositivos e aparelhos implantados, sobretudo em pacientes muito jovens, idosos e imunocomprometidos (Kloos e Bannerman, 1994; Savithri et al, 2011).

A habilidade de infectar pacientes utilizando dispositivos médicos é primariamente associada à capacidade de alguns CoNS de produzir biofilmes, nos quais as bactérias aderem a superfícies inertes de dispositivos plásticos, ativados pelo mecanismo de *quorum sensing*, nos quais a camada mais externa de células protege a comunidade bacteriana interior (Davey e O'Toole, 2000; Vuong et al, 2003) e confere resistência aumentada a agentes antimicrobianos (Stewart e Costerton, 2001; Singh et al, 2010).

O uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos pode ter levado a um aumento no número de cepas resistentes a essas drogas. A resistência à oxacilina, que substituiu a meticilina em uso nos pacientes com infecções por estafilococos resistentes à penicilina, tem crescido de forma exponencial entre os CoNS no Brasil e no mundo. Trabalhos mostram taxas de resistência à oxacilina de 41% em 1978 (Siebert et al, 1978), e já no final da década de 1990, em 68% dos CoNS (Marshall et al, 1998), 71% no final dos anos 2000 (Oliveira et al, 2007), e 83% no início da década de 2010 (Ustulin e Cunha; 2012).

A resistência à oxacilina é geralmente associada a uma proteína ligadora de penicilina 2 (PBP2) modificada, denominada PBP2a ou PBP2', que possui baixa afinidade aos beta-lactâmicos e impede que o antimicrobiano iniba a síntese da parede celular. Tal produto é codificado pelo gene *mecA*, que é regulado pelos genes *mecI* e *mecR1* (Matsushashi, 1986), e que está contido em um elemento genético móvel, denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), considerado um intercâmbio de resistência entre CoNS e *S. aureus* (Ito et al, 2004).

A detecção de resistência à oxacilina é problemática, devido ao fato de a expressão do gene *mecA* ser heterogênea, principalmente entre os CoNS (Garza-Gonzalez et al, 2009), apesar da pesquisa deste por PCR ser considerada técnica padrão-

ouro pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Caeirão et al, 2004). A hiperprodução de beta-lactamases também é um dos mecanismos de resistência à oxacilina (Caeirão et al, 2004).

Os métodos fenotípicos de disco-difusão são frequentemente utilizados pelos laboratórios para detectar a resistência à oxacilina, por serem considerados mais rápidos, práticos e com menor custo. O CLSI recomenda a utilização do disco de cefoxitina como substituto para a detecção de resistência à oxacilina em CoNS (CLSI, 2007), já que a cefoxitina permite uma leitura mais clara do que o disco de oxacilina, e de produtos de genes similares ao gene *mecA*, como o gene *mecC* (CDC, 2013). Entretanto, alguns estudos mostram que se forem considerados apenas os resultados do disco de cefoxitina, em detrimento do disco de oxacilina, cepas resistentes podem acabar sendo reportadas como susceptíveis (Frigatto et al, 2005). Além disso, cepas de CoNS com resistência *borderline* apresentam maior dificuldade de detecção, além de já terem sido sugeridas mudanças na interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do disco de cefoxitina (Frigatto et al, 2005).

Os *breakpoints* para resistência à oxacilina foram definidos a MICs $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$ em CoNS (exceto para *S. lugdunensis*, $\geq 4 \mu\text{g/mL}$) (CLSI, 2008). Entretanto, resultados falso-positivos (*Major error*) para resistência são esperados em 1 a 9% dos casos (Skov et al, 2005).

São vários os trabalhos que demonstram a necessidade de revisão nos pontos de corte para resistência à oxacilina nas espécies de CoNS (Johnson et al, 2014). Ferreira et al (2012), por exemplo, observaram discrepâncias entre os resultados do *mecA* comparado ao teste de disco-difusão com oxacilina e cefoxitina em *S. saprophyticus*, bem como demonstraram baixa especificidade, revelando que os *breakpoints* não correspondem à determinação do gene *mecA*. O mesmo estudo apontou ainda boa eficácia do disco de oxacilina na detecção de resistência à oxacilina para *S. epidermidis* (Ferreira et al, 2012), apesar de o CLSI não recomendar a utilização deste disco para CoNS.

O SCC*mec*, considerado um elemento de intercâmbio para genes de resistência, é composto de diferentes combinações entre o complexo *mec*, que codifica a resistência à meticilina, e o complexo *ccr*, que codifica as enzimas recombinases responsáveis pela mobilidade do elemento genético. O complexo *mec* é composto de IS431, gene *mecA* e sequências intactas ou truncadas de genes regulatórios *mecI* e *mecR1*. O complexo *ccr*

pode ser composto dos genes recombinases *ccrA* e *ccrB* ou *ccrC* e seus subtipos. (Ma et al, 2002; Ito et al, 2004; Chongtrakool et al, 2006; Kondo et al, 2007).

Foram descritos 11 tipos de SCC*mec* em *S. aureus*, enquanto só foram identificados em CoNS os tipos I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX (Zong et al, 2011; Sinlapasorn et al, 2015). As cepas carreando SCC*mec* dos tipos I, IV, e V são frequentemente mais susceptíveis a antibióticos, já que esses tipos não contêm outros genes de resistência além do gene *mecA* (Hanssen, 2006). Até a última década, observava-se que os tipos I, II e III estavam principalmente associados a infecções hospitalares, enquanto os tipos IV e V a infecções adquiridas na comunidade (Ito et al, 2004; Martins e Cunha, 2007). Apesar de menos tipos de SCC*mec* terem sido identificados em CoNS, ou seja, uma menor diversidade nomeada, vários estudos demonstram a presença de mais de dois SCC*mec* na mesma cepa, e elementos ainda não descritos, com combinações de complexos *mec* e *ccr* não relatadas (Miragaia et al, 2007; Murugesan et al, 2015; Pinheiro et al, 2016). Uma alta porcentagem de elementos SCC*mec* em CoNS não pode ser tipada baseando-se nos protocolos atualmente disponíveis baseados em PCR multiplex.

Estudos mostram que há transferência de SCC*mec* entre as cepas de *Staphylococcus*, o que poderia explicar a presença de isolados de diferentes espécies com o mesmo tipo de SCC*mec* (Hanssen et al, 2006; Machado et al, 2007) e, inclusive, o fato de que o SCC*mec* tipo III encontrado no clone de MRSA (*S. aureus* resistentes à meticilina) amplamente distribuído no Brasil (clone brasileiro) parece ter se originado dos CoNS (DaSilva Coimbra et al, 2000).

Com o aumento de cepas de CoNS resistentes à oxacilina, que confere resistência a todos os beta-lactâmicos, a vancomicina é considerada a droga de escolha para o tratamento de MR-CoNS. Apesar disso, as primeiras cepas de CoNS com susceptibilidade reduzida a este antimicrobiano foram já descritas em 1981 (Cherubin et al, 1981). No Brasil, foram observadas, entre 1996 e 1997, duas cepas de CoNS (um *Staphylococcus epidermidis* e um *Staphylococcus haemolyticus*) com resistência intermediária à vancomicina (Del'Alamo et al, 1999), e mecanismo desconhecido. Em 2005, Palazzo et al encontraram cepas de CoNS resistentes à vancomicina, incluindo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. capitis*.

As primeiras cepas de *S. aureus* denominadas hetero-VISA (*S. aureus* com heterorresistência à vancomicina), que apresentam fenótipos heterogêneos de susceptibilidade reduzida à vancomicina, foram relatadas em 1999 (Sieradzki et al,

1999; Wong et al, 1999). Esses isolados apresentam susceptibilidade à vancomicina quando testados por métodos de referência (NCCLS, 2003), mas são capazes de crescer na presença de altas concentrações de vancomicina, caracterizando o fenômeno da heterorresistência. Assim, uma cepa heterorresistente pode apresentar duas populações celulares, uma composta de células susceptíveis à vancomicina, e outra por um pequeno número de células com graus variáveis de resistência ao antimicrobiano (Schwalbe et al, 1987). A geração das subpopulações resistentes acontece em alta frequência (Hiramatsu, 2001).

A heterorresistência à vancomicina em cepas de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. capitis* e *S. caprae* foi observada em vários estudos (Nunes et al, 2002; Center et al, 2003; Nunes et al, 2006; Natoli et al, 2009; Ma et al, 2011). Alguns trabalhos observaram diferenças no tamanho das colônias de cepas hetero-VICoNS (em inglês, *heteroresistant Vancomycin Intermediate Coagulase Negative Staphylococci*), denominados pequenas colônias variantes (*small colony variants* - SCVs), e perfis bioquímicos alterados nas subpopulações (Schwalbe et al, 1987; Nunes et al, 2006). Zhou et al (2012) relataram mudanças em cepas de *S. haemolyticus* heterorresistentes à vancomicina (hetero-VISH), em relação ao isolado original, quanto a características como crescimento, tamanho das colônias, aumento de pigmento, hemólise, produção de coagulase e positividade para manose e manitol, sendo que elas foram erroneamente identificadas como *S. aureus* pelo sistema de identificação VITEK-2.

Segundo Natoli et al (2009), a heterorresistência à vancomicina em CoNS pode ser considerada quando o MIC para a população bacteriana em geral está contido nos limites para susceptibilidade definidos pelo CLSI, mas uma subpopulação é capaz de crescer na presença de $\geq 4\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. Esse fenótipo deve ser considerado nas decisões terapêuticas, pois pode estar associado à falha no tratamento. Acredita-se ainda que a ocorrência de cepas de estafilococos com heterorresistência, crescendo em altas concentrações de vancomicina, possa ser precursora *in vivo* de cepas apresentando resistência homogênea à vancomicina, caracterizando uma especial preocupação (Sieradzki et al, 1999; Bobin-Dubreux et al, 2001; Nunes et al, 2006).

Entre os mecanismos de resistência à vancomicina descritos em estafilococos, está a expressão dos genes *van* (Fines et al, 1999; Cetinkaya et al, 2000; Mckessar et al, 2000). Mas o principal mecanismo de resistência à vancomicina é o espessamento da parede celular bacteriana. Os isolados não suscetíveis apresentam uma produção

aumentada de peptidoglicano, com mais monômeros de mureína e mais camadas na parede celular, o que gera o aprisionamento das moléculas de vancomicina nas camadas de peptidoglicano, impedindo que cheguem à membrana citoplasmática, onde a síntese de peptidoglicano ocorre (Hanaki et al, 1998a; Hanaki et al, 1998b; Cui et al, 2000). Assim, uma maior concentração de vancomicina é necessária para saturar os monômeros de mureína, que estão sendo produzidos a altas taxas (Hiramatsu, 2001). Apesar do fenômeno do espessamento da parede celular ser bem estudado em *S. aureus*, há poucos trabalhos demonstrando essa característica em isolados de CoNS (Palazzo et al, 2005; Kim et al, 2012).

A genotipagem ao nível de cepas têm sido amplamente empregada para avaliar uma possível relação clonal entre isolados envolvidos em eventos de transmissão cruzada (Sloos et al, 2000) e disseminação local. A técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), utilizando-se de digestão pela enzima *SmaI*, é a principal metodologia utilizada para análise clonal de isolados de estafilococos, devido à sua alta confiabilidade, poder de discriminação e procedimentos de tipagem altamente reproduzíveis (Montesinos et al, 2002). A tipagem clonal por PFGE têm sido amplamente utilizada para analisar isolados de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (em inglês, MRSE) provenientes de surtos e transmissão local.

Variações no padrão de macrorrestrrição do PFGE foram detectadas mesmo entre isolados obtidos do mesmo sítio de infecção de um único paciente (Van Eldere et al, 2000; Ziebuhr et al, 2000). Paradoxalmente, os mesmos estudos reportam disseminação de cepas de *S. epidermidis* entre diferentes pacientes, hospitais, enfermarias, e mesmo de diferentes países, sugerindo a hipótese de natureza clonal da população de *S. epidermidis* (Miragaia et al, 2007).

Contudo, o PFGE não é o método de escolha quando o objetivo é se identificar clones disseminados no mundo todo, já que essa técnica analisa todo o cromossomo, sendo que partes deste podem evoluir com certa rapidez (Miragaia et al, 2007). A tipagem molecular multi-lócus (em inglês, *Multilocus Sequence Typing* - MLST), baseada no sequenciamento de genes *housekeeping* conservados, é a ferramenta mais adequada ao estudo da epidemiologia global de muitas bactérias patogênicas devido à natureza distinguível das sequências de DNA e à rapidez com que essa e outras informações podem ser armazenadas e compartilhadas via internet (pubmlst.org). Atualmente, o MLST é considerado uma técnica altamente eficiente para avaliar relação filogenética entre isolados (Willemse-Erix et al, 2010).

Entre os CoNS, apenas para *S. epidermidis* há um banco de dados robusto que permite uma comparação efetiva. Alguns estudos demonstram que isolados de *S. epidermidis* do complexo clonal ST2 (ST27) são altamente flexíveis em relação à resistência à meticilina. Uma grande variedade de elementos SCC foi detectada, muitos deles novos e variantes não-tipáveis, sugerindo que cepas *S. epidermidis* ST2 (ST27) são especificamente propensas a receber esses elementos genéticos móveis (Wisplinghoff et al, 2003; Kozitskaya et al, 2005; Miragaia et al, 2007).

O avanço da resistência antimicrobiana tornou mais estreitos os limites entre hospital e comunidade em relação à circulação de cepas. A análise do perfil clonal das espécies de CoNS permite a observação de eventos de disseminação, características de diversidade ou mesmo homogeneidade inerente da espécie. A necessidade de revisão dos pontos de corte dos testes fenotípicos para cada espécie de CoNS se justifica pela heterogeneidade da expressão de resistência à oxacilina intra e inter-espécies. A susceptibilidade reduzida à vancomicina parece estar associada a várias alterações celulares, que podem estar associadas a falha terapêutica, identificação incorreta ou detecção de susceptibilidade errônea.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Caracterizar isolados de Estafilococos coagulase-negativa (CoNS) de origem hospitalar e comunitária quanto à diversidade clonal, analisar os aspectos de resistência à oxacilina pelas metodologias genotípica e fenotípicas e verificar os determinantes de susceptibilidade reduzida à vancomicina.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar espécies de CoNS provenientes de amostras biológicas hospitalares e comunitárias;
- Determinar a presença de clones entre os CoNS de origem hospitalar e comunitária;
- Caracterizar o tipo de *SCCmec*;
- Comparar a resistência à oxacilina através de metodologias fenotípicas e presença do gene *mecA*;
- Determinar a produção de beta-lactamase;
- Avaliar pontos de corte para testes fenotípicos de resistência à oxacilina em espécies de CoNS;
- Selecionar isolados heterorresistentes à vancomicina, comparar os MICs das cepas parentais com as subpopulações heterorresistentes e avaliar alterações macroscópicas, bioquímicas e nas ultraestruturas celulares.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27 (4): 870–926.
2. Belkaid Y, Tamoutounour S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 353–366. 10.1038/nri.2016.48
3. Bobin-Dubreux S, Reverdy M, Nervi C, Rougier M, Bolmström A, Vandenesch F, et al. Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycinresistant derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:349–52.
4. Caierão J, Musskopf M, Superti S, Roesch E, Dias CG, d'Azevedo PA. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative Staphylococci (CNS). *J Med Microbiol* 2004; 53: 1195-1199.
5. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Reminds Clinical Laboratories and Healthcare Infection Preventionists of their Role in the Search and Containment of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), May 2014. [Internet]. Acesso em: 18 de Junho, 2017 Disponível em: http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/vrsa_lab_search_containment.html.
6. Center KJ, Reboli AC, Hubler R, Rodgers GL, Long SS. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4660–4665.
7. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistance Enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(4):686-707.
8. Cherubin CE, Corrado ML, Sierra MF, Gombert ME, Shulman M. Susceptibility of gram-positive cocci to various antibiotics including cefotaxime, moxalactam, and N-formimidoyl thienamycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;20:553-5.
9. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1001–12.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2007.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement, CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighth Informational Supplement, CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
13. Conlan S, Mijares LA, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, Brooks S, et al. *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biol* 2012; 13: 64.
14. Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2276–285.
15. Da Silva Coimbra MV, Teixeira LA, Ramos RLB, Predari SC, Castello L, Famiglietti A et al. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol* 2000; 49, 187–192.
16. Davey ME, O’Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Molec Biol Rev* 2000; 64: 847–867.
17. Del’ Alamo L, Cereda RF, Tosin I, Miranda EA, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 185–191.
18. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 428–42.
19. Euzéby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. 2018. [acesso em: 22 mar 2018]. Disponível em: <http://www.bacterio.net/s/staphylococcus.html>.
20. Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, Camargo CH, Cunha MLRS. Oxacillin resistance and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus saprophyticus* and other *Staphylococci* isolated from patients with urinary tract infection. *Chemother* 2012; 58(6):482-91.
21. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahn DF, Courvalin P. *VanE*, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999;43(9):2161-4.
22. Frigatto EAM, Machado AMO, Pignatari ACC, Gales AC. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative *Staphylococci*? *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2028-2029
23. Garza-Gonzalez E, Martin-Otero R, Llaca-Diaz JM, Rodriguez-Noriega E. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol Infect* 2010; 138, 645–654.

24. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 2005, 187:2426-2438.
25. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Antimicrob Chemother* 1998; 42: 199–209. (a)
26. Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K. Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 315–20. (b)
27. Hanssen A, Sollid JUE. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;46:8–20.
28. Harris SR, Cartwright EJ, Török ME, Holden MT, Brown NM, et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2012; 13 (2): 130–136.
29. 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. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5):2286-90.
30. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 147–155
31. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2637–51.
32. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2637–51.
33. Johnson KN, Andreacchio K, Edelstein PH. Detection of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci by the Vitek 2 System. *J Clin Microbiol* 2014; 52(9): 3196-3199.
34. Kim JH, Chung GT, Yoo JS, Lee YS, Yoo JI. Autolytic activity and molecular characteristics of *Staphylococcus haemolyticus* strains with induced vancomycin resistance. *J Med Microbiol* 2012; 61:1428-34.
35. Kloos W, Schleifer KH. In: Sneath PHA, Mair N, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986. p. 1013–1035.

36. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington: American Society Microbiology; 1999. p. 264-82.
37. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical Significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 117-40.
38. Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. Appl Microbiol 1975; 30(3):381-5.
39. Kloos WE. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Annu Rev Microbiol 1980;34:559-92.
40. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:264-74
41. Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2005; 43: 4751-4757.
42. Ma X X, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1147-52.
43. Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. J Clin Microbiol. 2011; 49(5):1866-71.
44. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30(3): 205-214.
45. Martins A, Cunha MLRS. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol Immunol 2007;51:787-795.
46. Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1986; 167(3): 975-980.

47. Mckessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of *van G*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000;44(11):3224-8.
48. Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a Population Structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol* 2007; 189(6): 2540–2552.
49. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2119-2125.
50. Murugesan S, Perumal N, Mahalingam SP, Dilliappan SK, Krishnan P. Analysis of antibiotic resistance genes and its associated SCCmec types among nasal carriage of Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci from community settings, Chennai, Southern India. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(8):DC01-5. doi: 10.7860/JCDR/2015/11733.6307.
51. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Approved Standard M7-A6. Villanova, PA: NCCLS; 2003.
52. Natoli S, Fontana C, Favaro M, Bergamini A, Testore GP, Minelli S, et al. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 83.
53. Nguyen TH, Park MD, Otto M. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7:90. doi:10.3389/fcimb.2017.00090.
54. Nunes APF, Teixeira LM, Bastos CCR, Fonseca LS, Santos KRN. Susceptibility of Brazilian staphylococcal strains to glycopeptides evaluated by different testing methods. *Curr Microbiol* 2002;44:385–90.
55. Nunes APF, Teixeira LM, Iorio NLP, Bastos CCR, Fonseca LS, Souto-Padrón T, et al. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Internat J Antimicrob Agents* 2006; 27(4): 307–315.
56. Oliveira ADD, d'Azevedo PA, de Sousa LB, Viana-Niero C, Francisco W, Lottenberg C, Martino MD, Höfling-Lima AL. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. *Arq Bras Oftalmol* 2007; 70(2): 667-675.
57. Otto M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol* 2010; 5(2): 183–195.

58. Palazzo ICV, Araujo MLC, Darini ALC. First Report of Vancomycin-Resistant *Staphylococci* Isolated from Healthy Carriers in Brazil. *J Clin Microbiology* 2005; 43:1 179-185.
59. Palazzo ICV, Darini ALC. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative *Staphylococci* including cefoxitin disc diffusion. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 257: 299-305.
60. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A, Bartolomeu AR, Camargo CH, Cunha MLRS. Susceptibility profile of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from blood cultures to vancomycin and novel antimicrobial drugs over a period of 12 years. *Microb Drug Resist* 2016; 22(4):283-93. doi: 10.1089/mdr.2015.0064. Epub 2015 Dec 1.
61. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infect Dis Clin N Am* 2009; 23(1): 73–98.
62. Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5614–5619.
63. Savithri MB, Iyer V, Jones M, Yarwood T, Looke D, Kruger PS, et al. Epidemiology and significance of coagulase-negative staphylococci isolated in blood cultures from critically ill adult patients. *Crit Care Resusc* 2011;13(2):103-7.
64. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med* 1987; 316:927–31.
65. Siebert WT, Moreland N, Williams TW Jr. Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. *South Med J* 1978; 71(11): 1353-5.
66. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SE, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med* 1999; 340: 517–23.
67. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1955 –1958.
68. Sinlapasorn S, Lulitanond A, Angkititrakul S, Chanawong A, Wilailuckana C, Tavichakorntrakool R et al. SCC*mec* IX in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from pigs and workers at pig farms in Khon Kaen, Thailand. *J Med Microbiol* 2015; 64(9):1087-93. doi: 10.1099/jmm.0.000119.
69. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Moller N, Olsson-Liljequist B et al. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:204-207.

70. Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Boven CPA. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2488-93.
71. Stewart PS, Consterton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-8.
72. Ustulin DR, Cunha MLRS. Methods for Detection of Oxacillin Resistance among Coagulase-Negative Staphylococci Recovered from Patients with Bloodstream Infections at the University Hospital in Brazil. *J Virol Microbiol* 2012; doi: 10.5171/2012.164822.
73. Van Eldere J, Peetermans WE, Struelens M, Deplano A, Bobbaers H. Polyclonal staphylococcal endocarditis caused by genetic variability. *Clin Infect Dis* 2000; 31:24-30.
74. Vuong C, Christiane G, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 2003;188:706–18.
75. Willemse-Erix HFM, Jachtenberg J, Barutçi H Puppels GJ, van Belkum A, Vos MC, Maquelin K. Proof of principle for successful characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from skin by use of raman spectroscopy and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2010; 48(3): 736-740.
76. Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3574–3579
77. Wong SSY, Ho PL, Woo PCY, Yuen KY. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. *Clin Infect Dis* 1999; 29:760–767.
78. Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* 2003, 49:1577-1593.
79. Zhou X, Dai YY, Ma XL. Be alert to the alterations in the biological characteristics in heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Microbiol* 2012; 30: 215-7.
80. Ziebuhr W, Dietrich K, Trautmann M, Wilhelm M. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. *Int J Med Microbiol* 2000; 290:115-120.
81. Zong Z, Peng C, Lü X. Diversity of SCCmec Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *PLoS ONE* 2011; 6(5): e20191. doi:10.1371/journal.pone.0020191.

4. APRESENTAÇÃO DA TESE

Os resultados e a discussão dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de artigos científicos.

4.1 Artigo Científico I: Presença de clones de *Staphylococcus* Coagulase-Negativa no hospital e comunidade por longos períodos de tempo

Revista: PLOS One

Fator de Impacto: 2,81

Status: A ser submetido

4.2 Artigo Científico II: Avaliação dos valores de referência para testes fenotípicos para resistência à oxacilina em isolados de *Staphylococcus* Coagulase-Negativa

Revista: Future Microbiology

Fator de Impacto: 3,374

Status: Publicado

4.3 Artigo Científico III: Alterações morfoquímicas e espessamento da parede celular em *Staphylococcus* coagulase-negativa com susceptibilidade reduzida à vancomicina

Revista: Microbial Drug Resistance

Fator de Impacto: 2,344

Status: A ser submetido

ARTIGO I

Presença de clones de *Staphylococcus* Coagulase-Negativa no hospital e comunidade por longos períodos de tempo

Luiza Pinheiro^{a,b}, Danilo Flávio Moraes Riboli^a, Ligia Maria Abraão^a, Eliane Patricia Lino Pereira Franchi^a, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha^a

^aDepartamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu 18618-970, Brasil.

^bDepartamento de Anatomia Patológica, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, 17034-971, Brasil.

E-mails:

luizapineiro@ibb.unesp.br (L. Pinheiro); danilo.riboli@ibb.unesp.br (D. F. M. Riboli); ligia.abraao@ymail.com (L. M. Abraão); cunhamlr@ibb.unesp.br (M. L. R. S. Cunha).

#Correspondência a Luiza Pinheiro, luizapineiro@ibb.unesp.br

*Endereço postal: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha. Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Departamento de Microbiologia e Imunologia. Distrito de Rubião Jr. s/n. CEP. 18618-970. Botucatu, São Paulo – Brasil.

Telefone: +551438800428

1. Resumo

Por serem colonizantes da pele e mucosa de seres humanos, ao serem isolados de materiais clínicos, os estafilococos coagulase-negativa (CoNS) podem ser facilmente considerados como contaminantes. Análises moleculares como tipagens por PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), MLST (*Multilocus Sequence Typing*) e SCC*mec* são importantes para se avaliar a clonalidade de isolados de estafilococos e eventos de disseminação. Este estudo teve como objetivo avaliar a relação clonal e SCC*mec* de cepas de diversas espécies de CoNS isoladas de hemoculturas de pacientes internados, de swab nasal de indivíduos saudáveis da mesma comunidade e de feridas de pele crônicas. *S. epidermidis*, a espécie mais frequente em todas as origens, apresentou alta diversidade clonal, mas a presença de clusters no ambiente hospitalar e na comunidade foi observada. Clones hospitalares pertenciam aos STs 2, 6 e 23. *S. haemolyticus* revelou pequenos clones circulando separadamente nos ambientes, enquanto *S. saprophyticus* mostrou altíssima diversidade clonal. Clusters grandes circulando no hospital e comunidade foram encontrados em isolados de *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. capitis*, demonstrando que provavelmente, nestas espécies, há baixa taxa de eventos de diversidade ou certos clones estão se sobressaindo e disseminando. A variedade dos tipos de SCC*mec* foi bem elevada, sendo que isolados do mesmo cluster possuíam tipos distintos. *S. epidermidis* teve alta prevalência dos tipos I e III, *S. haemolyticus* dos tipos I e II, *S. capitis* do tipo V, *S. hominis* esteve associado ao complexo *mec* do tipo A e *ccr1*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* ao SCC*mec* tipo I. Curiosamente, o SCC*mec* IV não foi observado com frequência, mesmo nos isolados de colonização. A geração de elementos e combinações novas dos genes do cassete se mostrou altamente relacionada às cepas de CoNS, sugerindo que o SCC*mec* não é um bom marcador para clonalidade nessas bactérias.

Palavras-chave: Estafilococos Coagulase-Negativa; SCC*mec*; PFGE; MLST

2. Introdução

Staphylococcus coagulase-negativa (CoNS) são agentes colonizantes da pele e mucosa de seres humanos e animais (1,2). O grupo dos CoNS é formado por várias espécies, sendo as mais frequentemente observadas *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, e *S. schleiferi* (3). Apesar de viverem de forma simbiótica com seu

hospedeiro, em caso de rompimento da barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implante de dispositivos médicos (cateteres, próteses ou válvulas), os CoNS expressam fatores de patogenicidade e podem causar sérias infecções (4). Assim, são reconhecidos como micro-organismos essencialmente oportunistas, que se utilizam de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções (3).

