

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE VANCOMICINA PARA  
*Staphylococcus* sp. COAGULASE NEGATIVA RESISTENTE À METICILINA:  
COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E *E-TEST*  
E CORRELAÇÃO COM FALHA TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM BACTEREMIA**

RODRIGO MINUTO PAIVA

PORTO ALEGRE, 2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE VANCOMICINA PARA  
*Staphylococcus* sp. COAGULASE NEGATIVA RESISTENTE À METICILINA:  
COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E *E*TEST  
E CORRELAÇÃO COM FALHA TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM BACTEREMIA**

Dissertação apresentada por **Rodrigo Minuto Paiva** para  
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Porto Alegre, 2010

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 01.04.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Ana Lúcia Peixoto de Freitas  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

P149c Paiva, Rodrigo Minuto  
Concentração inibitória mínima de vancomicina para *Staphylococcus* sp. coagulase negativa resistente à metilina: comparação entre os métodos de microdiluição em caldo e *etest* e correlação com falha terapêutica em pacientes com bacteremia / Rodrigo Minuto Paiva. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xi, 77 p. : il., tab., gráf.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Vancomicina. 2. Bacteremia. 3. *Staphylococcus* sp. coagulase negativa. 4. Resistência à metilina. I. Barth, Afonso Luís. II. Título.

CDU: 616-074.32

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

*Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).*

***Dedico este trabalho aos meus queridos e compreensíveis pais.***

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Afonso Luís Barth, por sua orientação e ensinamentos durante a execução deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente, à Faculdade de Farmácia, pelo privilégio de estudar em uma instituição com ensino de qualidade.

À Ana Lúcia Antunes, pelo coleguismo nas disciplinas teóricas, troca de experiências, dicas e artigos científicos.

À Alice Mombach, pelo incentivo, assessoria técnico-científica e grande torcida durante o período de realização deste estudo.

À Denise Machado, pelo treinamento prático da técnica de microdiluição em caldo, bem como pela troca de conhecimentos em microbiologia.

Às minhas colegas de laboratório Alice, Fernanda, Carmen e Denise, pelo apoio nos momentos em que precisei me afastar da rotina de trabalho.

À Vânia Naomi, pelas consultorias estatísticas.

Aos funcionários do SAMIS do HCPA pela prontidão e disponibilização dos prontuários médicos.

Aos meus amigos Liciane, Vanessa, Eduardo, Gabriele, Mariana, Janaína, Lessandra, Renata e Vinícius pela amizade incondicional, companheirismo e incentivo.

Aos meus queridos amigos Fábio e Márcio, que mesmo de tão longe, se fazem sempre presentes em todos os momentos.

Ao Luiz Fernando, pelo apoio e compreensão, principalmente, durante a fase final deste estudo.

À minha família amada, Ana, Vera, Felipe, Denise e Luiz Antonio, pelo apoio e torcida incondicional.

Aos meus queridos pais, Léo e Lilia, pelo amor, dedicação e educação, elementos essenciais de minha formação.



## RESUMO

Vancomicina é o antimicrobiano de escolha no tratamento de bacteremias causadas por estafilococos resistentes à meticilina. No entanto, estudos recentes têm reportado que a vancomicina apresenta atividade reduzida contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) próximas do limite do ponto de corte de suscetibilidade, conforme critérios do CLSI, indicando falha terapêutica. Entretanto, existem poucos estudos à respeito dos *Staphylococcus* sp. coagulase negativa resistentes à meticilina (SCoNRM). Ademais, para determinação da CIM, deveria ser utilizado o método de referência microdiluição em caldo (MDC), mas a maioria dos laboratórios clínicos utiliza a técnica de *Etest* ou sistemas automatizados. Alguns estudos com *S. aureus* demonstraram discrepâncias entre MDC e *Etest*, contudo não existem dados referentes aos SCoN. Os objetivos deste estudo foram avaliar a correlação entre as CIMs de vancomicina determinadas pelas técnicas de MDC e *Etest* em 130 SCoNRM isolados de hemocultura, bem como verificar a relação entre valores de CIM e falha terapêutica entre pacientes com bacteremia por SCoNRM tratados com este antimicrobiano. A maioria dos resultados de CIM por MDC (98,5%) foram  $\leq 1,0 \mu\text{g/mL}$ , enquanto o *Etest* apresentou 72,3% de CIM  $\geq 1,5 \mu\text{g/mL}$ . As CIMs de vancomicina obtidas por *Etest* foram, em geral, uma a duas diluições maiores do que as CIMs obtidas por MDC. Os resultados indicam que a técnica de *Etest* gera valores de CIM consistentemente maiores do que os obtidos por MDC nos SCoNRM. Apenas 37 (28,5%) dos 130 pacientes com hemocultura positiva para SCoNRM apresentaram dados clínicos compatíveis com bacteremia. A maioria dos pacientes com bacteremia comprovada (n=24) apresentaram CIMs de vancomicina  $\geq 1,5 \mu\text{g/mL}$ , sendo que 13 pacientes (35,1%) obtiveram CIM  $< 1,5 \mu\text{g/mL}$ . Este estudo não observou relação estatisticamente significativa entre valores de CIM de vancomicina que pudessem ser associados com falha terapêutica em pacientes com bacteremia por SCoNRM.

**Palavras-chave:** vancomicina, CIM, bacteremia, *Staphylococcus* sp. coagulase negativa resistente à meticilina.

**ABSTRACT****Vancomycin MIC for Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococcus* sp.: Comparison of Broth Microdilution and Etest Methods and Correlation to Therapeutic Failure among Patients with Bacteremia**

Vancomycin is the first-line therapy for methicillin-resistant staphylococci bacteremia. However, recent studies have reported that vancomycin demonstrates reduced activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia, with vancomycin MICs at the high end of the CLSI susceptibility range indicating treatment failure. There is, however, little data considering methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) bacteremia. Besides, the reference method that should be used for MIC determination is the broth microdilution (BMD), but many clinical laboratories use the commercial Etest technique or automated systems. Some reports have showed a growing number of vancomycin MIC discrepancies between BMD and Etest method for *S. aureus*, but there are no studies about CoNS. The aims of this study were to evaluate the correlation between the vancomycin MIC determined by the Etest and the BMD method for a total of 130 MRCoNS bloodstream isolates as well as to examine the relationship between vancomycin MICs and failure among patients with MRCoNS bacteremia treated with vancomycin. The vast majority (98.5%) of MIC results by BMD were  $\leq 1.0 \mu\text{g/mL}$  in contrast to MIC by Etest which majority (72.3%) was  $\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$ . The vancomycin MICs obtained by the Etest for the same isolates were, in general, one to twofold higher than those obtained by the BMD method. The results indicate that the Etest provides vancomycin MIC values consistently higher than those obtained by BMD method for MRCoNS. Only 37 (28.5%) out of the 130 patients with a positive MRCoNS bloodstream culture met the eligibility criteria to be considered bacteremic. The majority of these patients ( $n = 24$ , 64.9%) presented vancomycin MIC  $\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$ , in opposite to 13 patients (35.1%) with MIC  $< 1.5 \mu\text{g/mL}$ . This study did not observe any statistical significant relationship between vancomycin MIC and treatment failure.

**Keywords:** vancomycin, MIC, bacteremia, methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- ACCP – *American College of Chest Physicians*
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BMD – *Broth Microdilution*
- CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CoNS – *Coagulase-negative Staphylococcus sp.*
- EPS – Extracelular Polissacarídica
- HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- ICU – Intensive Care Unit
- MDC – Microdiluição em Caldo
- MH – Mueller-Hinton
- SCoNRM – *Staphylococcus sp. coagulase negativa resistente à meticilina*
- MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*
- MRCoNS – *Methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococcus sp.*
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
- PBP2a – *Penicilin Binding Protein* (Proteína ligadora de Penicilina)
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- SCC – *Staphylococcal cassette chromosome*
- SCCM – *Society of Critical Care Medicine*
- SCCmec – *Staphylococcal cassette chromosome MEC*
- SCoN – *Staphylococcus sp. coagulase negativa*
- TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
- UTI - Unidade de Terapia Intensiva
- VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina

## SUMÁRIO

Introdução.....	01
Objetivos do Estudo.....	05
Revisão da Literatura.....	06
1. Aspectos gerais sobre o gênero <i>Staphylococcus</i> sp.....	06
2. Epidemiologia.....	07
3. Importância clínica e patogenicidade.....	09
4. <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativa e bacteremia.....	11
5. Aplicação da vancomicina.....	14
6. Resistência aos antimicrobianos.....	16
7. Considerações gerais sobre os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	19
8. Metodologias utilizadas.....	21
8.1. Técnica qualitativa.....	21
Disco Difusão.....	21
8.2. Técnicas Quantitativas.....	22
Microdiluição em Caldo.....	22
Macrodiluição em Caldo.....	22
Diluição em Ágar.....	23
<i>Etest</i> .....	23
8.3. Sistemas Automatizados.....	24
Artigo I – <i>Vancomycin MIC for Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus</i> sp.: <i>Evaluation of the Broth Microdilution and Etest Methods</i> .....	28
Artigo II – <i>Is there relationship between vancomycin MIC and clinical outcomes among patients with Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus</i> sp. <i>Bacteremia treated with vancomycin?</i> .....	51
Discussão.....	67
Conclusões.....	69

Referências.....70  
Anexo (Parecer do Comitê de Ética).....77



## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus* sp. são reconhecidamente uma importante causa de infecções humanas nosocomiais e adquiridas na comunidade. São encontrados colonizando a pele e membranas mucosas de humanos e animais, no entanto são agentes oportunistas de infecções. Em humanos, podem causar diversas síndromes clínicas, tais como bacteremia, infecções cutâneas, pneumonia, endocardite, osteomielite e outras. Dentre as espécies de estafilococos, *Staphylococcus aureus* é considerado o organismo patogênico mais importante. As demais espécies do gênero estão incluídas no grupo *Staphylococcus* sp. coagulase negativa (SCoN), apresentando crescente interesse clínico (FORBES *et al.*, 2002; BANNERMAN & PEACOCK, 2007; HARRISON, 2007).

As infecções estafilocócicas, principalmente, de natureza hospitalar, apresentam índices altos de resistência aos antimicrobianos (SKOV *et al.*, 2005; CASEY *et al.*, 2007). Para cada classe de antimicrobiano, são observados mecanismos de resistência específicos, com envolvimento de genes plasmidiais ou transposons, que codificam elementos inativadores do antimicrobiano ou diminuem a sua afinidade de ligação, modificando o sítio alvo (JONES, 2001). Entre os *Staphylococcus* sp., o mecanismo de resistência mais importante envolve o gene *mecA*, que confere resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, por codificar a produção de uma proteína de ligação alterada, com baixa afinidade por estas drogas (ROSSI & ANDREAZZI, 2005; BANNERMAN & PEACOCK, 2007). A detecção laboratorial desta resistência faz-se através do teste de disco difusão com disco de cefoxitina, segundo os critérios do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Uma vez encontrada este tipo de resistência, o laboratório deve reportar o microrganismo como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), bem como *Staphylococcus* sp. coagulase negativa resistente à meticilina (SCoNRM), sinalizando para o clínico que o uso de  $\beta$ -lactâmicos será ineficaz na terapêutica (CHAMBERS, 1997).

Os SCoN eram microrganismos considerados saprófitas ou raramente patogênicos, mas atualmente são reconhecidos como oportunistas, que se prevalecem

de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções. Durante a última década, os SCoN têm se tornado fortemente associados a bacteremias em pacientes de unidades de tratamento intensivo (UTIs), bem como em pacientes neonatos (BRODIE *et al.*, 2000; SOHN *et al.*, 2001; CENTER *et al.*, 2003; CASEY *et al.*, 2007). Estima-se que, aproximadamente, 30% de todas as infecções nosocomiais e 50% das bacteremias estejam relacionadas com o gênero *Staphylococcus* e estes têm apresentado um significativo aumento de resistência aos antimicrobianos (SKOV *et al.*, 2005). Em um estudo multicêntrico, os índices de resistência à meticilina reportados foram de 78,7% em SCoN e 31,0% em *S. aureus* (GALES *et al.*, 2009). O tratamento de infecções causadas por SCoNRM é complicado, uma vez que estes microrganismos são resistentes a múltiplas drogas. O aumento da incidência de SCoNRM é preocupante, visto que restringe as opções de tratamento antimicrobiano.

A vancomicina é uma das alternativas no tratamento de bacteremias causadas por SCoNRM. Este antimicrobiano pertence à classe dos glicopeptídeos, empregado no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, apresentando como mecanismo de ação a inibição da síntese da peptidoglicana da parede celular (TAVARES, 2001; JONES, 2006; BASTOS, 2007). Este agente antimicrobiano vem sendo utilizado por aproximadamente 40 anos, em função de sua grande ação contra os estafilococos. Entretanto, as concentrações de vancomicina necessárias para inibir o crescimento dos estafilococos estão aumentando progressivamente, o que vem sendo relatado pela crescente elevação dos valores de concentrações inibitórias mínimas (CIMs) necessárias para combater o microrganismo (TACCONELLI *et al.*, 2001; CENTER *et al.*, 2003; LODISE *et al.*, 2008a). Em vista disso, em 2006, o CLSI reduziu o ponto de corte de suscetibilidade do *S. aureus* frente à vancomicina de 4 µg/mL para 2 µg/mL, em função de que a vancomicina estava apresentando eficácia reduzida contra isolados de CIM = 4 µg/mL. Contudo, o CLSI manteve o ponto de corte de suscetibilidade ≤ 4 µg/mL para os SCoN (CLSI, 2006c).



