RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/05/2019.

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

PG-BGA

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

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

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

PG-BGA

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 TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

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

RESUMO GERAL.....9
GENERAL ABSTRACT.....11
1.INTRODUÇÃO..... 13
2. OBJETIVO..... 20
2.1 Objetivo Geral..... 20
2.2 Objetivos específicos 20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 21
4. APRESENTAÇÃO DA TESE 28
ARTIGO I..... 29
ARTIGO II 58
ARTIGO III.....93
5. CONCLUSÕES.....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. pasteuri, S. simulans* e *S. xylosus*. 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 Inibirtória 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 Eletrophoresis*) 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 possuiam 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. 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 ≥ 0,75 µg/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 µg/ml de vancomicina: 8,3% de swab nasal e 19% de hemoculturas. 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*. 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. pasteuri, S. simulans* and *S. xylosus*. The disc diffusion test (DDT) using oxacillin and cefoxitin 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 microdiluition method for the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), the transmission eletronic microscopy for evaluation of cellwall thickening and phenotypic modifications by biochemical tests were performed. Clonal profile was determined by PFGE (*Pulsed-Field Gel Eletrophoresis*) 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 *ccr1*, *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.

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 resistantt 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-Padrón 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. Comparision 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, Marczynski W, Plewik D. 2014. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphyloccocus 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 muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. J Antimicrob Chemother 42:315-320. (b)

36. Hiramatsu K. 1998. Vancomycin resistance in Staplylococci. 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. pasteuri, S. simulans, S. xylosus* 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 SCC*mec* 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 SCC*mec* 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.