A resistência aos antimicrobianos é um desafio mundial para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias, principalmente as associadas ao ambiente hospitalar. A resistência à meticilina em CoNS é estimada em 20% na comunidade (5) e mais de 80% em isolados hospitalares (6). Tal resistência é geralmente associada a uma proteína ligadora de penicilina 2 (PBP2) modificada, que é codificada pelo gene *mecA*, a qual está contida em um elemento genético móvel, denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), considerado um intercâmbio de resistência entre CoNS e *S. aureus* (7), e também utilizado para caracterizar a relação filogenética entre cepas de *Staphylococcus*.

A tipagem molecular de cepas hospitalares de *S. epidermidis* utilizando-se de diferentes métodos têm mostrado diversidade considerável dentro desta espécie (8). O PFGE é uma metodologia amplamente utilizada em estudos de clonalidade local em cepas bacterianas, que se mostra muito eficiente na identificação de perfis entre os estafilococos. Usando-se a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), estudos observaram que a estrutura populacional de *S. epidermidis* nos ambientes hospitalares é composta de uma linhagem principal, com alta diversidade genética, o complexo clonal 2 (CC2) (9,10,11). A combinação da tipagem pelo SCC*mec* e análise por PFGE contribuiu com informações tanto na epidemiologia a curto prazo quanto a longo prazo, consistente com a avaliação por MLST (11). Entretanto, pouco se é estudado quanto à diversidade filogenética das outras espécies de CoNS.

Pouca informação se tem quanto às clonalidade de cepas de CoNS isoladas de colonização, e menos se sabe quanto à sua relação filogenética com isolados de sítios de infecção. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar a relação clonal e tipagem do SCC*mec* de cepas de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. pasteurii*, *S. simulans*, *S. xylosus* e *S. cohnii* isolados de hemoculturas de pacientes internados em hospital, colonização nasal em indivíduos

saudáveis e feridas crônicas de pacientes atendidos em unidades básicas de saúde, todos do mesmo município.

3. Materiais e Métodos

3.1 Isolados

Duzentos e noventa e nove isolados de CoNS foram estudados. Do total, 132 foram obtidos a partir de hemoculturas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, de 1990 a 2012, os quais estão estocados na Coleção de Culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP. Ainda, 145 foram isolados de swab nasal de indivíduos saudáveis da mesma comunidade e 22 de feridas crônicas de pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde de Botucatu -SP, isolados de 2011 a 2013 e mantidos a -80°C.

3.2 Identificação dos CoNS

A identificação do gênero *Staphylococcus* foi realizada conforme as normas descritas por Baker (11) e Koneman et al (12). A identificação das espécies de CoNS foi realizada utilizando o método simplificado proposto por Cunha et al (13), conforme esquema de provas bioquímicas. Após extração de DNA realizada utilizando-se o kit Illustra (GE Healthcare), as amostras foram submetidas à identificação genotípica utilizando-se primers de seqüências conservadas adjacentes aos genes que codificam o RNAr16S e RNAr23S pela técnica ITS-PCR (14,15). Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *ureolyticus* (ATCC 49325), *S. warneri* (ATCC 10209), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. xylosus* (ATCC 29979) e *S. caprae* (ATCC 35538). Os isolados que não puderam ser identificados pela técnica de ITS-PCR foram submetidos ao sequenciamento do gene *rpoB*, (nucleotídeos 1444-1928) (16).

3.3 Análise por PFGE

A tipagem por PFGE foi realizada conforme protocolo modificado de McDougal et al (17). As amostras foram colocadas em caldo BHI e incubadas em estufa a 37°C por 24h. Em um microtubo, 0,25ml da amostra crescida foi centrifugada a 12.000rpm por 50s. Depois de desprezado o sobrenadante, foi adicionado 150 µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10min a 37°C. Após vortexar, foram adicionados 2,5 µl de lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 150µl de agarose *low melt*. As amostras foram colocadas nos moldes para plugues até que endurecessem e, então, colocadas em 2ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por pelo menos 4h. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente por meia hora. A restrição enzimática foi feita em um quarto do plugue com a enzima *SmaI* em 50µl de tampão de restrição. Géis de agarose a 1% foram preparados com TBE 0,5X onde os plugues foram colocados e cobertos com agarose *low melt*. A corrida foi feita à 6V/cm e 14°C por 21h. A análise dos resultados foi realizada pelo software Bionumerics 7.1, utilizando-se valores de otimização iguais a 1,0, e tolerância a 1,25.

Como os isolados de *S. hominis* não apresentaram perfis adequados para análise com o protocolo da enzima *SmaI*, revelando padrões com menos do que 5 bandas, foi utilizado o protocolo de acordo com Bouchami et al (18), que se baseia na restrição enzimática pela enzima *XhoI*. As análises se utilizaram de valores de 1% de tolerância e 0.8% de otimização. Os clusters foram definidos em um valor de cut-off de 80%.

3.4 Determinação do SCCmec

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando o método de reação PCR-Multiplex com os primers descritos por Machado et al (19) (Protocolo 1). Apenas para os isolados não tipados pelo primeiro protocolo, os PCRs multiplex 1 e 2 descritos por Kondo et al (20) (Protocolo 2) foram usados. O SCCmec foi definido como não tipável quando (1) o Protocolo 1 não gerou nenhum produto de amplificação E (2) no Protocolo 2 (2.1) o complexo *ccr* não gerou outro produto de amplificação além do gene *mecA* (286pb); OU (2.2) o complexo *mec* não gerou nenhum produto na amplificação; (2.3) OU quando a combinação dos complexos *ccr/mec* não gerou um SCCmec

conhecido. Em caso de amplificação de mais de um fragmento pelo Protocolo 1, foram considerados presentes dois tipos de SCC*mec*.

3.5 MLST

O MLST para *S. epidermidis* foi realizado segundo as normas descritas por Thomas et al (21). Os sete genes housekeeping utilizados no esquema do MLST foram: carbamatoquinase (*arcc*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glp*), guanilatoquinase (*gmk*), fosfato acetiltransferase (*atp*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*). PCRs foram realizadas com um volume de reação de 50 µl contendo 0,5 µl de DNA cromossômico (aproximadamente 0,5 µg), 0,5 µg de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase, 5 µl de tampão de 10 X (fornecido com a Taq polimerase), e 0,2 mM desoxinucleotídeos trifosfatos. A PCR foi realizada em uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida por uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram precipitados com 20% de polietileno glicol, 2,5 M NaCl, ressuspenso em etanol frio a 70% e reprecipitado. O sequenciamento foi realizado em sequenciador de DNA ABI (Applied Biosystems) Prism model 377. Os programas Bionumerics Software Sequence Typing e MEGA 6.0 foram utilizados para alinhar as sequências de nucleotídeos. A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<http://www.mlst.net>).

Os STs de *S. epidermidis* identificados foram depositados no banco de dados do MLST (pubmlst.org). Duas cepas (2A e 47A) possuíam um perfil ainda não descrito, e foram denominadas com os STs 637 e 638, respectivamente.

3.6 Índice de diversidade

O valor do índice de diversidade de Simpson foi calculado através do número de amostras por perfil clonal, de acordo com Hunter e Gaston (22). É definido pela probabilidade de duas cepas não relacionadas, originadas de uma determinada população, serem alocadas em grupos diferentes.

4. Resultados

Os isolados de swab nasal estavam distribuídos entre as seguintes espécies: 57 (39,3%) *S. epidermidis*, 18 (11,7%) *S. haemolyticus*, 27 (17,5%) *S. warneri*, 19 (12,3%) *S. lugdunensis*, 5 (3,2%) *S. capitis*, 12 (7,8%) *S. saprophyticus*, 2 (1,3%) *S. simulans*, 3 (2%) *S. pasteurii*, 1 (0,6%) *S. xylosum* e 1 (0,6%) *S. cohnii*.

Dos isolados de feridas de pele, havia 3 (13,6%) *S. epidermidis*, 7 (31,8%) *S. haemolyticus*, 5 (22,7%) *S. warneri*, 1 (4,5%) *S. hominis*, 1 (4,5%) *S. lugdunensis*, 1 (4,5%) *S. simulans*, 2 (9%) *S. capitis* e 2 (9%) *S. saprophyticus*. Os isolados de hemoculturas foram distribuídos em 40 (30,3%) *S. epidermidis*, 28 (21,2%) *S. haemolyticus*, 7 (31,8%) *S. warneri*, 22 (16,7%) *S. hominis*, 10 (7,6%) *S. lugdunensis* e 25 (19%) *S. capitis*.

Os dendrogramas apresentam o perfil *pulsotype* das espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus* e *S. pasteurii* (Figuras de 1 a 8). Os perfis com final 'A' representam isolados de swab nasal, com final 'B', de feridas, e aqueles com 'C' representam os isolados de hemoculturas. As três amostras de *S. simulans* tiveram uma similaridade menor do que 60%, portanto não estão sendo apresentadas em dendrograma.

Do total de isolados (299), 185 (62%) apresentaram positividade para o gene *mecA*, sendo 48 de origem comunitária (33%), 21 de feridas (100%), e 116 isolados de hemoculturas (88%). A Tabela 1 descreve o número e porcentagem de tipos de SCC*mec* por origem, e a Tabela 2 mostra os resultados de amplificação dos isolados não tipados pelos Protocolos 1 e 2 para determinação do SCC*mec* (não estão representados os casos em que apenas o controle interno do gene *mecA* no Protocolo 2 foi amplificado).

A tabela 3 mostra os índices de diversidade calculados a partir dos perfis clonais encontrados no PFGE.

Tabela 1. Isolados e seus tipos de SCC*mec* por origem.

SCC <i>mec</i>	Colonização Nasal	Feridas	Hemoculturas
I	25 (52)	9 (42,8)	32 (27,6)
II	1 (2)	0	1 (0,9)
III	3 (6,25)	0	9 (7,8)
IV	1 (2)	0	9 (7,8)
V	3 (6,25)	0	12 (10,3)
I,III	4 (8,3)	0	16 (13,8)
I,II	3 (6,25)	4 (19)	6 (5,2)
III,IV	0	0	9 (7,8)
VIII	1 (2)	0	0
NT	7 (14,6)	8 (38)	21 (18,1)
<i>mecA</i> -	97 (67)	1 (4,5)	16 (12,1)
Total	145 (100)	22 (100)	132 (100)

Tabela 2. Isolados não tipáveis para o SCC*mec* que apresentaram ausência de amplificação do complexo *mec* OU *ccr*, ou multiplicidade de complexos. Nos casos restantes houve ausência de amplificação de ambos os complexos apesar do controle interno positivo.

Isolado	Espécie	Protocolo 2		
		CI	<i>ccr</i>	<i>mec</i>
78A	<i>S. epidermidis</i>	+	1+4	A
83C	<i>S. hominis</i>	+	1	A
93C	<i>S. hominis</i>	+	1	A
116C	<i>S. warneri</i>	+	1+4+5	-
139C	<i>S. capitis</i>	+	-	A+B

CI = Controle Interno do gene *mecA*

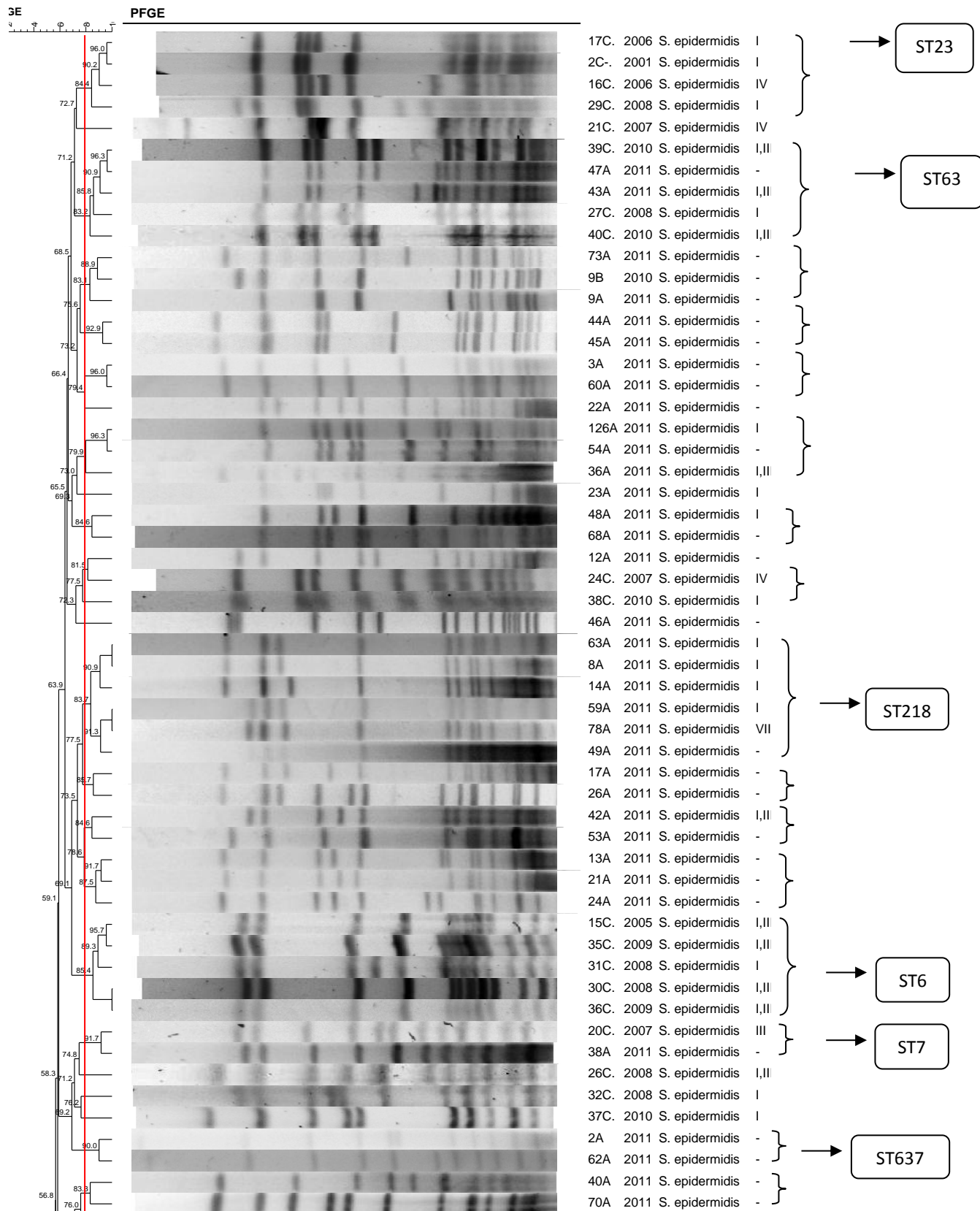


Figura 1. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *Sma*I de *S. epidermidis* provenientes de swab nasal (A), de feridas (B) e hemoculturas (C).

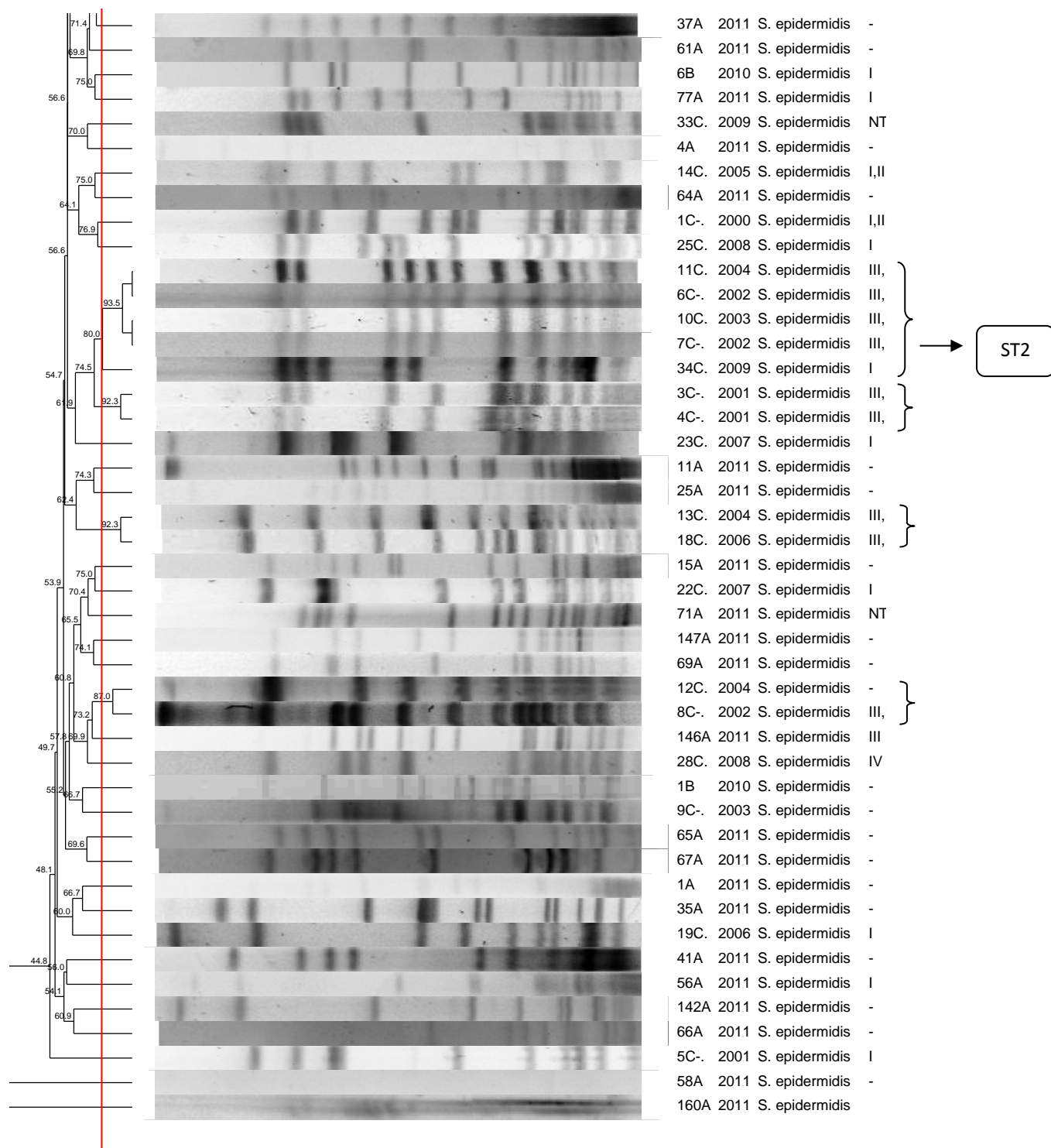


Figura 1 (continuação). Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *SmaI* de *S. epidermidis* provenientes de swab nasal (A), de feridas (B) e hemoculturas (C).

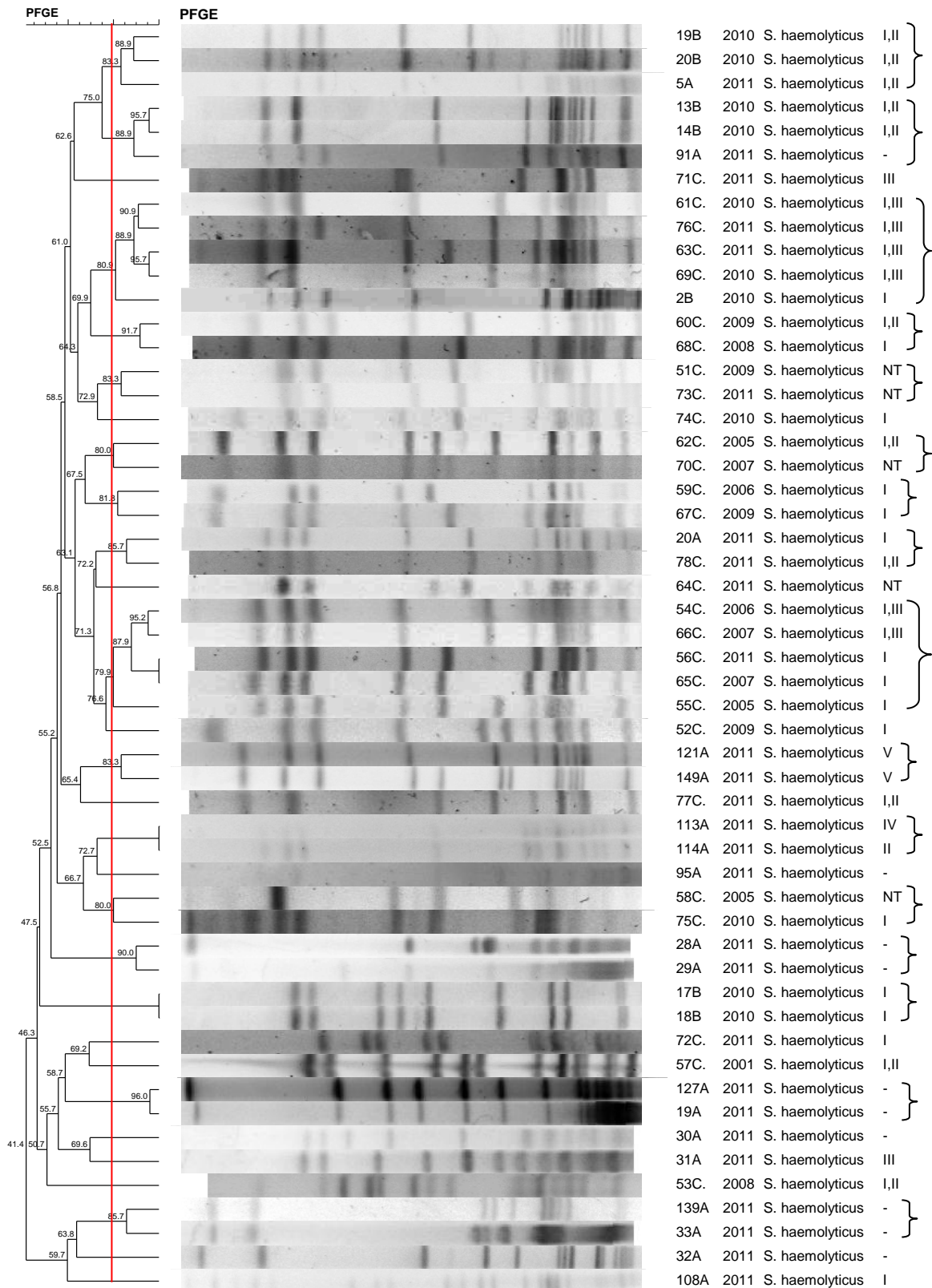


Figura 2. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *Sma*I de *S. haemolyticus* provenientes de swab nasal (A), de feridas (B) e hemoculturas (C).

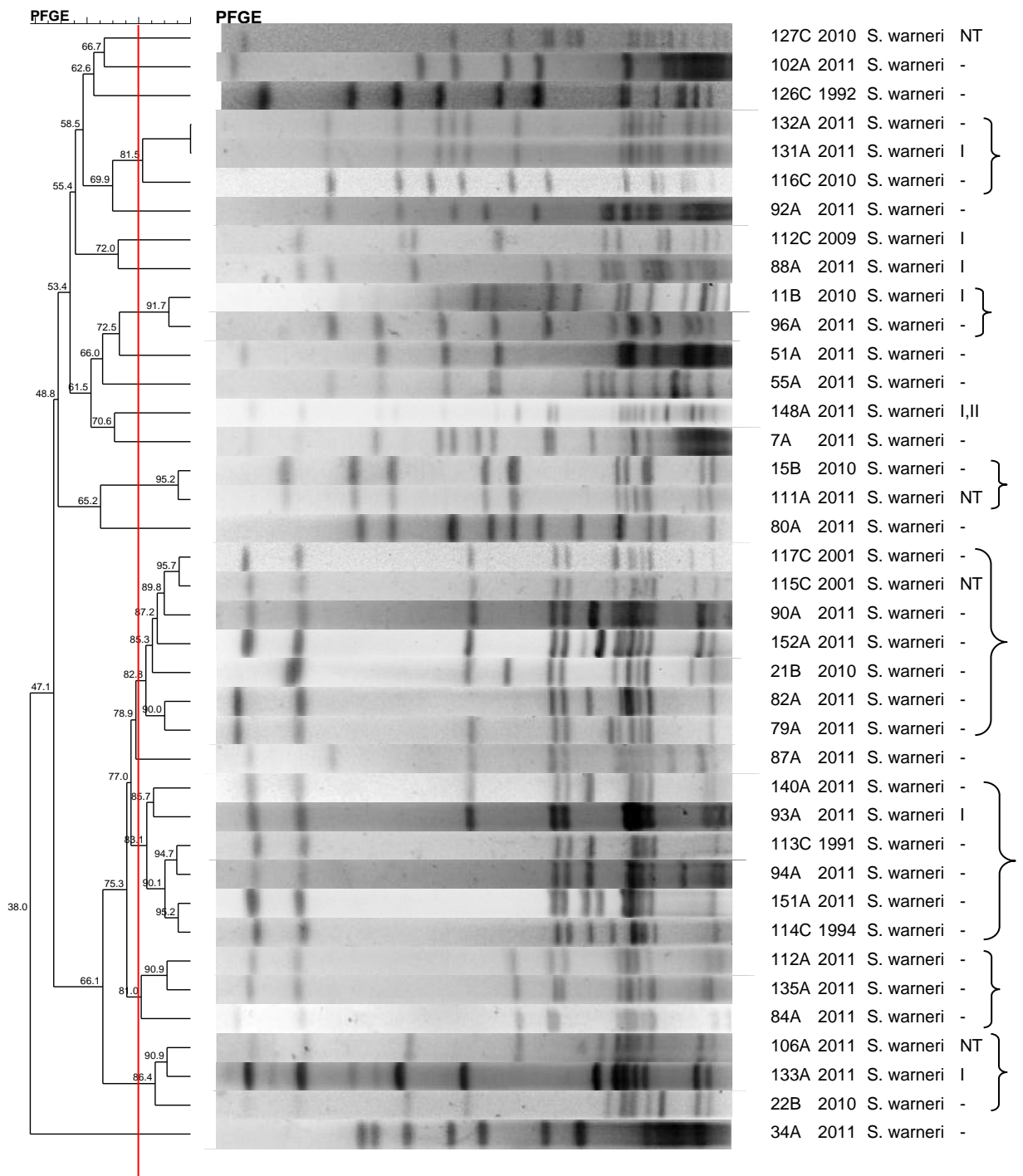


Figura 3. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *SmaI* de *S. warneri* provenientes de swab nasal (A), de feridas (B) e hemoculturas (C).

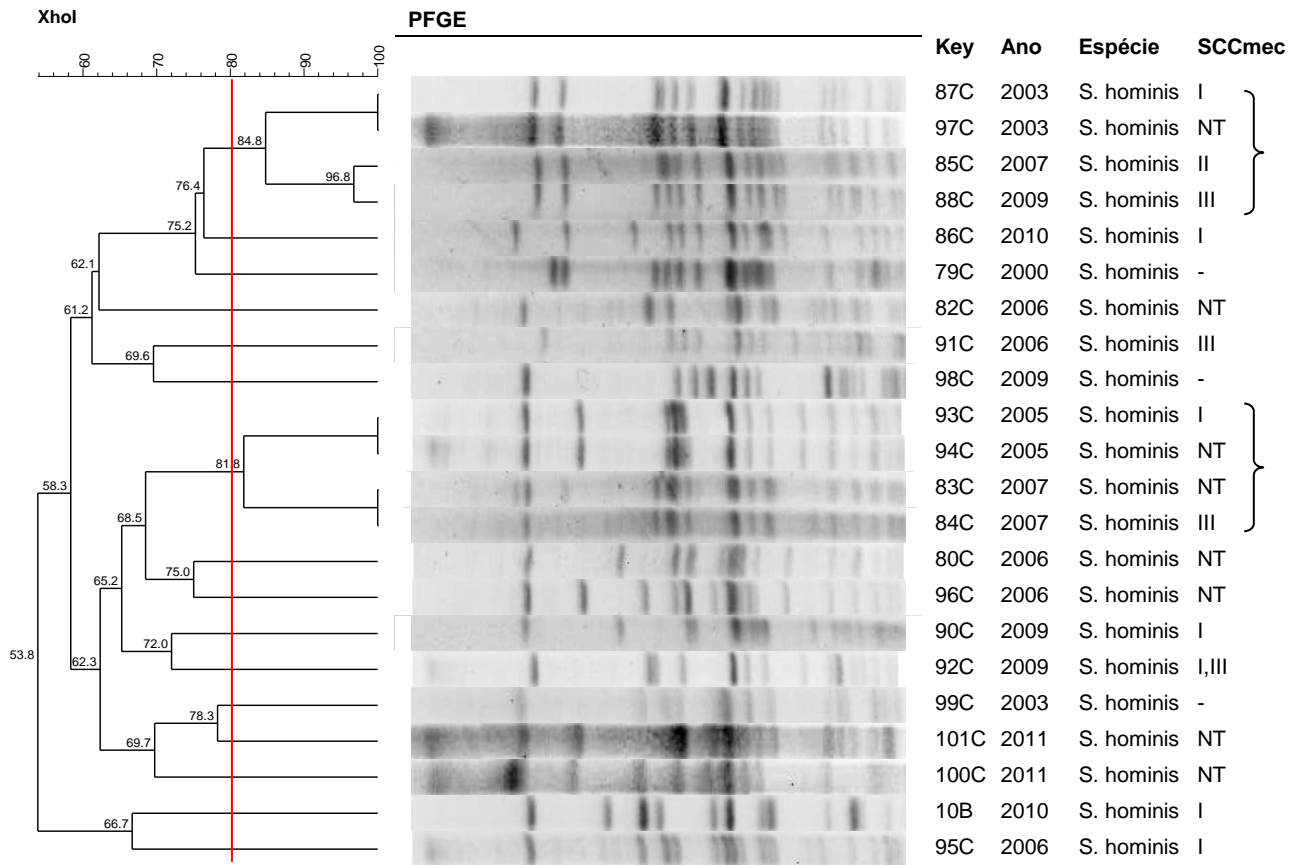


Figura 4. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE – *XhoI* de *S. hominis* provenientes de feridas (B) e hemoculturas (C).