Entretanto, mais recentemente, alguns estudos vêm relatando o aparecimento de isolados de MRSA apresentando valores de CIM  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ , os quais apresentam resposta clínica diminuída à vancomicina (MOISE-BRODER *et al.*, 2004; SAKOULAS *et al.*, 2004; HIDAYAT *et al.*, 2006; MACLAYTON *et al.*, 2006; SORIANO *et al.*, 2008). Este fato contribuiu para a alteração de alguns critérios do CLSI na determinação da CIM deste fármaco. No último documento do CLSI publicado em 2009, foi estabelecido que deve ser realizado o ensaio de determinação da CIM da vancomicina através da microdiluição em caldo para todos os isolados de estafilococos. Esse critério também teve como base o fato do teste de disco difusão não diferenciar mais os isolados de *S. aureus* e SCoN vancomicina-suscetíveis dos *S. aureus* e SCoN vancomicina-intermediários (CLSI, 2009). Contudo, a maioria dos laboratórios clínicos de microbiologia testa a suscetibilidade da vancomicina ainda por teste de disco difusão. Para a determinação da CIM da vancomicina, de acordo com a disponibilidade do laboratório, faz-se o uso, principalmente, da técnica comercial do *Etest* ou sistemas automatizados. No entanto, apesar da praticidade na realização da técnica do *Etest*, existem estudos demonstrando que a determinação da CIM pelo *Etest* pode informar valores de concentração até duas vezes maiores que no ensaio de microdiluição em caldo (PRAKASH *et al.*, 2008).

Além das mudanças recentes nas padronizações do CLSI, dados da literatura sugerem que pacientes com bacteremia por MRSA, que estejam apresentando valores de CIM de vancomicina entre  $1,5 \mu\text{g/mL}$  e  $2 \mu\text{g/mL}$ , respondem pobremente a este fármaco (LODISE *et al.*, 2008a; LODISE *et al.*, 2008b; WELSH *et al.*, 2010). Entretanto, em relação aos SCoNRM, existem poucos estudos, sobretudo com avaliação da distribuição dos valores de CIM e sua influência no desfecho clínico de pacientes com bacteremia. Ademais, alguns laboratórios de microbiologia testam somente a suscetibilidade da vancomicina por meio do teste de disco difusão, não reportando os valores de CIM, tornando difícil a identificação de pacientes que poderiam apresentar risco de falha terapêutica, em função de valores de CIM  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ . A partir disso, até a determinação dos valores de CIM da vancomicina tornar-se amplamente disponível nos

hospitais, faz-se necessário estudos que avaliem a acurácia entre as técnicas que determinam a CIM, bem como a avaliação da influência de valores de CIM elevados no desfecho clínico de pacientes com bacteremia por SCoNRM, que estejam sendo tratados com este antimicrobiano.

## OBJETIVOS DO ESTUDO

### Geral

Avaliar as CIMs de vancomicina frente aos SCoNRM no desfecho clínico de pacientes com bacteremia.

### Específicos

- Determinar as CIMs de vancomicina através da técnica de microdiluição em caldo e pela técnica comercial de *Etest* entre os SCoNRM;
- Avaliar a distribuição dos valores de CIM entre as diferentes espécies identificadas dos SCoNRM;
- Avaliar a influência dos valores de CIM  $\geq 1,5 \mu\text{g/mL}$  de vancomicina no desfecho terapêutico dos pacientes com bacteremia por SCoNRM.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Aspectos gerais sobre o gênero *Staphylococcus* sp.

*Staphylococcus* sp. são bactérias classificadas como cocos Gram-positivos, devido ao seu formato esférico e coloração positiva no Gram. Apresentam a enzima catalase, sendo consideradas catalase-positivas, característica que as diferenciam de outros gêneros. São bactérias imóveis, não formadoras de esporos e tipicamente não encapsuladas. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* consiste de 37 espécies, muitas das quais são encontradas no homem (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Os estafilococos estão disseminados pela natureza, sendo a pele e a mucosa do homem e outros animais seu principal habitat. Geralmente, esses microrganismos apresentam uma relação benigna ou simbiótica com seus hospedeiros, tornando-se patogênicos devido a uma quebra de barreira cutânea, inoculação através de seringas e dispositivos médicos como cateteres ou por predisposição do hospedeiro. Os estafilococos são patógenos importantes para os seres humanos e causam um amplo espectro de enfermidades, incluindo doenças de pele, tecidos moles, além de infecções oportunistas e bacteremias. As espécies mais comumente associadas a doenças humanas são *S. aureus* e as espécies do grupo dos estafilococos coagulase-negativa (SCoN) – *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* (FORBES *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 2006; BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Os SCoN, uma vez considerados contaminantes de culturas, tem se tornado patógenos predominantes causadores de bacteremias em pacientes que requerem longo período em internações hospitalares. O número de infecções causado por esses patógenos tem aumentado significativamente, sendo que seu grau de infectividade pode ser explicado devido a sua capacidade de expressar resistência a múltiplos antimicrobianos (CENTER *et al.*, 2003).

## 2. Epidemiologia

Os SCoN foram primeiramente descritos em 1884 por Rodenbach como *S. albus*, um estafilococo avirulento. Somente em 1958, houve o primeiro relato publicado de um potencial SCoN patogênico isolado de pacientes com sepse (SMITH *et al.*, 1958 *apud* KLOSS & BANNERMAN, 1994). Embora desde a década de 50 já houvesse relatos de SCoN causando infecções, somente a partir da década de 70 os SCoN passaram a ser reconhecidos como agentes etiológicos de uma ampla variedade de infecções. Durante muitos anos, os SCoN foram considerados não patogênicos e seu isolamento no laboratório clínico era atribuído à contaminação pela microbiota cutânea normal. Com o reconhecimento de sua importância, fatores específicos envolvidos na sua patogênese começaram a serem explorados (HUEBNER & GOLDMANN, 1999).

Pacientes com infecções por SCoN são geralmente imunocomprometidos, submetidos a quimioterápicos, imunossupressores e dispositivos médicos, apresentando situações de risco para o acometimento de infecções. Os SCoN possuem a habilidade de sobreviver em UTIs, na superfície de dispositivos médico-hospitalares e equipamentos médicos durante semanas ou até meses (NEELY & MALEY, 2000). A disseminação dos isolados de SCoN tem sido bem estudada em UTIs neonatais, onde estas bactérias são as principais causadoras de bacteremia. As infecções causadas pelo SCoN são freqüentemente persistentes e recidivantes, e a emergência de resistência antimicrobiana entre os SCoN trouxe mais complicações para o tratamento, especialmente na presença de dispositivos médico-hospitalares (O'GARA & HUMPHREYS, 2002; BEEKMANN *et al.*, 2003).

Em um estudo multicêntrico de monitoramento da resistência antimicrobiana realizado pelo SENTRY, no período de 2005 a 2008, foram verificadas altas taxas de resistência dos SCoN para a maioria dos antimicrobianos nos hospitais brasileiros. Aproximadamente 80% desses isolados foram resistentes à oxacilina, 70% à eritromicina, 50% à sulfametoxazol-trimetoprima e 45% resistentes à levofloxacina

(GALES *et al.*, 2009). Demais estudos epidemiológicos também divulgaram dados semelhantes e agravantes sobre o aumento da incidência de resistência dos SCoN aos antimicrobianos (SADER *et al.*, 2004). Além disso, outros estudos vêm demonstrando que os SCoN estão sendo isolados frequentemente em bacteremias, principalmente, em neonatos e crianças até um ano de idade (BIEDENBACH *et al.*, 2004).

### 3. Importância clínica e patogenicidade

Os SCoN, entre os quais o *S. epidermidis* é o mais comumente encontrado, são substancialmente menos virulentos do que os *S. aureus*, no entanto são patógenos oportunistas (MURRAY *et al.*, 2006). Um aumento no número de infecções envolvendo os SCoN tem sido relacionado ao aumento do uso de dispositivos médico-hospitalares e ao crescente número de pacientes imunocomprometidos. *S. epidermidis* tem sido documentado como um dos principais patógenos causadores de bacteremia, além de infecções relacionadas a cateteres, válvulas cardíacas, feridas pós-cirúrgicas e próteses articulares. Embora os SCoN estejam muito associados a infecções nosocomiais, infecções do trato urinário podem ser causadas por *S. saprophyticus*, especialmente em mulheres jovens sexualmente ativas (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

O segundo SCoN mais associado às infecções humanas é o *S. haemolyticus*, podendo infectar válvulas cardíacas nativas resultando em endocardite, além de causar bacteremia, peritonite, infecções ósseas e articulares. *S. lugdunensis* também apresenta importância em endocardites bacterianas, infectando válvulas cardíacas nativas e prostéticas, além de estar associado a altas taxas de mortalidade em função de seu poder de virulência. Além disso, outras espécies de SCoN tais como *S. capitis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans* têm sido implicados em uma variedade de infecções humanas (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Os fatores de virulência presentes nos SCoN, não estão claramente estabelecidos como nos *S. aureus*. Os *S. epidermidis* não produzem toxinas, nem exoenzimas que causam danos severos aos tecidos, como ocorre com o *S. aureus*. O sucesso do *S. epidermidis* como patógeno deve-se, provavelmente, ao fato de se aderir a superfícies e conseguir permanecer sob a cobertura de um material extracelular de proteção, passando despercebido, podendo causar infecções subagudas ou crônicas (VUONG *et al.* 2003). Assim, o principal fator de virulência associado às infecções causadas pelos SCoN é a formação deste material extracelular denominado biofilme

bacteriano. O biofilme caracteriza-se pela formação de uma comunidade de bactérias envolvidas por uma fina camada (matriz) extracelular polissacarídica (EPS), a qual facilita sua adesão a superfícies biológicas e interfaces sintéticas. As células bacterianas permanecem irreversivelmente unidas umas as outras, às interfaces ou até mesmo aos substratos que circulam dentro da matriz. A vida em comunidade altera o fenótipo da bactéria com relação à taxa de crescimento bacteriano e transcrição de genes (LEWIS, 2001; DONLAN & COSTERTON, 2002; DONLAN, 2002; FLEMMING *et al.*, 2007).

O biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e entrada dos antimicrobianos, dificultando assim, a difusão da droga nos tecidos. A concentração de antibiótico para eliminar bactérias produtoras de biofilme é de 100 a 1000 vezes maior do que a concentração necessária para as mesmas espécies na forma planctônica (DAVEY & O'TOOLE, 2000; FRANK & PATEL, 2007). Os antibióticos administrados aos pacientes, em muitos casos, não atingem as células do interior do biofilme protegidas pela matriz EPS, preservando a fonte de re-infecção do microrganismo. A matriz também protege as células do interior do biofilme contra a ação dos anticorpos produzidos pelo sistema imune e contra os radicais livres e outros compostos reativos produzidos na explosão de fagócitos recrutados para o combate do biofilme (COSTERTON *et al.*, 1999).



#### **4. *Staphylococcus* sp. coagulase negativa e bacteremia**

Usualmente, o termo bacteremia, quando se remete a uma infecção verdadeira, resulta em respostas fisiológicas sistêmicas que indicam a presença de infecção. No passado, o termo septicemia era utilizado para indicar bacteremia associada a uma apresentação clínica de sinais físicos e sintomas de invasão bacteriana, além de produção de toxinas. Posteriormente, o termo septicemia foi substituído por sepse. No entanto, é comum a utilização inadequada desses termos. Assim, devido a esta imprecisão conceitual e para facilitar o estudo da patogênese, bem como para o tratamento das infecções sanguíneas, alguns consensos internacionais padronizaram esses conceitos.

Em 2001, a *International Sepsis Definitions Conference* realizou uma reunião de consenso para reavaliar as definições e critérios de sepse padronizadas pelo *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)* em 1991. A definição de sepse manteve-se como uma síndrome clínica caracterizada pela presença de infecção e resposta inflamatória sistêmica, ou seja, uma resposta sistêmica a uma infecção. Esta síndrome clínica pode ser classificada em sepse, sepse severa e choque séptico. Quando a sepse é acompanhada por alguma disfunção de órgão, hipotensão ou por hipoperfusão tecidual, denomina-se sepse severa. Um quadro de sepse mais grave, acompanhada de hipotensão refratária, denomina-se de choque séptico. Nos três casos, o risco de morte é progressivo, à medida que aumenta a gravidade da sepse (ACCP/SCCM, 1992; LEVY *et al.*, 2003).

Embora a bacteremia possa resultar em sepse, sepse severa e até choque séptico, estas respostas não são automaticamente associadas com bacteremia. Bacteremia refere-se a presença de bactérias viáveis no sangue, determinada pela positividade de um exame cultural de sangue (hemocultura). Tal achado laboratorial pode relacionar a existência ou não de infecção. As hemoculturas podem ser positivas como resultado de uma contaminação das amostras durante a flebotomia, levando a

um resultado falso-positivo, também denominado pseudobacteremia. Esta contaminação é mais frequente devido a presença de bactérias residentes na pele como os SCoN. A pseudobacteremia não é um reflexo da infecção, logo não necessita de tratamento. No entanto, o crescimento de SCoN ou outra bactéria da flora da pele, a partir da hemocultura, nem sempre representa pseudobacteremia e pode indicar uma bacteremia verdadeira, dependendo da situação clínica (TREVINO & ROSS, 2007).

Bacteremia pode ser classificada de acordo com seu sítio de origem em bacteremia primária e secundária. A bacteremia primária resulta quando a fonte de infecção é endovascular (válvulas cardíacas ou cateteres intravasculares). Já a bacteremia secundária é denominada quando a fonte de infecção é extravascular, tal como o pulmão de um paciente com pneumonia. Entretanto, não é infrequente o relato de bacteremias de origem desconhecida. Bacteremia pode ser também classificada conforme o local de aquisição, podendo ser adquirida em ambientes hospitalares (bacteremia nosocomial) ou na comunidade (bacteremia adquirida na comunidade). A bacteremia nosocomial é definida como qualquer bacteremia ocorrida após 72 horas de hospitalização (TREVINO & ROSS, 2007).

Além disso, a bacteremia pode ser classificada de acordo com a sua duração. Uma bacteremia transiente pode ocorrer após um procedimento médico em um sítio específico, onde reside flora bacteriana como, por exemplo, a partir da boca, sítios gastrointestinal e urogenital. Assim, a bacteremia transiente pode aparecer em um curto espaço de tempo após um procedimento dentário, colonoscópico ou citoscópico, respectivamente. Já uma bacteremia intermitente, pode ocorrer como resultado de um abscesso de um local específico ou como uma manifestação clínica de certas infecções como meningococemia e gonococemia. A bacteremia contínua ocorre quando os microrganismos têm como sítio primário de infecção uma fonte intravascular, além de se manifestarem em grande quantidade na corrente sanguínea. Endocardite infecciosa é a manifestação clínica mais comum associada a bacteremia contínua, embora outras

fontes endovasculares, tais como cateteres intravasculares infectados possam resultar em bacteremia contínua (TREVINO & ROSS, 2007).