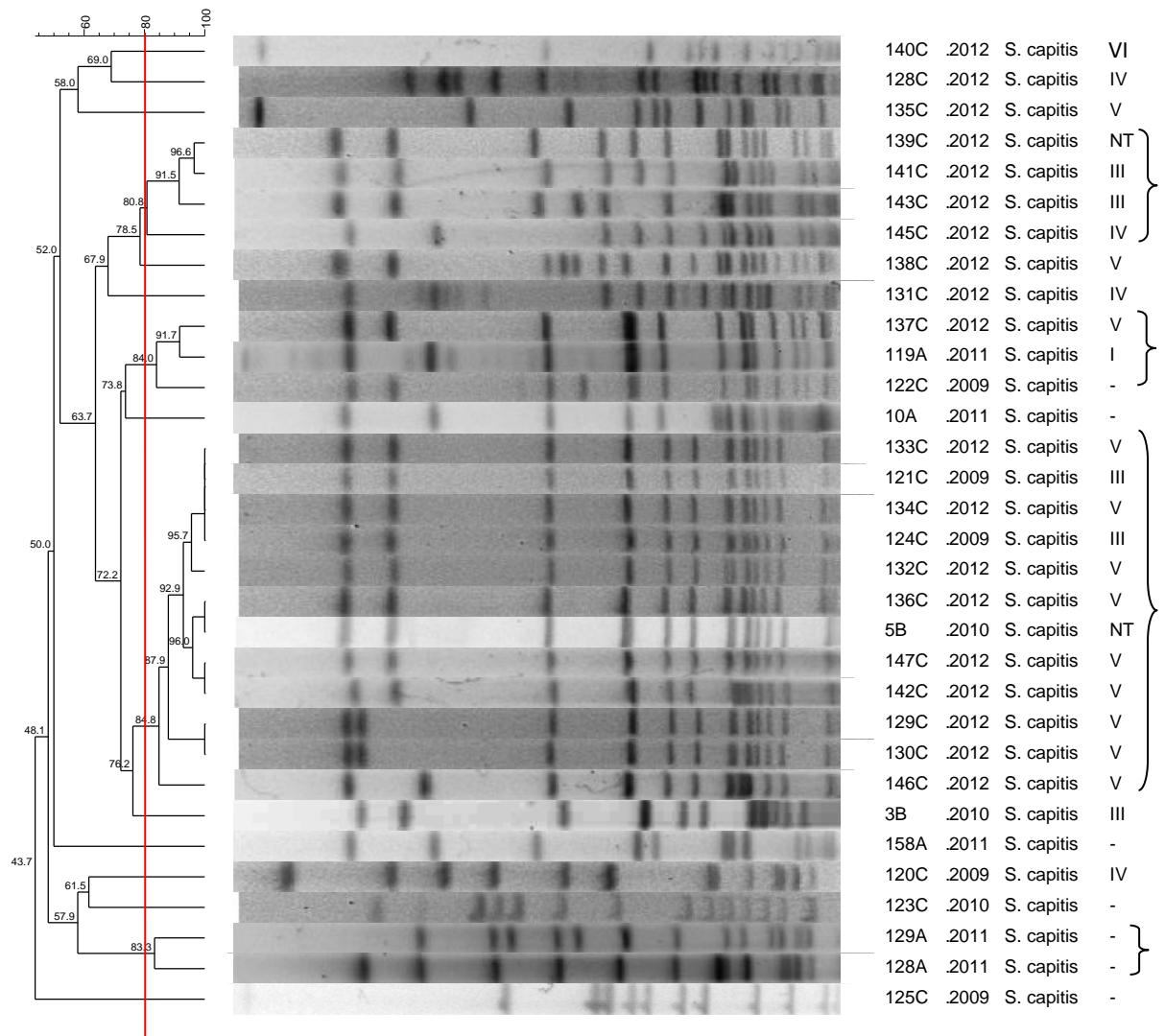


Figura 5. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *SmaI* de *S. capitis* provenientes de swab nasal (A), de feridas (B) e hemoculturas (C).

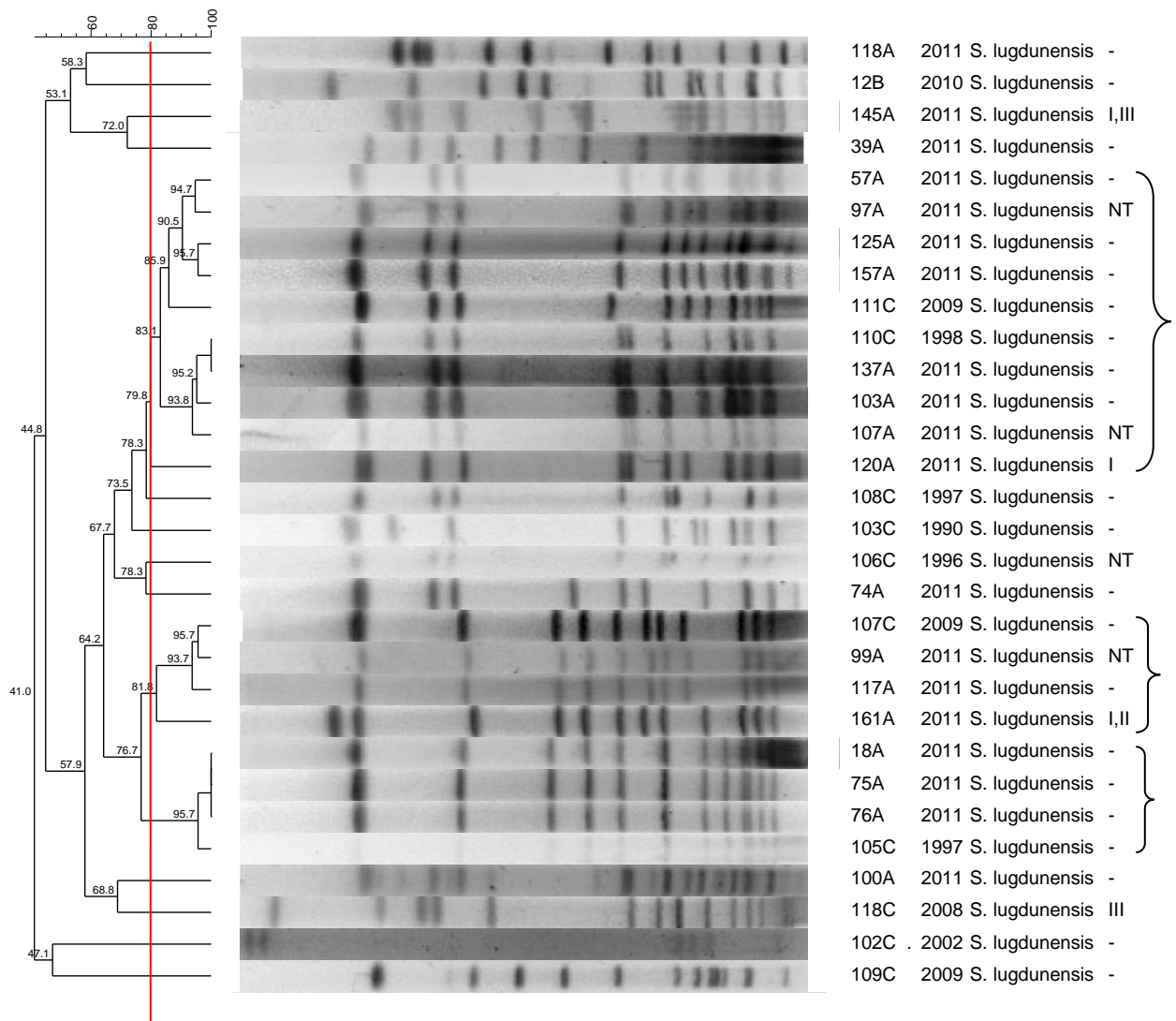


Figura 6. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *SmaI* de *S. lugdunensis* provenientes de swab nasal (A), de feridas (B) e hemoculturas (C).

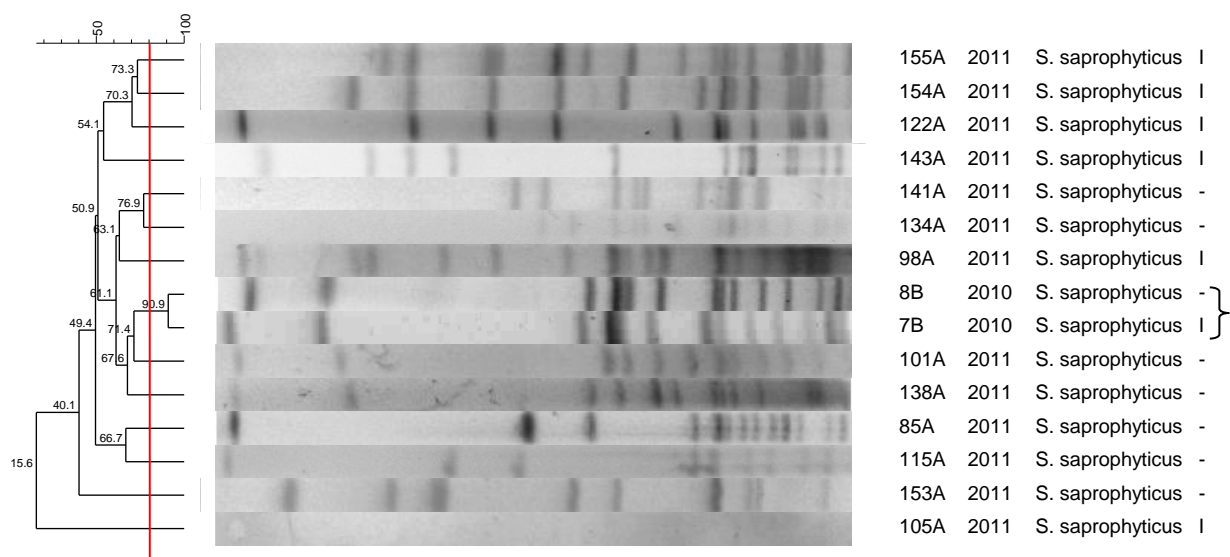


Figura 7. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *SmaI* de *S. saprophyticus* provenientes de swab nasal (A) e de feridas (B).



Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *SmaI* de *S. pasteurii* provenientes de swab nasal (A).

Tabela 3. Índice de diversidade das espécies de CoNS por perfil clonal.

Espécie	Índice de diversidade
<i>S. epidermidis</i>	0,971026
<i>S. haemolyticus</i>	0,984708
<i>S. warneri</i>	0,981087
<i>S. hominis</i>	0,995717
<i>S. capitis</i>	0,969416
<i>S. lugdunensis</i>	0,977062
<i>S. saprophyticus</i>	0,999598
<i>S. pasteurii</i>	0,999598

5. Discussão

Este estudo buscou relacionar isolados clínicos, comensais e de feridas, a fim de se fazer uma ligação epidemiológica local entre as diferentes espécies de CoNS. Este tipo de estudo genético é o primeiro passo para se avaliar a diversidade de uma espécie e determinar a ligação entre subpopulações de cepas, especialmente entre isolados comensais e isolados de pacientes com doenças infecciosas, ou entre cepas que são susceptíveis ou resistentes a um antibiótico (23).

S. epidermidis

S. epidermidis revelou uma estrutura filogenética muito distinta, tanto no hospital como na comunidade, como já observado anteriormente (24-27), apesar da presença de três clusters hospitalares, alguns clones na comunidade, e um cluster contendo amostras clínicas e colonizantes. Este cluster teve uma amostra submetida à tipagem do MLST e pertence ao ST 638, próximo aos STs 151 e 228 e, pela sua presença no hospital/comunidade, possivelmente possui vantagens evolutivas que estão permitindo sua circulação eficiente nestes ambientes, observação rara para isolados de *S. epidermidis*, que possuem grande variabilidade genética (9).

As três amostras escolhidas para representar dois clusters hospitalares pertenciam ao ST2, ST6 e ST23. Este último já foi associado a cepas resistentes à linezolida, com mutações no gene do rRNA 23S e carregando o plasmídeo *cfr* (28-31). Já o ST2 é o mais encontrado tanto em isolados clínicos como colonizantes (9,28,32), mas mais frequentemente em cepas hospitalares (24). O ST6 é frequentemente descrito em isolados clínicos e comunitários (8), sendo um dos principais em isolados hospitalares (10). Entretanto, diferentemente do presente estudo, em que foi associado ao SCC*mec* tipos I e III, o ST6 foi descrito como relacionado ao SCC*mec* tipos II e V (10), e já foi também relacionado à resistência à linezolida (33).

O ST7, observado em um cluster contendo um isolado de hemocultura e um isolado nasal, já foi descrito como associado ao SCC*mec* tipo IV (28), provavelmente relacionado à interface comunidade-hospital. Como no presente estudo, o ST7 já foi associado a isolados de *S. epidermidis* sensíveis à meticilina (MSSE) (24).

Os dois isolados tipados por MLST que pertenciam a clones da comunidade foram identificados como ST218 e ST637. Em estudo anterior, por sua vez, o ST218 foi descrito em *S. epidermidis* causando infecção na corrente sanguínea (34).

S. haemolyticus

Os isolados de *S. haemolyticus* apresentaram-se com certa diversidade molecular, formando pequenos clusters, sendo que o maior contém 7 isolados hospitalares, e um cluster agrupa dois isolados colonizantes e dois de feridas. Um isolado de hemocultura e um de ferida formaram um pequeno cluster. As cepas de feridas crônicas demonstraram-se ser próximas geneticamente tanto às cepas nosocomiais como às comensais, enfatizando seu papel duplo como colonizante/causador de infecção. De fato, a alta plasticidade das cepas de *S. haemolyticus* foi já relatada quando a primeira cepa desta espécie foi sequenciada, mostrando a presença de uma grande quantidade de sequências de inserção e transposons (35). A alta diversidade dessa espécie foi também descrita por trabalhos anteriores (27,36). Ocasionalmente, certos clones de *S. haemolyticus* podem predominar sobre outros no ambiente hospitalar (37). Sua alta plasticidade genômica parece contribuir para a grande heterogeneidade da espécie, sendo que pequenos clones podem aparecer em localidades próximas dentro do hospital ou na comunidade, mas a circulação de certos clones dentro e entre estes ambientes parece não ocorrer com tanta frequência.

S. hominis

Curiosamente, *S. hominis* foi a única espécie de CoNS no presente trabalho que não sofreu restrição enzimática adequada pela enzima *SmaI*. Semelhantemente, Bouchami et al (18) observaram o mesmo fenômeno, assim como a baixa clonalidade dessa espécie. Nossos resultados demonstram grande diversidade de *S. hominis* dentro do ambiente hospitalar, apesar da presença de um cluster circulando por 7 anos, e outro por 3 anos. A maioria das cepas, entretanto, parece ser originada da microbiota dos pacientes. A comparação com *S. hominis* proveniente de indivíduos saudáveis da comunidade permitiria uma melhor avaliação da clonalidade dessa espécie: a ausência de isolamento de *S. hominis* nos swabs nasais, no presente estudo, caracteriza uma grande limitação nesse aspecto.

Alta prevalência de SCC*mec* tipo III em *S. hominis* também já foi relatada no Brasil (38). No presente estudo, 20% dos isolados com SCC*mec* não tipados possuíam complexo *mec* do tipo A e *ccr1*, observação descrita anteriormente (18,39). A alta frequência do complexo *mec* A confirma que *S. hominis* pode ser reservatório para este elemento.

S. saprophyticus

Observamos, na análise clonal de *S. saprophyticus* isolados de swab nasal, a ausência de clusters ou PFGE-types. Entretanto, os dois *S. saprophyticus* de feridas, de dois pacientes distintos, apresentaram perfil similar. Sousa et al (40), por sua vez, demonstraram a alta clonalidade de cepas de *S. saprophyticus* causadoras de infecções comunitárias do trato urinário, provavelmente devido a surto. Widerstrom et al (41) encontraram uma população bem heterogênea com vários clones de *S. saprophyticus* associados à UTI, ausência de um clone uropatogênico específico, mas clusters de isolados altamente relacionados geneticamente. Tal resultado demonstra a alta diversidade desta espécie nos isolados comensais, com pouca probabilidade de causar infecções, enquanto que certos genótipos provavelmente possuem vantagens biológicas que facilitam sua persistência como causadores de diferentes tipos de infecção. Um mesmo genótipo presente em diferentes pacientes sugere uma fonte comum para a aquisição deste micro-organismo. O estudo detalhado de tais cepas, a fim de se identificar quais fatores bacterianos intrínsecos favorecem o curso das infecções, é necessário.

Soderquist et al (42) demonstraram a presença de pelo menos 3 tipos de SCC*mec* em isolados de *S. saprophyticus* de origem diversa, mas relacionados geneticamente. Os resultados do presente trabalho, por sua vez, revelam o carreamento apenas do SCC*mec* tipo I nos *S. saprophyticus* de infecção, apesar da sua relação clonal ter sido baixa.

S. lugdunensis

S. lugdunensis é considerado uma espécie muito menos comum do que os outros CoNS, sendo descrito como contaminante ou micro-organismo colonizador; entretanto, sua presença é considerada significativa, pelo seu curso infeccioso ser semelhante ao de *S. aureus* (43). *S. lugdunensis* pode estar associado à maior manifestação de sinais clínicos e menor tempo entre cirurgia e infecção quando comparado a *S. epidermidis* e

S. aureus (44). Alguns autores sugerem que qualquer isolado desta espécie deve ser considerado um patógeno até que se prove o contrário (43).

Os isolados de *S. lugdunensis* agruparam-se em dois clusters principais, que continham cepas colonizantes e clínicas, com alta similaridade. O agrupamento de *S. lugdunensis* isolados em períodos longos de intervalo, chegando a 15 anos de diferença, sugere que o nível de diversidade genética desta espécie seja baixo, como já observado anteriormente, variando muito pouco entre os estudos (23,45). A estrutura genética dessa população sugere que a maior parte das cepas comensais possui a habilidade de causar infecção, ao menos localmente, ou que as cepas presentes no ambiente hospitalar possam estar se disseminando para a comunidade, atingindo a população saudável. Ainda, a alta similaridade entre os padrões de restrição pode também indicar que se trate mais de homogeneidade intrínseca da espécie *S. lugdunensis* do que uma ligação epidemiológica entre as cepas (23).

S. warneri

S. warneri, sendo uma espécie pouco isolada de infecções humanas e animais, mostrou-se presente em certa frequência neste estudo, principalmente nos isolados de colonização nasal e em feridas. Em hemoculturas, essa proporção foi bem menor. O presente trabalho mostrou uma relativa baixa diversidade dentre os isolados dessa espécie, sendo que alguns clusters foram identificados, incluindo isolados das três origens. Identificamos um clone maior, que compreendeu cepas de hemoculturas, nasais e de feridas, que demonstra a circulação deste pulso-type entre os três ambientes, o que sugere a presença de vantagens evolutivas que permitem sua disseminação/estabelecimento.

Enquanto a alta diversidade inter-específica de *S. warneri* foi relatada (46), a disseminação de um único clone colonizando profissionais da saúde em hospital também foi descrita (47). Entretanto, a escassez de estudos de epidemiologia molecular abrangendo isolados de *Staphylococcus warneri* dificulta a obtenção de maiores informações sobre a clonalidade desta espécie. Não há, de acordo com nosso conhecimento, dados na literatura que relacionem geneticamente um número razoável de cepas de *S. warneri*; os dados do presente estudo parecem constituir o primeiro passo para o entendimento do estabelecimento e disseminação de *S. warneri*.

S. capitis

Foi possível observar baixa heterogeneidade das cepas de *S. capitis*, principalmente aquelas obtidas de hemoculturas, com alta clonalidade. De Silva et al (48), estudando isolados de bacteremia, contaminantes de hemocultura e colonizantes, verificaram que todos os 29 *S. capitis* pertenciam a um só clone. Entretanto, naquele estudo, apenas foram avaliados pacientes internados no hospital.

No presente trabalho, os mesmos clones de *S. capitis* que estão colonizando os moradores da cidade (swab nasal), provavelmente estão associados a infecções no hospital (hemoculturas) e doenças crônicas (feridas). Tais dados confirmam a alta homogeneidade desta espécie e a persistência de certos clones. Um único clone com alta similaridade, circulante desde 2009 até 2012, pode estar associado a um pequeno surto de *S. capitis* envolvendo, além dos pacientes com hemocultura positiva, uma infecção em ferida. *S. capitis* não é um patógeno nosocomial comum, e geralmente aparece em baixa frequência na microbiota de pacientes testados (49). Apesar disso, essa espécie é endêmica em alguns hospitais, como em unidades neonatais, estando relacionada a infecções associadas à corrente sanguínea (50).

S. pasteurii

Apesar de a descrição desta espécie ser relativamente recente, alguns trabalhos revelam alta frequência em isolados humanos e animais (51,52), sendo que *S. pasteurii* ocorre de ser erroneamente identificado como outras espécies, como *S. warneri* (53). Trabalhos que utilizam a metodologia de sequenciamento do gene RNAr16S ou do gene *rpoB* relatam a presença desta espécie (51,52,53), enquanto que estudos que utilizam testes bioquímicos ou protocolos de amplificação de DNA podem subestimar a presença destes isolados. No presente estudo, três amostras que não puderam ser tipadas pelos testes bioquímicos e pelo ITS-PCR foram confirmadas como *S. pasteurii* pelo sequenciamento do gene *rpoB*.

Dois dos isolados de *S. pasteurii* em colonização nasal mostraram-se clonalmente relacionados, provavelmente devido à baixa prevalência desta espécie. O único isolado de *S. pasteurii* carregando *SCCmec* possuía o tipo I, resultado já descrito anteriormente (54).

S. simulans

Enquanto alguns trabalhos mostram alta clonalidade de *S. simulans* (29,55), principalmente associado a resistência antimicrobiana, outros demonstram heterogeneidade específica (56). O número muito reduzido de isolados de *S. simulans* no presente estudo limita as conclusões a respeito da relação filogenética entre cepas desta espécie.

Ao propor um critério para definição de clone, a partir do PFGE, tipo de SCC*mec* e MLST, Miragaia et al (11) sugeriram que a melhor abordagem seja a tipagem por PFGE seguida do SCC*mec*. De fato, em tal estudo, isolados pertencentes ao mesmo PFGE-type carregavam SCC*mec* distintos. No presente estudo, tais diferenças foram também encontradas, dados que pode estar relacionados à utilização de duas técnicas de tipagem do cassete. Claramente, as altas taxas de recombinação e a aquisição frequente de elementos genéticos móveis guia a geração de polimorfismos genômicos (11) não só em *S. epidermidis*, mas também nas outras espécies de CoNS.

Em uma parte considerável dos isolados, o SCC*mec* não pôde ser tipado devido à amplificação de dois ou mais tipos de complexos *ccr/mec*, ausência de amplificação de um dos complexos, ou combinação de complexos *mec/ccr* que não se aplicam aos tipos já descritos. Salgueiro et al (32) observaram 83% de isolados de *S. epidermidis* com SCC*mec* não tipáveis pelo mesmo protocolo, sendo que as cepas não tipadas com complexo *ccr* tipo 2 e complexo *mec* não detectável se associaram positivamente a cepas isoladas de infecções da corrente sanguínea. No presente estudo, um número considerável de cepas colonizantes mostrou este mesmo perfil de SCC*mec*. Entretanto, como a metodologia de detecção dos dois complexos foi utilizada apenas nos isolados que não foram tipados pelo protocolo de Machado et al (9), não podemos fazer tal correlação nos nossos isolados.

É possível que as altas taxas de recombinação e o alto número de aquisições de SCC*mec* em CoNS (9), associados à alta frequência de carregamento do SCC*mec* (57) aumente o potencial para geração de recombinações no cassete. De fato, o estudo da região completa do SCC*mec* através do sequenciamento total do genoma dessas cepas com cassetes não tipáveis pelas técnicas de amplificação ofereceriam um arsenal importante de informações para estudo de novos tipos de SCC*mec* e recombinações.

De acordo com o estudo de Miragaia et al (11), pelo menos 18% dos isolados de *S. epidermidis* carregavam novas variantes de SCCmec (elementos não tipáveis ou novas combinações dos complexos *mec/ccr*), enquanto outros estudos mostraram frequências ainda maiores (24, 32). No presente estudo, apenas um isolado de *S. epidermidis* não teve seu SCCmec tipado, enquanto grande parte dos isolados de *S. hominis* e *S. warneri* não foram tipáveis. Tal observação contrasta com o que se sabe sobre *S. aureus*, em que apenas poucos tipos de SCCmec foram identificados em grandes coleções de isolados. A existência de regiões similares entre diferentes tipos de SCCmec indica que o cassete passou por vários eventos sequenciais de recombinação, dando origem a estruturas semelhantes a mosaicos. Acredita-se que um reservatório de variantes de SCCmec está sendo produzido em CoNS e então transferido para *S. aureus* e outras espécies (9).

Oliveira et al (38) também identificaram clones com 100% de similaridade que possuíam tipos de SCCmec distintos, ou ainda, em que um isolado era resistente e o outro não. É notável que isolados pertencendo ao mesmo PFGE-type podem carrear até 3 diferentes combinações de complexos *mec* e *ccr*, mais de um tipo de SCCmec e vários isolados podem carrear SCCmec com múltiplos complexos *ccr*. Grande parte dos isolados pode carrear remanescentes de SCCmec. Tais observações indicam que a aquisição e a perda de elementos genéticos móveis em *S. epidermidis* é provavelmente muito frequente, mesmo no ambiente da comunidade (24).

Os resultados apresentados em relação à diversidade do SCCmec em CoNS podem possuir vieses dado o fato de que foram duas metodologias usadas. Por isso, é preciso cautela na interpretação de tais dados. A grande frequência de elementos não tipáveis em CoNS pode ser uma indicação de que os elementos dos CoNS são tão diferentes dos de *S. aureus* que os métodos de tipagem não podem ser aplicados para essas espécies (39).

6. Conclusão

O presente estudo demonstrou a presença de clones de CoNS circulando entre os ambientes hospitalar e comunitário, principalmente em isolados das espécies *S. lugdunensis* e *S. warneri*, e certos *pulsotypes* mantendo-se restritos a um dos ambientes, como nos isolados de *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. capitis*. A alta diversidade dos tipos de SCCmec em isolados do mesmo clone sugere que este possa não ser um marcador de escolha para observar diversidade filogenética em CoNS, diferentemente

do MLST, o qual identificou STs de *S. epidermidis* associados à resistência a antimicrobianos e novos tipos.