Devido à gravidade da bacteremia e possibilidade de resultar em sepse, sua definição torna-se imprescindível para o diagnóstico e tratamento correto do paciente, principalmente, tratando-se de hemoculturas positivas com SCoN (BEEKMANN *et al.*, 2005). Frequentemente, para determinação de bacteremia verdadeira ou contaminação por SCoN, utilizam-se os critérios estabelecidos pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (O'GRADY *et al.*, 2002). Um desses critérios é a utilização do número de hemoculturas positivas com SCoN: uma hemocultura positiva, relaciona-se à contaminação e duas ou mais hemoculturas com o mesmo microrganismo isolado, relaciona-se à bacteremia. No entanto, o diagnóstico de bacteremia pode ser dificultado, quando instituições hospitalares adotam a coleta de somente uma hemocultura por paciente. Entretanto, estudos recentes demonstraram dados contrários a este padrão, reportando taxas de mortalidade semelhantes em uma e duas ou mais hemoculturas positivas (16,2% e 10,8%, respectivamente). Assim, as bacteremias por SCoN têm uma taxa de mortalidade significativa mesmo em uma única cultura positiva, sendo que na presença de sinais de sepse, a cultura única deve ser considerada clinicamente relevante (BEEKMANN *et al.*, 2005; FAVRE *et al.*, 2005).

Ainda não existem dados mais definidos sobre o impacto de uma bacteremia por SCoN, no entanto esses microrganismos são frequentemente isolados de culturas de cateteres, sendo também a causa mais comum de infecções relacionadas a cateter, entre elas, a infecção da corrente circulatória (DIEKEMA *et al.*, 2001). Mesmo considerando o papel relevante da contaminação dos SCoN em hemoculturas, esses microrganismos tornaram-se importantes patógenos nosocomiais (KATHIB *et al.*, 1995; FAVRE *et al.*, 2005).

## 5. Aplicação da vancomicina

A vancomicina é um antimicrobiano glicopeptídeo, que foi introduzido em 1956 nos EUA. No período de sua descoberta, a vancomicina representava a alternativa terapêutica para as infecções causadas pelos estafilococos produtores de penicilinas e resistentes à ação da penicilina G. Entretanto, a descoberta da meticilina e da oxacilina fez diminuir a importância médica da vancomicina, que foi relegada a um papel secundário devido à sua maior toxicidade (TAVARES, 2001).

A vancomicina, originalmente obtida a partir de *Streptomyces orientalis*, é um glicopeptídeo complexo que interrompe a síntese do peptidoglicano da parede celular das bactérias Gram-positivas em crescimento. O antimicrobiano interage com o terminal D-alanil-D-alanina da cadeia lateral de pentapeptídeo, interferindo por competição na formação das pontes entre as cadeias do peptidoglicano (SCHEFFERS & PINHO, 2005; MURRAY *et al.*, 2006).

Atualmente, a vancomicina apresenta novamente posição de importância na terapêutica infecciosa, em função do surgimento e disseminação dos estafilococos resistentes à meticilina e de sua eficácia no combate ao *Clostridium difficile*, agente causador de colites resultantes do uso de antibióticos. Embora seja um antimicrobiano ativo sobre os microrganismos Gram-positivos, gonococos e alguns anaeróbios, a vancomicina é especificamente indicada como uma opção para o tratamento de infecções estafilocócicas sistêmicas em pacientes alérgicos às penicilinas ou para infecções causadas por estafilococos meticilina-resistentes. Além disso, apresenta indicação nas infecções por enterococos resistentes às penicilinas, meningites causadas por pneumococos com elevada resistência à penicilina, bem como em pneumonias, osteomielites, sepses, celulites, abscessos e endocardites bacterianas (TAVARES, 2001).

A vancomicina apresenta atividade bactericida, não tendo ação contra bacilos Gram-negativos, uma vez que a molécula é muito grande para passar através dos poros da membrana externa e atingir o sítio-alvo no peptidoglicano. Além disso, alguns microrganismos são intrinsecamente resistentes à vancomicina (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Erysipelothrix*), porque seu pentapeptídeo termina em D-alanil-D-lactato, o qual não se liga à vancomicina. A resistência intrínseca também é encontrada em algumas espécies de enterococos que contêm D-alanil-D-serina terminal (*Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus*). Entretanto, algumas espécies de enterococos, principalmente, *E. faecalis* e *E. faecium*, adquiriram resistência à vancomicina. Relatos de resistência entre algumas espécies de SCoN, tais como *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*, também já foram descritos (MURRAY *et al.*, 2006). Ademais, diversos estudos já reportaram a diminuição da atividade bactericida da vancomicina nos *S. aureus* (*S. aureus* com suscetibilidade diminuída à vancomicina), bem como o aparecimento de isolados com resistência plena à vancomicina (HIRAMATSU *et al.*, 1997; APPELBAUM, 2006).

A exemplo das propriedades da vancomicina verifica-se que o efeito pós-antibiótico deste glicopeptídeo contra as bactérias Gram-positivas ocorre entre uma e duas horas. A vancomicina pode ser administrada com outros antimicrobianos, visto que não apresenta resistência cruzada, exceto com os glicopeptídeos, em particular, a teicoplanina. Além disso, apresenta pouca absorção por via oral, sendo administrada por esta via somente nos casos de infecção intestinal pelo *C. difficile*. Para efeito sistêmico, deve ser administrada por via intravenosa. No entanto, a administração de vancomicina de forma intravenosa pode causar dor e flebite no local da infusão. Sendo assim, o antimicrobiano deve ser diluído com solução fisiológica e administrado com gotejamento lento. Ademais, a vancomicina apresenta propriedades tóxicas (nefrotóxica e ototóxica), que podem resultar, raramente, em insuficiência renal e surdez permanente, bem como propriedades alergizantes, podendo resultar na síndrome do pescoço vermelho (YAO & MOELLERING, 2007).

## 6. Resistência aos antimicrobianos

Os estafilococos desenvolveram rapidamente resistência aos antimicrobianos logo após a introdução da penicilina. Em 1968, a taxa de resistência já era de 60% (CORSE & WILLIAMS, 1968) e atualmente, menos de 10% dos isolados de SCoN são suscetíveis à penicilina (KOKSAL *et al.*, 2009). Esse tipo de resistência é mediado pela produção de penicilinases ( $\beta$ -lactamases) que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico da penicilina. A partir disso, foram desenvolvidas penicilinas semi-sintéticas, como, por exemplo, a meticilina, que são resistentes à hidrólise das  $\beta$ -lactamases. Entretanto, o surgimento de estafilococos resistentes à meticilina não tardou em aparecer (MRSA e SCoNRM). O mecanismo de resistência à meticilina nos estafilococos está bem caracterizado nos *S. aureus*, sendo homólogo aos SCoN. Basicamente, este mecanismo de resistência deve-se, além da produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, a produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional PBP2a (*Penicilin Binding Protein*) que está associada à alteração do sítio de ação do antibiótico  $\beta$ -lactâmico (CHAMBERS, 1997). Esta proteína é codificada pelo gene *mecA*, que está localizado em um elemento genético denominado cassete cromossômico staphylococcal mec – SCC*mec* (HIRAMATSU *et al.*, 2004).

Os SCoN possuem a capacidade de albergar vários marcadores de resistência, o que mostra a sua importância como reservatório de genes de resistência, que podem ser transmitidos para outras espécies e gêneros de microrganismos (ARCHER *et al.* 1994). Existem evidências de transferência horizontal de cassetes SCC entre as espécies de estafilococos. Um dos exemplos de transferência desses genes, já foi caracterizado entre os SCoN e os *S. aureus* (HANSSEN *et al.*, 2004).

Com o crescimento da caracterização de infecções por SCoN, o interesse em estudar sua suscetibilidade também tem aumentado proporcionalmente. A multirresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre os isolados hospitalares de SCoN e têm incluído resistência a diversos

antimicrobianos, tais como eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima, aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos e, eventualmente, quinolonas (SANTOS *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria dos estudos aborda sobre a resistência à meticilina, nos quais tem se verificado um aumento significativo de SCoNRM, ao longo do tempo. Um estudo realizado na Espanha verificou que a frequência de SCoNRM aumentou de 26 – 34% entre 1986 e 1994 para 51% em 1996, alcançando 61% em 2002 (CUEVAS *et al.*, 2004). Em 2007, na Turquia, foram verificadas taxas semelhantes de resistência, em torno de 68%, em amostras de hemocultura que causaram bacteremia (KOKSAL *et al.*, 2009). Já em um estudo multicêntrico realizado no Brasil, os índices de resistência a meticilina reportados foram de 78,7% nos SCoN, no período de 2005 a 2008 (GALES *et al.*, 2009).

O aumento da resistência à meticilina e, conseqüentemente, a toda classe de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cefalosporinas e carbapenêmicos, resultou em um aumento do uso dos glicopeptídeos em terapias empíricas e até mesmo profiláticas. No entanto, com a disseminação do uso dos glicopeptídeos, começaram a surgir relatos de diminuição da sua eficácia. Na verdade, o primeiro relato documentado de resistência aos glicopeptídeos nos SCoN ocorreu em 1986 (DEL BENE *et al.*, 1986 *apud* BIAVASCO *et al.*, 2000). Contudo, naquela época, a atenção estava focada nos enterococos resistentes aos glicopeptídeos, uma vez que já havia sido descoberta a transferência de genes *vanA* dos enterococos para os *S. aureus*, tornando-os *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina – VISA. Além disso, historicamente, as infecções causadas pelos SCoN eram consideradas infrequentes. Entretanto, no final da década de 1990, a emergência de VISA no Japão (HIRAMATSU *et al.*, 1997) e nos EUA (SMITH *et al.*, 1999), seguido de estudos relatando a heterorresistência dos MRSA frente aos glicopeptídeos, alertou para o problema das opções terapêuticas limitadas existentes contra esses Gram-positivos multirresistentes. Esta problemática rapidamente estendeu-se para os SCoN multirresistentes, em função do aumento de seu isolamento clínico, principalmente, nas infecções sanguíneas.

A maioria dos isolados clínicos de estafilococos resistentes aos glicopeptídeos é resistente a teicoplanina, mas suscetível a vancomicina, indicando uma expressão heterogênea da resistência aos glicopeptídeos. Nos últimos anos, alguns estudos têm relatado o aparecimento de SCoN com suscetibilidade diminuída à vancomicina (GARRETT *et al.*, 1999; CENTER *et al.*, 2003). Esses estudos verificaram um aumento nos valores de CIM da vancomicina, tanto em isolados de *S. aureus*, quanto em SCoN. No entanto, o mecanismo de redução de suscetibilidade à vancomicina nos SCoN não está totalmente compreendido (SRINIVASAN *et al.*, 2002). Este mecanismo parece estar relacionado à seleção de populações bacterianas resistentes, sob pressão da exposição antimicrobiana (DUNNE, 2001; WONG, 1999). Por outro lado, alguns estudos tem descrito um mecanismo de resistência dos SCoN aos glicopeptídeos similar ao descrito nos VISA e nos isolados VISA heterorresistentes (SIERADZKI *et al.*, 1998). Já NUNES e colaboradores (2006) verificaram que o aumento do espessamento da parede celular entre os *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. warneri* é um fator associado com a resistência à vancomicina e teicoplanina, como já descrito nos VISA.

Entre as espécies de SCoN, a taxa de resistência aos antimicrobianos varia de forma significativa. Existem altas taxas de resistência encontradas em *S. haemolyticus*: 76 – 96% são resistentes à oxacilina, 80 – 90% são resistentes à eritromicina e 26 – 29% dos isolados apresentam não suscetibilidade à teicoplanina (DEL'ALAMO *et al.*, 1999; CHAUDHURY & KUMAR, 2007; GATERMANN *et al.*, 2007). As taxas de resistência à oxacilina também são elevadas em *S. hominis* (aproximadamente, 80%) e em *S. epidermidis* (38 – 81%) (GILL *et al.*, 1983; DEL'ALAMO *et al.*, 1999; GATERMANN *et al.*, 2007). Já em relação a teicoplanina, cerca de 3% dos isolados de *S. epidermidis* e nenhum isolado de *S. hominis* foram não-suscetíveis (DAL'ALAMO *et al.*, 1999). *S. lugdunensis* tem apresentado suscetibilidade a maioria dos antimicrobianos testados *in vitro*, incluindo penicilinas, cefalosporinas e macrolídeos (POUTANEN & BARON, 2001; GATERMANN *et al.*, 2007).



## 7. Considerações gerais sobre os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), também denominado de antibiograma, avalia o padrão de resposta da bactéria (padrão de suscetibilidade) frente a concentrações pré-estabelecidas de antimicrobianos, correlacionadas com os níveis séricos atingidos após doses usuais em pacientes em condições de normalidade. Basicamente, o antibiograma reflete duas variáveis – o antimicrobiano e a bactéria, sem considerar outros aspectos clínicos que acompanham o processo infeccioso (idade, sítio de infecção, *clearance* renal, etc.), sendo assim, seu resultado necessita ser interpretado pelo médico (TURNIDGE *et al.*, 2007).

A determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos a partir de isolados bacterianos é uma das principais funções dos laboratórios clínicos de microbiologia. O principal objetivo desses testes é prever o desfecho do tratamento com os agentes antimicrobianos testados. A informação de que um microrganismo é “sensível” a determinado antimicrobiano testado implica na alta probabilidade do paciente responder ao tratamento com este fármaco, na dosagem apropriada. O resultado “resistente” informa que o tratamento com o agente antimicrobiano tende a falhar. Além disso, a maioria dos testes inclui a categoria “intermediária” de suscetibilidade. A informação de que um microrganismo apresenta suscetibilidade intermediária a um antimicrobiano caracteriza que a sua prescrição pelo médico requer cautela, uma vez que pode ser necessária a utilização de doses mais elevadas deste fármaco para se atingir o sucesso terapêutico (TURNIDGE *et al.*, 2007).

O TSA é um importante guia para o médico na seleção do agente mais apropriado para um determinado caso clínico. Na maioria dos casos, os resultados desses testes são obtidos 24 a 48 horas após o paciente já ter recebido tratamento empírico. O resultado do teste pode confirmar a suscetibilidade do organismo ao fármaco inicialmente prescrito ou pode indicar a sua resistência, no qual será necessária uma terapia alternativa. Além disso, o resultado do antibiograma

disponibiliza aos médicos a suscetibilidade bacteriana frente a diversos antimicrobianos, proporcionando, geralmente, alternativas medicamentosas para o tratamento do paciente, no caso do aparecimento de reações adversas ao fármaco prescrito inicialmente (ROSSI & ANDREAZZI, 2005; TURNIDGE *et al.*, 2007).

Além disso, o laboratório clínico de microbiologia deve realizar os testes de suscetibilidade somente mediante a padronização dos métodos para estes patógenos, além do conhecimento de resistência intrínseca de patógenos frente a determinados antimicrobianos. O antibiograma deve ser realizado para microrganismos cujas técnicas e padronizações estejam referenciadas e publicadas em consensos. Existem padronizações definidas para os organismos aeróbios e facultativos. Os resultados refletem diferentes padrões de resistência, e sua interpretação pode ser diversa, de acordo com a metodologia e padronização empregada em cada país (CLSI, 2001).

Existem diversos comitês internacionais que desenvolvem e padronizam as diferentes metodologias de antibiograma, disponibilizando, por exemplo, os pontos de corte (*breakpoints*) de suscetibilidade, tipo de meio de cultura a ser empregado, temperatura e tempo de incubação necessária. No cenário internacional, destacam-se o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (EUA), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Europa), *Société Française de Microbiologie Methodologie* (França), *British Society for Antimicrobial Chemotherapy Methodology* (Inglaterra) e *Deutsches Institut für Normung Methodologie* (Alemanha). Até o presente momento, o Brasil não possui normas definidas para a nossa realidade. Assim, a maioria dos laboratórios brasileiros de microbiologia adota as normas padronizadas pelo CLSI, o qual publica anualmente as recomendações e atualizações sobre essas técnicas. Dessa maneira, o controle de qualidade dos testes de suscetibilidade tem como finalidade monitorar a precisão e a acurácia dos procedimentos aplicados nesses métodos, verificar a qualidade dos materiais empregados e o desempenho do técnico que conduz o teste e realiza a leitura. Para esse controle, são utilizadas cepas padrões ATCC (*American Type Culture Collection*) (CLSI, 2001; OPLUSTIL *et al.*, 2004; ROSSI & ANDREAZZI, 2005; CLSI, 2009).

## 8. Metodologias utilizadas

Os documentos do CLSI descrevem vários métodos para testar a suscetibilidade aos antimicrobianos. De um modo geral, existem as técnicas convencionais tais como diluição em caldo, diluição em ágar e disco difusão, bem como os sistemas comerciais automatizados ou não. Basicamente, essas técnicas podem ser classificadas em dois tipos: técnicas qualitativas e técnicas quantitativas (CLSI, 2009).

### 8.1. Técnica qualitativa

Disco Difusão – inicialmente descrito por Kirby e Bauer, é um método que fornece os resultados em categorias definidas como: sensível, intermediário e resistente, conforme descrição anterior. Para a realização do método, um inóculo padronizado da bactéria na concentração de 0,5 de McFarland ( $\approx 1,5 \times 10^8$  UFC/mL) é semeado sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton (MH) de forma uniforme. Após o inóculo, um disco de papel comercial impregnado com antimicrobiano em concentração definida é colocado sobre o ágar. As placas devidamente preparadas são incubadas em estufa bacteriológica, geralmente a 35°C. Durante a incubação, a droga vai se difundindo pelo meio sólido, formando um gradiente decrescente de concentração em torno do disco. Se o microrganismo for sensível ao antimicrobiano, o seu crescimento será inibido onde a droga estiver presente em concentração adequada, formando-se então, um halo de inibição do crescimento. Após determinado tempo de incubação, o diâmetro da zona de inibição será medido e comparado com os padrões estabelecidos pelo CLSI, definindo se o microrganismo é sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano (OPLUSTIL *et al.*, 2004; CLSI, 2006a).

O método de disco difusão apresenta como vantagens ser simples, rápido e de baixo custo. Entretanto, apresenta como desvantagem o fato de ser apenas qualitativo. É o método mais rotineiramente empregado em laboratórios de microbiologia (BASTOS, 2007).

## 8.2. Técnicas Quantitativas

As técnicas quantitativas podem ser realizadas por metodologias de diluição (microdiluição ou macrodiluição) por sistemas automatizados ou não, ou por gradiente de difusão (fitas *Etest*). Diferentemente das técnicas qualitativas, as técnicas quantitativas expressam em números a menor concentração do antimicrobiano que é capaz de inibir o crescimento do microrganismo – CIM (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Microdiluição em Caldo – neste método utiliza-se uma placa de microdiluição com 96 poços. Uma suspensão bacteriana em caldo MH deve ser preparada, sendo sua concentração ajustada a 0,5 de McFarland por nefelometria ou por comparação visual através de um tubo de ensaio comercial com turbidez padronizada. Esta suspensão deve ser diluída com caldo MH, de modo que após a adição do antibiótico, a concentração final de bactérias do teste seja de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL. São pipetados 50  $\mu$ L da suspensão bacteriana em cada poço da placa, aos quais são acrescentados 50  $\mu$ L de determinada concentração de antimicrobiano, totalizando 100  $\mu$ L de volume por poço. Geralmente, as seguintes diluições de antimicrobiano são colocadas em cada poço da microplaca – 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25  $\mu$ g/mL. As placas devidamente inoculadas são incubadas em estufa bacteriológica, por exemplo, a 35°C em atmosfera adequada. De acordo com o antimicrobiano, após 18 a 24 horas de incubação, será realizada a leitura da CIM. A presença de turbidez é indicativa de crescimento bacteriano e a ausência de turbidez é indicativa de eficácia do antimicrobiano. Sendo assim, a menor concentração do antimicrobiano no qual não houver turvação será considerada a CIM (ISENBERG, 1992; CLSI, 2006b; HINDLER & JORGENSEN, 2007).

Macrodiluição em Caldo – neste método, determinadas concentrações do antimicrobiano são incorporadas ao meio de cultura (caldo MH) presente em tubos de ensaio. Os princípios deste método são os mesmos aplicados à microdiluição em caldo, contudo são utilizados tubos de ensaio em vez de microplacas e, conseqüentemente, o volume de caldo utilizado é maior (aproximadamente 1 mL). Em cada tubo de ensaio é

testada uma concentração diferente de antimicrobiano (ISENBERG, 1992; CLSI, 2006b; BASTOS, 2007).

Diluição em Ágar – é um método semelhante à diluição em caldo, no entanto o antimicrobiano é incorporado ao meio de cultura sólido (ágar MH em placas de Petri) durante o seu preparo, antes da solidificação. Assim como no método de diluição em caldo, diferentes concentrações do antimicrobiano são incorporadas ao meio sólido em cada placa de Petri, antes da semeadura do microrganismo. Uma das vantagens desse método é que em cada placa, que contém uma única concentração de antimicrobiano, existe a possibilidade de semear diferentes isolados clínicos. Assim, o ágar poderá ser dividido para ser posteriormente semeado. A determinação da CIM é realizada após incubação a temperatura e período adequados, sendo a inexistência de crescimento bacteriano na superfície do ágar indicativo de inibição pelo antimicrobiano (FORBES, 2002; CLSI, 2006b).

As técnicas de diluição em caldo e diluição em ágar apresentam como vantagem a possibilidade de obtenção de resultados quantitativos, bem como resultados qualitativos, visto que os resultados de CIM podem ser categorizados, a partir dos documentos do CLSI. Entretanto, estas técnicas não são frequentemente utilizadas pelos laboratórios de microbiologia, visto que são métodos laboriosos.

Etest (AB Biodisk, Solna, Suécia) – na técnica comercial do Teste E (*Etest*), desenvolvida mais recentemente, são também testadas diversas concentrações de um mesmo antimicrobiano para se determinar a CIM. O interessante é que neste teste é empregada uma tira (fita) de plástico, na qual é aplicado e imobilizado, de uma forma longitudinal, um gradiente de concentração (indicado na própria fita) do antimicrobiano. Consiste de uma fita de plástico inerte, transparente, medindo 5,5 mm de largura por 60 mm de comprimento. De um lado da fita está impressa uma escala de CIM em  $\mu\text{g/mL}$ , e do outro lado existe um gradiente exponencial do antimicrobiano, seco e estabilizado. A concentração varia de 0,016 a 256  $\mu\text{g/mL}$  ou de 0,002 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , dependendo do

antimicrobiano distribuído ao longo da fita. Uma suspensão bacteriana ajustada a 0,5 de McFarland é semeada na placa de MH com auxílio de um swab em toda a placa durante três vezes, a fim de garantir um crescimento confluyente. Após dez minutos, tempo necessário para a secagem do inóculo, a fita de *Etest* é colocada na placa com auxílio de uma pinça. As placas devidamente preparadas são incubadas em estufa bacteriológica por tempo e em temperatura adequados. Durante a incubação, o antimicrobiano difunde-se no meio, mantendo o gradiente de concentração presente na fita. Observa-se, assim, a inibição do crescimento da bactéria testada, geralmente nas regiões da placa correspondentes às maiores concentrações do antimicrobiano. Esta zona de inibição apresenta a forma de uma elipse. A leitura da CIM será realizada verificando a inibição de crescimento bacteriano da bactéria testada ao longo da fita. A menor concentração do antimicrobiano no qual não houver crescimento será considerada o valor de CIM (ISENBERG, 1992; OPLUSTIL *et al.*, 2004; BASTOS, 2007).

Este método combina algumas vantagens dos métodos de diluição e de difusão, sendo simples, rápido e quantitativo. Uma das vantagens adicionais deste método é que, se fitas impregnadas com diferentes antimicrobianos forem aplicados sobre uma mesma placa, a CIM poderá ser verificada para vários antimicrobianos simultaneamente, economizando tempo e reduzindo custos. No entanto, quando comparado com os métodos quantitativos de diluição, o *Etest* apresenta um custo mais elevado.

### **8.3. Sistemas Automatizados**

Equipamentos automáticos podem ser extremamente úteis, possibilitando a diminuição do tempo de realização desses exames, contudo há situações em que a diminuição do tempo de leitura dos testes pode interferir com a detecção adequada de tipos específicos de resistências, podendo, assim, comprometer o resultado. Portanto, a aquisição de equipamentos automatizados não substitui a qualificação do microbiologista, que precisa conhecer as limitações dessas novas tecnologias e sua

adequação na detecção de resistências nos diferentes microrganismos (TURNIDGE *et al.*, 2007).

Atualmente, existem três tipos de sistemas automatizados frequentemente utilizados: Sistemas *Vitek*, *Vitek 2* e *Vitek 2 Compact* (*bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA*), Sistema *MicroScan WalkAway SI* (*Dade Behring Inc., West Sacramento, CA, USA*) e o *BD Phoenix System* (*BD Diagnostics, Sparks, Md*). Esses sistemas são capazes de gerar resultados de TSA de forma rápida (5 a 15 horas) ou através do *overnight* (16 a 24 horas). São instrumentos que automatizam etapas substanciais das metodologias manuais. Evita-se, por exemplo, a etapa de ressuspensão dos antimicrobianos em pó e do preparo de suas respectivas diluições, além da diminuição do número de pipetagens de antimicrobiano e inóculo na placa ou tubo de ensaio (FORBES, 2002; HINDLER & JORGENSEN, 2007).

O sistema *Vitek* é um equipamento relativamente compacto que utiliza cartões plásticos com quantidades de antimicrobianos em concentrações conhecidas, distribuídas em 45 poços para o teste de suscetibilidade. Os cartões funcionam como se fosse uma microplaca do ensaio de microdiluição, onde será inoculada a suspensão bacteriana, sendo que em cada poço encontram-se antimicrobianos liofilizados. O *Vitek* pode ser configurado para acomodar 30, 60, 120 ou 240 cartões. Estes cartões permitem com que seja disponibilizado o resultado de CIM, acompanhado com a informação de sua interpretação (suscetível, intermediário ou resistente) para a maioria das bactérias aeróbicas de crescimento rápido, em um período de 4 a 18 horas. Para isso ocorrer, o *Vitek* foi desenvolvido com um módulo para inoculação dos cartões e um compartimento de incubação e leitura. A leitura é realizada por fotometria, através de medidas turbidimétricas do crescimento bacteriano realizadas a cada 1 hora. É medida a quantidade de luz transmitida através de cada poço, incluindo o poço de controle de crescimento (FORBES, 2002).

Desenvolvido a partir da tecnologia do *Vitek*, o *Vitek 2*, apresenta algumas novidades para a realização do TSA. Primeiramente, após o preparo da suspensão

bacteriana padronizada, não é mais necessária a sua inoculação manual. O inóculo passa a ser introduzido no equipamento através de uma microtubulação por aspiração, dando-se início ao ensaio. A suspensão é automaticamente dirigida para um cartão plástico fechado com 64 poços (19 poços a mais do que na primeira geração do *Vitek*), contendo concentrações específicas de antimicrobianos liofilizados. Os cartões são incubados em um compartimento de temperatura controlada para posterior leitura por turbidimetria. No entanto, um número maior de leituras ocorre durante o período de incubação, sendo a leitura do crescimento bacteriano realizada a cada 15 minutos. Além disso, a determinação da CIM no *Vitek 2* pode ocorrer num período de tempo menor – entre 6 e 8 horas para a maioria das bactérias clinicamente significantes (FORBES, 2002; HINDLER & JORGENSEN, 2007).

A nova geração do *Vitek 2*, o *Vitek 2 Compact*, representa uma versão do *Vitek 2* em tamanho menor. O equipamento está disponível para utilização de 30 ou 60 cartões ao mesmo tempo, ou seja, uma versão mais compacta. O *Vitek 2 Compact* é uma opção de menor custo para os laboratórios, principalmente para aqueles com uma demanda menor de exames de microbiologia (HINDLER & JORGENSEN, 2007).