7. Referências

1. Kloos W, Schleifer KH. 1986. Genus IV. *Staphylococcus*, p 1013–1035. In Sneath PHA, Mair N, Sharpe ME, Holt JG (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
2. Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*—the ‘accidental’ pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 555–567
3. Kloos WE, Bannerman TL. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p 264-82. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. American Society Microbiology, Washington.
4. Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 43(5):2286-90.
5. Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, et al. 2010. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCC_{mec} IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 202(2):270-81. doi: 10.1086/653483.
6. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. 2001. 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* 32 Suppl 2:S114.
7. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2637–51.
8. Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, et al. 2013. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. *PLoS ONE* 8(5): e62742. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062742>
9. Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. 2007. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol* 189(6):2540-2552. doi:10.1128/JB.01484-06.
10. Li M, Wang X, Gao Q, Lu Y. 2009. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J Med Microbiol* 58(Pt 4):456-61. doi: 10.1099/jmm.0.007567-0.

11. Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. 2008. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: Proposal for clone definition. *J Clin Microbiol* 46(1): 118-129. doi:10.1128/JCM.01685-07
11. Baker JS. 1984. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol* 9:875-9.
12. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed. Lippincott, Philadelphia.
13. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. 2004. Comparison of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:855-60.
14. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. 2001. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *J Clin Microbiol* 39:3099–103.
15. Barry T, Colleran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* 1:51-56.
16. Mellmann A, Becker K, Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. 2006. Sequencing and staphylococci identification. *Emerg Infect Dis* 12: 333-336.
17. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing of oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Microbiol* 41: 5113-20.
18. Bouchami O, Ben Hassen A, de Lencastre H, Miragaia M. 2011. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements. *PLoS One* 6(7):e21940. doi: 10.1371/journal.pone.0021940.
19. Machado ABMP, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL. 2007. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) types I, II, III, and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Medical Microbiol* 56: 1328–1333.
20. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 51:264-74.

21. Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC. 2007. Improved Multilocus Sequence Typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. J Clin Microbiol 45(2): 616–619.
22. Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 26(11): 2465-6.
23. Van der Mee-Marquet N, Achard A, Mereghetti L, Danton A, Minier M, Quentin R. 2003. *Staphylococcus lugdunensis* Infections: High frequency of inguinal area carriage. J Clin Microbiol 41(4):1404-1409. doi:10.1128/JCM.41.4.1404-1409.2003.
24. Cherifi S, Byl B, Deplano A, Nonhoff C, Denis O, Hallin M. 2013. Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. J Clin Microbiol 51(5): 1541-1547. doi:10.1128/JCM.03378-12
25. Bogado J, Limansky A, Sutich E, Marchiaro P, Marzi M, Putero J, et al. 2002. Molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from a neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 23:447–451.
26. Rolo J, de Lencastre H, Miragaia M. 2012. Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of SCC*mec*. J Antimicrob Chemother 67:1333–1341.
27. Nunes AP, Teixeira LM, Bastos CC, Silva MG, Ferreira RB, Fonseca LS, et al. 2005. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. J Hosp Infect 59(1):19-26.
28. Martínez-Meléndez A, Morfín-Otero R, Villarreal-Treviño L, Camacho-Ortíz A, González-González G, Llaca-Díaz J, et al. 2016. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. Braz J Infect Dis 20(5):419-28. doi: 10.1016/j.bjid.2016.05.007.
29. Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, Baldi MT, Provenzani R, Reali S, et al. 2010. DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. J Antimicrob Chemother 65: 2336–2340
30. Lozano C, Ruiz-García M, Gómez-Sanz E, López-García P, Royo-García G, Zarazaga M, et al. 2012. Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection. Diagn Microbiol Infect Dis 73:380–382

31. Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. 2010. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother* 65:2329–2335.
32. Salgueiro VC, Iorio NLP, Ferreira MC, Chamon RC, Santos KRN. 2017. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. *BMC Microbiol* 17:15. doi: 10.1186/s12866-017-0930-9.
33. Almeida LM, Lincopan N, Araújo MRE, Mamizuka EM. 2012. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 67: 768–784. doi:10.1093/jac/dkr538
34. Sharma P, Satorius AE, Raff MR, Rivera A, Newton DW, Younger JG. 2014. Multilocus Sequence Typing for interpreting blood isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 787458. doi:10.1155/2014/787458
35. Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, et al. 2005. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing Staphylococcal species. *J Bacteriol* 187(21): 7292-7308. doi:10.1128/JB.187.21.7292-7308.2005
36. Barros EM, Ceotto H, Bastos MCF, dos Santos KRN, Giambiagi-deMarval M. 2012. *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. *J Clin Microbiol* 50(1): 166-168. doi:10.1128/JCM.05563-11.
37. Yu M, Chen YG, Yu YS, Chen CL, Li LJ. 2010. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Staphylococcus haemolyticus* in a Chinese hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 613. doi:10.1007/s10096-010-0893-3.
38. Oliveira CF, Cavanagh JP, Fredheim EG, Reiter KC, Rieger A, Klingenberg C, et al. 2016. Coagulase-negative staphylococci in Southern Brazil: looking toward its high diversity. *Rev Soc Bras Med Trop* 49(3): 292-299.
39. Mendoza-Olazarán S, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Llaca-Díaz J, Flores-Treviño S, González-González GM, et al. 2013. Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *PLoS ONE* 8(4):e61161. doi:10.1371/journal.pone.0061161.
40. Sousa VS, Rabello RF, Dias RCS, Martins IS, Santos LBG, Alves EM, et al. 2013. Time-based distribution of *Staphylococcus saprophyticus* pulsed field gel-electrophoresis clusters in community-acquired urinary tract infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(1): 73-76.

41. Widerström M, Wiström J, Ferry S, Karlsson C, Monsen T. 2007. Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 45(5): 1561-1564. doi:10.1128/JCM.02071-06
42. Söderquist B, Berglund C. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), *Clin Microbiol Infect.* 15(12): 1176-1178. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02771.x>.
43. Poutanen SM. 2001. *Staphylococcus lugdunensis*: a notably distinct coagulase-negative Staphylococcus. *Clin Microbiol Newsletter* 23: 147–150.
44. Lourtet-Hascoët J, Bicart-See A, Félicé MP, Giordano G, Bonnet E. 2016. *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Infect Dis* 51:56-61. doi: 10.1016/j.ijid.2016.08.007.
45. Etienne J, Poitevin-Later F, Renaud F, Fleurette J. 1990. Plasmid profiles and genomic DNA restriction endonuclease patterns of 30 independent *Staphylococcus lugdunensis* strains. *FEMS Microbiol Lett* 55:93-97.
46. BATTERY JP, Easton M, Pearson SR, Hogg GG. 1997. Pediatric bacteremia due to *Staphylococcus warneri*: microbiological, epidemiological, and clinical features. *J Clin Microbiol.* 35(8):2174-2177.
47. Shamoto I, Ishihara Y, Sato A, Usami H, Matsuda N, Ohta M. 2015. Dissemination of *Staphylococcus warneri* in the Hair of ICU Doctors. *Adv Microbiol* 5: 599-603. doi: 10.4236/aim.2015.58062.
48. Silva GDI, Justice A, Wilkinson AR, BATTERY J, Herbert M, Day NPJ, et al. 2001. Genetic population structure of coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in preterm infants. *Clin Infect Dis* 33:1520–1528.
49. Vermont CL, Hartwig NG, Fleer A, Man P, Verbrugh H, van den Anker J, et al. 1998. Persistence of clones of coagulase-negative staphylococci among premature neonates in neonatal intensive care units: two-center study of bacterial genotyping and patient risk factors. *J Clin Microbiol* 36:2485–90.
50. Cui B, Smooker PM, Rouch DA, Daley AJ, Deighton MA. 2013. Differences between two clinical *Staphylococcus capitis* subspecies as revealed by biofilm, antibiotic resistance, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis profiling. *J Clin Microbiol* 51(1): 9-14. doi:10.1128/JCM.05124-11
51. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Marín M, del Campo R, Fernández L, et al. 2009. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering

infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol* 9(1): 82.

52. Bjorland J, Steinum T, Kvitle B, Waage S, Sunde M, Heir E. 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among Staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J Clin Microbiol* 43(9): 4363-4368. doi:10.1128/JCM.43.9.4363-4368.2005

53. Luiz LMP, Chuat V, Madec MN, Araújo EA, Carvalho AF, Valence F. 2016. Mesophilic lactic acid bacteria diversity encountered in Brazilian farms producing milk with particular interest in *Lactococcus lactis* strains. *Curr Microbiol* 73: 503. doi:10.1007/s00284-016-1086-9

54. Garza-González E, López D, Pezina C, Muruet W, Bocanegra-García V, Muñoz I, et al. 2010. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance. *J Med Microbiol* 59: 323-329. doi: 10.1099/jmm.0.015800-0

55. Mørk T, Jørgensen HJ, Sunde M, Kvitle B, Sviland S, Waage S, et al. 2012. Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. *Vet Microbiol* 14;159(1-2):171-80. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.034.

56. Zeng ZL, Wei HK, Wang J, Lin DC, Liu XQ, Liu JH. 2014. High prevalence of *cfr*-producing Staphylococcus species in retail meat in Guangzhou, China. *BMC Microbiol* 14:151. doi: 10.1186/1471-2180-14-151

57. John MA, Pletch C, Hussain Z. 2002. In vitro activity of quinupristin/ dalfopristin, linezolid, telithromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 50:933–938.

ARTIGO II

Avaliação dos valores de referência para testes fenotípicos para resistência à oxacilina em isolados de Estafilococos Coagulase-Negativa

Luiza Pinheiro^{a,b}, Priscila Luiza Mello^a, Ligia Maria Abraão^a, José Eduardo Corrente^c,
Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha^a

^a*Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu 18618-970, Brasil.*

^b*Departamento de Anatomia Patológica, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, 17034-971, Brasil.*

^c*Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu 18618-970, Brasil.*

E-mails:

luizapinho@ibb.unesp.br (L. Pinheiro); priscila_mello@ibb.unesp.br (P. L. Mello);
ligia.abraao@ymail.com (L. M. Abraão); jecorren@ibb.unesp.br (J. E. Corrente);
cunhamlr@ibb.unesp.br (M. L. R. S. Cunha).

#Correspondência a Luiza Pinheiro, luizapinho@ibb.unesp.br

*Endereço Postal: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha. Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Departamento de Microbiologia e Imunologia. Distrito de Rubião Jr. s/n. CEP. 18618-970. Botucatu, São Paulo – Brasil.

Telefone: +551438800428

***Publicado na revista Future Microbiology.** <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0221>

1. Resumo

Objetivos: Comparar as metodologias de teste de disco-difusão (TDD) e Etest com a positividade para o gene *mecA* e avaliar a sua adequação em CoNS isolados de hemoculturas, swab nasal e feridas. **Resultados:** A concordância entre todas as técnicas foi observada em 65,7% dos casos. A maior discrepância entre gene *mecA*/Etest sensível foi em espécies não-*epidermidis*. Um ponto de corte de ≤ 19 mm no disco de oxacilina para resistência classificou melhor o total de CoNS. Para *S. epidermidis*, diâmetros menores ou iguais a 19 e 27 mm, respectivamente, classificaram melhor nos discos de oxacilina e cefoxitina. Para *S. haemolyticus* e *S. capitis*, respectivamente, diâmetros ≤ 21 mm e ≤ 18 mm no disco de oxacilina, e MICs $\geq 0,75$ $\mu\text{g/ml}$ para *S. warneri* para resistência. **Conclusões:** Apesar de o TDD com disco de oxacilina não ser mais recomendado pelo CLSI, observamos alguns casos em que apenas este detectou a resistência. A discrepância dos testes fenotípicos quando comparada à positividade do gene *mecA* é provavelmente devida à característica heterogênea dessa resistência, e o fenômeno de resistência *borderline* foi muito frequente.

Palavras-chave: Estafilococos Coagulase-Negativa; Etest; *mecA*; resistência à oxacilina; pontos de corte de referência; teste de disco-difusão; oxacilina; cefoxitina.

2. Introdução

O aumento dos casos de resistência à oxacilina entre os estafilococos, juntamente à emergência das infecções causadas pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa (CoNS), tornou necessária a adequação dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos, especialmente à oxacilina, entre estes microrganismos.

A resistência à oxacilina geralmente se deve a uma proteína ligadora de penicilina modificada (PBP2a), que possui baixa afinidade à meticilina/oxacilina e a todos os antibióticos beta-lactâmicos, o que impede que o antimicrobiano iniba a síntese da parede celular. Tal proteína é codificada pelo gene *mecA*, o qual é regulado pelos genes *mecI* e *mecR1* [1], e está contido em um elemento genético móvel, denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), que pode ser transferido inter e intra-espécies de estafilococos [2]. Essa característica do SCC*mec* traduz a necessidade de controle dos isolados positivos, pois sua transferência para *Staphylococcus aureus*

significa um problema maior, já que as infecções causadas por este são consideradas graves e se relacionam a altos índices de mortalidade.

A expressão do gene *mecA*, entretanto, pode se dar de forma heterogênea, principalmente entre os CoNS [3]. Além disso, a hiperprodução de beta-lactamases é considerada outro mecanismo de baixos níveis de resistência à oxacilina [4,5,6], apesar da oxacilina ter se mostrado igualmente efetiva contra cepas totalmente susceptíveis e cepas hiperprodutoras, *in vivo* [7,8,9], e de não haver relatos de falha de tratamento associada à hiperprodução de beta-lactamases.

Os métodos fenotípicos de disco-difusão são frequentemente utilizados pelos laboratórios para detectar a resistência à oxacilina, por serem considerados mais rápidos, práticos e com menor custo. O CLSI recomenda a utilização do disco de cefoxitina como substituto para a detecção de resistência à oxacilina em CoNS, já que a cefoxitina permite uma leitura mais clara do que o disco de oxacilina [10]. Entretanto, alguns estudos mostram que se forem considerados apenas os resultados do disco de cefoxitina, em detrimento do disco de oxacilina, cepas resistentes podem acabar sendo reportadas como susceptíveis. Além disso, cepas de CoNS com resistência *borderline* apresentam maior dificuldade de detecção, além de já terem sido sugeridas mudanças na interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do disco de cefoxitina [11].

O CLSI diminuiu os *breakpoints* para oxacilina a maior ou igual a 0,5 µg/mL para detecção de resistência em CoNS (exceto para *S. lugdunensis*, que se manteve maior ou igual a 4 µg/mL) [12,13]. Esses *breakpoints*, correlacionando-se à presença do gene *mecA*, caracterizam corretamente a resistência à oxacilina em espécies mais frequentes, como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis*, mas pode indicar falsa resistência em outras espécies de CoNS, menos comuns (Hussain et al, 2000). Isolados negativos para o gene *mecA* e com MIC de oxacilina >0,5 µg/ml (indica resistência, de acordo com CLSI [13] revelaram resultados controversos nos testes de disco-difusão, e essa observação foi mais frequente ainda para espécies menos comuns, como *S. cohnii* e *S. warneri* [14,15]. Resultados falso-positivos para resistência são esperados em 1 a 9% dos casos [16].

Ferreira et al [17] também observaram discrepâncias entre os resultados do *mecA* comparado ao MIC de oxacilina, juntamente aos testes de disco-difusão com oxacilina e cefoxitina em *S. saprophyticus*, bem como demonstraram baixa especificidade,

revelando que os *breakpoints* não correspondem à determinação do gene *mecA*. Desse modo, seria necessária uma revisão nos pontos de corte para *S. saprophyticus*. O mesmo estudo apontou ainda boa eficácia do disco de oxacilina na detecção de resistência à oxacilina para *S. epidermidis* [17], apesar de o CLSI não recomendar a utilização deste disco para CoNS.

Visto isso, o presente estudo buscou comparar os testes de susceptibilidade à oxacilina, como o teste de disco-difusão com discos de oxacilina e cefoxitina, a determinação do MIC pelo Etest, com a presença/ausência do gene *mecA*. Através dessa comparação, buscaram-se valores de *breakpoints* nos testes de disco-difusão que melhor se encaixassem na determinação de susceptibilidade/resistência a esta droga.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostras

Duzentas e noventa e uma cepas CoNS foram estudadas, incluindo 126 isolados de hemoculturas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, os quais estão estocados na Coleção de Culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP, de 1990 a 2012. As cepas de origem comunitária (144 isolados) foram obtidas a partir de swab nasal de indivíduos saudáveis da mesma comunidade e 21 isolados de feridas crônicas de pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu – SP, nos anos de 2011 a 2013, e mantidas a -80°C.

3.2 Identificação dos CoNS

A identificação do gênero *Staphylococcus* foi realizada conforme as normas descritas [18,19]. A identificação das espécies de CoNS foi realizada utilizando o método simplificado proposto por Cunha et al [20], conforme esquema de provas bioquímicas.

3.3 Extração do DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o Kit Illustra (GE healthcare), que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml).

3.4 Identificação genotípica dos CoNS

As amostras foram submetidas à identificação genotípica utilizando-se primers de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica ITS-PCR [21]. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *ureolyticus* (ATCC 49325), *S. warneri* (ATCC 10209), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. xylosum* (ATCC 29979) e *S. caprae* (ATCC 35538). Os isolados que não puderam ser identificados pela técnica de ITS-PCR foram submetidos ao sequenciamento do gene *rpoB*, (nucleotídeos 1444-1928) de acordo com o protocolo descrito por Mellmann et al [22].

3.5 Técnica de disco-difusão (TDD) em ágar com discos de oxacilina e cefoxitina

O teste de sensibilidade à oxacilina foi realizado pela técnica da difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI [12,13]. Para o preparo dos inóculos foi utilizada suspensão de colônias crescidas por 24 horas e ajustada com a turbidez da escala 0,5 de McFarland. Os discos utilizados incluíram os discos de Oxacilina (1 µg) e Cefoxitina (30 µg). A semeadura foi feita através de swab estéril na superfície de ágar Mueller-Hinton, e a seguir aplicados os discos impregnados com as drogas. As placas foram incubadas à temperatura de 35°C por 24 horas.

3.6 Detecção do gene *mecA*

A PCR em tempo real para o gene *mecA* foi executado através do Sistema StepOne Plus (Life). As reações foram realizadas de acordo com Pinheiro et al [23]. A incubação foi realizada empregando-se os parâmetros e primers descritos por Vandecasteele et al [24].

3.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de oxacilina pelo método de Etest®

A sensibilidade *in vitro* das amostras de CoNS foi testada para oxacilina através da determinação do MIC, utilizando-se o método de E-test®, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8 Determinação da Hiperprodução de Beta-Lactamases

As amostras que apresentaram resultado negativo na detecção do gene *mecA* e apresentarem resistência à oxacilina pelos métodos fenotípicos foram testadas para hiperprodução de β -lactamase. Um inóculo correspondente à escala 0.5 de McFarland foi passado a uma placa com ágar Mueller-Hinton, na qual foram colocados um disco de amoxicilina (20 μ g) e um disco de ácido clavulânico (10 μ g). O breakpoint para sensibilidade consiste na formação de um halo de inibição ≥ 20 mm após 24h de incubação à 35° C [9].

3.9 Comparação dos halos de inibição do TDD e MIC de oxacilina com a pesquisa do gene *mecA*

Os resultados obtidos no teste de disco-difusão e o MIC de oxacilina por Etest foram comparados através de um algoritmo, calculando valores para os quais menos isolados estivessem no grupo “Major error” e “Very major error”, os quais refletem, respectivamente, isolados reportados como resistentes pelo TDD, mas sensíveis no MIC de oxacilina, e isolados reportados como susceptíveis pelo TDD, mas resistentes como determinado pelo MIC de oxacilina. No caso de valores diferentes que gerassem um mesmo valor de “Major error” e “Very major error”, foi considerada a positividade do gene *mecA* como variável para resistência.

4. Resultado

A Tabela 1 mostra o número de isolados de cada espécie por origem da cepa.

Tabela 1. Isolados de cada espécie de CoNS por origem.

	Colonização nasal	Hemocultura	Feridas
<i>S. epidermidis</i>	56 (39)	40 (32)	2 (9,5)
<i>S. haemolyticus</i>	18 (12,5)	28 (22)	7 (33)
<i>S. warneri</i>	27 (19)	7 (5,5)	5 (24)
<i>S. hominis</i>	0	22 (17,5)	1 (4,8)
<i>S. lugdunensis</i>	19 (13)	7 (5,5)	1 (4,8)
<i>S. capitis</i>	5 (3,4)	22 (17,5)	2 (9,5)
<i>S. saprophyticus</i>	12 (8,3)	0	2 (9,5)
<i>S. pasteurii</i>	3 (2)	0	0
<i>S. simulans</i>	3 (2)	0	1 (4,8)
<i>S. xylosum</i>	1 (0,7)	0	0
Total	144 (100)	126 (100)	21 (100)

As Figuras 1 e 2 mostram *scattergrams* que correlacionam os halos de inibição com o MIC de oxacilina, pelos testes de susceptibilidade à oxacilina com discos de oxacilina e cefoxitina, com a presença do gene *mecA*. A cor vermelha simboliza a positividade para o gene *mecA* de todos os isolados daquele ponto, e a cor verde, de pelo menos um isolado daquele ponto. As linhas contínuas demonstram a separação dos pontos de corte para susceptibilidade e resistência definidos pelo CLSI, e as linhas tracejadas, os pontos de corte encontrados através do algoritmo, os quais classificaram com menor porcentagem de erro as amostras do presente estudo. As figuras 3 a 16 fazem a mesma correlação, mas para as espécies separadamente (Material Suplementar).

Do total de CoNS, comparando-se o disco de oxacilina com o MIC, 29 (10%) dos isolados foram classificados na categoria Very Major Error e 4 (1,4%) na categoria Major Error. Já pelo disco de cefoxitina, 36 (12,4%) foram classificados na categoria Very Major Error e 10 (3,4%) na categoria Major Error.

Apenas 191 isolados (65,7%) apresentaram concordância em todos os métodos (TDD com discos de oxacilina e cefoxitina, MIC e gene *mecA*). Das amostras classificadas como resistentes pelo MIC de oxacilina, 93,8% possuíam o gene *mecA*. Ainda deste grupo, as negativas para o gene apresentaram MICs próximos aos pontos de corte (0,5 e 0,75 µg/ml) e foram negativas no teste de hiperprodução de beta-lactamases. Das amostras sensíveis pelo MIC de oxacilina (n = 162), 46 (28%) foram positivas para o gene *mecA*. A sensibilidade do Etest foi de 72% e a especificidade,

94%, quando comparado ao gene *mecA*. Enquanto a sensibilidade foi de 56% para os isolados comunitários, para as cepas hospitalares foi de 81%. A Tabela 2 descreve a concordância entre o TDD com a presença do gene *mecA* e MIC de oxacilina.

Observou-se que 86% dos isolados da comunidade em que o gene *mecA* estava presente com MIC de oxacilina menor do que 0,5 µg/ml eram de espécies não – *S. epidermidis*, contabilizando 75% dos *S. warneri mecA* positivos. Já para as amostras hospitalares, essa discrepância foi observada em 60% dos casos em *S. epidermidis*, sendo o restante *S. hominis* e *S. capitis*.

Os três casos em que o MIC de oxacilina foi bem abaixo do ponto de corte para resistência e os halos foram de valor bem pequeno, e houve positividade para o gene *mecA*, foram de amostras da espécie *S. hominis*.

A Tabela 3 descreve os casos de heterorresistência à oxacilina pelos métodos fenotípicos. A presença de colônias nos halos de inibição está representada pela letra “H”.

Tabela 2. Comparação dos resultados de susceptibilidade obtidos pelo teste de disco-difusão com discos de oxacilina e cefoxitina, MIC de oxacilina e presença do gene *mecA*.

	TDD	Oxacilina			Cefoxitina		
		Resistente	Sensível	Total	Resistente	Sensível	Total
<i>mecA</i>	Positivo	88	81	169	101	68	169
	Negativo	1	121	122	1	121	122
	Total	89	202	291	102	189	291
MIC (Etest)	Resistente	85	44	129	93	36	129
	Sensível	4	158	162	9	153	162
	Total	89	202	291	102	189	291

Tabela 3. Casos de heterorresistência visível nos testes fenotípicos.

Isolado	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Halo Oxacilina (mm)	Halo Cefoxitina (mm)	<i>mecA</i>
29C	<u>1,5 H</u>	<u>16 H</u>	23	+
53C	<u>0,25 H</u>	22	23	+
60C	<u>0,75 H</u>	<u>20 H</u>	<u>21 H</u>	+
6A	0,25	<u>24 H</u>	32	+
25A	0,25	<u>26 H</u>	<u>32 H</u>	-
143A	0,5	<u>21 H</u>	29	+
147A	0,125	<u>26 H</u>	<u>36 H</u>	-
98A	0,5	25	<u>25 H</u>	+

O algoritmo reduziu os casos de major error e very major error quando foi alterado o breakpoint de resistência dos halos de inibição do disco de oxacilina do total de CoNS de ≤ 17 mm para ≤ 19 mm; para *S. epidermidis*, de ≤ 17 mm para ≤ 19 mm e disco de cefoxitina de ≤ 24 mm para ≤ 27 mm; para *S. haemolyticus*, de ≤ 17 mm para ≤ 21 mm, para disco de oxacilina; para *S. warneri* quando o MIC para resistência foi $\geq 0,75$ $\mu\text{g/ml}$; para *S. capitis* quando o breakpoint para resistência com o disco de oxacilina foi ≤ 18 mm; para *S. saprophyticus*, MICs para resistência maiores que 1 $\mu\text{g/ml}$.

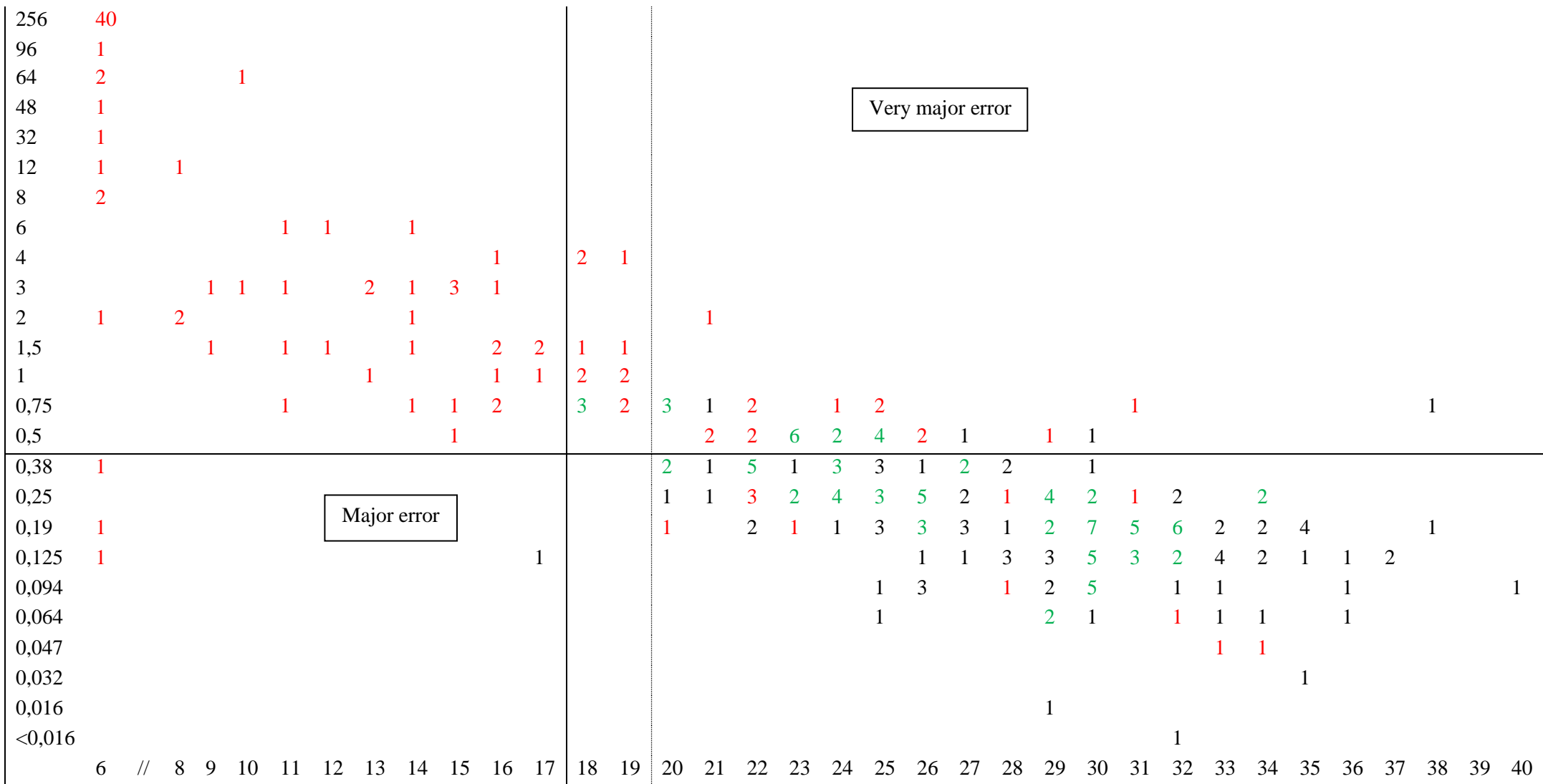


Figura 1. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de oxacilina com os MICs de oxacilina do total de isolados de CoNS.

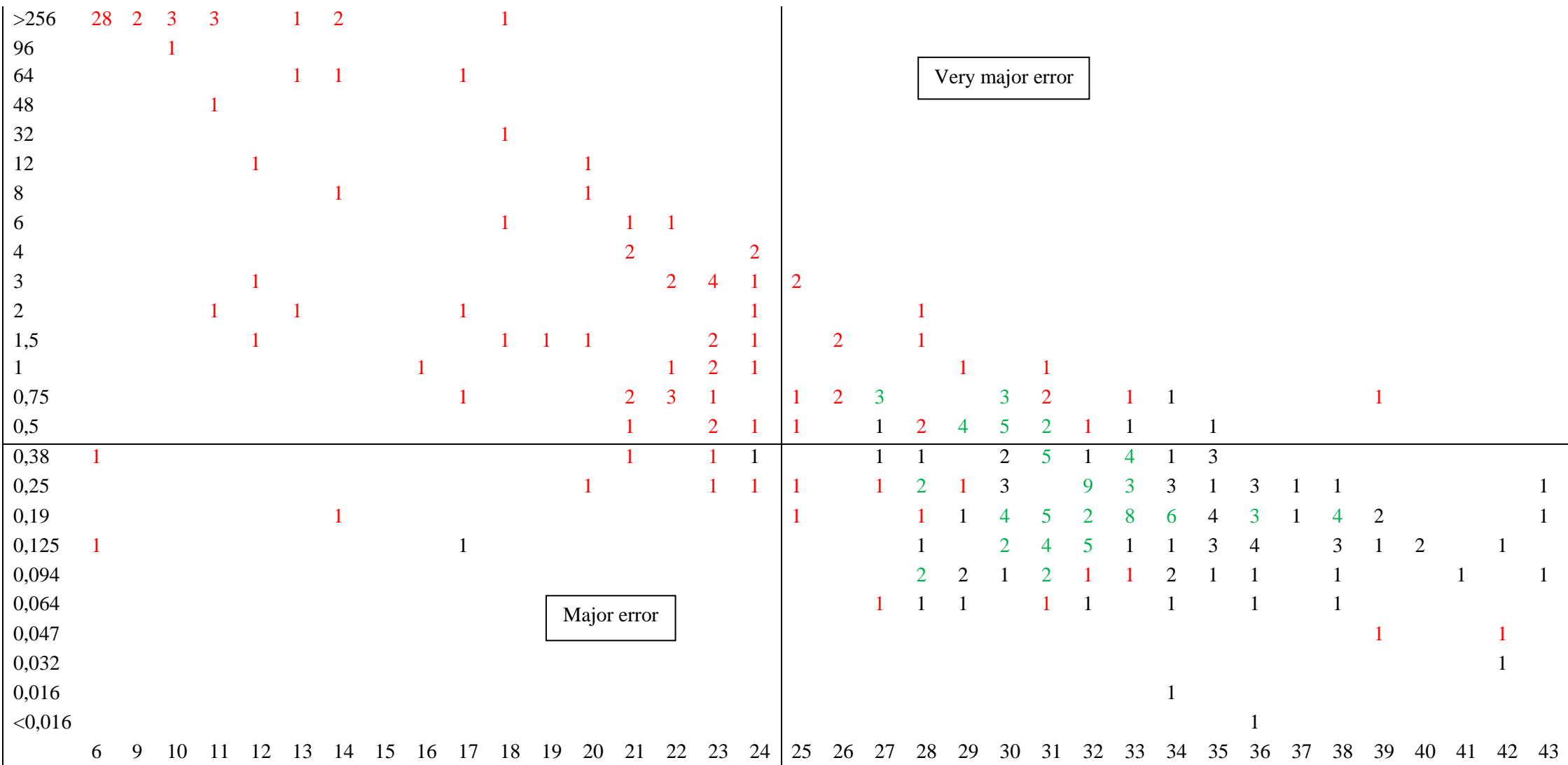


Figura 2. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de cefoxitina com os MICs de oxacilina do total de isolados de CoNS.

Tabela 4. Alteração no número de isolados em Major Error e Very Major Error com o critério de breakpoints do CLSI e dos propostos neste trabalho. Nos casos com ‘*’, a alteração foi nos pontos de corte do MIC.

Espécie (n) - Disco	Breakpoints CLSI (%)		Breakpoints propostos (%)	
	Very Major	Major	Very Major	Major
Total CoNS (291) - Oxacilina	47 (16)	4 (1.4)	33 (11)	4 (1.4)
<i>S. epidermidis</i> (98) - Oxacilina	15 (15)	1 (1)	7 (7)	1 (1)
<i>S. epidermidis</i> (98) - Cefoxitina	14 (14)	2 (2)	6 (6)	2 (2)
<i>S. haemolyticus</i> (53) - Oxacilina	10 (19)	0	6 (11)	1 (2)
<i>S. saprophyticus</i> (14) – Oxacilina*	6 (43)	0	0 ^a	3 (21)
<i>S. saprophyticus</i> (14) – Cefoxitina*	8 (57)	0	0 ^a	1 (7)
<i>S. warneri</i> (39) – Oxacilina*	5 (13)	0	0	0
<i>S. warneri</i> (39) – Cefoxitina*	5 (13)	0	0	0
<i>S. capitis</i> (29) - Oxacilina	3 (10)	0	1 (3)	0

^ap<0,05

5. Discussão

A emergência dos CoNS como agentes oportunistas importantes está diretamente associada à resistência aos antimicrobianos, principalmente à oxacilina/meticilina. A incidência da resistência à meticilina depende da origem da população de CoNS estudada e o tipo de método utilizado nesta detecção [25]. Estudos mostram frequência de 75-80% de resistência em isolados nosocomiais, comparada a 27% em CoNS de centros de cuidados primários [26,27,28]. O presente estudo observou 9-10% dos isolados da comunidade e 57-62% dos isolados hospitalares resistentes à oxacilina segundo a técnica de disco-difusão.

Já de acordo com o método padrão-ouro, a detecção do gene *mecA*, 36% e 81% dos isolados da comunidade e hospital, respectivamente, foram resistentes à oxacilina.

Essas frequências foram ainda maiores considerando-se as espécies individualmente, sendo que 100% dos *S. haemolyticus*, 97,8% dos *S. epidermidis*, 86% dos *S. capitis* de hemoculturas, e 60% dos *S. haemolyticus* da comunidade possuíam o gene *mecA*. Cuevas et al [29], estudando CoNS nosocomiais e de origem comunitária por um período de 15 anos, observou que cepas do hospital estão mais propensas a desenvolver resistência a antimicrobianos.

Desde décadas atrás, a resistência à oxacilina tem sido documentada com maior frequência em isolados causadores de doenças do que em cepas comensais [30]. Zilevica et al [31] sugerem a detecção de fatores de virulência como produção de urease e hemolisinas para discriminar cepas de *S. epidermidis* comensais e nosocomiais. Em vista da resistência à oxacilina ter sido observada seis vezes mais nos isolados clínicos do que nos comunitários, é possível inferir a susceptibilidade à droga em CoNS como um possível marcador de cepas clínicas potencialmente patogênicas. O sequenciamento total do genoma de cepas de *S. epidermidis* isoladas da comunidade e hospital demonstrou a presença de marcadores de resistência associados aos isolados nosocomiais [32]. Segundo estes mesmos autores, enquanto a aquisição de genes de resistência a antibióticos e outros mecanismos de defesa podem predispor uma cepa à patogenicidade, pode ser também uma consequência da exposição ao ambiente hospitalar.

Comparando-se as frequências de resistência entre as espécies de CoNS, observa-se que *S. haemolyticus*, seguido por *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. hominis* foram as que mais apresentaram esta característica. *S. warneri* e *S. lugdunensis*, por outro lado, apesar de estarem presentes em número significativo, apresentaram menores taxas de resistência. *Staphylococcus haemolyticus* é conhecido pela sua multirresistência a drogas [33,34], e está predisposto a desenvolver resistência com mais facilidade a beta-lactâmicos. O sequenciamento total de seu genoma demonstrou extensa plasticidade, com grande número de sequências de inserção cromossômicas, característica que pode resultar em rearranjos genômicos frequentes, diversificação fenotípica e aquisição de fatores de resistência antimicrobiana [35]. *S. lugdunensis* é comumente suscetível a maior parte dos antimicrobianos, incluindo a meticilina/oxacilina [36]; e *S. warneri* é, dentre as espécies mais isoladas de CoNS, o que possui maior susceptibilidade à oxacilina e outras drogas [37,38], o que explica porque o tratamento das infecções, apesar de sérias, causadas por este último, é

geralmente bem-sucedido se for feito a tempo. Uma limitação da avaliação das metodologias fenotípicas foi a ausência de isolados resistentes à oxacilina no presente estudo.

Desde as primeiras descrições de resistência à oxacilina em estafilococos, o comportamento incomum das cepas nos testes de susceptibilidade tem sido notado [8]. A expressão de resistência à oxacilina está relacionada a variações grandes no grau de resistência entre as células individuais de uma população, e as variações dentro de cada teste influenciam na detecção de resistência aos beta-lactâmicos [39,40].

A metodologia de disco-difusão com discos de oxacilina e cefoxitina é principalmente utilizada rotineiramente nos laboratórios devido à sua praticidade, facilidade e baixo custo. A expressão fenotípica de resistência, entretanto, pode variar dependendo das condições de crescimento (temperatura, osmolaridade e suplementos da cultura como NaCl e sacarose) [41], tornando os testes de susceptibilidade potencialmente problemáticos. No presente estudo, os discos concordaram na predição da resistência à oxacilina em 91% dos casos, sendo que essa porcentagem foi ligeiramente maior nos isolados comunitários. Entre as espécies, os maiores casos de discrepância na predição de susceptibilidade entre os discos ocorreram entre isolados de *S. haemolyticus* (n=10; 19%), *S. epidermidis* (n=11; 11,2%), seguido por *S. saprophyticus*, sendo que para esta última espécie, 29% das amostras (n=4) não tiveram resultados concordantes entre os dois discos. Semelhantemente, Antunes et al [25] encontraram discrepâncias entre os discos em espécies menos frequentes, como *S. saprophyticus*, *S. cohnii* e *S. sciuri*, mas com menos frequência em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* quando comparado a este estudo.

Observamos que, das amostras resistentes positivas para o gene *mecA*, 52% demonstraram resistência fenotípica pelo disco de oxacilina e 60% pelo disco de cefoxitina. Essas diferenças podem ser explicadas pela característica heterogênea de resistência à metilina codificada pelo gene *mecA*. Além disso, halos próximos aos *breakpoints*, característico de cepas *borderline*, podem dificultar a interpretação da resistência [11]. O disco de cefoxitina se mostrou como melhor preditivo da resistência à oxacilina, assim como verificado por Antunes et al [25]. Entretanto, observamos alguns casos em que só o disco de oxacilina detectou a resistência. Por esta razão, é importante realizar testes com os dois discos. Palazzo e Darini [15], também sugerem a

utilização de ambos os discos e da determinação do MIC de oxacilina, o que pode reduzir os erros nos resultados. Na detecção de resistência à oxacilina mediada pelo gene homólogo ao gene *mecA*, o *mecC*, o disco de cefoxitina foi considerado mais confiável [42].

A detecção do MIC de oxacilina pelo Etest mostrou sensibilidade maior para os isolados do hospital. Tais resultados podem se dever à maior proporção de espécies como *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii* e *S. warneri*, nas quais os discos provêm resultados errôneos com maior frequência [14]. Em 33% dos isolados comunitários desta última espécie, por exemplo, pelo menos um dos discos não demonstrou resistência à oxacilina, apesar dos isolados serem positivos para o gene *mecA*.

A presença do gene *mecA* com MICs de oxacilina indicando susceptibilidade foi frequente, mais nas espécies não-*epidermidis* da comunidade. Distintamente, Antunes et al [25] observaram o oposto: a maior parte das discrepâncias entre o MIC de oxacilina e o gene *mecA* consistiu em amostras resistentes fenotipicamente mas ausentes deste gene. A maior parte dos casos de discrepância no presente trabalho também mostrou resultados controversos nos testes de disco-difusão, revelando halos de inibição e valores de MIC muito próximos aos pontos de corte, o que, além de confirmar o caráter heterogêneo de resistência destas amostras [43], corrobora uma revisão nestes breakpoints do MIC de oxacilina, principalmente em espécies como *S. warneri* e *S. hominis*.

As cepas consideradas “*borderline*” na susceptibilidade à oxacilina podem (i) possuir PBPs alteradas, (ii) serem hiperprodutoras de beta-lactamases, ou (iii) carrear o gene *mecA*, mas serem heterogêneas na expressão deste, com apenas uma pequena proporção da população de células exibindo altos níveis de resistência. As condições usadas para o teste de susceptibilidade podem ser modificadas alterando-se a proporção de células expressando altos níveis de resistência em cepas carreadoras do gene *mecA*, mas a distinção entre cepas hiperprodutoras de beta-lactamase, das cepas verdadeiramente resistentes, isto é, *mecA* positivas, permanece problemática [8].

A heterorresistência à oxacilina é considerada quando <1 célula em 10^8 da população é altamente resistente à droga. Esta pode ser caracterizada na formação de colônias dentro dos halos da zona de inibição em testes fenotípicos, observada em 2,7%

dos casos no presente estudo, ou quando há a presença do gene *mecA* com susceptibilidade fenotípica (27-47%). Ainda, é documentada a existência de cepas *mecA* positivas e fenotipicamente susceptíveis à oxacilina de forma não-heterogênea (OS-MRCoNS) [44]. O uso de beta-lactâmicos para tratar tais isolados pode causar um aumento no MIC de oxacilina bem acima do *breakpoint* estabelecido para resistência, geralmente levando a falha terapêutica [41]. A resistência induzível à oxacilina está fortemente associada às discrepâncias entre os testes fenotípicos e a positividade para o gene *mecA* [9].

Grande parte das amostras apresentou valores de MIC e de zona de inibição muito próximos aos *breakpoints*, e que classificaram incorretamente a amostra como susceptível ou resistente, quando comparados tanto ao MIC quanto à presença do gene *mecA*. Apesar da positividade para este gene ser considerada como o padrão-ouro para resistência à oxacilina, observamos que, das amostras *mecA* positivas, 27.8%, 47.9% e 40%, respectivamente, não expressaram resistência no Etest, disco-difusão com disco de oxacilina e disco-difusão com disco de cefoxitina. Esses valores são altos e podem ser considerados alarmantes, baseando-se na suposição de que apenas a presença do gene caracteriza a cepa como resistente. Podemos considerar que outros fatores estejam afetando a expressão do gene/produção proteica, apesar do potencial de resistência inerente ao carreamento do gene.

Alguns trabalhos descrevem cepas com susceptibilidade à oxacilina, mas positivas para o gene *mecA*, tanto em *S. aureus* como em CoNS [45,46,47], e mostraram que geralmente em CoNS a expressão da resistência é heterogênea, e pode ser estimulada na presença de cefoxitina. O sequenciamento total de uma cepa de *S. aureus* *mecA* positiva e susceptível à oxacilina demonstrou a presença de um repressor do gene *mecA* (*BlaI*), que não é reprimido na presença de beta-lactâmicos e, portanto, impede a expressão do gene *mecA*, apesar de as sequências intactas de regiões promotoras/operadoras do *mecA* e *blaZ* estarem presentes [48].

Apesar de susceptíveis pelos métodos fenotípicos, as cepas *mecA* positivas devem ser tratadas como resistentes em relação ao controle clínico e precauções de higiene. Dessa forma, os testes fenotípicos devem ser combinados aos testes genotípicos, já que a realização de apenas testes fenotípicos pode mascarar cepas

positivas para o gene *mecA*, enquanto que a utilização de somente testes genotípicos pode privar o paciente de regimes de tratamento potencialmente melhores [48].

De forma geral, nós sugerimos a alteração do *breakpoint* para resistência no teste de disco-difusão com disco de oxacilina para ≤ 19 mm, classificando melhor as cepas como resistentes e diminuindo o número de amostras com Very Major Error. Apesar de o CLSI não recomendar mais a utilização do disco de oxacilina para detecção de resistência, e sim apenas o disco de cefoxitina, nós observamos que o uso do disco de oxacilina pode ser utilizado como complemento na detecção de resistência, apesar de ser necessária cautela quanto à interpretação de casos em que há discrepância entre os resultados dos dois discos. Nas amostras do presente estudo, mais isolados foram classificados incorretamente pelo disco de cefoxitina do que pelo disco de oxacilina, quando confrontados ao MIC de oxacilina pelo Etest. Entretanto, na comparação com a presença do gene *mecA*, o disco de cefoxitina classificou melhor as amostras, com maior sensibilidade. Ferreira et al [17] observaram que o disco de cefoxitina mostrou especificidade mais alta em relação à presença do gene *mecA* como parâmetro para resistência à oxacilina. Por sua vez, aquele trabalho também observou baixa especificidade do MIC obtido por Etest em relação ao gene *mecA*, o que provavelmente não se relaciona à falha da técnica, e sim à necessidade de revisão dos breakpoints do MIC para a espécie *S. saprophyticus*.

Em relação a *S. saprophyticus*, aproximadamente metade dos isolados do presente estudo revelaram “Major error” na classificação da susceptibilidade à oxacilina pelos dois discos, quando comparados ao MIC. Tendo em vista os resultados também discrepantes encontrados em outros estudos [14], assim como estudo prévio de nosso grupo em isolados de infecção urinária de *S. saprophyticus* [17], no qual a maior parte das amostras revelou-se susceptível pela ausência do gene *mecA* e pelo TDD com disco de cefoxitina, mas resistente pelos MICs maiores que 0,5 μ g/ml e pelo TDD com disco de oxacilina, a avaliação criteriosa de resistência nessa espécie deve ser cautelosamente avaliada, já que os métodos mostram resultados totalmente diferentes.

De acordo com os resultados obtidos neste e em estudo prévio [17], sugerimos que os *breakpoints* para MIC de oxacilina sejam revisados em *S. saprophyticus*, sendo que valores de MIC maiores que 1 μ g/ml para identificação de resistência parecem classificar de forma mais eficiente os isolados resistentes à oxacilina, e que o disco de

cefotitina aparentemente classifica melhor do que o disco de oxacilina. De fato, o EUCAST classifica apenas isolados de *S. saprophyticus* com MICs maiores que 2 µg/ml como resistentes [49].

Em relação a *S. hominis*, uma das limitações para a melhor aferição dos valores de inibição comparados ao gene *mecA*/MIC de oxacilina foi o pequeno número de isolados obtidos dessa espécie. Não houve isolamento de *S. hominis* colonizando as narinas dos indivíduos saudáveis, o que pode indicar que este não é um local de frequência para tal espécie. Os isolados que apresentaram MICs bem abaixo dos breakpoints, mas foram considerados resistentes pelos TDD com discos de oxacilina e cefotitina, apresentando halos bem pequenos, e positividade para o gene *mecA* devem ser futuramente melhor estudados para elucidação da causa desta observação.

O aumento do breakpoint para resistência em *S. warneri* de 0.5 para 0.75 µg/ml é concordante com estudos anteriores [14], sendo que o valor de MIC 0.5 µg/ml nesta espécie parece associar-se à sensibilidade em ambos os estudos.

O EUCAST alterou recentemente os valores classificatórios das zonas de inibição de *S. epidermidis*, de R ≤21 mm para ≤ 24 mm. Nos isolados desta espécie, observamos que aumentando o valor do halo de inibição de 17 para 19 mm para o disco de oxacilina, e de 24 para 27 mm para o disco de cefotitina menos cepas estiveram classificadas incorretamente como susceptíveis baseando-se no MIC de 0,5 µg/ml, com redução de casos de Very Major Error.

A importância da detecção acurada de resistência à oxacilina se dá não só pelo controle de cepas de CoNS resistentes a essa droga, mas pelo fato de essa resistência estar altamente associada à resistência a outras drogas, como o glicopeptídeo vancomicina [50], e pela possibilidade de transferência genética para *S. aureus* [2].

A baixa concordância entre os testes fenotípicos entre si, e entre os métodos fenotípicos e a presença do gene *mecA* enfatiza a necessidade da revisão nos pontos de corte dos halos de inibição atualmente recomendados e, mais ainda, análises diferentes por espécie de CoNS, dada a heterogeneidade do fenótipo de resistência à oxacilina em cada uma das espécies estudadas. Este trabalho pode contribuir para tais revisões e fornecer uma visão mais focada nas espécies individuais, na detecção mais precisa de resistência à oxacilina e prevenção de persistência e disseminação de cepas resistentes.

Conclusões

A alteração dos pontos de corte para valores maiores em geral classificou melhor as espécies, mas valores específicos para isolados de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. capitis* reduziram o número de casos de major error e very major error. Apesar de não mais recomendado pelo CLSI, o uso de disco de oxacilina conseguiu detectar resistência em casos em que o disco de cefoxitina falhou. A discrepância entre os testes fenotípicos e a detecção do gene *mecA* é provavelmente devida à heterogeneidade dessa resistência, com o fenômeno da resistência borderline sendo muito comum. Esses resultados enfatizam o uso de mais de um teste de susceptibilidade, especialmente uma técnica molecular, já que as subpopulações podem não expressar o fenótipo de resistência se o número de células é pequeno.

Perspectiva futura

Ao se notar a crescente importância que vem se dando às espécies de CoNS em termos de causadores oportunistas de infecções e reservatórios de *SCCmec* e resistência a antimicrobianos em geral, a tendência de estudos envolvendo mecanismos de evasão e resistência espécie-específicos de CoNS é crescer. Com metodologias de identificação como MALDI-TOF, análise genômica, transcriptômica e proteômica que vem sendo cada vez mais utilizadas, se tornam menos complexos o entendimento e a detecção de fenômenos como a heterorresistência e mais notórios os papéis distintos de cada uma das espécies de CoNS na colonização e infecção.

Sumário Executivo

Bullet points

- Detecção de resistência à oxacilina em CoNS é complicada pela heterogeneidade
- A técnica de disco difusão com oxacilina e cefoxitina foi comparada com MIC e *mecA*
- 10-12% dos isolados foram classificados na categoria Very Major pelos testes de disco-difusão
- 28% possuíam *mecA* e mostraram resistência borderline, particularmente espécies não-*epidermidis* (principalmente *S. warneri*)
- Valores aumentados nos breakpoints de zona de inibição classificaram melhor algumas espécies
- Resultados discrepantes entre os TDD e entre E-test e *mecA* foram encontrados para *S. saprophyticus*

- Apesar de não mais recomendado, houve casos em que apenas o disco de oxacilina detectou resistência
- A discrepância entre os testes fenotípicos e *mecA* é provavelmente devida à heterogeneidade dessa resistência, com o fenômeno de resistência borderline sendo muito comum
- As subpopulações podem não expressar o fenótipo de resistência se o número de células é pequeno

6. Referências

1. Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi *et al.* Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 167(3), 975–980 (1986).
2. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2637–51 (2004).
3. Garza-Gonzalez E, Martin-Otero R, Llaca-Diaz JM, Rodriguez-Noriega E. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol. Infect.* 138, 645–654 (2010).
4. Chambers HF, Archer G, Matsushashi M. Low-level methicillin resistance in strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(4), 424-8 (1989).
5. McDougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.* 23(5), 832-839 (1986).
6. Petinaki E, Arvaniti A, Bartzavali C, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Presence of *mec* genes and overproduction of beta-lactamase in the expression of low-level methicillin resistance among staphylococci. *Chemotherapy.* 48(4),174-81 (2002).
7. Thauvin-Eliopoulos C, Rice LB, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Efficacy of oxacillin and ampicillin-sulbactam combination in experimental endocarditis caused by beta-lactamase-hyperproducing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(5), 728-32 (1990).
8. Brown DF. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1,65-70 (2001).
9. Ghoshal U, Prasad KN, Singh M, Tiwari DP, Ayyagari A. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Infect. Chemother.* 10(2), 86-9 (2004).
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Atlanta, USA, 8 September 2016. [accessed 2 August 2017]. Available at <https://www.cdc.gov/mrsa/lab/index.html>.

11. Frigatto EAM, Machado AMO, Pignatari ACC, Gales AC. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative Staphylococci? *J. Clin. Microbiol.* 43, 2028-2029 (2005).
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement, CLSI document M100-S18. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighth Informational Supplement, CLSI document M100-S25. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute (2015).
14. Hussain Z, Stoakes L, Massey V *et al.* Correlation of oxacillin MIC with *mecA* carriage in coagulase-negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 38, 752-754 (2000).**similar findings regarding less common species and oxacillin resistance detection
15. Palazzo ICV, Darini ALC. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative Staphylococci including ceftiofur disc diffusion. *FEMS Microbiol. Lett.* 257, 299-305 (2006).*phenotypic detection of oxacillin resistance in CoNS – similar findings
16. Skov R, Smyth R, Clausen M *et al.* Evaluation of a ceftiofur 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 204-207 (2003).
17. Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, Camargo CH, Cunha MLRS. Oxacillin resistance and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus saprophyticus* and other *Staphylococci* isolated from patients with urinary tract infection. *Chemother.* 58(6),482-91 (2012).**shows problematic detection of oxacillin resistance in *S. saprophyticus* and the need to revise MIC breakpoints
18. Baker JS. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J. Clin. Microbiol.* 9,875-9 (1984).
19. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. (5th edition). Philadelphia, Lippincott (1997).
20. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99, 855-60 (2004).
21. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3099–103 (2001).
22. Mellmann A, Becker K, Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. Sequencing and staphylococci identification. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 333-336 (2006).
23. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC *et al.* Susceptibility profile of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from blood cultures to

- vancomycin and novel antimicrobial drugs over a period of 12 years. *Microb. Drug Resist.* 22(4), 283-93 (2016). doi: 10.1089/mdr.2015.0064.
24. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R *et al.* Expression of Biofilm-Associated Genes and In Vivo Foreign Body Infections. *J. Infect. Dis.* 188, 730–7 (2003).
 25. Antunes ALS, Secchi C, Reiter KC, Perez LRR, Freitas ALP, d’Azevedo PA. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102(6), 719-723 (2007).
 26. Claesson C, Hallgren A, Nilsson M, *et al.* Susceptibility of staphylococci and enterococci to antimicrobial agents at different ward levels in four north European countries. *Scand. J. Infect. Dis.* 39(11-12), 1002-12 (2007).
 27. Claesson C, Nilsson LE, Kronvall G, *et al.* Antimicrobial activity of tigecycline and comparative agents against clinical isolates of staphylococci and enterococci from ICUs and general hospital wards at three Swedish university hospitals. *Scand. J. Infect. Dis.* 41(3),171-81 (2009).
 28. Li M, Wang X, Gao Q, *et al.* Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J. Med. Microbiol.* 58(Pt 4), 456-61 (2009).
 29. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4240–5 (2004).
 30. Archer GL, Scott J. Conjugative transfer genes in staphylococcal isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35(12), 2500-4 (1991).
 31. Žileviča A, Tracevska T, Liduma I, Viesturs U. Discrimination between contaminating and commensal strains of *Staphylococcus epidermidis* (Search for phenotypic virulence criteria in *Staphylococcus epidermidis*). *Int J Bioautomation* 14(3) (2010).
 32. Conlan S, Mijares LA, NISC Comparative Sequencing Program, *et al.* *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biol.*13:R64 (2012). DOI: 10.1186/gb-2012-13-7-r64
 33. Yu MH, Chen YG, Yu YS, Chen CL, Li LJ. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Staphylococcus haemolyticus* in a Chinese hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 613– 616 (2010).
 34. Monsen T, Karlsson C, Wiström J. Spread of clones of multidrug resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26:76 – 80 (2005).
 35. Barros EM, Ceotto H, Bastos MCF, dos Santos KRN, Giambiagi-deMarval M. *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *J. Clin. Microbiol.* 50(1), 166-168 (2012). doi:10.1128/JCM.05563-11.

36. Frank KL, Del Pozo JL, Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(1),111-33 (2008).
37. Price SB, Flournoy DJ. Comparison of antimicrobial susceptibility patterns among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21, 436-40 (1982).
38. Campoccia D, Montanaro L, Visai L, *et al.* Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. *Int. J. Artif. Organs* 33 (9), 575-581 (2010).
39. Jevons MP. "Celbenin" - resistant Staphylococci. *Brit. Med. Journal.* 1(5219), 124-125 (1961).
40. Hewitt JH, Coe AW, Parke MT. The detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 2, 443-456 (1969).
41. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* 39,3946-3951 (2001).
42. Skov R, Larsen AR, Kearns A, *et al.* Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (1), 133-135 (2014).
43. Bard JD, Hindler JA, Gold HS, Limbago B. Rationale for eliminating *Staphylococcus* breakpoints for β -Lactam agents other than penicillin, oxacillin or cefoxitin, and ceftaroline. *Clin. Infect. Dis.* 58(9), 1287-96 (2014).
44. Ikonomidis A, Michail G, Vasdeki A, *et al.* In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3905-3908 (2008).
45. Kumar VA, Steffy K, Chatterjee M, *et al.* Detection of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* isolates by use of chromogenic medium MRSA ID. *J. Clin. Microbiol.* 51(1), 318-9 (2013). doi: 10.1128/JCM.01040-12.
46. Manguera EVC, Oliveira WLM, Almeida AMP, Leal NC. Analysis of the correlation between oxacillin/cefoxitin susceptibility/resistance, the presence of the gene *mecA* and PBP2a production in hospital infection- associated staphylococcal isolates. *J. Microbiol. Pathol.* 2(1), 014 (2014).
47. Pu W, Su Y, Li J, *et al.* High Incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *PLoS ONE* 9(2), e88134 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0088134
48. Sabat AJ, Pournaras S, Akkerboom V, Tsakris A, Grundmann H, Friedrich AW. Whole-genome analysis of an oxacillin-susceptible CC80 *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolate: insights into the mechanisms of cryptic methicillin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 70 (11), 2956-2964 (2015). doi: 10.1093/jac/dkv210
49. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.1. Available at: <http://www.eucast.org>. (2017).

50. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 40,135–6 (1997).*association between oxacillin resistance and reduced susceptibility to vancomycin

7. Material Suplementar

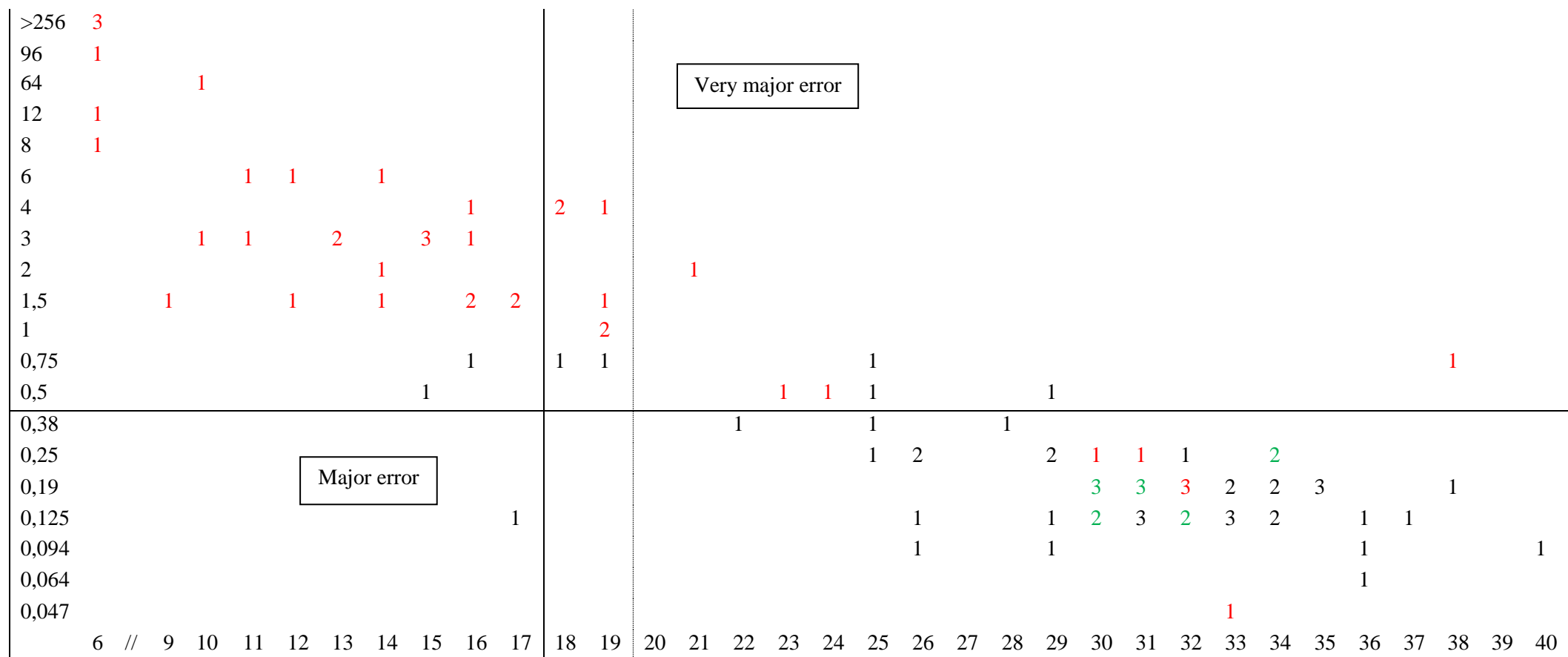


Figura 3. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de oxacilina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. epidermidis*.

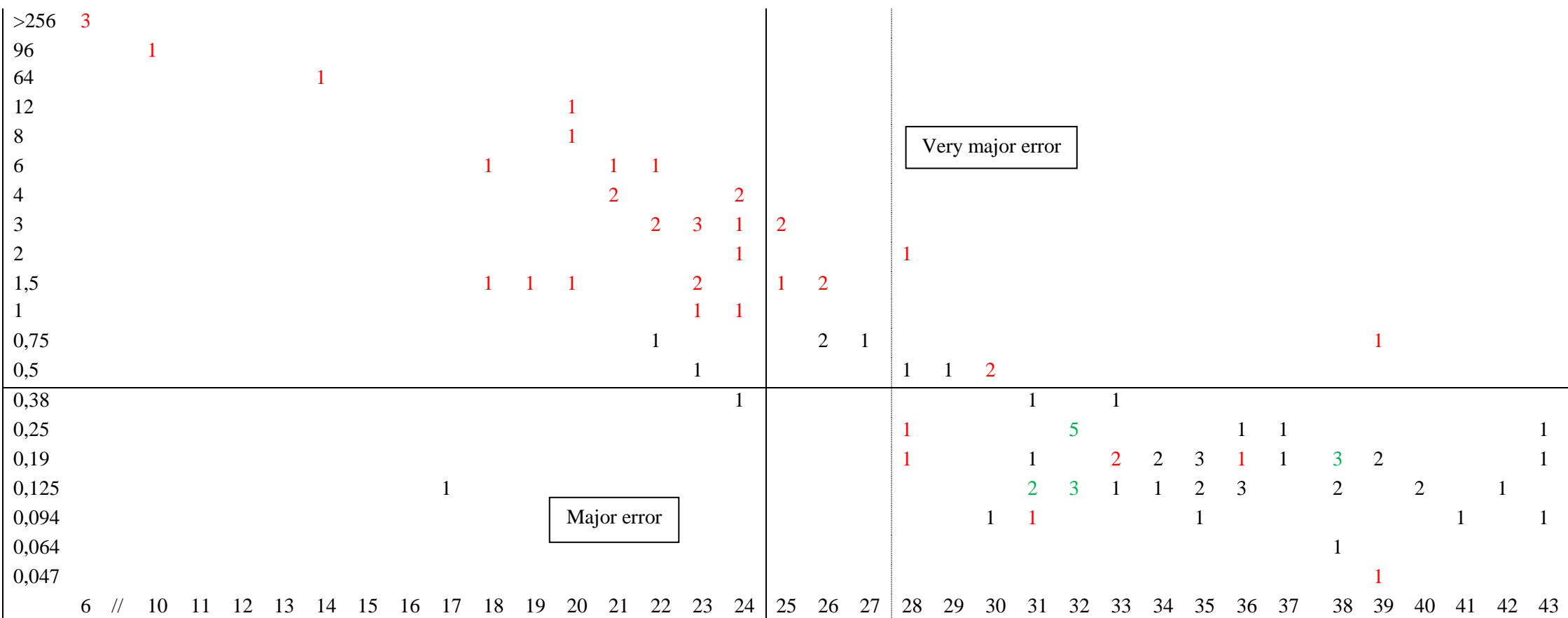


Figura 4. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de cefoxitina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. epidermidis*.

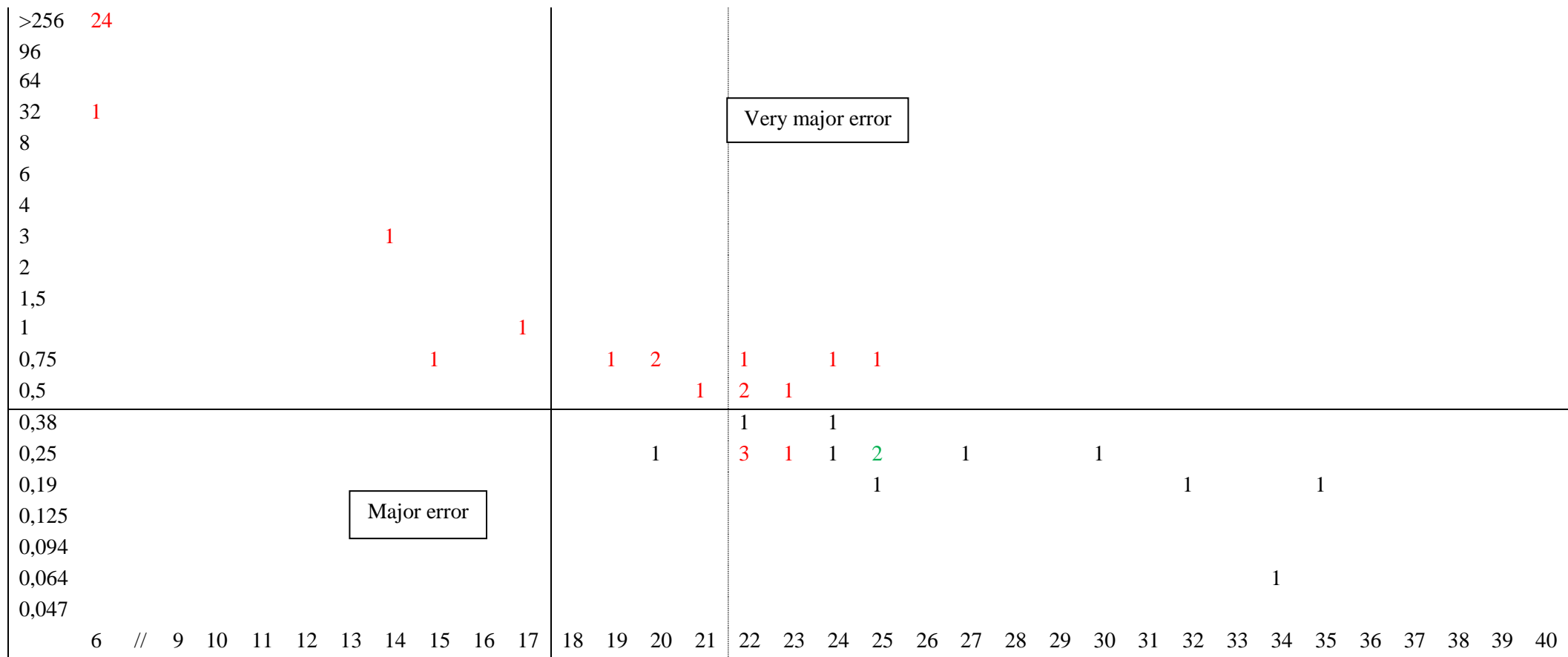


Figura 5. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de oxacilina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. haemolyticus*.

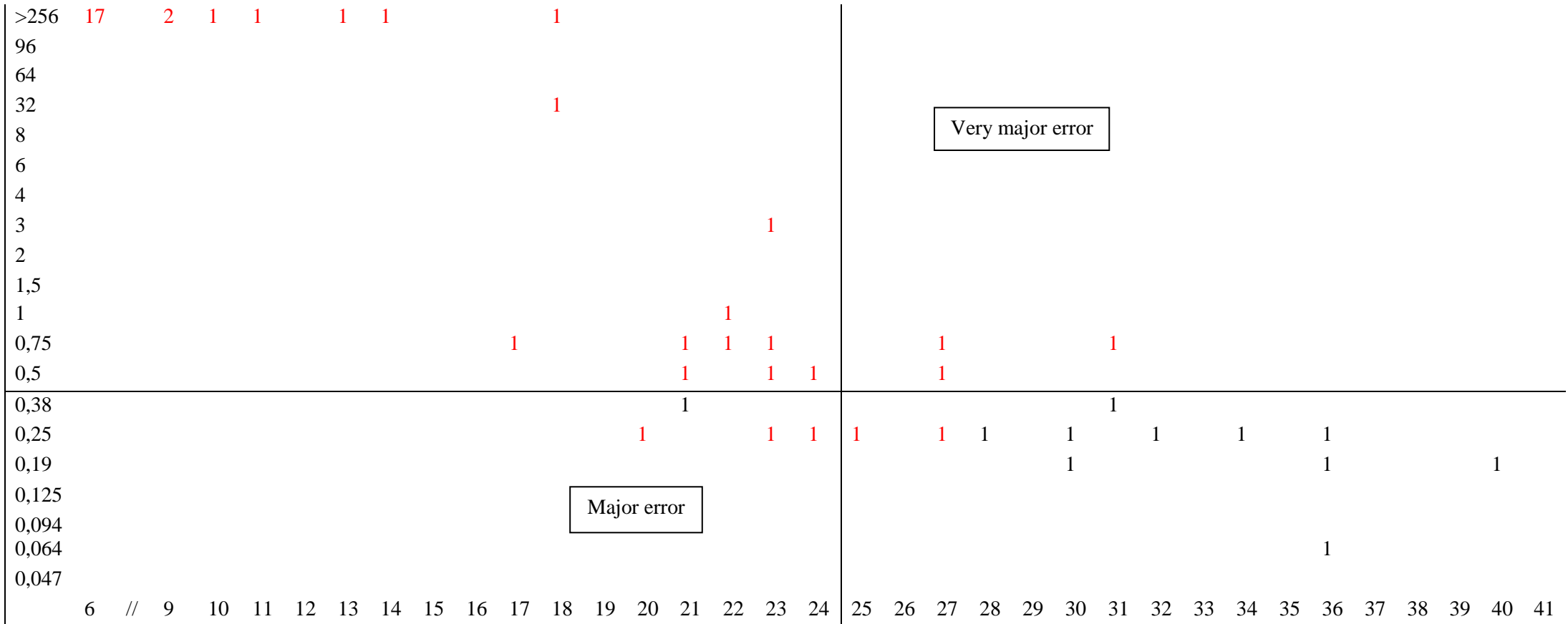


Figura 6. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de cefoxitina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. haemolyticus*.

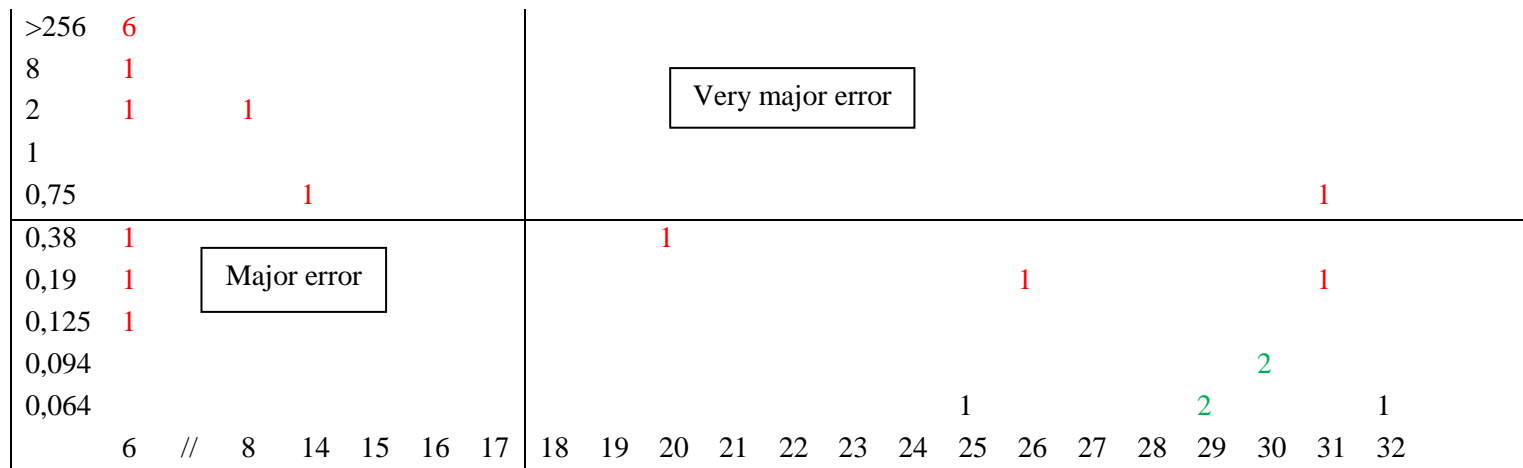


Figura 7. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de oxacilina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. hominis*.

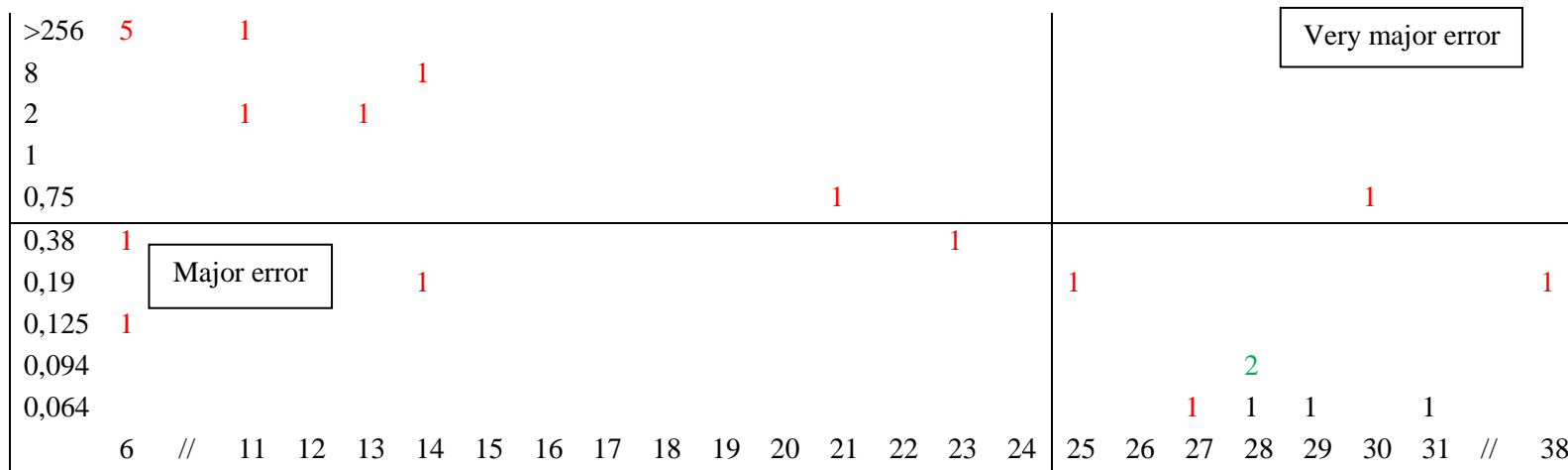


Figura 8. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de cefoxitina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. hominis*.

4																					
//																					
0,75						1	1														
0,5								1												1	
0,38						1	1		1		1	1	1								
0,25											1									1	
0,19						1			1	2	1	2	1								
0,125												1									
0,094									1	1										1	
0,032																					1
0,016															1						
<0,016																					1
	10	11	12	13	//	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35

Figura 9. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de oxacilina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. lugdunensis*.

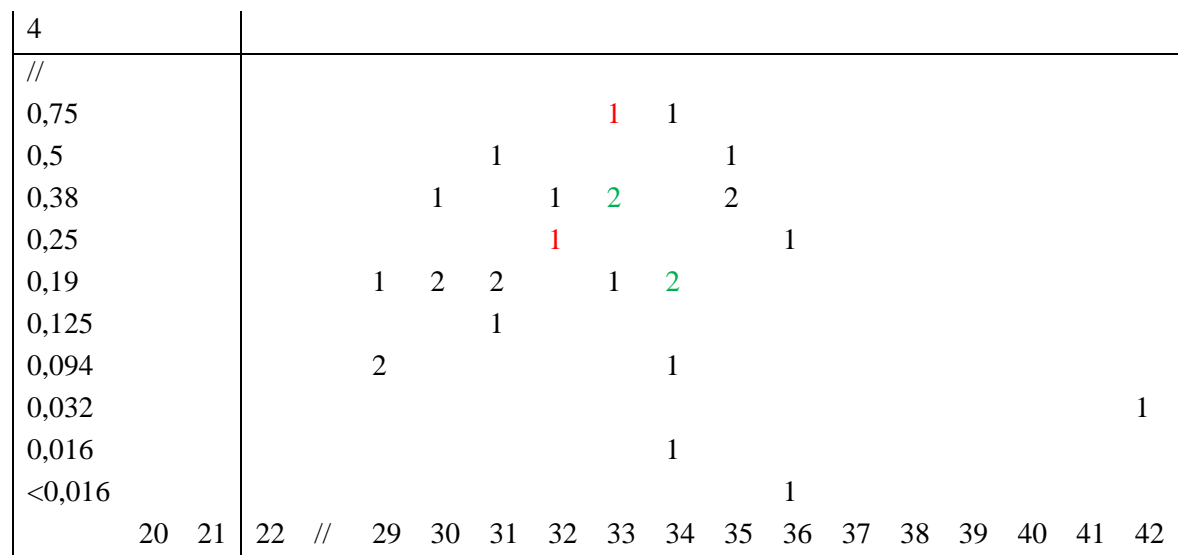


Figura 10. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de cefoxitina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. lugdunensis*.

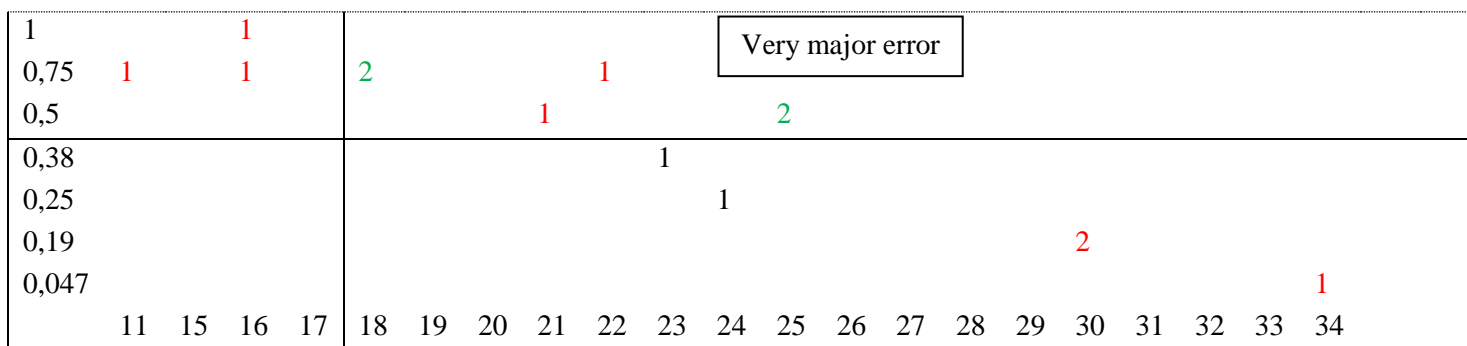


Figura 11. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de oxacilina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. saprophyticus*.

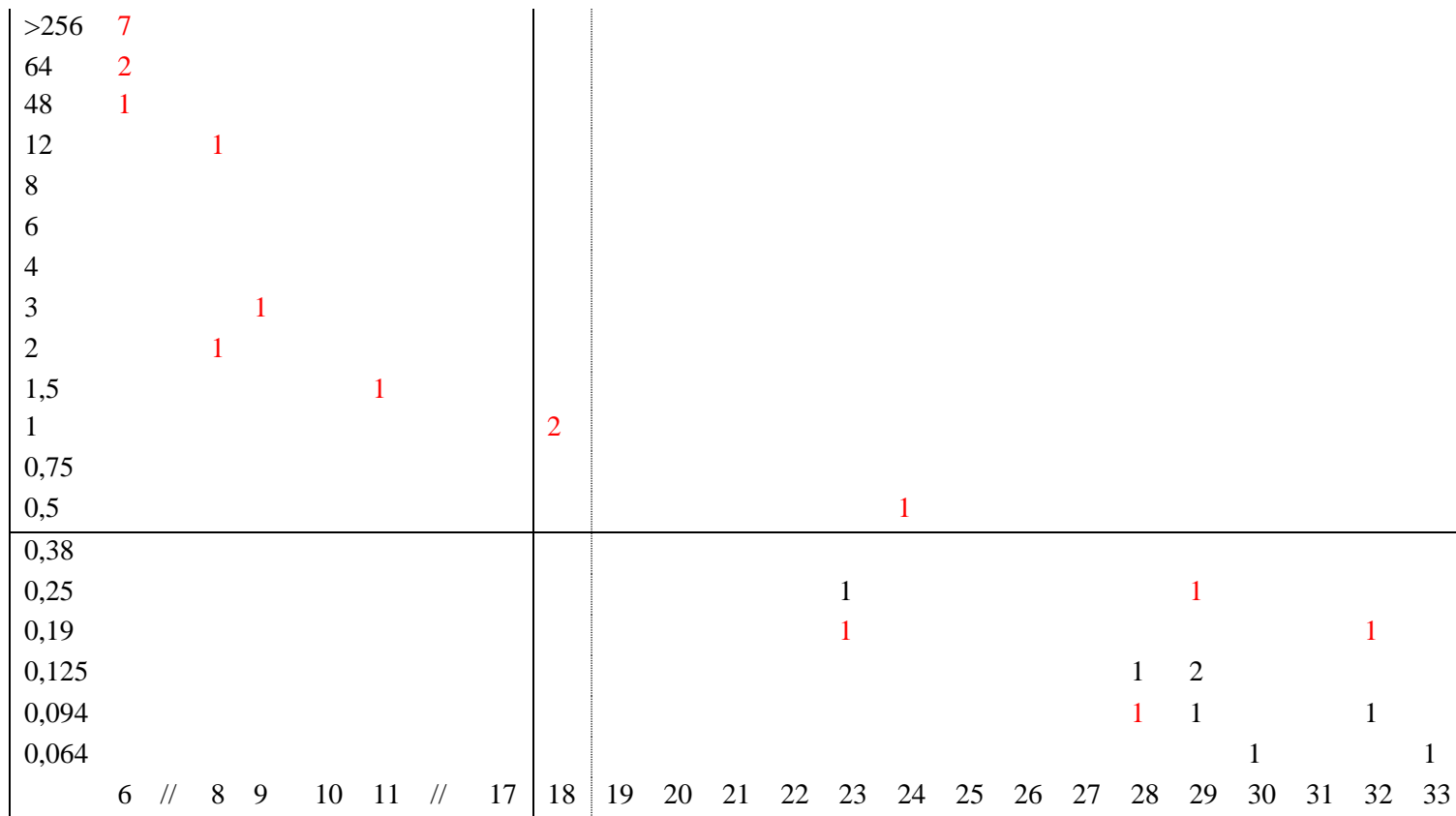


Figura 15. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de oxacilina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. capitis*.

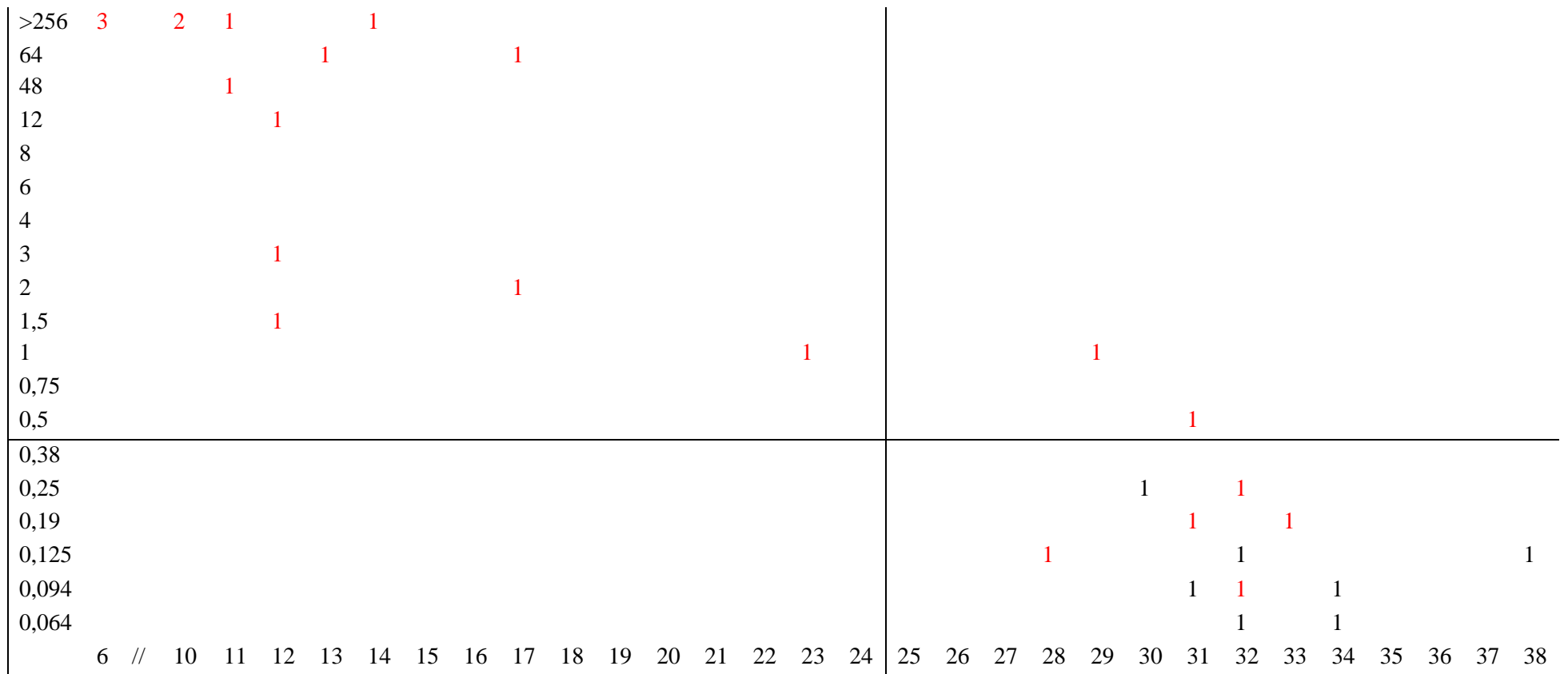


Figura 16. Scattergram comparativo dos halos de inibição pelo disco de cefoxitina com os MICs de oxacilina dos isolados de *S. capitis*.

ARTIGO III

Alterações morfobioquímicas e espessamento da parede celular em *Staphylococcus* coagulase-negativa com susceptibilidade reduzida à vancomicina

Luiza Pinheiro^{a,b}, Priscila Luiza Mello^a, Ligia Maria Abraão^a, Valéria Cataneli Pereira^a,
Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha^a

^a*Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu 18618-970, Brasil.*

^b*Departamento de Anatomia Patológica, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, 17034-971, Brasil.*

E-mails:

luizapinho@ibb.unesp.br (L. Pinheiro); priscila_mello@ibb.unesp.br (P. L. Mello);
ligia.abraao@ymail.com (L. M. Abraão); cunhamlr@ibb.unesp.br (M. L. R. S. Cunha).

#Correspondência a Luiza Pinheiro, luizapinho@ibb.unesp.br

*Endereço Postal: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha. Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Departamento de Microbiologia e Imunologia. Distrito de Rubião Jr. s/n. CEP. 18618-970. Botucatu, São Paulo – Brasil.

Telefone: +551438800428

1. Resumo

A redução da susceptibilidade à vancomicina é um fenômeno cada vez mais encontrado em isolados de estafilococos, cujos determinantes e consequências ainda não estão bem elucidados em *Staphylococcus* coagulase-negativa (CoNS). Com este trabalho, objetivou-se comparar as características biológicas das cepas parentais e suas colônias com heterorresistência à vancomicina provenientes de hemoculturas de pacientes e swab nasal de indivíduos saudáveis. De 291 isolados, 12,4% apresentaram crescimento nas placas com 6 ou 8 µg/ml de vancomicina. O aumento do MIC em 2 ou mais vezes nas colônias heterorresistentes quando comparadas às parentais foi observado em 42,5%. Os MICs de vancomicina estiveram em valores maiores ou iguais a 4 µg/ml em 10 isolados parentais e em 22 colônias heterorresistentes. Colônias crescidas na triagem de isolados selecionados de *S. warneri*, *S. haemolyticus* e *S. capitis* mostraram espessamento de parede celular significativo quando comparado à cepa parental e diâmetro reduzido nos isolados heterorresistentes de *S. haemolyticus* e *S. warneri* por microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se que 60% das subpopulações apresentaram alteração macroscópica no aspecto das colônias. Alterações na fermentação dos açúcares e descarboxilação da ornitina foram encontradas, mas não seguiram um padrão. A presença de colônias mistas com características distintas demonstra a necessidade de testar todas quanto à susceptibilidade e identificação fenotípica. Os resultados enfatizam que a subpopulação heterorresistente necessita estar em um número suficiente de células para se expressar nos testes de susceptibilidade e possui natureza instável. O mecanismo de espessamento da parede celular parece ser a causa mais provável de heterorresistência em *S. capitis*, *S. warneri* e *S. haemolyticus*, ainda mais evidente que em cepas de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina.

Palavras-chave: Estafilococos Coagulase-Negativa; Susceptibilidade reduzida à vancomicina; MICs de vancomicina; alterações morfo-bioquímicas; espessamento da parede celular; SCVs.

2. Introdução

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa (CoNS) são considerados importantes agentes gram-positivos associados a infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos e produção de biofilme em dispositivos médicos. O uso

indiscriminado de agentes antimicrobianos tem tornado mais frequente a identificação de cepas resistentes e com susceptibilidade reduzida a drogas consideradas de alta eficácia contra estas bactérias.

A susceptibilidade reduzida ao glicopeptídeo Vancomicina (RSV) é bem estudada em *Staphylococcus aureus*. As cepas heterorresistentes à vancomicina (hetero-VISA) comumente apresentam-se em forma de subpopulações capazes de crescer em concentrações de vancomicina que deveriam inibir seu crescimento. Tais subpopulações podem apresentar características morfofisiológicas alteradas, como espessamento de parede celular [1], crescimento lento, colônias pequenas, menor produção de pigmento, ausência ou pouca hemólise e redução na atividade da coagulase [2].

As alterações biológicas encontradas em cepas hetero-VISA podem levar à identificação incorreta de cepas de *S. aureus* pelos métodos bioquímicos. Dai et al [3] descreveram diversas modificações biológicas em cepas clínicas hetero-VISA que levaram a sua identificação como *S. haemolyticus*. Tal erro é considerado grave e pode inclusive levar a falha de tratamento e de controle de disseminação hospitalar.

Em CoNS, entretanto, as características da heterorresistência à vancomicina ainda não estão bem elucidadas. Alguns trabalhos apresentam o espessamento da parede celular em cepas de CoNS com susceptibilidade reduzida à vancomicina [4]; entretanto, não há dados sobre alterações morfofisiológicas nestes isolados. Visto que os CoNS estão presentes em alta frequência como causadores de infecções hospitalares crônicas e oportunistas, este trabalho objetivou comparar características biológicas entre as populações parentais e populações heterorresistentes à vancomicina de isolados de CoNS de amostras clínicas e comunitárias.

3. Materiais e Métodos

3.1 Isolados

Cento e vinte seis cepas de CoNS de origem hospitalar a serem estudadas foram isoladas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, os quais estão estocados na Coleção de Culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP. Cento e quarenta e quatro cepas de origem comunitária foram obtidas a partir de swab nasal de indivíduos saudáveis da mesma comunidade e 21 isolados de feridas crônicas de pacientes

atendidos em Unidades Básicas de Saúde em Botucatu –SP, mantidos a -80°C no Laboratório de coleção de culturas.

3.2 Identificação dos CoNS

A identificação do gênero *Staphylococcus* foi realizada conforme as normas descritas por Baker [5] e Koneman et al [6]. A identificação das espécies de CoNS foi realizada utilizando o método simplificado proposto por Cunha et al [7], conforme esquema de provas bioquímicas. Após extração de DNA realizada utilizando-se o kit Illustra (GE Healthcare), as amostras foram submetidas à identificação genotípica utilizando-se primers de sequências conservadas adjacentes aos genes que codificam o RNAr 16S e RNAr 23S pela técnica ITS-PCR [8,9]. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *ureolyticus* (ATCC 49325), *S. warneri* (ATCC 10209), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. xylosus* (ATCC 29979) e *S. caprae* (ATCC 35538). Os isolados que não puderam ser identificados pela técnica de ITS-PCR foram submetidos ao sequenciamento do gene *rpoB* (nucleotídeos 1444-1928) [10].

3.3 Teste de triagem para detecção de heterorresistência à vancomicina

Para verificação de heterorresistência à vancomicina, foi utilizado o meio de triagem preparado com ágar BHI adicionado de 6 e 8 µg/ml de vancomicina. As cepas referência *S. aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, susceptíveis a vancomicina, foram utilizadas como controle negativo e a amostra *E. faecalis* ATCC 51299, resistente a vancomicina, foi utilizada como controle positivo. Dois inóculos correspondentes à escala 2 de McFarland foram feitos em spots em cada uma das placas com as duas concentrações de vancomicina. Após incubação por 24 horas a 35 °C, a presença de pelo menos uma colônia em um dos inóculos foi considerada como crescimento positivo. Todas as análises posteriores partiram da mesma colônia crescida na triagem, que foi estocada com caldo nutriente com 10% de glicerol. Todas as colônias da triagem foram confirmadas como CoNS através dos testes de catalase e coagulase e estocadas para testes posteriores.

3.4 Determinação da MIC de vancomicina pelo método de microdiluição em caldo

Para a técnica de microdiluição em caldo na determinação do MIC de vancomicina, foram utilizadas placas de microtitulação estéreis, utilizando o caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions (Oxoid, U.K.), conforme recomendado pelo CLSI [11]. Uma solução-estoque de vancomicina foi preparada em água destilada na concentração de 3200 µg/ml. Em placa de microtitulação foram feitas diluições seriadas de vancomicina nas concentrações de uma escala logarítmica de 2, compreendendo os *breakpoints* (CLSI [11]) 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/ml, em caldo Müeller-Hinton, com um volume final de 100µL. As amostras foram isoladas e reisoladas e, então, uma suspensão bacteriana com turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) foi preparada e diluída em 1:312, e então adicionados 100 µL em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 35°C e a leitura do MIC feita após 24 e 48 horas de incubação. Foram utilizados um controle de crescimento, contendo o caldo e a suspensão bacteriana, sem antimicrobiano, e um controle de esterilidade contendo apenas o caldo Müeller-Hinton não inoculado. Adicionalmente, para validação dos resultados, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, susceptível a vancomicina, e *E. faecalis* ATCC 51299, resistente a vancomicina, foram utilizados como controle. O MIC foi considerado como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do micro-organismo, conforme detectado a olho nu.

3.5 Análise das mudanças morfológicas e bioquímicas das subpopulações heterorresistentes

As subpopulações crescidas no método de triagem foram analisadas quanto a variações na coloração e morfologia das colônias vistas a olho nu por um mesmo observador, após crescimento por 24 horas em ágar sangue. Testes bioquímicos que incluíram a fermentação dos açúcares sacarose, trealose, manitol, maltose, lactose, manose e frutose, e testes para observação de urease e ornitina descarboxilase, foram realizados nas cepas parentais e nos isolados recuperados das colônias crescidas na triagem com vancomicina. Os testes bioquímicos foram lidos após 24 e 72 horas de incubação; foram considerados, entretanto, para comparação, apenas os resultados após

72 horas, visto que poucos isolados apresentaram alteração na leitura de 24 horas, podendo ser considerados fermentadores lentos.

3.6 Avaliação do espessamento da parede celular das subpopulações crescidas na triagem através de Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células em fase de crescimento logarítmico foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,12 M de tampão fosfato de sódio e tratadas com 2% de tetróxido de osmium. As células foram desidratadas com concentrações graduais de acetona, e embebidas na resina Durcupan ACM, Epoxy Resin (SEM, Fort Washington, PA). Cortes ultra-finos foram colocados em 2% de acetato de uracila aquoso e citrato de chumbo, e então examinados em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit – FEI Company.

A avaliação morfológica do espessamento da parede celular foi realizada utilizando imagens fotográficas obtidas em uma magnificação final de X 30.000. Em cada célula cortada com superfície aproximadamente equatorial, três eixos foram medidos em linha reta, da membrana até a parte externa da parede celular, e a média desses valores calculada, utilizando o programa Axion 4.7 software (Zeiss). A espessura da parede celular de 30 células de cada isolado foi medida e os resultados expressos como a média +/- DP. A significância estatística para comparação entre as células parentais e as subpopulações foi avaliada pelo teste t de Student ($p < 0.05$).

O diâmetro foi medido em cada célula cortada com superfície aproximadamente equatorial, dois eixos foram medidos em linha reta, em um total de 10 a 15 células únicas (ausência de divisão celular), e a média desses valores calculada. As cepas *S. aureus* Mu3 (heteroVISA, com MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$) e Mu50 (VRSA, MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$) foram também submetidas à microscopia eletrônica de transmissão e usadas na avaliação morfológica.

4. Resultados

Trinta e seis (12.4%) isolados demonstraram crescimento nas placas com 6 e 8 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. Trinta e um isolados apresentaram colônias nas placas com 6 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina; 4 amostras cresceram nas placas com 6 e 8 $\mu\text{g/ml}$; e uma amostra apenas na placa com 8 $\mu\text{g/ml}$. As colônias crescidas foram recuperadas, reisoladas e estocadas para os testes posteriores. Foram testadas quanto à produção de

catalase e coagulase, confirmando se tratarem de CoNS. Tanto as subpopulações como as cepas parentais foram submetidas à microdiluição em caldo para avaliação do MIC de vancomicina.

Das colônias crescidas na triagem com vancomicina, 12 (8.3%) eram provenientes de swab nasal, as quais 9 eram *S. epidermidis*, 1 *S. haemolyticus*, 1 *S. warneri* e 1 *S. capitis*. Outras 24 (19%) amostras hospitalares revelaram heterorresistência: 3 *S. epidermidis*, 4 *S. haemolyticus*, 6 *S. hominis*, 2 *S. warneri* e 9 *S. capitis*. Nenhum dos isolados de feridas cresceu na triagem, e nenhum isolado de *S. lugdunensis* ou *S. saprophyticus* revelou heterorresistência à vancomicina.

A Figura 1 demonstra a comparação do MIC de vancomicina entre as cepas parentais e as subpopulações com susceptibilidade reduzida. Já a Tabela 1 mostra os MICs de vancomicina das amostras e das colônias heterorresistentes avaliados pela microdiluição em caldo.

As características macroscópicas avaliadas incluíram coloração, aspecto, tamanho, hemólise, variação do tamanho, centro da colônia e irregularidade das colônias. Enquanto a Figura 2 mostra as *small-colony variants* nos isolados parentais e heterorresistentes, a Tabela 2 demonstra as cepas que mostraram alteração em pelo menos uma das características macroscópicas avaliadas. A Tabela 3 apresenta o perfil bioquímico dos isolados parentais e das subpopulações heterorresistentes à vancomicina. As alterações mais frequentes foram na fermentação da manose e do manitol.

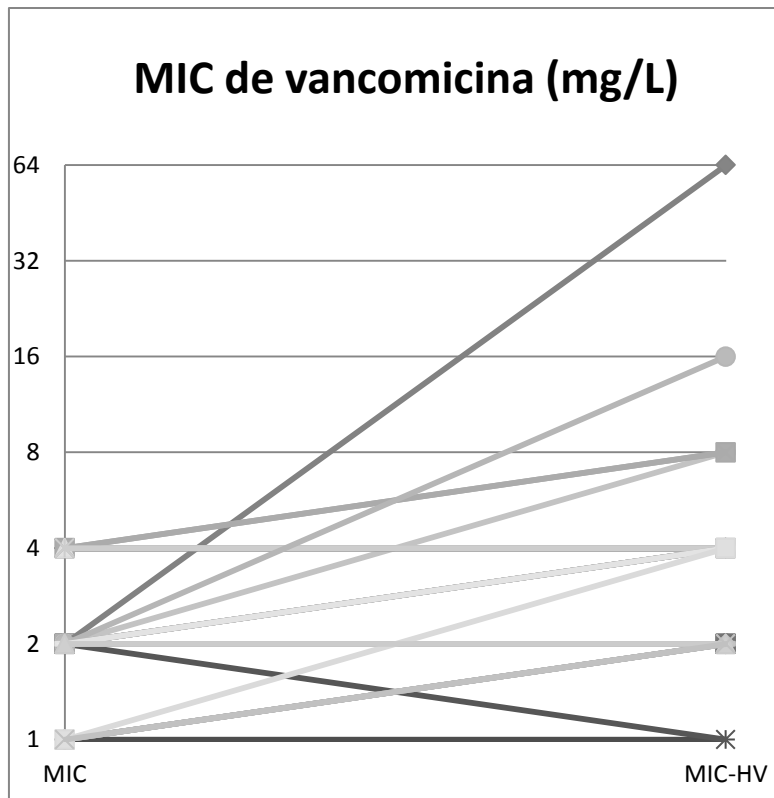


Figura 1. Comparação do MIC de vancomicina das subpopulações crescidas na triagem com a cepa parental. MIC: MIC da cepa parental; MIC-HV (heterorresistência à vancomicina): MIC da subpopulação.

Tabela 1. MICs de vancomicina obtidos após incubação das cepas parentais e subpopulações crescidas na triagem em ágar com vancomicina.

MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	n isolados (%)	Subpopulação no ágar com vancomicina (%)	
		$6 \mu\text{g ml}^{-1}$	$8 \mu\text{g ml}^{-1}$
1	5 (14)	2 (5.7)	0
2	21 (58.3)	16 (46)	0
4	10 (28)	13 (37.1)	4 (80)
8	0	2 (5.7)	1 (20)
≥ 16	0	2 (5.7)	0
Total	36 (100)	35 (100)	5 (100)

n strains: número de cepas parentais. (%): porcentagem de cepas parentais.

Três isolados de CoNS e suas respectivas colônias heterorresistentes foram submetidos à microscopia eletrônica de transmissão para avaliação de espessamento da

parede celular, e mais duas cepas referência: Mu3 (hetero-VISA) e Mu50 (resistente à vancomicina) foram testadas. Dos três CoNS analisados por MET, um tratava-se de *S. capitis* e sua colônia crescida na placa com 6 µg/ml de vancomicina, um *S. warneri* e suas colônias crescidas nas placas com 6 e 8 µg/ml, e um *S. haemolyticus* e sua colônia crescida na placa com 6 µg/ml da droga (Figura 3).

A Tabela 5 apresenta os isolados avaliados pela Microscopia Eletrônica de Transmissão quanto ao MIC de vancomicina, espessura da parede celular, aumento em relação à cepa parental, diâmetro das células e comparação com a cepa parental, e significância estatística das diferenças. As cepas de *S. warneri*, *S. haemolyticus* e *S. capitis* demonstraram espessamento significativo ($p < 0.05$). O diâmetro das células esteve reduzido em maior proporção nas subpopulações derivativas de 73C (*S. haemolyticus*) e 115C (*S. warneri*).

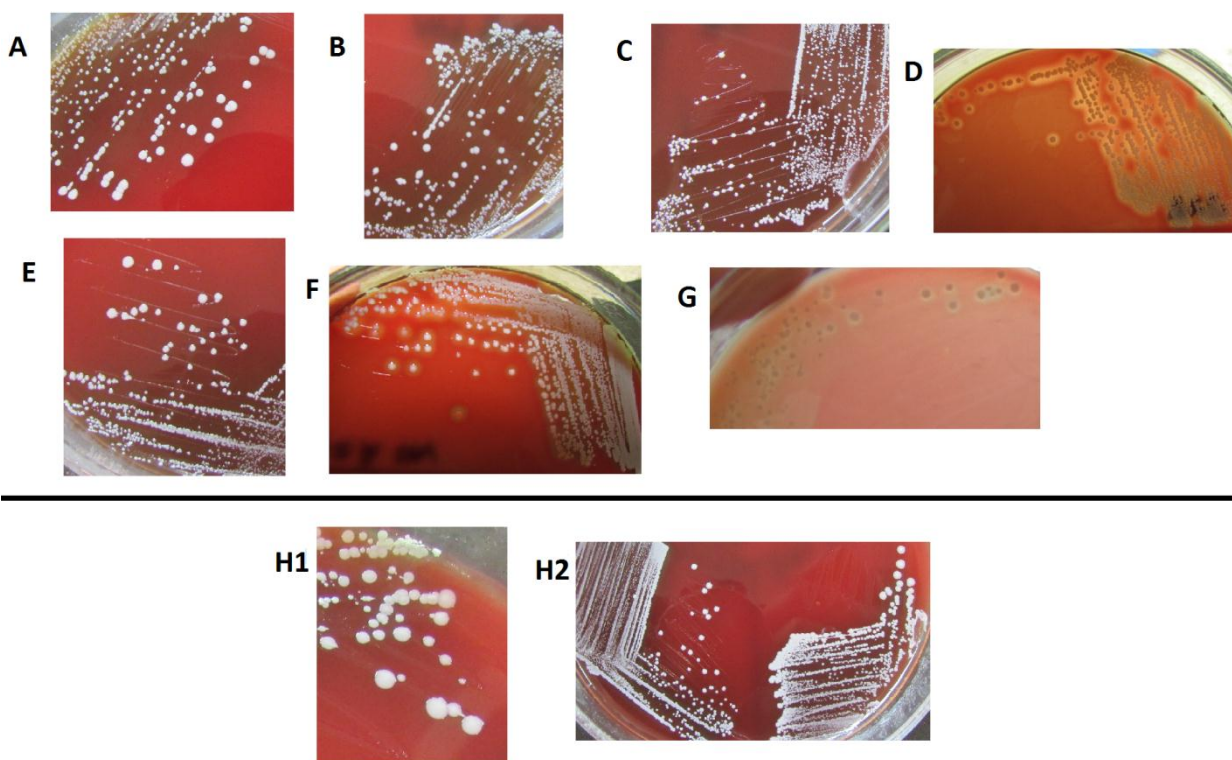


Figura 2. *Small-colony variants* (SCVs) nos isolados. A: Isolado parental de CoNS. B, E: Isolados recuperados da triagem com vancomicina 6 µg/ml. C: Isolado recuperado da triagem com vancomicina 8 µg/ml. D, F: Isolados com variação de hemólise. G: Variação de hemólise em isolado de CoNS parental. H1: Isolado parental 115C; H2:

Isolados recuperados da triagem com 6 µg/ml de vancomicina (esquerda) e 8 µg/ml (direita) 115C (*S. warneri*).

Tabela 2. Características das cepas parentais e dos isolados recuperados das colônias de CoNS crescidas na triagem com vancomicina. HV representa as colônias da triagem. Os blocos sombreados representam as alterações identificadas entre isolado parental/heterorresistente.

Amostra	Espécie	Coloração	Aspecto	Tamanho	Hemólise	Variação Tamanho	Centro	Irregularidade
23A	<i>S. epidermidis</i>	Branco	Brilhante	Pequeno	Ausente	Não	Branco	Não
23A – HV		Branco	Brilhante	Pequeno	Ausente	Sim	Branco	Não
43A	<i>S. epidermidis</i>	Branco	Cremoso	Médio/Pequeno	Variável	Sim	Branco	Não
43A – HV		Branco	Cremoso	Médio	Sim	Não	Branco	Não
47A	<i>S. epidermidis</i>	Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Não	Branco	Não
47A – HV		Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Sim	Branco	Não
84A	<i>S. warneri</i>	Branco	Cremoso	Grande	Presente	Sim	Branco	Sim
84A – HV		Branco	Cremoso	Pequena	Presente	Não	Branco	Não
91A	<i>S. haemolyticus</i>	Branco	Cremoso	Grande	Ausente	Não	Amarelo	Não
91A – HV		Branco	Cremoso	Grande	Ausente	Não	Amarelo	Sim
142A	<i>S. epidermidis</i>	Branco acinzentado	Brilhante	Pequena	Fraca	Não	Branco	Não
142A – HV		Branco	Cremoso	Média	Ausente	Sim	Branco	Não
29C	<i>S. epidermidis</i>	Branco acinzentado	Brilhante	Médio	Ausente	Não	Branco	Não
29C – HV		Branco acinzentado	Brilhante	Médio	Ausente	Sim	Branco	Não
73C	<i>S. haemolyticus</i>	Branco	Cremoso	Grande	Presente	Não	Branco	Não
73C – HV		Branco	Cremoso	Grande	Ausente	Não	Branco	Não
86C	<i>S. hominis</i>	Branco acinzentado	Brilhante	Pequena	Ausente	Não	Branco	Não
86C – HV		Branco	Cremoso	Pequena	Ausente	Sim	Branco	Não
87C	<i>S. hominis</i>	Branco	Cremoso	Pequena	Ausente	Sim	Branco	Não
87C – HV		Branco	Cremoso	Pequena	Ausente	Não	Branco	Não
90C	<i>S. hominis</i>	Branco	Cremoso	Médio	Ausente	Não	Branco	Não
90C – HV		Branco	Cremoso	Médio	Ausente	Sim	Branco	Não
97C	<i>S. hominis</i>	Amarelada	Cremoso	Médio	Ausente	Não	Branco	Não
97C – HV		Branco	Cremoso	Médio	Ausente	Não	Branco	Não

Amostra	Espécie	Coloração	Aspecto	Tamanho	Hemólise	Variação Tamanho	Centro	Irregularidade
123C	<i>S. capitis</i>	Branco acinzentado	Brilhante	Médio	Ausente	Sim	Branco	Não
123C – HV		Branco acinzentado	Brilhante	Médio	Ausente	Não	Branco	Não
124C	<i>S. capitis</i>	Branco	Cremoso	Médio	Ausente	Não	Branco	Não
124C – HV6/8		Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Não	Branco	Não
130C	<i>S. capitis</i>	Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Não	Branco	Não
130C – HV		Branco	Cremoso	Grande	Ausente	Sim	Amarelo	Sim
134C	<i>S. capitis</i>	Branco	Cremoso	Médio	Ausente	Não	Branco	Não
134C – HV		Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Não	Branco	Não
138C	<i>S. capitis</i>	Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Sim	Branco	Não
138C – HV		Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Não	Branco	Não
146C	<i>S. capitis</i>	Branco	Cremoso	Médio	Ausente	Não	Branco	Não
146C – HV		Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Não	Branco	Não
114C	<i>S. warneri</i>	Branco acinzentado	Brilhante	Médio	Ausente	Sim	Branco	Não
114C – HV		Branco	Cremoso	Pequeno	Ausente	Sim	Branco	Não
115C	<i>S. warneri</i>	Branco	Cremoso	Grande	Ausente	Sim	Branco	Sim
115C – HV		Branco	Cremoso	Pequena	Presente	Não	Branco	Não
20C	<i>S. epidermidis</i>	Branco	Cremoso	Pequena	Ausente	Sim	Branco	Não
20C – HV		Branco acinzentado	Brilhante	Pequena	Ausente	Sim	Branco	Não
122C	<i>S. capitis</i>	Branco	Brilhante	Pequena	Ausente	Sim	Branco	Não
122C – HV		Branco	Brilhante	Média	Ausente	Não	Branco	Não

Tabela 3. Perfil bioquímico dos isolados parentais e das colônias heterorresistentes. A barra ‘|’ separa o resultado da cepa parental da colônia heterorresistente. Os blocos sombreados representam as alterações identificadas entre isolado parental/heterorresistente.

Isolado	Sacarose	Trealose	Manitol	Maltose	Lactose	Manose	Frutose	Ureia	Ornitina
59A	+	-	-	+	+	+	+	+	+ -
84A	+	+	- F	+	- +	- +	+	+	-
91A	- +	- +	-	+	+	- +	- +	- F	-
142A	+	+	-	+	- +	+	+	+	+ -
25C	+	+ -	+ -	+	+	+	+	+ -	-
61C	+ -	+ -	-	+ -	+ -	-	+	-	-
63C	+	+	+ -	+	+	+ -	+	-	- +
73C	+	-	+ -	+	F -	-	+	-	-
87C	+	-	-	+	-	-	- +	+	-
88C	+ -	-	-	+	-	-	+	+	-
90C	F -	-	-	F +	+	F	+	+	-
123C	+	- +	- +	+	+	+	+	+	+ -
134C/HV6	+	-	-	+	- +	-	+	+	-
138C	-	-	-	F +	F -	+ -	+	+	-
146C	-	-	-	+ F	-	+	+	+	-
114C/HV6	+	+	+	+	- +	- +	+	+	-
115C/HV6	+	+	-	+	+	- +	+	+	-
122C	+	-	+	+	-	F -	+	+	+ -

+: positivo; -: negativo; F: Fraco.

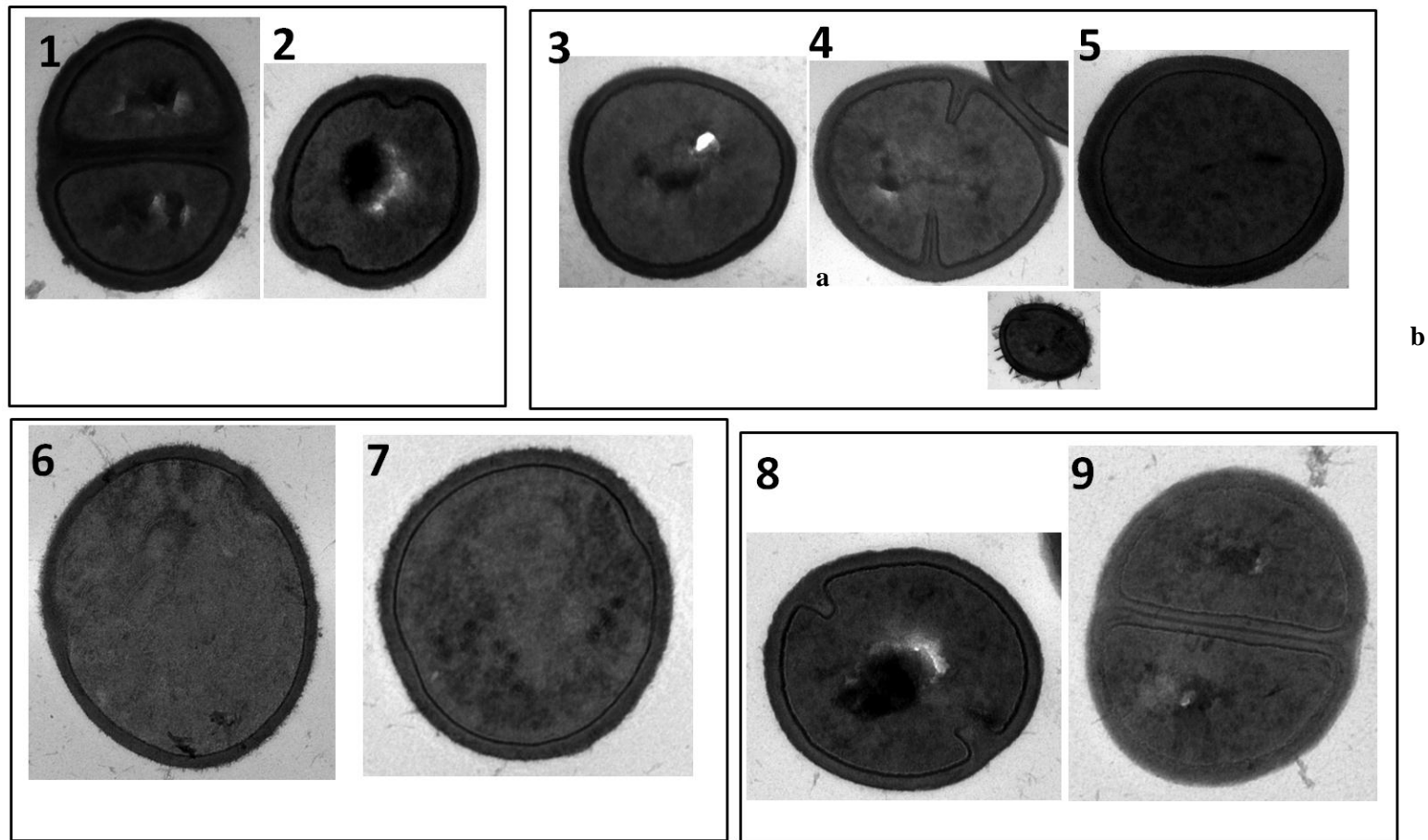


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão das cepas parentais e derivativas. 1 e 2: 146C e 146CHV6 (*S. capitis*); 3, 4 e 5: 115C, 115CHV6 e 115CHV8 (*S. warneri*); 6 e 7: 73C e 73CHV6 (*S. haemolyticus*); 8: *S. aureus* Mu3; 9: *S. aureus* Mu50. Magnificação de 30 000X em todas as imagens. 4a: estrutura encontradas em algumas células (extrusão da parede celular).

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (MIC), espessura da parede celular e diâmetro das células submetidas à microscopia eletrônica de transmissão.

Espécie/Isolado	MIC Vancomicina (µg/ml)	Média (±DP) parede celular (nm)	valor p	% variação espessamento parede celular ^a	Média (±DP) diâmetro (nm)	% variação diâmetro ^a
<i>S. capitis</i>						
146C	2	45,97 ± 4,9		-	573,4 ± 36,5	-
146CHV6	16	49,44 ± 6,6	0,02*	7,5%	557,6 ± 50,7	-2,8%
<i>S. warneri</i>						
115C	1	45,2 ± 5,8		-	763 ± 86,8	-
115CHV6	2	53,02 ± 5,13	<0,0001*	17,3%	631,6 ± 31,8	-17,2%
115CHV8	4	60,36 ± 7,9	<0,0001*	33,5%	698,5 ± 71,6	-8,5%
<i>S. haemolyticus</i>						
73C	2	45,49 ± 7,43		-	884±116,2	-
73CHV6	8	56,2 ± 11	0,0002*	23,5%	798,4±74,2	9,7%
Controles <i>(S. aureus)</i>						
Mu3	2	43,4r ± 4,9		-	615,5±45,9	-
Mu50	8	46,32 ± 3,7		-	595±74,1	-

^a: Em comparação à célula parental

*significante

5. Discussão

No presente estudo, uma porção significativa dos isolados apresentou susceptibilidade reduzida ou heterorresistência à vancomicina, sendo que a frequência em isolados hospitalares foi o mais que duas vezes maior do que em isolados de colonização nasal. A heterorresistência à vancomicina (HV) foi inicialmente definida como a presença de $>10^{-6}$ de células estáveis de uma cepa que é aparentemente susceptível à vancomicina baseando-se em critérios convencionais, mas para as quais o MIC de vancomicina da subpopulação de células estafilocócicas é maior ou igual a 8 $\mu\text{g/ml}$ [2]. Desde 2006, os pontos de corte definidos pelo CLSI mudaram, sendo que a atual definição sustenta que apesar do MIC da população toda estar dentro da faixa de susceptibilidade de acordo com o critério do CLSI, as subpopulações crescidas na presença de ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina podem ser consideradas heterorresistentes. O fenótipo de heterorresistência pode estar associado à falha terapêutica e/ou ser precursor da resistência a glicopeptídeos, devendo ser considerado nas decisões terapêuticas [12].

Em estudo anterior [13], avaliamos a heterorresistência à vancomicina em isolados clínicos de *S. epidermidis* crescidos na triagem com 4 e 6 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. Naquele estudo, 47.7% dos isolados cresceram na triagem, enquanto no presente trabalho, 12.4%. Além do uso de concentrações menores de vancomicina, a avaliação de apenas isolados hospitalares justifica a maior prevalência de susceptibilidade reduzida à vancomicina. De fato, encontramos quase 2.5 vezes mais susceptibilidade reduzida à vancomicina nos isolados hospitalares do que nos colonizantes. A pressão seletiva exercida pelo ambiente hospitalar pode favorecer a circulação e estabelecimento de subpopulações heterorresistentes.

Entre as espécies estudadas, *S. capitis* foi a que, proporcionalmente, mais apresentou crescimento na triagem com vancomicina, mesmo com número total de isolados bem menor, quando comparado a outras espécies como *S. epidermidis* ou *S. haemolyticus*. Entretanto, tais isolados podem se tratar de um mesmo clone (dados não mostrados). Trabalhos anteriores descrevem *S. haemolyticus* como o CoNS com menor susceptibilidade à vancomicina [14,15]. Por sua vez, D'mello et al [16] mostraram heterorresistência à vancomicina em todos os isolados de *S. capitis* obtidos de hemoculturas de recém-nascidos.

O mesmo trabalho de D'mello et al [16] mostrou que apenas isolados com as maiores subpopulações heterorresistentes foram identificados como tal pelo Etest. No presente estudo, foi possível verificar que 80% das colônias crescidas na placa com 8 µg/ml da droga tiveram seus MICs duplicados ou quadruplicados em relação à cepa parental, enquanto nas colônias da placa com 6 µg/ml, essa proporção foi de 36%. Entretanto, os MICs da cepa parental observados já foram relativamente maiores do que em relação a estudos anteriores, mesmo de um total de isolados hospitalares [17, 13]. Pode-se sugerir que, para algumas amostras, dentro da população parental, o número de células da subpopulação HV era grande o suficiente para crescer em maiores concentrações no teste de susceptibilidade, enquanto que para outras, a triagem favoreceu o crescimento de uma colônia representante da subpopulação HV, que estava em número tão reduzido na população parental, que não conseguiu se expressar no teste de susceptibilidade à vancomicina.

Nem sempre a colônia crescida na placa com maior concentração de vancomicina (8 µg/ml) reflete uma subpopulação com MIC maior. Pode-se considerar que, ocasionalmente, naquele inóculo, havia células que conseguiram crescer em tal concentração da droga, mas que no teste de susceptibilidade, i.e., na microdiluição em caldo, falhou em crescer em concentrações maiores que 8µg/ml. Nossos resultados, portanto, apontam para as conclusões obtidas por D'mello et al [16], visto que a subpopulação heterorresistente precisa estar em um número suficiente de células para se expressar nos testes de susceptibilidade e, muitas vezes, aquelas com menores quantidades de células podem passar despercebido por estes testes, causando falha terapêutica com o glicopeptídeo.

Todos os isolados parentais que tiveram crescimento na triagem possuíam MIC dentro da faixa de susceptibilidade (≤ 4 µg/ml). Pouco mais da metade das subpopulações exibiram MICs iguais às cepas parentais. A pressão seletiva exercida pela vancomicina favoreceu o crescimento das subpopulações com susceptibilidade reduzida que, por sua vez, demonstraram sua natureza instável, já que quando foram retestadas, apresentaram MICs baixos, do mesmo valor das cepas parentais. Tal instabilidade no fenótipo de resistência é demonstrada na tendência de algumas cepas de reduzirem seus MICs quando a pressão seletiva da vancomicina é reduzida [18].

Observamos que 60% das amostras com heterorresistência à vancomicina apresentaram alteração macroscópica no aspecto das colônias, quando visualizadas em ágar-sangue. Tal modificação não demonstrou um padrão comum, mas as alterações mais frequentes observadas incluíram o tamanho diferente entre a população parental e a heterorresistente e a variação de tamanho dentro do mesmo isolado, sendo denominadas *small-colony variants* (SCVs), aparecendo tanto nos isolados parentais como nos isolados crescidos na triagem. De fato, a existência de SCVs em *S. aureus*, subpopulações naturais que apresentam crescimento lento e características fenotípicas e mecanismos patogênicos distintos [19,20], têm sido associadas à heterorresistência à vancomicina e infecções persistentes e crônicas [21, 22, 23, 24]. A frequência de recuperação de SCVs de materiais clínicos varia de 1 a 30% (20). Em CoNS, as SCVs já estiveram relacionadas a infecções associadas ao uso de dispositivos médicos e biofilme [23, 20, 25, 26, 27]. Muitos dos fenótipos associados às SCVs, como crescimento lento, pigmentação reduzida e resistência aos aminoglicosídeos podem ser devidos à interrupção da respiração e da produção de energia [28, 29]. No presente estudo, as alterações na pigmentação e na capacidade hemolítica dos isolados heterorresistentes comparados aos isolados parentais enfatiza a necessidade de observação atenta para detecção acurada dessas subpopulações no laboratório clínico e realização de testes adicionais para susceptibilidade à vancomicina. É importante que sejam testados os dois tipos de colônias “mistas” quanto à susceptibilidade a antimicrobianos [30].

Pudemos observar que em 49% das amostras heterorresistentes houve alteração na metabolização em pelo menos um dos açúcares testados, ureia e/ou ornitina. Entretanto, tais alterações não demonstraram um padrão, tanto no tipo de substrato como em relação ao isolado ser parental/derivado. Em *S. aureus*, a alteração na metabolização do manitol, lactose e da própria coagulase já foi demonstrada, porém em padrões não uniformes, o que pode levar à incorreta identificação como CoNS, e comprometer o tratamento de infecções [3]. Do mesmo modo, não foi encontrada uma alteração uniforme na composição do peptidoglicano entre os isolados heterorresistentes [31], o que indica que não é provável que uma única alteração genética ou bioquímica possa contribuir para a resistência aos glicopeptídeos em *S. aureus* com resistência intermediária [31], o mesmo se aplicando para CoNS. Assim, é provável que os rearranjos que ocorrem nas populações com susceptibilidade reduzida variem de cepa

para cepa [30], o que pode afetar a metabolização de substratos distintos, de acordo com a estrutura e rearranjo que a célula sofre para driblar a presença de concentrações médias de vancomicina.

As cepas derivadas na triagem apresentaram um significativo aumento na espessura da parede celular. Os dois isolados derivados de *S. warneri* na triagem com 6 e 8 µg/ml de vancomicina mostraram aumentos de 17,3 e 33,5%, respectivamente. A subpopulação heterorresistente de *S. capitis*, por sua vez, revelou um aumento menor na espessura da parede, diferentemente de trabalho anterior [32]. Apesar de observado nas cepas de *S. warneri* e *S. haemolyticus* do presente estudo, o aumento do MIC proporcional à espessura da parede celular não foi evidente na espécie *S. capitis*, cujas subpopulações com MICs 16 e >64 µg/ml, respectivamente, não refletiram proporcionalmente no aumento da parede celular. Tal associação aumento do MIC/parede mais espessa em *S. haemolyticus* foi relatada previamente, juntamente à hipótese da grande tendência da espécie *S. warneri* desenvolver resistência a glicopeptídeos, já que suas populações derivativas demonstraram alta espessura de parede celular [4]. Em *S. aureus*, outro mecanismo pode estar associado ao MIC elevado de vancomicina. Mutações nos *vraTSR*, *graSR*, *walKR*, *stk1/stp1*, *rpoB*, *clpP*, e *cmk* já foram descritas como associadas à redução da susceptibilidade à vancomicina em *S. aureus* [33].

Da mesma forma, alterações na espessura das camadas de peptidoglicano ocorrem nas cepas com susceptibilidade reduzida à vancomicina. As cepas padrão Mu50 e sua precursora Mu3, designada hVISA [2], possuem síntese da parede celular aumentada. Quando comparadas aos controles susceptíveis à vancomicina, elas possuem maior incorporação de N-acetilglicosamina (GlcNAc) dentro da parede celular, maior quantidade do precursor de monômeros de mureína citoplasmáticos (UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide), e uma maior taxa de turnover da parede celular [34, 35, 36]. Os isolados de CoNS apresentaram paredes tão ou mais espessas quanto as cepas padrão Mu3 e Mu50. Tal fato foi mais evidente nos isolados de *S. warneri* e *S. haemolyticus*, ambos isolados de hemoculturas. De fato, as cepas de CoNS apresentam comumente maiores MICs de vancomicina em comparação a *S. aureus*, e os breakpoints que classificam os isolados com resistência são maiores [11, 37].

As populações derivadas mostraram, inclusive, maior variação intercelular quanto ao espessamento da parede celular. Devido à instabilidade do fenótipo de susceptibilidade reduzida à vancomicina, algumas células podem apresentar paredes mais espessas do que as outras, dentro da mesma população. No detalhe da Figura 3 (4a), observamos uma estrutura interessante presente na superfície da parede celular de algumas células das subpopulações heterorresistentes. Tal estrutura foi encontrada por Palazzo et al [38], os quais sugerem tratar-se de um mecanismo de “aprisionamento” de vancomicina. Este poderia estar relacionado à redução da ligação cruzada do peptidoglicano, gerando maiores quantidades de ácido teicóico produzido por esta cepa, ou ainda mudanças estruturais na parede celular, que resultaram em extrusões de superfície. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar as alterações produzidas nestas células.

Para avaliar uma possível alteração celular associada ao tamanho, o diâmetro das populações parentais e derivativas foi analisado. Enquanto as subpopulações de *S. capitis* demonstraram uma discreta redução no diâmetro, as de *S. warneri* e *S. haemolyticus* apresentaram redução significativa no tamanho das células. Além da diminuição no metabolismo, aparentemente, a redução da susceptibilidade à vancomicina pode causar redução celular, como recentemente observado em isolados resistentes a outros glicopeptídeos, como a ramoplanina [39].

6. Conclusões

A redução da susceptibilidade à vancomicina em isolados clínicos e comensais de CoNS está principalmente associada ao espessamento da parede celular, especialmente em *S. haemolyticus* e *S. warneri*, o qual parece não estar proporcionalmente relacionado ao aumento do MIC. As alterações morfo-bioquímicas parecem não seguir um padrão e podem se dever a diversas alterações metabólicas das células, as quais permitem sua persistência na presença de vancomicina, levam a modificações fenotípicas que podem levar à identificação incorreta das espécies de estafilococos.

7. Referências

1. van Hal SJ, Paterson DL, Gosbell IB. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient--a review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(5):603-10.
2. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670-1673.
3. Dai Y, Zhou X, Ma X, Lu H, Li H. Misidentification of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* as coagulase-negative *Staphylococcus*. *J Med Microbiol* 2012; 61(Pt 10):1454-8.
4. Nunes AP, Teixeira LM, Iorio NL, Bastos CC, de Sousa Fonseca L, Souto-Pradón T, dos Santos KR. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(4):307-15.
5. Baker JS. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol* 1984; 9:875-9.
6. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
7. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:855-60.
8. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3099–103.
9. Barry T, Colleran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* 1991; 1:51-56.
10. Mellmann A, Becker K, Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. Sequencing and staphylococci identification. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 333-336.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighth Informational Supplement, CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
12. Natoli S, Fontana C, Favaro M. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infect Dis* 2009; 9:83.

-
13. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A, Camargo CH, Cunha MLRS. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Mem Inst Osw Cruz* 2014; 109 (7): 871-878.
 14. Froggatt JW, Johnston JL, Galetto DW, Archer GL. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:460-6.
 15. Kristof K, Kocsis E, Szabo D, Kardos S, Cser V, Nagy K, Hermann P, Rozgonyi F. Significance of methicillin-teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* in bloodstream infections in patients of the Semmelweis University hospitals in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30:691-9.
 16. D'mello D, Daley AJ, Rahman MS, Qu Y, Garland S, Pearce C, Deighton MA. 2008. Vancomycin heteroresistance in bloodstream isolates of *Staphylococcus capitis*. *J Clin Microbiol Sep*;46(9):3124-6. doi: 10.1128/JCM.00592-08.
 17. Paiva RM, Mombach Pinheiro Machado AB, Zavascki AP, Barth AL. 2010. Vancomycin MIC for methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates: evaluation of the broth microdilution and Etest methods. *J Clin Microbiol* 48: 4652-4654.
 18. Tajima Y, Komatsu M, Ito T, Hiramatsu K. 2007. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* strains having reduced susceptibility to vancomycin using a chemiluminescence-based drug-susceptibility test. *J Microbiol Methods* 70:434–441
 19. Proctor RA, Peters G. 1998. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis* 27:419-422.
 20. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4:295-305.
 21. Seifert H, Wisplinghoff H, Schnabel P, von Eiff C. 2003. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* and pacemaker-related infection. *Emerg Infect Dis* 9:1316-1318.
 22. Tsuji BT, von Eiff C, Kelchlin PA, Forrest A, Smith PF. 2008. Attenuated Vancomycin bactericidal activity against *Staphylococcus aureus hemB* mutants expressing the small-colony-variant phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4 1533-1537. doi:10.1128/AAC.01254-07
 23. Baddour LM, Christensen GD. 1987. Prosthetic valve endocarditis due to small-colony staphylococcal variants. *Rev Infect Dis* 9:1168-1174.
 24. Kim NH, Kang YM, Han WD, Park KU, Park KH, Yoo JI, Lee DG, Park C, Song KH, Kim ES, Park SW, Kim NJ, Oh MD, Kim HB. 2016. Small-colony variants in

persistent and recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Microb Drug Resist* 22(7): 538-544

25. von Eiff C, Arciola CR, Montanaro L, Becker K, Campoccia D. 2006. Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. *Int J Artif Organs* 29:360-367.

26. von Eiff C, Vaudaux P, Kahl BC, Lew D, Emler S, Schmidt A, Peters G, Proctor RA. 1999. Bloodstream infections caused by small-colony variants of coagulase-negative staphylococci following pacemaker implantation. *Clin Infect Dis* 29:932-934.

27. Bogut A, Niedzwiadek J, Koziol-Montewka M, Strzelec-Nowak D, Blacha J, Mazurkiewicz T, Marczyński W, Plewik D. 2014. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus warneri* small-colony variants associated with prosthetic-joint infections. *J Med Microbiol.* 63(Pt 2):176-85. doi: 10.1099/jmm.0.066068-0.

28. Kurosu M, Narayanasamy P, Biswas K, Dhiman R, Crick DC. 2007. Discovery of 1,4-dihydroxy-2-naphthoate prenyltransferase inhibitors: new drug leads for multidrug-resistant gram-positive pathogens. *J Med Chem* 50:3973–3975. 10.1021/jm070638m

29. von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Gotz F. 1997. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol* 179:4706–4712

30. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. 2010. Reduced Vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 23(1):99-139. doi:10.1128/CMR.00042-09.

31. Boyle-Vavra S, Labischinski H, Ebert CC, Ehlert K, Daum RS. 2001. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 45(1):280-7.

32. Butin M, Martins-Simões P, Picaud JC, Kearns A, Claris O, Vandenesch F, Laurent F, Rasigade JP. 2015. Adaptation to vancomycin pressure of multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A involved in neonatal sepsis. *J Antimicrob Chemother* 70(11):3027-31. doi:10.1093/jac/dkv217

33. Hu Q, Peng H, Rao X. 2016. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 7:1601. doi:10.3389/fmicb.2016.01601.

34. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K. 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. J Antimicrob Chemother 42:199-209. (a)

35. Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K. 1998. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. J Antimicrob Chemother 42:315-320. (b)

36. Hiramatsu K. 1998. Vancomycin resistance in Staphylococci. Drug Resist 1:135-150.

37. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>.

38. Palazzo ICV, d'Azevedo PA, Secchi C, Pignatari ACC, Darini ALC. 2008. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. J Antimicrob Chemother 62 (6): 1222-1226. doi:10.1093/jac/dkn375

39. Schmidt JW, Greenough A, Burns M, Luteran AE, McCafferty DG. 2010. Generation of ramoplanin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 2010 Sep 1;310(2):104-11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02051.x.

5. CONCLUSÕES

- ✓ As cepas de CoNS isoladas de hemoculturas, swabs nasais e feridas crônicas estiveram distribuídas entre as espécies de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. pasteurii*, *S. simulans*, *S. xylosum* e *S. cohnii*.
- ✓ *S. epidermidis*, apresentou alta diversidade clonal, apesar da presença de clusters no ambiente hospitalar (STs 2, 6 e 23) e na comunidade. *S. haemolyticus* apresentou pequenos clones circulando separadamente nos ambientes.
- ✓ Clusters grandes circulando no hospital e comunidade foram encontrados em isolados de *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. capitis*, demonstrando que provavelmente, nestas espécies, há baixa taxa de eventos de diversidade ou certos clones estão se sobressaindo e disseminando.
- ✓ A variedade dos tipos de SCCmec é bem elevada em CoNS, sendo que isolados do mesmo cluster podem possuir tipos distintos.
- ✓ A geração de elementos e combinações novas dos genes do cassete se mostrou altamente relacionada às cepas de CoNS, sugerindo que o SCCmec não é um bom marcador para clonalidade nessas bactérias.
- ✓ A maior discrepância entre gene *mecA*/Etest sensível aparece em espécies não-*epidermidis*, principalmente *S. warneri*.
- ✓ Aumentos nos valores de *breakpoint* para os halos de inibição classificaram melhor o total de CoNS para resistência à oxacilina, e para algumas espécies separadamente, reduzindo casos de *very major* e *major error*.
- ✓ Apesar de o TDD com disco de oxacilina não ser mais recomendado pelo CLSI, observamos alguns casos em que apenas este detectou a resistência. Há necessidade do uso de mais de uma metodologia de aferição da susceptibilidade.
- ✓ A discrepância dos testes fenotípicos quando comparada à positividade do gene *mecA* foi provavelmente devida à característica heterogênea dessa resistência, e o fenômeno de resistência *borderline* foi muito frequente.
- ✓ A heterorresistência à vancomicina se mostrou mais frequente em isolados hospitalares do que em isolados colonizantes. A presença de colônias mistas com características distintas demonstra a necessidade de testar todas quanto à susceptibilidade e identificação fenotípica.

-
- ✓ A subpopulação heterorresistente necessita estar em um número suficiente de células para se expressar nos testes de susceptibilidade e possui natureza instável
 - ✓ O mecanismo de espessamento da parede celular parece ser a causa mais provável de heterorresistência em *S. capitis*, *S. warneri* e *S. haemolyticus*, ainda mais evidente que em cepas de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina, e diâmetro reduzido é uma característica que pode estar presente.