Todas as três versões do *Vitek* utilizam medidas cinéticas do crescimento bacteriano na presença de agentes antimicrobianos. Análises algorítmicas do crescimento cinético em cada poço são realizadas pelo software do sistema para derivar os valores de CIM, a partir de curvas de crescimento. Os resultados das CIMs são validados através dos softwares *Expert System (Vitek)* e *Advanced Expert System (Vitek 2 e Vitek 2 Compact)*, permitindo reconhecer o padrão de resistência bacteriano usual, além de detectar possíveis mecanismos de resistência incomuns antes de serem reportados (FORBES, 2002; HINDLER & JORGENSEN, 2007).

O sistema *MicroScan* utiliza um painel semelhante a microplaca utilizada na microdiluição em caldo, sendo a inoculação manual realizada através de um inoculador produzido pela própria *Dade Behring*. Os painéis inoculados são introduzidos em uma



unidade de incubação e leitura, onde eles são incubados por tempo determinado até o padrão de crescimento adequado necessário para leitura e interpretação. O *MicroScan* foi desenvolvido para comportar 40 ou no máximo 96 painéis. Existem 3 tipos de painéis que fazem a identificação bacteriana e o TSA: painéis para Gram-positivos, Gram-negativos e um único painel para os dois grupos bacterianos. A leitura é feita por espectrofotometria, sendo necessária uma incubação *overnight*. No entanto, a leitura pode ser feita visualmente, como descrita pela microdiluição em caldo, no caso de mau funcionamento do *MicroScan*. O equipamento também oferece a possibilidade de uma leitura prévia das primeiras reações finalizadas entre 4,5 e 6,5 horas, emitindo um resultado parcial do exame. O resultado final do ensaio ocorre após a incubação completa, entre 18 e 24 horas, podendo ser requerido mais tempo, de acordo com o microrganismo (FORBES, 2002; HINDLER & JORGENSEN, 2007).

O sistema *Phoenix* é um equipamento que pode acomodar até 100 painéis de testes simultaneamente. Os painéis contêm 136 pequenos poços para testar 16 a 25 agentes antimicrobianos, os quais podem ser testados simultaneamente com poços que contêm substratos bioquímicos para identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os painéis são inoculados manualmente assim como no sistema *Microscan*. O sistema *Phoenix* emprega um sistema indicador redox para medir o crescimento bacteriano nos poços do teste de suscetibilidade. O indicador é adicionado ao caldo no momento de sua inoculação nos painéis. Este equipamento permite a determinação do TSA aproximadamente após 6 a 8 horas de incubação (HINDLER & JORGENSEN, 2007).



## **ARTIGO I**

*Vancomycin MIC for Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus sp.:  
Evaluation of the Broth Microdilution and Etest Methods*

Artigo redigido segundo as normas da Revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*



**Vancomycin MIC for Methicillin-Resistant Coagulase-Negative  
*Staphylococcus* sp.: Evaluation of the Broth Microdilution and Etest Methods**

*Running title:* Vancomycin MIC for MRCoNS.

Rodrigo M. Paiva<sup>1\*</sup>, Alice B. Mombach Pinheiro Machado<sup>2</sup>, Afonso L. Barth<sup>3</sup>.

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular<sup>1,2,3</sup>, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Faculdade de Farmácia<sup>1,3</sup>, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*\*Corresponding author:*

Rodrigo M. Paiva

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-903

Phone: +55 51 3359-8860

Fax: +55 51 3359-8310

E-mail: [rpaiva@hcpa.ufrgs.br](mailto:rpaiva@hcpa.ufrgs.br)

## ABSTRACT

Vancomycin is the antimicrobial most used for the treatment of methicillin-resistant staphylococci bacteremia. However, recent studies have reported that treatment failures is not uncommon, even when methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates are fully susceptible to vancomycin according to the criterion (breakpoint MIC  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ) used by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The reference method that should be used for MIC determination is the broth microdilution (BMD), but many clinical laboratories use the commercial Etest technique or automated systems. Some reports have showed a growing number of vancomycin MIC discrepancies between BMD and Etest method for *S. aureus*, but less is known about coagulase-negative staphylococci (CoNS). We evaluated the correlation between the vancomycin MIC determined by the Etest and the BMD method for a total of 130 methicillin-resistant CoNS (MRCoNS) clinical isolates. *S. epidermidis* was the most prevalent CoNS in this study (66.9% of all CoNS). The vast majority (98.5%) of MIC results by BMD were  $\leq 1.0$   $\mu\text{g/mL}$  in contrast to MIC by Etest which majority (72.3%) was  $\geq 1.5$   $\mu\text{g/mL}$ . The vancomycin MICs obtained by the Etest for the same isolates were, in general, one to twofold higher than those obtained by the BMD method. The results of this study indicate that the Etest provides vancomycin MIC values consistently higher than those obtained by BMD method for MRCoNS.

## INTRODUCTION

In January 2009, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) established the broth microdilution method (BMD) as a test to determine vancomycin MIC for *Staphylococcus* spp. isolates (9). The reference method BMD should be used to determine the MIC, but many clinical laboratories use the commercial Etest technique (AB Biodisk, Solna, Sweden), automated systems or even disk diffusion as routine. Data in the literature indicate that the disk diffusion method and the majority of automated systems do not accurately detect vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (18, 33). Besides, some reports have showed a growing number of discrepancies between in vitro susceptibility test results for vancomycin and clinical outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (35, 16). Clinical failure due to treatment with vancomycin is increasingly reported, even when the MRSA isolates are fully susceptible to vancomycin according to the criterion ( $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ ) used by the CLSI (20, 31). However, some of these studies have used BMD for determining vancomycin MICs, while others have used Etest technique. It has already been reported that Etest provide MICs higher than that obtained with BMD (28, 29). Nevertheless, these studies have tested basically *S. aureus*, mainly MRSA. There is no comparative data about MICs methods and clinical outcomes for coagulase-negative staphylococci (CoNS).

CoNS have emerged as important nosocomial pathogens during the last decades particularly in nosocomial bloodstream infections. Treatment of CoNS

infections may be difficult due to ability of the bacterium to express resistance to multiple antibiotics. Resistance to methicillin in CoNS (MRCoNS) is very common among isolates recovered from hospitalized individuals (11, 19, 34). For this reason, vancomycin is usually the drug of choice for treatment of infection by MRCoNS (7, 32). However, it has been reported that the glycopeptide susceptibilities of clinically significant staphylococci are decreasing. A reduction in the efficacy of vancomycin against MRSA strains with vancomycin MIC between 1 and 2  $\mu\text{g/mL}$  has been described in observational studies, suggesting that slight increases in MICs may be related to suboptimal clinical outcomes (23, 30, 36). Therefore, discrepancies among methods for MICs and the rising resistance of staphylococci warrants local studies to determine the correlation between vancomycin MICs for MRCoNS obtained by Etest technique and the CLSI reference BMD method. We have compared the MIC methods in this study as well as evaluated the distribution of MIC among different species of CoNS.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Bacterial isolation and species identification.** A total of 130 clinical isolates of CoNS were obtained from patients attending *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* with bloodstream cultures. Part of the 130 CoNS isolates (116 isolates) were eligible from the storage bank (24) and 14 clinical isolates were eligible from microbiology clinical laboratory results. The study included only one isolate per patient or more than one isolate when they were obtained after a three



days interval. The blood cultures were performed using Bact Alert<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). The colony morphology, Gram stain reaction, catalase test and absence of the coagulase enzyme were used to screen for CoNS identification. Isolates were identified as *Staphylococcus epidermidis* by PCR, with primers for the *tuf* gene (21). The isolates that were not identified as *S. epidermidis* by PCR were identified using the API ID 32 STAPH (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) semi-automated system, according to the instructions of the manufacturer. Results yielding a quality of identification of 85% or higher were accepted.

**Antimicrobial susceptibility testing.** (I) Broth microdilution technique. MICs of vancomycin were determined by the reference broth microdilution (BMD) as recommended by CLSI, using in-house-prepared panels (8). Eight dilutions of vancomycin between 16 and 0.125 µg/mL (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 and 0.125 µg/mL) were tested. This procedure was performed in duplicate and the MICs were read manually after 24h of incubation.

(II) Etest for vancomycin susceptibility. The standard Etest procedure was performed using Mueller-Hinton agar (Becton Dickinson, Sparks, Md.) with an inoculum density equivalent to 0.5 McFarland. Vancomycin Etest strips were placed onto the agar with sterile forceps. The cultures were incubated for 24h at 35°C, in accordance to the recommendations of the Etest manufacturer (AB Biodisk, Solna, Sweden).

*S. aureus* ATCC 29213 was used as a quality control for BMD and Etest procedures (8).

**Determination of *mecA* gene.** Resistance to oxacillin was determined by the presence of *mecA* gene by PCR with specific primers. We used the primers F1 (5'-CTTACTTACTGGCTGTACCTG-3') and F2 (5'-ATGTCGCTTGTTATGTGC-3') which amplified a 310 bp fragment of the *mecA* gene. The PCR product was visualized under ultraviolet light by the addition of ethidium bromide (0.5 µg/mL) in the agarose gel. *S. epidermidis* ATCC 12228 and *S. aureus* ATCC 33591 were used as negative and positive controls, respectively.

**Statistical analysis.** In order to establish comparative ranges, BMD results were rounded up to the next dilution provided for the Etest method in some analysis. The Wilcoxon test was used as the statistical analysis.

## RESULTS

Antimicrobial susceptibility testing by the BMD and Etest were performed in all MRCoNS and the MICs for vancomycin obtained by the Etest were consistently higher ( $P < 0.001$ ) than those obtained by the BMD method. The majority of results by Etest were  $\geq 1.5$  µg/mL (94 isolates – 72.3%) while by the BMD method the vast majority of MICs were  $\leq 1.0$  µg/mL (128 isolates – 98.5%). In fact, 86.9% (113 isolates) and 3.8% (5 isolates) of all isolates reflected Etest MIC one and twofold dilutions higher than the BMD method, respectively. Indeed, only 10 isolates (7.7%) presented the same MIC in the two methods (Fig. 1). When the Etest MICs 0.38, 0.75, 1.5, and 3.0 µg/mL were converted to 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 µg/mL, respectively, as recommended by the manufacturer, there is an even higher

discrepancy between the methods. In this case, the rounding up of Etest MIC indicates that almost all MRCoNS presented MIC  $\geq$  1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (124 isolates – 95.4%) (Fig. 2).

A total of 87 from 130 isolates were identified by PCR as *S. epidermidis* (66.9% of all CoNS). The other 43 isolates were identified, using the semi-automated method as described, as *S. haemolyticus* (13 isolates, 10.0%), *S. hominis* (12 isolates, 9.2%) and *S. capitis* (11 isolates, 8.5%). Only 7 isolates (5.4%) were not identified to the species level because they presented <85% of confidence of identification in the semi-automated method; these were classified generally as CoNS.

The percentage of Etest MICs of 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (including the rounding up from measured MIC = 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for *S. epidermidis* was elevated – 81.6% (n=71). However, when tested by BMD method, only one isolate of *S. epidermidis* displayed (1.1%) the same MIC result. Comparing the results of MIC = 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (considering 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 13.8% (n=12) and 86.2% (n=75) were obtained according to Etest and BMD methods, respectively. Vancomycin MICs were >2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for one isolate, and this isolate could be considered to a group with decreased vancomycin susceptibility. Among the 13 *S. haemolyticus* isolates, all of them presented MIC = 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  by the Etest but 11 isolates (84.6%) presented MIC = 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  by the BMD method. On the other hand, *S. hominis* displayed the lowest MIC values among all CoNS. A total of 9 isolates of *S. hominis* (75.0%) presented MIC = 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (8 isolates were 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) by Etest, but 7 (77.8%) from these presented MIC = 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  by the BMD method (Table 1).

Noteworthy, the MIC did not exceed 4.0 µg/mL for any of the CoNS isolates, considering  $\leq 4.0$  µg/mL the cutoff for CoNS susceptibility.

## **DISCUSSION**

CoNS are considered important agents of hospital acquired infection, in particular bacteremia, causing significant morbidity and mortality (3, 5, 12). The multiresistant nature of many methicillin-resistant staphylococci is a common characteristic of the CoNS, especially among those recovered during hospitalization (4, 34). Glycopeptides have often been used both in rational and empirical therapy for the treatment of serious infections caused by CoNS owing to the high prevalence of methicillin resistance among these microorganisms (26). In the last two decades, a worldwide increase in the number of CoNS with decreased susceptibility to glycopeptides (mainly vancomycin) has been described (14, 15). In fact, the widespread use of vancomycin has been related to the emergence of CoNS isolates with decreased susceptibility to glycopeptides (10, 25). The emergence of decreased vancomycin susceptibility among staphylococci, has led to evaluations of the susceptibility tests performed by the clinical laboratories to avoid imprecise vancomycin MIC determinations.

Although de BMD is the reference method for MIC determination, the Etest is an attractive option as it is easy to perform and can be used in many clinical laboratories which perform worldwide disk-diffusion method. However, the results

of the present study demonstrated that Etest provides vancomycin MIC results consistently higher than MICs determined by CLSI reference method (BMD).

We found that the Etest MIC was one to twofold dilutions higher than the BMD method. Mason et al., using the BMD with exactly the same concentrations as the Etest, reported MIC disagreement results as in our study (22). In fact, these findings have been frequently reported for *S. aureus*, indicating discrepancies among different methods for MIC determinations (16, 18, 28, 29, 33). However, there is a lack of studies about comparative MIC methods for CoNS. It is of note that the discrepancies described between Etest and BMD methods for *S. aureus* were also observed in this study for CoNS.

A recent antimicrobial surveillance study involving Brazilian hospitals documented that 812 CoNS isolates were tested against vancomycin and the majority presented MIC = 1 µg/mL (54.7%) or 2 µg/mL (35.7%) by the BMD method (13). In contrast, the MICs obtained from our hospital were lowest, totalizing 96.2% of BMD MICs between 0.5 and 1 µg/mL (Fig. 2).

There are studies suggesting that the efficacy of vancomycin in the treatment of *S. aureus* infections decreased for isolates with vancomycin MICs of  $\geq 1$  µg/mL (1, 30, 36, 37). It is possible that the CoNS from patients at HCPA do not represent, as yet, a problem for vancomycin treatment, considering the BMD method. This issue, however, has to be properly addressed in further clinical studies which would validate, or not, the real significance of in vitro vancomycin MIC established by either BMD or Etest.

The general distribution of the species of CoNS identified in this study demonstrated that the main pathogen associated to the bacteremia was the *S. epidermidis* (66.9% of all CoNS isolates). This reflected the current epidemiology of CoNS, with *S. epidermidis* as the most prevalent species (17, 27). We have detected in our institution 86.2% of *S. epidermidis* with BMD MIC = 1.0 µg/mL and only 1.1% with MIC = 2.0 µg/mL (Table 1). In a previous study, Center et al. have described that 56.4 and 38.2% of 220 *S. epidermidis* isolates presented BMD MIC 1 and 2 µg/mL, respectively (6). In this case, the comparison indicates that *S. epidermidis* isolated in our study are more susceptible to vancomycin. Among *S. haemolyticus*, the majority of Etest MIC obtained were around 1 to 2 µg/mL, despite the fact that it is expected that members of this species to be more resistant to multiple antimicrobial agents, including glycopeptides (2). *S. hominis* presented the lowest MIC results.

In conclusion, although still relatively infrequent, multiresistant CoNS with reduced susceptibility to vancomycin are emerging pathogens of clinical concern. In order to establish the antimicrobial resistance profile of CoNS, susceptibility testing methods used routinely in clinical laboratories should be evaluated for their clinical relevance since there is a discrepancy among different methods.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) grant from *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*. Vancomycin Etest strips were kindly provided by Pfizer.

**REFERENCES**

1. **Appelbaum, P. C.** 2007. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30:398-408.
2. **Bannerman, T. L., and S. J. Peacock.** 2007. *Staphylococcus, micrococcus, and other catalase-positive cocci*, p. 390-411. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Jorgensen, and M. L. Landry (ed.), *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.
3. **Beekmann, S. E., D. J. Diekema, and G. V. Doern.** 2005. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **26**:559-566.
4. **Biavasco, F., C. Vignaroli, and P. E. Varaldo.** 2000. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:403-417.
5. **Casey, A. L., P. A. Lambert, and T. S. Elliott.** 2007. Staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29:S23-S32.

6. **Center, K. J., A. C. Reboli, R. Hubler, G. L. Rodgers, and S. S. Long.** 2003. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4660-4665.
7. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:781-791.
8. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th ed. CLSI document M07-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
10. **Del'Alamo, L., R. F. Cereda, I. Tosin, E. A. Miranda, and H. S. Sader.** 1999. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **34**:185-191.



11. **Diekema D. J., M. A. Pfaller, F. J. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. N. Jones, M. Beach, and the SENTRY Participants Group.** 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**:S114-S132.
12. **Favre, B., S. Hugonnet, L. Correa, H. Sax, P. Rohner, and D. Pittet.** 2005. Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **26**:697-702.
13. **Gales, A. C., H. S. Sader, J. Ribeiro, C. Zoccoli, A. Barth, and A. C. Pignatari.** 2009. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz. J. Infect. Dis.* **13**:90-98.
14. **Garrett, D. O., E. Jochimsen, K. Murfitt, B. Hill, S. McAllister, P. Nelson, R. V. Spera, R. K. Sall, F. C. Tenover, J. Johnston, B. Zimmer, and W. R. Jarvis.** 1999. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **20**:167-170.

15. **Hope, R., D. M. Livermore, G. Brick, M. Lillie, and R. Reynolds on behalf of the BSAC working parties on resistance surveillance.** 2008. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**:ii65-ii74.
16. **Hsu, D. I., L. K. Hidayat, R. Quist, J. Hindler, A. Karlsson, A. Yusof, and A. Wong-Beringer.** 2008. Comparison of method-specific vancomycin minimum inhibitory concentration values and their predictability for treatment outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **32**:378-385.
17. **Huebner, J., and D. A. Goldmann.** 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* **50**:223-236.
18. **Jones, R. N.** 2006. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. *Clin. Infect. Dis.* **42**:S13-S24.
19. **Koksal, F., H. Yasar, and M. Samasti.** 2009. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol. Res.* **164**:404-410.

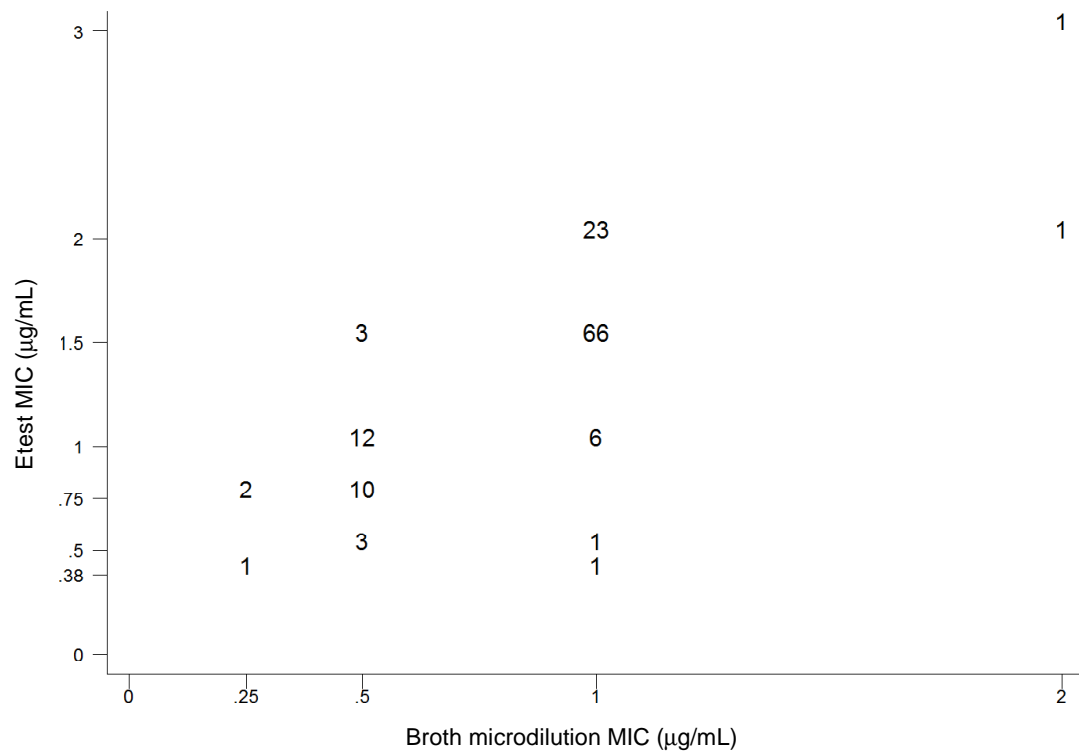
20. **Lodise, T. P., J. Graves, A. Evans, E. Graffunder, M. Helmecke, B. M. Lomaestro, and K. Stellrecht.** 2008. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3315-3320.
21. **Martineau, F., F. J. Picard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron.** 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2888-2893.
22. **Mason, E. O., L. B. Lamberth, W. A. Hammerman, K. G. Hulten, J. Versalovic, and S. L. Kaplan.** 2009. Vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* vary by detection method and have subtly increased in a pediatric population since 2005. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1628-1630.
23. **Moise-Broder, P. A., G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, J. J. Schentag, A. Forrest, and R. C. Moellering, Jr.** 2004. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin. Infect. Dis.* **38**:1700-1705.

24. **Mombach Pinheiro Machado, A. B., K. C. Reiter, R. M. Paiva, and A. L. Barth.** 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. Med. Microbiol.* **56**:1328-1333.
25. **Natoli, S., C. Fontana, M. Favaro, A. Bergamini, G. P. Testore, S. Minelli, M. C. Bossa, M. Casapulla, G. Broglio, A. Beltrame, L. Cudillo, R. Cerretti, and F. Leonardis.** 2009. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infect. Dis.* **9**:83.
26. **Nunes, A. P. F., L. M. Teixeira, N. L. P. Iorio, C. C. R. Bastos, L. S. Fonseca, T. Souto-Padrón, and K. R. N. Santos.** 2006. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterization of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **27**:307-315.
27. **Otto, M.** 2009. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:555-567.

28. **Prakash, V., J. S. Lewis II, and J. H. Jorgensen.** 2008. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4528.
29. **Sader, H. S., P. R. Rhomberg, and R. N. Jones.** 2009. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3162-3165.
30. **Sakoulas, G., P. A. Moise-Broder, J. Schentag, A. Forrest, R. C. Moellering, Jr., and G. M. Eliopoulos.** 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2398-2402.
31. **Soriano A., F. Marco, J. A. Martinez, E. Pisos, M. Almela, V. P. Dimova, D. Alamo, M. Ortega, J. Lopes, and J. Mensa.** 2008. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **46**:193-200.
32. **Srinivasan, A., J. D. Dick, and T. M. Perl.** 2002. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:430-438.

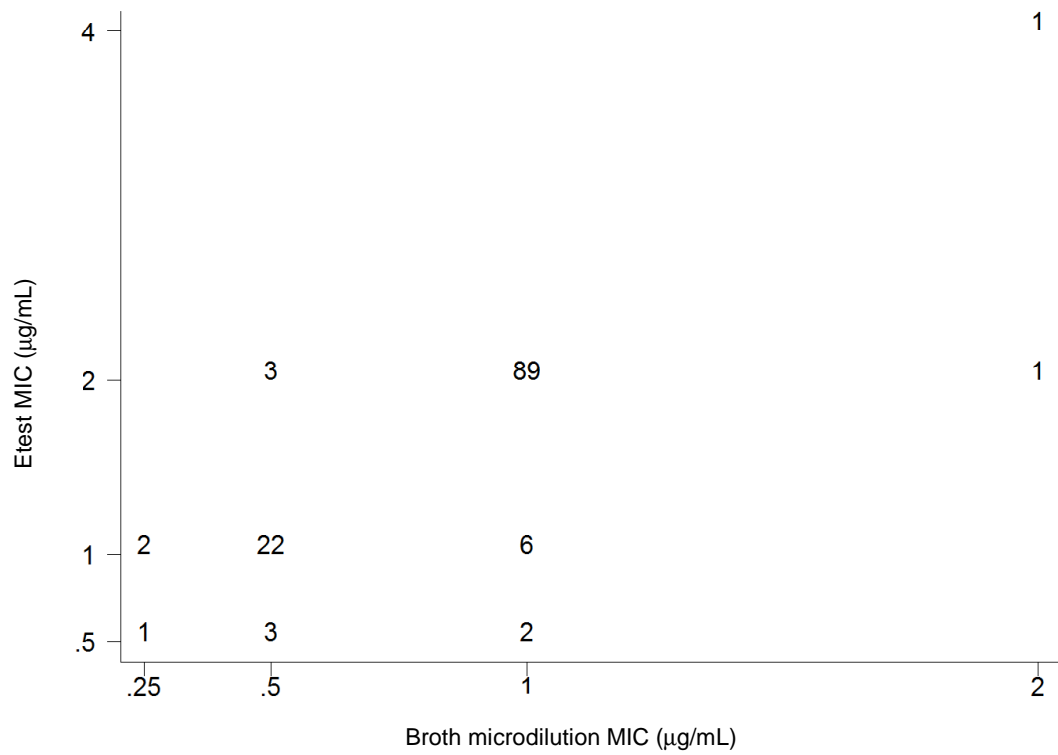
33. **Swenson, J. M., K. F. Anderson, D. R. Lonsway, A. Thompson, S. K. McAllister, B. M. Limbago, R. B. Carey, F. C. Tenover and J. B. Patel.** 2009. Accuracy of commercial and reference susceptibility testing methods for detecting vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **47**:2013-2017.
34. **Tacconelli, E., M. Tumbarello, K. G. Donati, M. Bettio, T. Spanu, F. Leone, L. A. Sechi, S. Zanetti, G. Fadda and R. Cauda.** 2001. Glycopeptide resistance among coagulase-negative staphylococci that cause bacteremia: epidemiological and clinical findings from a case-control study. Clin. Infect. Dis. **33**:1628-1635.
35. **Tenover, F. C., and R. C. Moellering, Jr.** 2007. The rationale for revising the clinical and laboratory standards institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretative criteria for *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. **44**:1208-1215.
36. **Wang, G., J. F. Hindler, K. W. Ward, and D. A. Bruckner.** 2006. Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. J. Clin. Microbiol. **44**:3883-3886.

37. **Wootton, M., A. P. MacGowan, T. R. Walsh, and R. A. Howe.** 2007. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.* **45**:329-332.



**FIGURE 1.** Scattergram of correlation between vancomycin MICs obtained by the broth microdilution method and the Etest.





**FIGURE 2.** Scattergram of correlation between vancomycin MICs obtained by the broth microdilution method and the Etest after rounding up.

TABLE 1. Distribution of vancomycin MICs according to CoNS species<sup>a</sup>

Species	Etest / BMD MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
<i>S. epidermidis</i>	0/1	3/10	12/75	71/1	1/0
<i>S. haemolyticus</i>	0/0	0/1	0/11	13/1	0/0
<i>S. hominis</i>	0/1	2/10	9/1	1/0	0/0
<i>S. capitis</i>	0/0	0/5	7/6	4/0	0/0
<b>Total</b>	0/2	5/26	28/93	89/2	1/0

<sup>a</sup>As determined by Etest and BMD methods. CoNS, coagulase-negative staphylococci.

## **ARTIGO II**

*Is there relationship between vancomycin MIC and clinical outcomes among patients with Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus sp. bacteremia treated with vancomycin?*

Artigo redigido no formato *note*, segundo as normas da Revista *Journal of Clinical Microbiology*

**Is there relationship between vancomycin MIC and clinical outcomes among patients with Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococcus* sp. bacteremia treated with vancomycin?**

*Running title:* Vancomycin MIC and patients with MRCoNS bacteremia.

Rodrigo M. Paiva<sup>1\*</sup>, Alice B. M. Pinheiro Machado<sup>2</sup>, Afonso L. Barth<sup>3</sup>.

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular<sup>1,2,3</sup>, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Faculdade de Farmácia<sup>1,3</sup>, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*\*Corresponding author:*

Rodrigo M. Paiva

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-903

Phone: (51) 3359-8860

Fax: (51) 3359-8310

Email: [rpaiva@hcpa.ufrgs.br](mailto:rpaiva@hcpa.ufrgs.br)

**ABSTRACT**

Evidences suggest that vancomycin demonstrates reduced activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia with vancomycin MICs at the high end (2 µg/mL) of the CLSI susceptibility range. There are, however, little data considering methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) bacteremia. This retrospective cohort study evaluated the outcomes and clinical characteristics of 130 patients with bloodstream MRCoNS in relation to vancomycin MICs. Only 37 (28.5%) patients with a positive MRCoNS bloodstream culture met the eligibility criteria to be considered bacteremic. The majority of patients (n = 24, 64.9%) presented vancomycin MIC  $\geq$  1.5 µg/mL, and 13 patients (35.1%) obtained MIC  $<$  1.5 µg/mL. We did not observe any statistical significant ( $P < 0.05$ ) relationship between vancomycin MIC and treatment failure.

## INTRODUCTION

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are among the most frequently bacteria group isolated in the clinical microbiology laboratory (21). These microorganisms are becoming increasingly important in hospital-acquired infections, mainly as cause of nosocomial bacteremia, although its clinical significance is a question target (1, 6). Treatment can be difficult because many CoNS are resistant to multiple antimicrobials. Methicillin-resistant in CoNS (MRCoNS) is most common and vancomycin, in many cases, is the only therapeutic alternative (2, 5). However, glycopeptide resistance among methicillin-resistant staphylococci (MRS) is emerging in the last few years (20). Furthermore, there have been a growing number of reports showing discrepancies between in vitro susceptibility test results for vancomycin. A few studies have presented data on vancomycin reduced activity against MRS (3, 16). Moreover, data suggest that patients with bloodstream infections due to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) with vancomycin MIC values  $\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$  respond poorly to this antibiotic (10, 15, 18, 19, 22). Despite the fact that the relationship between vancomycin MICs and clinical outcomes has been extensively explored in MRSA bloodstreams infections, there is a lack of studies about the correlation of vancomycin MICs on the outcomes of MRCoNS bacteremia.

The primary purposes of this study were to assess the prevalence of bacteremia caused by MRCoNS and to examine the relationship between

vancomycin MICs and clinical outcomes among patients with MRCoNS bacteremia treated with vancomycin.

We have used MRCoNS isolates from the study Mombach *et al.* (14) obtained from consecutive bloodstream infection recovered between August 2004 and December 2005 from patients attending *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, a tertiary university hospital in southern Brazil. Patients were included in the study whether they had at least one MRCoNS positive culture. If a patient had more than one bloodstream MRCoNS isolate during the study period, only the first isolate was considered. The blood cultures were processed by Bact Alert<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) and the colony morphology, Gram stain reaction, catalase test and absence of the coagulase enzyme were used to screen for CoNS identification. The species identification and determination of *mecA* gene were performed according as reported in Mombach *et al.* (14). Vancomycin susceptibility was determined by Etest technique in accordance to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (4) and Etest manufacturer (AB Biodisk, Solna, Sweden). *S. aureus* ATCC 29213 was used as a quality control for the Etest procedure. Vancomycin MICs were determined under blinded conditions without the knowledge of any clinical outcome.

Clinical data were extracted from patients' medical records using a structured data instrument. Data elements included: age, sex, medical history and comorbidities, antibiotic use in the 30 days preceding the first positive blood culture, admission to the intensive care unit (ICU), illness severity and

microbiological data. Disease severity was calculated according to the Pitt bacteremia score obtained in the day of the MRCoNS isolation (17).

Staphylococcal bacteremia was defined as occurring in a patient with at least 1 blood culture positive for CoNS and clinical signs and symptoms of sepsis based on a previous definition (8). Comorbidity was defined as a disease or therapy that could predispose patients to infection as the following: diabetes mellitus, heart failure, hepatic dysfunction, renal failure, treatment with immunosuppressors, neutropenia, cerebrovascular event, HIV infection, and severe chronic obstructive pulmonary disease. Prior antimicrobial therapy was defined as the use of any antibiotic for more than 3 days during the month prior to the occurrence of the bacteremic episode. The source of the MRCoNS bloodstream infection was determined from an assessment of other positive CoNS cultures at the time of CoNS bacteremia and the physician's clinical description in the medical record. Vancomycin use for more than 72 h and antibiotics administered in combination with vancomycin for more than 48 h (concomitant antibiotics) were also recorded. Nosocomial bacteremia was defined as positive blood culture collected after 48 h of hospital admission (7).

Treatment failure was defined as any of the following: (i) death within 30 days of index MRCoNS blood culture; (ii) microbiological failure, defined as a blood culture growing MRCoNS obtained 10 days after initiation of vancomycin therapy and before the completion of antimicrobial therapy; or (iii) recurrence of MRCoNS bacteremia within 60 days of the discontinuation of vancomycin therapy. If a patient met more than one criterion, the outcome would be classified only as a failure one time. If vancomycin was started prior to collection of the index MRCoNS blood



culture specimen, the index MRCoNS blood culture data was considered the first day of the bacteremia. Categorical variables were compared by the Fisher's exact test ( $P < 0.05$  was considered significant) and Pitt score was evaluated by the Mann-Whitney U test.

From a total of 130 individuals with MRCoNS, only 37 (28.5%) patients presented a positive MRCoNS bloodstream culture that met the eligibility criteria. The majority ( $n = 41$ , 31.5%) of the excluded patients had no clinical signs of bacteremia and 35 patients (26.9%) had no prescription to vancomycin, indicating that the CoNS obtained was due to blood culture contamination. Seventeen patients had no medical records available.

The vancomycin MICs of the 37 isolates (Figure 1) were categorized in high ( $1.5 \leq \text{MIC} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ ), and low ( $<1.5 \mu\text{g/mL}$ ) vancomycin MIC. The majority of patients ( $n = 24$ , 64.9%) exhibited a high vancomycin MIC, and 13 patients (35.1%) had a low vancomycin MIC. No vancomycin-intermediate CoNS isolates were found in the study.

A bivariate comparison of outcomes between the high and low vancomycin groups showed only two presumed clinical failures involving recurrence of bacteremia, one at the group of low vancomycin MIC and the other at the high vancomycin group (Table 1). These isolates were both *S. epidermidis*.

The bivariate comparison of clinical characteristics between high and low vancomycin MICs is represented in Table 2. There were no significant differences ( $P < 0.05$ ) in any clinical characteristics that could predict clinical failure.

Numerous studies have found that MRSA isolates with higher vancomycin MICs, even those in the “susceptible” range, are associated with a worse clinical outcome (9, 10, 11, 13, 18, 19). We did not observe this profile in MRCoNS in our study. This may reflect pathogenic differences between *S. aureus* and CoNS or the fact that the CoNS be contaminants. Limitations of the current study include its small sample size mainly due to the retrospective design. It is possible that additional factors may predict treatment failure. Additionally, it is necessary to develop a prospective study using a larger number of patients to better evaluate our findings.

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) grant from *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*. Vancomycin Etest strips were kindly provided by Pfizer.

## REFERENCES

1. **Beekmann, S. E., D. J. Diekema, and G. V. Doern.** 2005. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **26**:559-566.
2. **Biavasco, F., C. Vignaroli, and P. E. Varaldo.** 2000. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:403-417.
3. **Center, K. J., A. C. Reboli, R. Hubler, G. L. Rodgers, and S. S. Long.** 2003. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4660-4665.
4. **CLSI.** 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S16. CLSI, Wayne, PA.
5. **Diekema D. J., M. A. Pfaller, F. J. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. N. Jones, M. Beach, and the SENTRY Participants Group.** 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

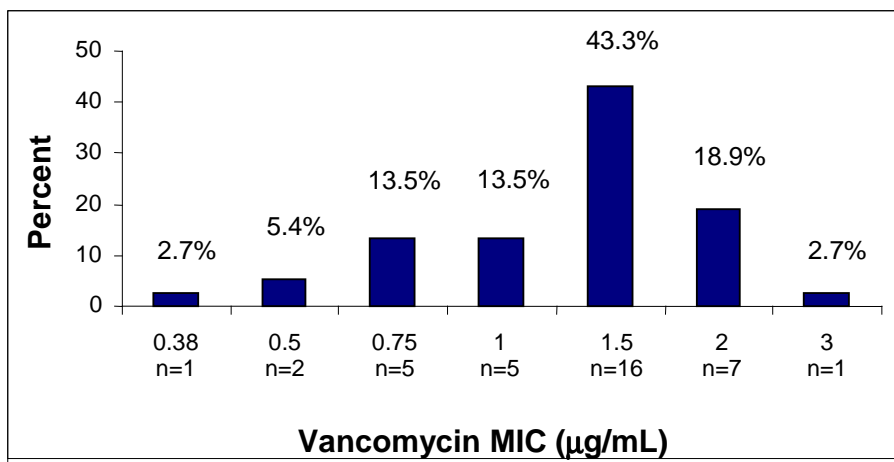
region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin. Infect. Dis. **32**:S114-S132.

6. **Favre, B., S. Hugonnet, L. Correa, H. Sax, P. Rohner, and D. Pittet.** 2005. Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. **26**:697-702.
7. **Garner, J.S., W. R. Jarvis, T. G. Emori, T. C. Horan, J. M. Hughes.** 1988. CDC definitions for nosocomial infections. Am. J. Infect. Control. **16**:128-40.
8. **Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J-L. Vincent, and G. Ramsay.** 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Intensive Care Med. **29**:530-538.
9. **Lodise, T. P., C. D. Miller, J. Graves, A. Evans, E. Graffunder, M. Helmecke, and K. Stellrecht.** 2008. Predictors of high vancomycin MIC values among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. J. Antimicrob. Chemother. **62**:1138-1141.
10. **Lodise, T. P., J. Graves, A. Evans, E. Graffunder, M. Helmecke, B. M. Lomaestro, and K. Stellrecht.** 2008. Relationship between vancomycin

- MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3315-3320.
11. **Maclayton, D. O., K. J. Suda, K. A. Coval, C. B. York, and K. W. Garey.** 2006. Case-control study of the relationship between MRSA bacteremia with a vancomycin MIC of 2 µg/mL and risk factors, costs, and outcomes in patients undergoing hemodialysis. *Clin Ther.* **28**:1208-1216.
  12. **Martineau, F., F. J. Picard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron.** 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2888-2893.
  13. **Moise, P. A., G. Sakoulas, A. Forrest, and J. J. Schentag.** 2007. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2582-2586.
  14. **Mombach Pinheiro Machado, A. B., K. C. Reiter, R. M. Paiva, and A. L. Barth.** 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. Med. Microbiol.* **56**:1328-1333.
15. **Neoh, H. M., S. Hori, M. Komatsu, T. Oguri, F. Takeuchi, L. Cui, and K. Hiramatsu.** 2007. Impact of reduced vancomycin susceptibility on the therapeutic outcome of MRSA bloodstream infections. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **6**:13.
  16. **Nunes, A. P. F., L. M. Teixeira, N. L. P. Iorio, C. C. R. Bastos, L. S. Fonseca, T. Souto-Padrón, and K. R. N. Santos.** 2006. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterization of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **27**:307-315.
  17. **Rhee, J-Y., K. T. Kwon, H. K. Ki, S. Y. Shin, D. S. Jung, D-R. Chung, B-C. Ha, K. R. Peck, and J-H. Song.** 2009. Scoring systems for prediction of mortality in patients with intensive care unit-acquired sepsis: a comparison of the pitt bacteremia score and the acute physiology and chronic health evaluation II scoring systems. *Shock.* **31**:146-150.
  18. **Sakoulas, G., P. A. Moise-Broder, J. Schentag, A. Forrest, R. C. Moellering, Jr., and G. M. Eliopoulos.** 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2398-2402.
19. **Soriano A., F. Marco, J. A. Martinez, E. Pisos, M. Almela, V. P. Dimova, D. Alamo, M. Ortega, J. Lopes, and J. Mensa.** 2008. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **46**:193-200.
  20. **Tacconelli, E., M. Tumbarello, K. G. Donati, M. Bettio, T. Spanu, F. Leone, L. A. Sechi, S. Zanetti, G. Fadda and R. Cauda.** 2001. Glycopeptide resistance among coagulase-negative staphylococci that cause bacteremia: epidemiological and clinical findings from a case-control study. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1628-1635.
  21. **von Eiff, C., G. Peters, and C. Heilmann.** 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis.* **2**:677-685.
  22. **Welsh, K. J., A. N. Abbott, E. M. Lewis, J. M. Gardiner, M. C. Kruzel, C. T. Lewis, J. F. Mohr, A. Wagner, and L. Y. Armitage.** 2010. Clinical characteristics, outcomes, and microbiologic features associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in pediatric patients treated with vancomycin. *J. Clin. Microbiol.* **48**:894-899.



**FIGURE 1.** Distribution of coagulase-negative staphylococci vancomycin MICs among 37 patients.



**TABLE 1.** Comparison of outcomes between high ( $\geq 1.5$   $\mu\text{g/mL}$ ) and low ( $< 1.5$   $\mu\text{g/mL}$ ) vancomycin MICs.

Outcome	High MIC (n=24)	Low MIC (n=13)	<i>P</i> value
30-day mortality	0	0	-
Microbiological failure	0	0	-
Recurrence within 60 days <sup>a</sup>	1 (4.2)	1 (7.7)	0.65

<sup>a</sup>All data presented are n o. (percent) of patients.

**TABLE 2.** Bivariate comparison of clinical characteristics by high ( $\geq 1.5\mu\text{g/mL}$ ) and low ( $< 1.5\mu\text{g/mL}$ ) vancomycin MIC values.

Demographic and clinical characteristics	High MIC (n=24)	Low MIC (n=13)	P value
Age (yr), min/max	0.01/76.0	0.01/66.8	-
Age (yr), MD ( $P_{25}/P_{75}$ ) <sup>c</sup>	0.2 (0.06/35.3)	0.1 (0.05/12.8)	-
Male gender <sup>b</sup>	16 (57.1)	9 (64.3)	>0.99
Comorbidity <sup>b</sup>			
Diabetes mellitus	0 (0)	1 (7.7)	0.35
Heart failure	4 (16.7)	2 (15.4)	>0.99
Hepatic dysfunction	1 (4.2)	0 (0)	>0.99
Renal failure	2 (8.3)	2 (15.4)	0.60
Immunosuppressants	1 (4.2)	0 (0)	>0.99
Neutropenia	2 (8.3)	1 (7.7)	>0.99
Cerebrovascular event	3 (12.5)	0 (0)	0.54
HIV infection	2 (8.3)	1 (7.7)	>0.99
COPD <sup>a</sup>	7 (29.2)	2 (15.4)	0.45
Surgery in previous 30 days <sup>b</sup>	2 (8.3)	0 (0)	0.53
Antibiotics in previous 30 days <sup>b</sup>	11 (45.8)	7 (53.8)	0.74
ICU <sup>a</sup> at onset <sup>b</sup>	17 (70.8)	9 (69.2)	>0.99
Pitt score, MD ( $P_{25}/P_{75}$ ) <sup>c</sup>	0 (0/2)	0 (0/2)	0.36
Source of bacteremia <sup>b</sup>			0.64
Intravenous catheter	4 (16.7)	1 (7.7)	
Skin and soft-tissue	0 (0)	0 (0)	
Respiratory tract	0 (0)	0 (0)	
Abdominal	0 (0)	0 (0)	
Urinary tract	0 (0)	0 (0)	
Unknown	20 (83.3)	12 (92.3)	
Vancomycin use after 72 h of therapy initiation <sup>b</sup>	24 (100)	12 (92.3)	0.35
Concomitant antibiotics administered >48 h <sup>b</sup>			
Gentamicin	2 (8.3)	2 (15.4)	0.60
Linezolid	0 (0)	0 (0)	>0.99
Macrolide	0 (0)	0 (0)	>0.99
Rifampin	1 (4.2)	0 (0)	>0.99
TMP/SMX <sup>a</sup>	1 (4.2)	0 (0)	>0.99

<sup>a</sup>COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ICU, intensive care unit; TMP/SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole.

<sup>b</sup>Values are numbers (%) of patients.

<sup>c</sup>MD, median;  $P_{25}/P_{75}$ , percentis.

## DISCUSSÃO

Diversos estudos já avaliaram o desempenho dos métodos comerciais e de referência para os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos em diferentes microrganismos. Essas avaliações têm como objetivo verificar a “performance” dessas técnicas, enfocando a reprodutibilidade dos resultados. As maiores divergências ocorrem entre os métodos quantitativos, principalmente, quando comparados com o método de referência. Desse modo, a determinação da CIM de um antimicrobiano, entre dois métodos quantitativos de baixa correlação entre si, pode originar valores diferentes de CIM. Diferenças nos valores de CIM podem alterar a interpretação das categorias de suscetibilidade bacteriana definidas pelo CLSI, como, por exemplo, do perfil suscetível para o perfil bacteriano intermediário frente a um antimicrobiano.

Os resultados apresentados neste estudo verificaram que a técnica comercial *Etest* obteve valores de CIM de vancomicina consistentemente mais elevados (1 a 2 diluições) do que a microdiluição em caldo, entre os SCoNRM. Estes resultados corroboram com os dados da literatura mais recente (PRAKASH *et al.*, 2008). Ademais, é importante ressaltar que a diferença de acurácia entre as metodologias encontradas neste estudo foi investigada em isolados de SCoN, microrganismos pouco estudados quando comparados com os *S. aureus*. Tal diferença foi similar aos resultados obtidos nos estudos com *S. aureus*, caracterizando que as técnicas de *Etest* e microdiluição em caldo não devem ser substituídas uma pela outra.

Embora existam estudos reportando discrepâncias entre as técnicas quantitativas, além da própria recomendação do CLSI em utilizar o ensaio de microdiluição em caldo na determinação da CIM da vancomicina para os estafilococos, muitos laboratórios de microbiologia ainda utilizam o *Etest* como método quantitativo. Tal prática acontece, em vista de que o *Etest* é uma técnica simples de realizar, enquanto a microdiluição em caldo é muito laboriosa. No entanto, o uso do método de *Etest* em laboratórios cujos isolados de estafilococos apresentam valores de CIM

próximos ao final do ponto de corte de suscetibilidade deve ser evitado, a fim de que estafilococos vancomicina-suscetíveis não sejam interpretados como vancomicina-intermediários, impactando na clínica de um paciente.

De acordo com os dados apresentados neste estudo, todos os isolados de SCoN apresentaram suscetibilidade à vancomicina, tanto no método da microdiluição em caldo, quanto na técnica de *Etest*. Nenhum isolado foi caracterizado como vancomicina-intermediário, considerando o ponto de corte de suscetibilidade para os SCoN ( $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ ) (CLSI, 2009). Somente um isolado de SCoN apresentou CIM *Etest* de  $4 \mu\text{g/mL}$  após arredondamento, no entanto o CIM na microdiluição em caldo foi de  $2 \mu\text{g/mL}$ . Assim, em vista de que a maioria dos valores de CIM de vancomicina para os SCoN isolados no HCPA estão distantes do ponto final de corte de suscetibilidade, o método do *Etest* ainda pode ser utilizado pelo laboratório, desde que com cautela, observando o perfil de suscetibilidade dos SCoN na instituição.

Além disso, apesar do crescente número de estudos demonstrando a existência de falha terapêutica da vancomicina em pacientes com bacteremia por MRSA, não foi encontrado neste estudo nenhuma relação de falha terapêutica da vancomicina, considerando bacteremia por SCoNRM. Entretanto, novas pesquisas devem ser necessárias para corroborar este resultado, visto que este estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente, trata-se de um estudo retrospectivo a partir de um banco de isolados bacterianos. Ademais, o baixo número de pacientes com bacteremia pode ser relacionado com a alta probabilidade de um isolado de SCoN ser contaminante da hemocultura. Além de a amostra ser considerada pequena, a idade dos pacientes incluídos foi bastante variada, dificultando uma adequada correlação entre as variáveis categóricas. Finalmente, considerando que os valores de CIM da vancomicina dos SCoNRM foram baixos, principalmente através da técnica de microdiluição em caldo, a probabilidade de falha terapêutica esperada com este antimicrobiano, neste estudo, tornou-se reduzida.

## CONCLUSÃO

Este trabalho obteve as seguintes conclusões:

- A técnica comercial de *Etest* fornece valores de CIM de vancomicina maiores do que o método de referência microdiluição em caldo;
- Os valores da CIM de vancomicina para os SCoNRM foram baixos e distantes do final do ponto de corte de suscetibilidade, conforme os critérios do CLSI;
- De acordo com os valores de CIM obtidos, os SCoN isolados no HCPA apresentaram alta suscetibilidade à vancomicina;
- A distribuição dos valores de CIM entre as espécies identificadas de SCoNRM não revelou nenhuma peculiaridade desses isolados, contudo são dados epidemiológicos necessários para compor o perfil de suscetibilidade dos SCoN na instituição hospitalar;
- Não houve significância estatística na correlação entre falha terapêutica e valores de CIM  $\geq 1,5 \mu\text{g/mL}$  de vancomicina nos pacientes com bacteremia por SCoNRM tratados com este antimicrobiano.

## REFERÊNCIAS

ACCP/SCCM - American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine*, v. 20, p. 864-874, 1992.

APPELBAUM, P. C. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12 (Suppl. 1), p. 16-23, 2006.

ARCHER, G. L.; NIEMEYER, D. M. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. **Trends of Microbiology**, v. 2, p. 325-34, 1994.

BASTOS, M. C. F. Mecanismos de Ação dos Quimoterápicos. In: **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. Cap. 9, p. 503-540.

BEEKMANN, S. E.; DIEKEMA, D. J.; CHAPIN, K. C. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.7, p. 3119-25, 2003.

BIEDENBACH, D. J.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 59-69, 2004.

BRODIE, S. B. et al. Occurrence of nosocomial bloodstream infections in six neonatal intensive care units. **Pediatric Infection Disease Journal**, v. 19, p. 56-62, 2000.

CHAUDHURY, A.; KUMAR, A. G. In vitro activity of antimicrobial agents against oxacillin resistant staphylococci with special reference to *Staphylococcus haemolyticus*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p. 50-52, 2007.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters: approved guideline M23-T3**, Wayne, Pennsylvania, 2001.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard M2-A9**, 9. ed., Wayne, Pennsylvania, 2006a.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods of dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: approved standard M7-A7**, 7. ed., Wayne, Pennsylvania, 2006b.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – Informational supplement. Approved document M2-A8 and M7-A6**. 16. ed., Wayne, Pennsylvania, 2006c.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – Informational supplement. Approved document M2-A8 and M7-A6**. 19. ed., Wayne, Pennsylvania, 2009.

CORSE, J.; WILLIAMS, R. E. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci and micrococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 21, p. 722-728, 1968.

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

CUEVAS, O. et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4240-4245, 2004.

DAVEY, M. E; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DEL BENE, V. E. et al. Antistaphylococcal activity of teicoplanin, vancomycin, and other antimicrobial agents: the significance of methicillin resistance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, p. 349-352, 1986 *apud* BIAVASCO, F., VIGNAROLI, C.; VARALDO, P. E. 2000. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, p. 403-417, 2000.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUNNE, W. M. et al. *Staphylococcus epidermidis* with intermediate resistance to vancomycin: elusive phenotype or laboratory artifact? **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 135-137, 2001.

FLEMMING, H-C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945-7947, 2007.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Diagnostic Microbiology**. 11. ed., St Louis: Mosby, 2002.

FRANK, K. L.; PATEL, R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 355-359, 2007.

GATERMANN, S. G.; KOSCHINSKI, T.; FRIEDRICH, S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 777-781, 2007.

GILL, V. J.; SELEPAK, S. T.; WILLIAMS, E. C. Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 18, p. 1314-1319, 1983.

HANSSEN, A. M.; KJELDSEN, G.; SOLLID, J. U. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 285-296.

HARRISON, L. S. Staphylococci. In: **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 3. ed., St Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap. 14, p. 367-381.

HIDAYAT, L. K. et al. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, p. 2138-2144, 2006.



HINDLER, J. F.; JORGENSEN, J. H. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 3. ed., St Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap. 13, p. 319-354.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 135-136, 1997.

HIRAMATSU K. et al. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**, v. 22, Suppl 1, p. S5-S8, 2004.

ISENBERG, H. D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. Washington, DC: American Society for Microbiology, v. 1, 1992.

JONES, R. N. Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. Results from the 1997-1999 SENTRY Antimicrobials Program. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 81-156, 2001.

KATHIB, R.; REIDERER, K. M.; KLARK, J. A.; KATHIB, S.; BRISKI, L. E.; WILSON, F. M. Coagulase-negative staphylococci in multiple blood cultures: strain relatedness and determinants of same-strain bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 816-820, 1995.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 29, p. 530-538, 2003.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.

LODISE, T. P. et al. Predictors of high vancomycin MIC values among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p.1138-1141, 2008a.

LODISE, T. P. et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia treated with vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p.3315-3320, 2008b.

MACLAYTON, D. O. et al. Case-control study of the relationship between MRSA bacteremia with a vancomycin MIC of 2 µg/mL and risk factors, costs, and outcomes in patients undergoing hemodialysis. **Clinical Therapeutics**, v. 28, p. 1208-1216, 2006.

MAHON, C. R.; LEHMAN, D. C.; MANUSELIS, G. Staphylococci. In: **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 3. ed., St. Louis, Missouri: Saunders Press, 2007. Cap. 14, p. 367-381.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Staphylococcus* e Microrganismos Relacionados. In: **Microbiologia Médica**, 5. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v. 1, 2006. Cap. 22, p. 215-230.

NEELY, A. N.; MALEY, M. P. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 724 –726, 2000.

O'GARA, J. P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 582-587, 2002.

O'GRADY, N. P. et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1281-1307, 2002.

OPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 2. ed. São Paulo: SARVIER, 2004.

POUTANEN, S. M.; BARON, E. J. *Staphylococcus lugdunensis*: a notably distinct coagulase-negative staphylococcus. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 23, p. 147-150, 2001.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana – Interpretando o Antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

SADER, H. S. et al. SENTRY Antimicrobial Surveillance program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

SANTOS, K.R.N. et al. Surgical site infection: rates, etiology and resistance patterns to antimicrobials among strains isolated at Rio de Janeiro University Hospital. **Infection**, v. 25, p. 217-220, 1997.

SCHEFFERS, D-J.; PINHO, M. G. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 585-607

SIERADZKI, K.; VILLARI, P.; TOMASZ, A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 100-107, 1998.

SKOV, R. et al. Evaluation of cefoxitin 5 and 10µg discs for the detection of methicillin resistance in Staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 157-161, 2005.

SMITH, I. M. et al. Observations on *Staphylococcus albuns* septicemia in mice and men. **Archives of Internal Medicine**, v. 102, p. 375-388, 1958 *apud* KLOSS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 117-140, 1994.

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

SOHN, A. H. et al. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: results from the first national point-prevalence survey. **Journal of Pediatrics**, v. 136, p. 821-827, 2001.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. Cap. 18, p. 627-643.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. Cap. 20, p. 532-556.

TREVINO, S.; ROSS, D. Bacteremia and Sepsis. In: **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 3. ed., St Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap. 36, p. 995-1009.

TURNIDGE, J. D.; FERRARO, M. J.; JORGENSEN, J. H. Susceptibility Test Methods: General Considerations. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed., Washington, DC: ASM Press, 2007. Cap. 72, p. 1146-1151.

VUONG, C. et al. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of Infection Disease**, v. 188, p. 706-718, 2003.

WONG, S. S. et al. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 760-767, 1999.

YAO, J. D. C.; MOELLERING, R. C. Jr. Antimicrobial Agents. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed., Washington, D.C.: ASM Press, 2007. Cap. 70, p. 1077-1113.

## ANEXO

**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 09-274

**Versão do Projeto:** 20/07/2009

**Pesquisadores:**

AFONSO LUIS BARTH  
RODRIGO MINUTO PAIVA

**Título:** INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE VANCOMICINA NO SUCESSO TERAPÊUTICO DE PACIENTES COM BACTEREMIA POR STAPHYLOCOCCUS SP. COAGULASE NEGATIVA RESISTENTES A METICILINA

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 10 de agosto de 2009.

  
Profª Nadine Clausen  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA