

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Bacteremias por *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes em um hospital terciário: Análise clínica, microbiológica e molecular.

ANGÉLICA BAUER CECHINEL

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Bacteremias por *Staphylococcus aureus* metilina resistentes em um hospital terciário: Análise clínica, microbiológica e molecular.

ANGÉLICA BAUER CECHINEL

Orientador Prof. Dr. Luciano Zubaran Goldani

Co-orientadora: Dra. Denise Pires Machado

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2014

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Bauer Cechinel, Angélica
Bacteremias por *Staphylococcus aureus* meticilina
resistentes em um hospital terciário: Análise
clínica, microbiológica e molecular. / Angélica Bauer
Cechinel. -- 2014.
59 f.

Orientador: Luciano Zubaran Goldani.
Coorientador: Denise Pires Machado.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. MRSA. 3. Bacteremia.
4. Vancomicina. 5. Locus agr. I. Zubaran Goldani,
Luciano, orient. II. Pires Machado, Denise,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Goldani, pela oportunidade, confiança, orientação e por ter me proporcionado meu crescimento pessoal e profissional através desse trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Denise Pires Machado, pela amizade, conhecimento e incentivo imprescindíveis.

À Dariane Pereira pela sua imensa ajuda e colaboração com o projeto.

À minha amiga Mariana Reis Rauber pela amizade incondicional e apoio em todas as horas.

As minhas amigas e colegas de laboratório, Ana Lúcia Souza Antunes, Laura Alencastro e Dariana Hübner pela amizade e apoio.

Aos meus pais, Antonio Duarte Cechinel e Eva Maria Duarte Cechinel e minha irmã, Raquel Bauer Cechinel, que sempre estiveram presentes me apoiando e incentivando.

Ao meu namorado Danilo Alba, por sempre estar ao meu lado, pela compreensão e companherismo.

Ao Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização desse projeto.

RESUMO

Introdução: *Staphylococcus aureus* é um patógeno que causa uma variedade de infecções nosocomiais e comunitárias. Bacteremia por *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) está associada com uma elevada morbidade e mortalidade. Alguns autores consideram uma maior taxa de mortalidade em bacteremia por MRSA em comparação aos observados em bacteremia causada por *Staphylococcus aureus* sensível a metilina. O uso da vancomicina no tratamento de infecções por MRSA tem estado sobre crescente vigilância nos últimos anos, já que existe uma grande preocupação sobre a redução de sua eficácia no tratamento de pacientes com bacteremia por MRSA. Estudos sugerem que a vancomicina tem atividade reduzida contra infecções por MRSA quando os valores da concentração inibitória mínima (CIM) se aproximam do valor máximo considerável como susceptível. O locus (*accessory gene regulator*) regula a expressão de vários genes de virulência, de aderência e produção de biofilme, e pode estar envolvido com a diminuição da sensibilidade a vancomicina. O *staphylococcal cassette chromosome* (SCC*mec*) carrega o gene *mecA* que caracteriza o fenótipo clássico de MRSA e confere resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

Objetivos: Avaliar as CIMs dos antibióticos: vancomicina, por microdiluição em caldo, e daptomicina, linezolida, tigeciclina e quinopristina/dalfopristina e teicoplanina pela metodologia de Etest®; caracterizar o polimorfismo do locus *agr* e os tipos de SCC*mec* de isolados de MRSA de pacientes internados em um hospital, terciário e acadêmico, no sul do Brasil.

Métodos: Estudo retrospectivo de coorte no qual foram avaliados todos os episódios de bacteremia causada por MRSA nos Centros de Terapia Intensiva (CTIs) durante o período de junho de 2009 a dezembro de 2011. A detecção dos grupos *agr* (*agr* tipo I, II, III e IV) e SCC*mec* (SCC*mec* I, II, III, IV e V) foi realizada a partir da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Resultados: Foram incluídos no total 21 pacientes. Os isolados de MRSA testados se apresentaram sensíveis a todos os antibióticos testados. O locus *agr* foi determinado em todos os isolados, sendo que onze pertencem ao grupo *agr* I (52,4%) e dez ao grupo *agr* II (27,6%). Já a caracterização dos tipos de SCCmec, não foi possível para onze isolados; para o restante, foi encontrado dois isolados SCCmec tipo I, cinco SCCmec tipo III e três SCCmec tipo IV.

Conclusão: Apesar do pequeno número de pacientes e da necessidade de maiores estudos em nosso meio, nossos resultados sugerem que a vancomicina continua a ser a primeira opção de escolha para o tratamento de infecções por MRSA, como recomendado pela *Infectious Diseases Society of America*. No entanto, a publicação de uma série de estudos sugerindo a susceptibilidade reduzida à vancomicina, mesmo com CIMs próximas ou no limite de corte, a terapia com vancomicina não seria recomendada a estes pacientes, sendo necessário a avaliação de um novo esquema terapêutico.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, MRSA, bacteremia, vancomicina.

ABSTRACT

Background: *Staphylococcus aureus* is a versatile pathogen that cause a variety of nosocomial and community infections. Bacteremia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with high morbidity and mortality. Some authors consider a higher rate of mortality in MRSA bacteremia compared to those observed in bacteremia caused by methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. The use of vancomycin to treat infection due to MRSA has been under increased vigilance in recent years, since there is great concern about reducing their effectiveness in treating patients with MRSA bacteremia. Studies suggest that reduced activity against vancomycin has MRSA when the values of the minimum inhibitory concentration (MIC) approach the upper end of the range of susceptibility. The *agr* locus (accessory regulator gene) and regulates the expression of several virulence genes, adherence and biofilm production and can be involved in reduced sensitivity to vancomycin. The *staphylococcal cassette chromosome* (SCC*mec*) carries the *mecA* gene that characterizes the classic phenotype of MRSA and confers resistance to β -lactam antibiotics.

Objectives: Evaluate MICs of antibiotics: vancomycin, by broth microdilution, and daptomycin, linezolid, tigecycline and quinopristina / dalfopristin and teicoplanin by Etest® methodology; characterize the polymorphism of the *agr* locus and SCC*mec* types of MRSA isolates from patients in a hospital, tertiary and academic, in southern Brazil.

Methods: A retrospective cohort study which evaluated all episodes of bacteremia caused by MRSA in intensive care units (ICUs) during the period June 2009 to December 2011. The detection of *agr* groups (*agr* type I, II, III and IV) and SCC*mec* (SCC*mec* I, II, III, IV and V) were performed using the technique of polymerase chain reaction (PCR).

Results: We included a total twenty one patients. The MRSA isolates tested were susceptible to all antibiotics tested. The *agr* locus was determined in all

isolates, eleven belong to *agr* group I (52.4%) and ten to *agr* group II (27.6%). Already characterization of *SCCmec* types, it was not possible to eleven isolates; for the remaining two isolates found was *SCCmec* type I, five *SCCmec* type III and three *SCCmec* type IV.

Conclusions: Despite the small number of patients and the need for further studies in this area, our results suggest that vancomycin remains the first choice option for the treatment of MRSA infections, as recommended by the *Infectious Diseases Society of America*. However, the publication of a series of studies suggesting reduced susceptibility to vancomycin, even with MICs near or on cut off, with vancomycin therapy would not be recommended for these patients, the evaluation of a new regimen is necessary.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, bacteremia, vancomycin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colônias de *Staphylococcus aureus* em meio cultura.

Figura 2. Estrutura molecular dos tipos de SCCmec

LISTA DE ABREVIATURAS

agr – *accessory gene regulator*

AUC – área sob a curva

AUC/CIM – área sob a curva/concentração inibitória mínima

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

DNase - desoxirribonuclease

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

hVISA – *Staphylococcus aureus* vancomicina intermediário heterorresistente (*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus heterogeneous*)

ICS – infecção de corrente sanguínea

IDSA – *Infectious Diseases Society of America*

IWG-SCC – *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome*

MRSA – *Staphylococcus aureus* metilina resistente (*methicilin resistant Staphylococcus aureus*)

NNIS – *National Nosocomial Infections Surveillance*

PBP – proteína ligadora de penicilina (*penicillin binding protein*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SCC*mec* – *Staphylococcal cassette chromosome mec*

VISA - *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina (*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*)

VRE – *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (*vancomycin resistant Enterococcus* spp.)

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (*vancomycin resistant Staphylococcus aureus*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Características microbiológicas da espécie <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.2 Epidemiologia dos <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente	14
2.3 Bacteremias por MRSA	15
2.4 Resistência	17
2.4.1 Resistência a oxacilina.....	17
2.4.1.1 Características do elemento móvel SCCmec.....	16
2.4.1.2 Distribuição dos SCCmec.....	17
2.4.2 Resistência à vancomicina	19
2.5 Detecção de resistências em <i>Staphylococcus aureus</i> no laboratório de microbiologia.....	20
2.5.1 Resistência à oxacilina.....	21
2.5.2 Resistência à vancomicina.....	21
2.6 Tratamento de infecções por MRSA.....	22
2.7 Relação entre a CIM da vancomicina e o tratamento das infecções por MRSA	23
2.8 Locus <i>agr</i>	25
2.8.1 Locus <i>agr</i> e surgimento da resistência a vancomicina	26
2.8.2 O papel do locus <i>agr</i> sobre a adesão	26
2.9 Tipagem molecular do elemento SCCmec e locus <i>agr</i>	27
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo geral.....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5. REFERÊNCIAS.....	30
6. ARTIGO.....	42

1. INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo Gram-positivo, oportunista, que pode causar uma variedade de infecções nosocomiais e comunitárias, como bacteremias, endocardites, pneumonias, infecções de pele e tecidos moles (1). É bastante prevalente na população, cerca de 30%, como colonizante de narinas, nasofaringe, pele e mucosas (2).

O surgimento dos *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) foi um grande marco na terapia antimicrobiana; são resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, pois expressam uma proteína alterada (PBP2a) com baixa afinidade a esses antibióticos. O gene *mecA* é o responsável pela codificação dessa proteína, e juntamente com seus reguladores, encontra-se em um elemento genético móvel, o *staphylococcal cassette chromosome* (SCC*mec*). Já foram descritos onze tipos de SCC*mec*, que se diferenciam entre si no número de genes e estrutura gênica, e estão ligados a resistência a diversas classes de antibióticos (3).

Diversos fatores de virulência estão envolvidos na patogenicidade do *Staphylococcus aureus*. Entre estes, o locus *agr* (*accessory gene regulator*) é um locus com atividade de *quorum-sensing*. São conhecidos quatro distintos grupos *agr*: I, II, III e IV; regulam a produção de diversos fatores de virulência entre eles proteínas de superfície, toxinas, e também participam da formação de biofilmes, e estão ligados a resistência aos antibióticos β -lactâmicos (4).

Para o tratamento de infecções estafilocócicas, a vancomicina, por muito tempo, foi a única alternativa disponível no mercado. Consequentemente, houve um uso excessivo deste antimicrobiano, o que levou esses microrganismos a desenvolverem resistência. Estudos recentes têm demonstrado um aumento da mortalidade e falha terapêutica em pacientes tratados com vancomicina com uma concentração inibitória mínima (CIM) dentro da faixa de susceptibilidade (CIM $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$) preconizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (5,6).

Em vista disso, nosso trabalho se propôs a determinar a associação entre o tipo do locus agr e a mortalidade em pacientes com bacteremia por MRSA e as CIMs de antibióticos utilizados para tratamento dessas infecções.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características microbiológicas da espécie *Staphylococcus aureus*

A espécie *Staphylococcus aureus* é classificada como cocos Gram-positivos, que pode se apresentar isolado ou aos pares, em cadeias curtas ou agrupados e forma colônias colônias acinzentadas a amarelo-dourado (figura 1); produtor das enzimas coagulase e catalase que servem como mecanismo de defesa para a bactéria contra células fagocitárias. A catalase é utilizada para diferenciar os estafilocócos (catalase positiva) dos estreptococos e enterococos (catalase negativa); são aeróbias ou anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos e conseguem sobreviver nos mais variados ambientes (1,2,7). Produzem diversos fatores de virulência como a proteína A estafilocócica, desoxorribonucleases (DNAses), adesinas, hemolisinas e toxinas que causam a síndrome do choque tóxico e as enterotoxinas estafilocócicas (8).

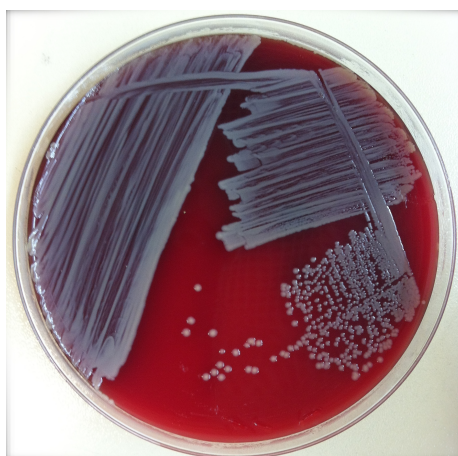


Figura 1. Colônias de *Staphylococcus aureus* em meio cultura.

A parede celular presente na célula bacteriana serve como uma barreira osmótica, permitindo que os microrganismos retenham nutrientes, proteínas

essenciais e ácidos nucléicos em seu interior e mantenham certas moléculas em seu exterior (9). Assim como todas as bactérias Gram-positivas, os estafilococos possuem uma parede celular cujo principal componente é um polímero constituído de longas cadeias de glicídios com ligações flexíveis de peptídeos, chamado peptídeoglicano, que forma uma estrutura forte e também elástica, sendo responsável por dar a forma e rigidez à célula bacteriana e compreende 60% da parede celular, sendo o restante constituído de ácidos teóicos (10). A síntese do peptídeoglicano inicia-se no citoplasma, com a formação de UDP-N-acetilmuramilpentapeptídeo. Este composto é o ácido N-acetilmurâmico ligado a um pentapeptídeo, composto pelos aminoácidos L-alanina, ácido D-glutâmico, L-lisina, D-alanina e D-alanina. As próximas etapas da síntese do peptídeoglicano ocorrem na superfície interna da membrana celular. O N-acetilmuramilpentapeptídeo liga-se à N-acetilglicosamina. A L-lisina do pentapeptídeo recebe uma cadeia de aminoácidos formada pela adição de 5 glicinas, chamada pentaglicina. Este dissacarídeo, com um pentapeptídeo e uma pentaglicina, é translocado para a porção externa da membrana citoplasmática, onde, então, é polimerizado. Esta é chamada reação de transglicosilação. Logo após, ocorrem as reações de traspeptidação, catalizadas pelas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). Nesta reação há a formação de ligações cruzadas pela transpeptidação dos terminais peptídicos, ligando as cadeias de peptídeoglicano dentro de uma camada, bem como entre outras camadas (11,12).

2.2 Epidemiologia dos *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente

O *Staphylococcus aureus* além de ser encontrado com frequência na população, cerca de 30%, colonizando, por exemplo, narinas, nasofaringe, pele e mucosas, pode causar uma variedade de infecções (2). É um agente infeccioso de grande importância clínica, causando infecções nosocomiais e comunitárias, como bacteremias, pneumonias, sítios cirúrgicos, cardiovasculares, infecção de pele e tecidos moles e relacionadas ao uso de próteses e catéteres cirúrgicos (13). Na América Latina, *S. aureus* foi o agente mais frequentemente isolado de pele e tecidos moles (14).

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) têm sido documentadas de modo crescente e têm como fatores de risco: idade superior a 60 anos, uso de corticosteróides, uso prévio de antimicrobianos, tempo de internação e presença de cateteres invasivos (13,15,16). Dados do *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) sugerem que nas unidades de terapia intensiva a proporção de MRSA aumentou de 59,3% para 64,4% (17,18).

Segundo os dados do *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* que monitora patógenos e padrões de resistência em diversos centros de terapia, estudou as infecções por MRSA em vários hospitais do mundo e constatou uma prevalência de 32% nos Estados Unidos, 26% na Europa, 35% na América Latina e 67% no Japão (19). Em outro estudo, os dados do SENTRY incluindo a América Latina, demonstraram que MRSA é o patógeno mais comum de bacteremia nosocomial, com prevalência de 21,6% entre isolados de infecção da corrente sanguínea (20). E no Brasil, entre 1997 e 2001, a prevalência de MRSA foi de 43,8% (21).

Com o passar dos anos a epidemiologia dos MRSA foi se modificando. As infecções por MRSA tem sido frequentemente diagnosticadas em pacientes que não apresentaram qualquer tipo de contato com o ambiente hospitalar. O MRSA adquirido na comunidade (CA-MRSA) tem se mostrado um patógeno bastante significativo e umas das principais causas de infecção adquirida na comunidade. Entretanto, é importante ressaltar, que as cepas de CA-MRSA, inicialmente associadas à comunidade, começaram a entrar nos hospitais, causando infecções nosocomiais (22). Em estudo de Reyes e colaboradores foi constatado que 74% dos isolados de MRSA no Equador eram causados por clones com características genotípicas de CA-MRSA, enquanto no Peru não foram observadas cepas CA-MRSA entre isolados de MRSA (23).

2.3 Bacteremias por MRSA

O MRSA está entre as causas mais comuns de infecções relacionadas a assistência a saúde em todo o mundo, sendo o agente de uma variedade de infecções como por exemplo bacteremias (24). Um recente estudo europeu classificou o MRSA como o segundo agente etiológico mais freqüente de

infecções da corrente sanguínea (ICS) e destacou que cepas com resistência à meticilina representaram aproximadamente 20% de todos os isolados (25). No Brasil, estudo que avaliou a incidência de bacteremias, dentre os 295 episódios de bacteremia identificados, em 118 (40%) foi identificado o *S. aureus*, com 55,9% de MRSA (26). Além disso, o MRSA está frequentemente associado a infecções secundárias graves tais como endocardite infecciosa, osteomielite e artrite séptica (27), e estas complicações estão combinadas com o aumento da morbidade e mortalidade, internação prolongada, necessidade de cuidados intensivos e de intervenção cirúrgica e aumento dos custos para o paciente e sistema de saúde (24,28-30). Sabe-se a vancomicina tem sido considerada a escolha padrão, porém há preocupações de que sua eficácia pode estar diminuindo e que outros agentes antimicrobianos podem ser utilizados com maior segurança (31,32).

Na maioria dos países o MRSA continua a ser uma causa predominante de bacteremia e existe pouca evidência de um declínio nas cepas resistentes. Enquanto a resistência à meticilina continua a ser o principal fenótipo de preocupação, vem surgindo vários níveis de susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos, ameaçando o uso de vancomicina e teicoplanina (33).

A taxa de mortalidade das infecções de corrente sanguínea causadas por MRSA após 30 dias tem sido relatada como igual ou superior a 20% (34). Vários fatores influenciam a mortalidade como fatores do hospedeiro: idade, sexo, etnia; as interações patógeno-hospedeiro: bacteremia persistente, bacteriúria, severidade da infecção; e fatores específicos do patógeno: resistência à meticilina e vancomicina, concentração inibitória mínima (CIM) para a vancomicina, clonalidade, exotoxinas, entre outros (35).

Recentemente estudos tem demonstrado um aumento da CIM para a vancomicina, designado como vancomicina “mic creep” (36). Embora este fenômeno possa ser influenciado pelo tipo de ensaio utilizado para obter a susceptibilidade microbiológica, a cepa *S. aureus* analisada ou o tipo de população de pacientes avaliados, também podem influenciar no fenômeno (24).

2.4 Resistência

2.4.1 Resistência a oxacilina

Nos MRSA, a resistência é resultado de genes cromossômicos que codificam modificações no receptor de ação dos β -lactâmicos, as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), havendo a produção de novas PBPs (PBP2a) com pequena afinidade pelos β -lactâmicos. Esta PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, que faz parte de um elemento genético móvel encontrado em todos os isolados com este tipo de resistência, denominado *staphylococcal cassette chromosome* (SCC*mec*) (3).

2.4.1.1 Características do elemento móvel SCC*mec*

Os elementos SCC*mec* possuem uma organização estrutural altamente diversificada, sendo uma característica fundamental que define os MRSA. Na evolução das cepas MRSA foi integrado ao seu genoma um elemento genético móvel de 21 a 67 kb que carrega o gene *mecA* que confere resistência à metilina e genes relacionados a virulência denominado *staphylococcal cassette chromosome* (SCC*mec*) (37).

A classificação dos elementos SCC*mec* seguem um sistema hierárquico de tipos e subtipos. Até 2009, foram descritos oito tipos de SCC*mec* pelo *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome* (IWG-SCC) (38) (Figura 2). Atualmente são onze tipos de cassetes já descritos. Os elementos mais recentemente descritos, SCC*mec* IX, X e XI compartilham características que fornecem ideias sobre a possível origem de SCC*mec* (39,40). Os SCC*mec* tipo I, IV, V, VI e VII possuem resistência apenas aos antibióticos β -lactâmicos por terem a presença do gene *mecA*. Os SCC*mec* tipo II e III contêm genes adicionais que determinam resistência a outros grupos de antibióticos além dos β -lactâmicos, tal como macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas, aminoglicosídeos e tetraciclina. Assim, adquire um fenótipo de multirresistência aos antibióticos (3).

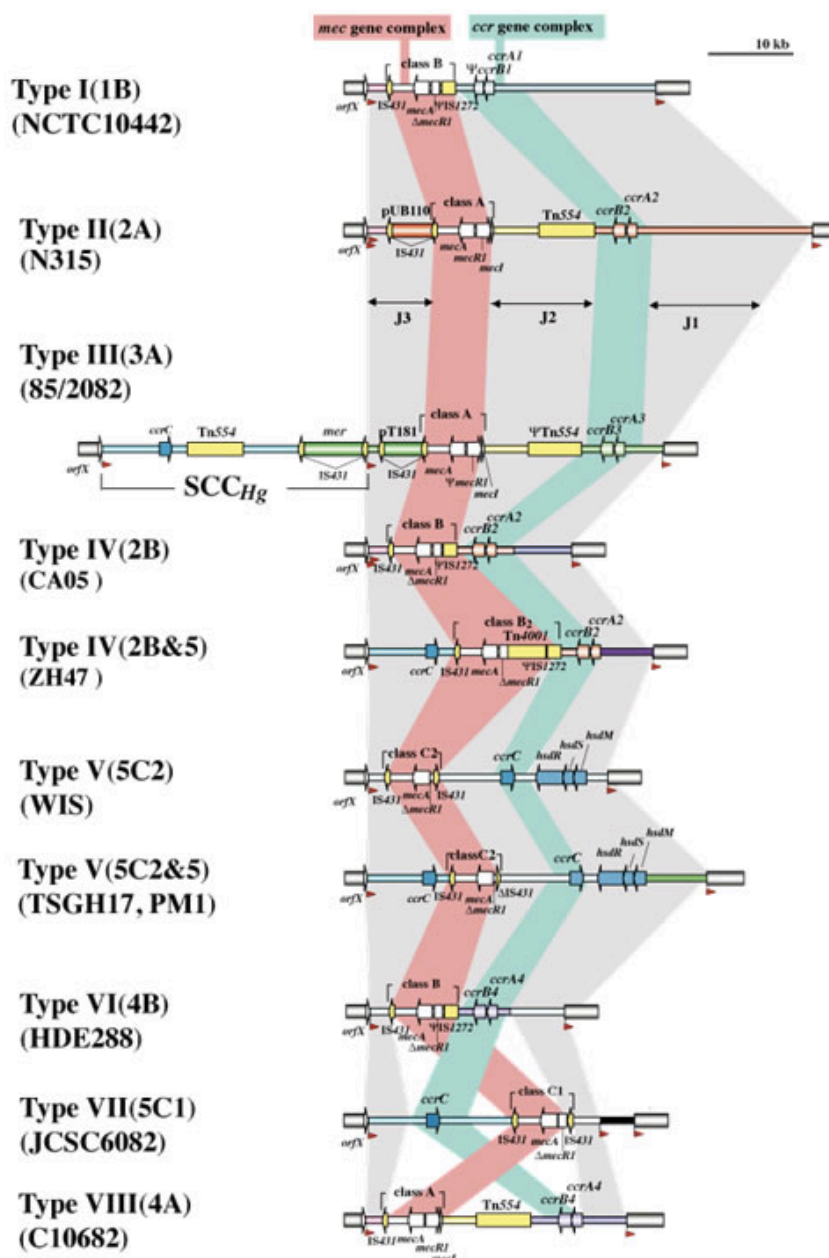


Figura 2. Estrutura molecular dos tipos de SCC_{mec}

2.4.1.2 Distribuição dos SCC_{mec}

O conhecimento da epidemiologia dos SCC_{mec} é de grande importância para o controle e prevenção da resistência bacteriana. Em estudo feito por Chen e colaboradores, pesquisou a diversidade genética e a epidemiologia dos MRSA em infecções de corrente sanguínea em Xangai, revelou que entre os 108 casos estudados, 62 (57,4%) eram *mecA*-positivos, e a tipagem dos SCC_{mec} revelou quatro tipos de SCC_{mec} incluindo SCC_{mec} II

(18, 29,0%), SCCmec III (39, 62,9%), SCCmec IV (2, 3,2%) e SCCmec V (3, 4,8%) (41).

Velasco e colaboradores estudaram os aspectos clínicos e epidemiológicos de 98 casos de bacteremia nosomial em Andaluzia na Espanha. Destes, 96 apresentaram SCCmec do tipo IV (42).

No Brasil, em estudo feito por Martins e colaboradores, teve como objetivo realizar a tipagem de SCCmec e caracterizar o perfil clonal destes isolados de culturas de sangue entre 2002 e 2006 em Hospital universitário brasileiro. Entre os 46 isolados de *S. aureus* foram mecA-positivos, e 41 isolados (89,1%) foram SCCmec do tipo III e 5 (10,9%) foram SCCmec do tipo IV (43). Epidemiologicamente, o SCCmec III é o tipo predominante nos hospitais brasileiros, sendo uma cepa resistente a diversos antibióticos (44).

2.4.2 Resistência à vancomicina

Assim como os β -lactâmicos, os glicopeptídeos agem inibindo a síntese da parede celular da célula bacteriana, todavia por outro mecanismo de ação que não o bloqueio de uma determinada enzima envolvida no metabolismo da parede celular e sim o bloqueio de um substrato (D-alanil -D-alanina) (12). A vancomicina liga-se à porção D-alanina-D-alanina do precursor peptídeoglicano através de pontes de hidrogênio, formando um complexo volumoso, que impede a ação das enzimas transpeptidase e transglicosilase em seu substrato. O resultado é que a síntese de peptídeoglicano fica comprometida, o que leva ao enfraquecimento da parede celular, tornando a bactéria susceptível à lise (12,13,45). Devido a seu alto peso molecular, a vancomicina atua apenas do lado externo da célula bacteriana, não conseguindo penetrar até o citoplasma (45). O mecanismo de resistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus* que leva a um fenótipo VISA (CIM entre 3,0 e 15,0 μ g/mL de vancomicina) e hVISA não é totalmente conhecido. Diversos estudos sugerem que seja devido ao sequestro da vancomicina, causado pelo espessamento da parede celular e, conseqüente, aumento do número de sítios de ligação D-alanil-D-alanina, o que impede que o antimicrobiano atinja seu sítio de ação (5,46-48).

Em 1996 foi identificado no Japão o primeiro isolado de *Staphylococcus aureus* intermediário a vancomicina (VISA; CIM 8,0µg/mL) chamado de Mu50, isolado se secreção de ferida cirúrgica de paciente pediátrico apresentando falha terapêutica no tratamento com vancomicina (36,49-51). No ano seguinte, também no Japão, foi relatado o primeiro isolado com heterorresistência à vancomicina (CIM 4,0µg/mL e subpopulações com CIM ≥8,0µg/mL) do escarro de um paciente com pneumonia e ficou conhecido como Mu3 (52). Em 2001, foi relatado por Oliveira e colaboradores, o isolamento de cepas VISA, sendo o primeiro da América Latina (53). No Hospital de Clínicas de Porto Alegre foi reportado um caso heterorresistência à vancomicina em paciente pediátrico com pneumonia por MRSA (47).

Em junho de 2002 foi identificado em Michigan, Estados Unidos, o primeiro isolado de *Staphylococcus aureus* com altos níveis de resistência a vancomicina (VRSA; CIM≥32µg/mL) foi isolado de um paciente que fazia uso prolongado de vancomicina. Este microrganismo continha o gene *vanA*, sugerindo que houve transferência de material genético de um *Enterococcus* que possuía este gene de resistência (54,55). Em 2013, foi relatado o primeiro caso de VRSA na Europa em paciente de 74 anos, isolado de ferida operatória. Foi detectado também a presença de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (VRE) no mesmo material clínico (56). No Brasil, o primeiro caso de VRSA foi isolado de amostra de sangue em paciente do sexo masculino, 35 anos com síndrome de Sézary, diabético e com infecções previamente tratadas com vancomicina e teicoplanina. Estudos moleculares revelou a presença do gene *van A* detectado em *E. faecalis*, isolado no paciente em culturas de vigilância (57).

2.5 Detecção de resistências em *Staphylococcus aureus* no laboratório de microbiologia

As recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para a detecção de resistência a oxacilina e a vancomicina são as seguintes:

2.5.1 Resistência à oxacilina

- Disco-difusão: um inóculo padronizado da bactéria (escala 0,5 *McFarland*) é colocado sobre a superfície do ágar *Mueller Hinton*. Logo após o inóculo, o disco do antimicrobiano é colocado sobre o ágar. O CLSI recomenda o uso de um disco de cefoxitina 30µg para predizer a resistência ou sensibilidade à oxacilina. Segundo alguns estudos, a cefoxitina detecta de forma mais segura todas as classes de MRSA, mesmo das cepas que apresentam resistência à oxacilina em baixos níveis e que não são detectadas utilizando o disco de oxacilina 1µg. Após incubação por 24 horas, à temperatura de 35°C, o diâmetro da zona de inibição é medido e comparado com a tabela do CLSI, segundo o documento M2-A8 que padroniza a técnica de disco difusão. Um halo de inibição da cefoxitina 30µg ≥ 22mm é considerado sensível à oxacilina, ≤ 21mm é considerado resistente. Algumas cepas de MRSA podem não ser detectadas se incubadas em temperaturas superiores a 35°C ou se incubadas por menos de 24 horas (58).

- Teste com ágar *screening* para oxacilina: para realizar esta triagem usa-se uma placa de ágar *Mueller Hinton* com NaCl a 4% mais 6µg/mL de oxacilina. Prepara-se um inóculo pelo método direto, ajustado na escala de 0.5 *McFarland*. Com o auxílio de um swab passa-se o inóculo sobre a placa. Deixa-se secar e incuba-se a placa na estufa a 35°C. A presença de crescimento nesse meio indica a presença de gene *mecA* (58).

- Detecção do gene *mecA* por PCR: para a detecção do gene *mecA* é utilizada a técnica da PCR, utilizando os primers específicos. Em particular, a técnica de PCR, neste caso, parece ser um ensaio rápido, sensível e específico em comparação com outras técnicas molecular (59).

2.5.2 Resistência à vancomicina

De acordo com o CLSI 2009, não é mais recomendado o uso de disco de vancomicina para testar a sensibilidade de isolados de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativo frente a este antimicrobiano. O disco de vancomicina não diferencia isolados sensíveis de isolados intermediários ou resistentes. Resta como opção a determinação da CIM por

microdiluição ou Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia) e o uso de meio BHI contendo vancomicina.

- Determinação da CIM da vancomicina por microdiluição: o método da diluição é usado para determinar quantitativamente a menor concentração do antimicrobiano necessário para inibir o crescimento *in vitro* de um microrganismo. Para a realização do teste, uma série de tubos ou placas é preparada com caldo ou ágar contendo várias concentrações do antimicrobiano, normalmente em diluições seqüenciais múltiplas de dois e o valor é expresso em µg/mL. Após a diluição do antimicrobiano no caldo ou ágar, uma suspensão bacteriana padronizada é inoculada e os tubos ou placas são incubados a 35°C. A leitura é feita pela observação de turbidez ou não do meio e pela presença ou ausência de crescimento de colônias na superfície do ágar. Este método não é muito usado em laboratórios de rotina devido a sua complexidade, sendo mais utilizado em pesquisa (60).

- Determinação da CIM da vancomicina pela fita de Etest®: esse é um método quantitativo, muito usado em laboratórios de rotina, para avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos. Consiste de uma fita de plástico inerte, transparente, medindo 5,5mm de largura por 60mm de comprimento. De um lado da fita está impressa uma escala da CIM em µg/mL, e do outro lado existe um gradiente exponencial do antimicrobiano seco e estabilizado. A concentração varia de 0,002 a 32µg/mL de vancomicina (61). Uma CIM $\leq 2\mu\text{g/mL}$ é considerada sensível, de 4-8µg/mL intermediária e $\geq 16\mu\text{g/mL}$ resistente (58).

2.6 Tratamento de infecções por MRSA

Para o tratamento de uma infecção por MRSA, o antimicrobiano de escolha vai depender do perfil de susceptibilidade de cada isolado, porém, um glicopeptídeo costuma a opção terapêutica para cepas multirresistentes. No Brasil, há dois glicopeptídeos existentes no mercado para uso: a vancomicina e a teicoplanina (51). Por décadas, a vancomicina tem sido a escolha predominante para o tratamento de MRSA, no entanto, há preocupações sobre

sua eficácia pelo surgimento de cepas menos susceptíveis e piores desfechos clínicos (5,62).

A recomendação da *Infections Diseases Society of America* (IDSA) para infecções por isolados de MRSA com CIM da vancomicina ($\leq 2,0\mu\text{g/mL}$), ou seja, sensíveis, devem ser tratados com vancomicina. Caso o paciente não tiver resposta ao tratamento, deve-se considerar a possibilidade de troca de antimicrobiano (63).

Para avaliar a atividade da vancomicina, é utilizado a razão da área sob a curva (AUC) pelo CIM (AUC/CIM) como melhor parâmetro farmacodinâmico. Em razão da dificuldade, muitas vezes, de se obter as dosagens séricas do paciente para determinar a AUC, a dosagem da vancomicina sérica no vale, após a quarta dose, é a melhor maneira de realizar o monitoramento terapêutico (51).

No ano de 2009 foi publicado um consenso que recomenda que as concentrações de vancomicina sérica, no vale, se mantenham entre 15,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ para infecções graves por MRSA que tenham a CIM $\leq 1,0\mu\text{g/mL}$. Desta forma, é possível obter a razão AUC/CIM ≥ 400 que prediz sucesso terapêutico e erradicação do microrganismo (51,63).

Nos últimos anos novos antimicrobianos foram aprovados para uso humano e em desenvolvimento que possuem atividade contra patógenos Gram-positivos multirresistentes incluindo o MRSA. Entre eles o lipopeptídeo daptomicina está indicada para o tratamento de bacteremias e a linezolida para tratamento de pneumonias e bacteremias nosocomiais. Quinopristina/dalfopristina e tigeciclina são outras opções terapêuticas com ação contra MRSA (63). Outros antimicrobianos como cefalosporinas ceftaroline e ceftopibrole, a oxazolidinona tedizolide, e os lipoglicopeptídeos telavancina, dalbavancina e oritavancina ainda não estão aprovados para uso no Brasil (62).

2.7 Relação entre a CIM da vancomicina e o tratamento das infecções por MRSA

Qualquer paciente com suspeita de bacteremia estafilocócica deve ser tratado, empiricamente, com vancomicina, até a infecção por MRSA ser

excluída, porque o atraso com a terapia pode aumentar a mortalidade. A revisão feita por McConeghy e colaboradores, avaliou associar à terapia empírica de vancomicina um agente β -lacâmico para o tratamento de bacteremia por MRSA. Demonstraram que terapias mais recentes, como daptomicina, linezolida e ceftaroline ainda não demonstraram superioridade à vancomicina para o tratamento empírico de bacteremia por MRSA e que combinar vancomicina com uma penicilina ou cefalosporinas de primeira geração poderia diminuir a morbidade e mortalidade (64).

Estudos recentes (35,65,66) descreveram menor eficácia no tratamento com vancomicina para bacteremia por MRSA quando a CIM é maior que $1,0\mu\text{g/mL}$. Murray e colaboradores compararam a eficácia clínica da daptomicina em relação a vancomicina em pacientes com bacteremia por MRSA com CIM $>1,0\mu\text{g/mL}$ da vancomicina. O tratamento com daptomicina resultou em melhores resultados de forma significativa, incluindo a diminuição da mortalidade em 30 dias e bacteremia persistente. Estes resultados suportam a prática da interrupção precoce de vancomicina e a troca para a daptomicina para o tratamento de bacteremia por MRSA quando a CIM da vancomicina é $>1,0\mu\text{g/mL}$ (67).

Lodise e colaboradores, relatou em estudo com pacientes que recebem vancomicina no tratamento de bacteremia por MRSA, que os pacientes com CIMs da vancomicina $\geq 1,5\mu\text{g/mL}$ estavam associados com maior risco de mortalidade (68). Soriano e colaboradores obtiveram resultados semelhantes com pacientes com bacteremia por MRSA com CIMs da vancomicina $\geq 1,0\mu\text{g/mL}$ estavam associados com maior risco de mortalidade (69).

Alguns estudos de meta-análises prévios abordaram a potencial associação entre valores de CIM para vancomicina com desfechos clínicos e sugeriu que a vancomicina com CIM elevada pode ser associado com piores resultados. No entanto, todos os três estudos incluíram pacientes altamente heterogêneos e avaliação de outras infecções, e não somente bacteremia (49,50,70). Já a meta-análise de Kalil e colaboradores avaliou de forma sistemática a evidência disponível sobre a associação da elevação da CIM para vancomicina com a mortalidade em pacientes com bacteremia. A principal conclusão desta meta-análise de 8291 episódios de bacteremia foi que não houve diferenças estatisticamente significativas no risco de morte quando

comparados os pacientes com isolados de *S. aureus* com CIM elevado para a vancomicina ($\geq 1,5$ mg/mL) para aqueles com CIM baixo para a vancomicina ($< 1,5$ mg/mL), embora os resultados não podem definitivamente excluir um aumento do risco de mortalidade (24).

2.8 Locus *agr*

O locus *agr* (*accessory gene regulator*), observado inicialmente nos *Staphylococcus aureus*, tem atividade de *quorum-sensing*, que é o mecanismo pelo qual a bactéria consegue perceber a densidade celular do meio em que se encontra, e é responsável pela produção de fatores de aderência, virulência e biofilme. Este locus é composto por 5 genes (*hld*, *agrB*, *agrD*, *agrC*, *agrA*). Polimorfismos nos genes *agrD* e *agrC* faz com que ocorram quatro tipos de locus *agr* em *Staphylococcus aureus* (I, II, III e IV). O gene *hld* para a toxina δ -hemolisina também produz a molécula reguladora do locus denominado RNAIII (71).

A disfunção do locus *agr* é medida pela ausência total da produção de δ -hemolisina. Schweizer e colaboradores relataram que de 814 pacientes 33 com bacteremia por *Staphylococcus aureus*, 181 (22%) tinham o locus *agr* disfuncional e estava associado com maior mortalidade (72). Cepas de *S. aureus* que apresentam uma disfunção no locus *agr* podem possuir a vantagem de uma sobrevivência intrínseca sob pressão seletiva de vancomicina (73,74).

Há estudos que mostram a relação entre o locus *agr* e mortalidade em pacientes com MRSA. No estudo feito por Albur e colaboradores, que abordou os fatores que influenciam na evolução clínica de pacientes com MRSA, entre os quatro grupos de *agr* avaliados, o grupo I apresentava maior mortalidade em menos de 30 dias em comparação com os outros grupos de *agr* (75). No estudo de Moise-Broder e colaboradores, foram avaliados 87 pacientes que receberam vancomicina para o tratamento de infecções por cepas de MRSA. Quarenta e cinco tiveram falha no tratamento com este antimicrobiano. Destes 45, 31 (68,9%) tinham a presença do *agr* II, mas a sua presença não estava associada com mortalidade em 30 dias (76).

2.8.1 Locus *agr* e surgimento da resistência a vancomicina

Alguns estudos mostraram que o surgimento de cepas VISA e hVISA estava relacionada com a presença de material plástico invasivo, como catéteres venosos, de diálise e outros dispositivos, mas também associada a uma longa terapia com vancomicina. A formação de biofilme e a adesão ao material plástico teriam um efeito protetor para a bactéria na presença de vancomicina, uma vez que a concentração do antibiótico que atinge as células aderidas é menor que a concentração que atinge as células soltas (46,77,78). Também foi relatado, que cepas de MRSA com *agr* disfuncional tendem a secretar um menor número de fatores de virulência, sendo menos agressivas que as com *agr* funcional, que leva a um maior tempo de exposição à vancomicina, podendo resultar no surgimento de tolerância e talvez resistência. Sakoulas e colaboradores demonstraram que a emergência de cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina está ligada ao locus *agr* (4).

2.8.2 O papel do locus *agr* sobre a adesão

A adesão a superfícies e a formação de biofilme são mecanismos de defesa da bactéria contra o hospedeiro. Na presença da vancomicina, esses mecanismos teriam um papel protetor à bactéria pois dificulta a penetração do antibiótico.

Sakoulas e colaboradores definiram que o RNAlII inibiria a transcrição de genes que expressam proteínas envolvidas na adesão da bactéria. O efeito que o locus *agr* tem na regulação da adesão bacteriana ainda está sendo estudado, porém já se sabe que cepas que apresentam alguma mutação que leva a uma disfunção do locus *agr* apresentam uma maior facilidade de adesão ao poliestireno e a produção de biofilme pela bactéria. Neste estudo, cerca de 78% das cepas apresentavam *agr* disfuncional com capacidade de produção de biofilme ao passo que apenas 6% possuíam o *agr* funcional (4). Em estudo de Hanaki e colaboradores observou-se que a emergência de cepas VISA, hVISA está ligada não somente a uma terapia prolongada com vancomicina mas também com a presença de dispositivos invasivos como cateteres, válvulas, *stents* (46).

2.9 Tipagem molecular do elemento SCCmec e locus agr

A tipagem molecular do MRSA, dentro do contexto epidemiológico, é de extrema importância para avaliar a relação entre os isolados e com isso, implementar medidas adequadas de controle de infecção (79). Vários critérios têm se mostrado útil na avaliação das técnicas de tipagem molecular como reprodutibilidade, poder de discriminatório, facilidade de realização e de interpretação e custo-eficiência (80,81).

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) é amplamente utilizada em estudos epidemiológicos de infecções causadas por várias espécies bacterianas que possuem importância clínica. Este método é uma excelente fonte de identificação da emergência e do subsequente espalhamento de novos clones. Cabe ressaltar que essa técnica possui uma grande reprodutibilidade interlaboratorial que pode ser utilizada para identificação do mesmo clone em diferentes lugares (82).

A tipagem molecular mais utilizada, tanto do elemento SCCmec quanto do grupo agr, é a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). O método mais empregado é o multiplex PCR, desenvolvido por Oliveira e colaboradores para a determinação dos tipos de SCCmec. A determinação dos grupos agr pode ser feita pela técnica de RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*, porém é uma técnica relativamente trabalhosa e pouco específica, devido a presença de pequenos polimorfismos presente dentro de um determinado grupo agr (83). Gilot e colaboradores desenvolveram a técnica de multiplex PCR na qual envolve um primer comum a todos os tipos e mais quatro primers específicos para cada tipo de agr (84).

3. JUSTIFICATIVA

Staphylococcus aureus metilina resistentes (MRSA) se tornou um grande problema nos hospitais do mundo inteiro. O aumento na frequência de MRSA como agente causador de infecções nosocomiais e o aumento da CIM da vancomicina, demanda uma rápida e efetiva caracterização dos mecanismos de resistência envolvidos, fornecendo informações suficientes que permitam a implementação de medidas apropriadas para o controle dessas infecções. Estudos têm demonstrado que cepas de MRSA estão associadas com maior mortalidade em pacientes com infecção por este microrganismo, principalmente em bacteremias. Cepas de MRSA também podem causar infecções graves associadas com falha terapêutica quando se faz o uso de vancomicina. Estes dados sugerem que a vancomicina tem uma atividade reduzida no tratamento de cepas de MRSA com CIMs elevados, estando associado com falha terapêutica. Outra possibilidade para explicar a diminuição da sensibilidade à vancomicina seria a presença do tipo de lócus *agr* encontrados nos isolados de MRSA. O *SCCmec*, é outro marcador molecular, encontrado em MRSA, que contém determinantes de resistência que contribuem para caracterizar diferentes tipos de *SCCmec*.

Portanto, com base nessas informações, se faz necessário um estudo, para avaliar a relação entre os tipos de *agr* e de *SCCmec* com o desfecho clínico dos pacientes, levando em consideração o padrão de susceptibilidade de isolados de MRSA encontrados em nossa instituição.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar os isolados clínicos de MRSA, de pacientes com bacteremia por MRSA internados nos CTIs no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), quanto ao polimorfismo do locus *agr* e tipos de *SCCmec* e a relação destes parâmetros com as apresentações e desfechos clínicos e a susceptibilidade aos antimicrobianos não testados na rotina na Unidade de Microbiologia do HCPA.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar as CIMs pela metodologia de Etest® para os antibióticos: daptomicina, linezolida, tigeciclina, quinopristina/dalfopristina e teicoplanina, e a vancomicina por microdiluição em caldo;
- Identificar e caracterizar o locus *agr* e os tipos *SCCmec* encontrados em isolados de MRSA provenientes de amostras de sangue de pacientes hospitalizados;
- Determinar a associação entre o polimorfismo do locus *agr* e a mortalidade em pacientes com bacteremia por MRSA;

5. REFERÊNCIAS

1. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003; 111:1265-1273.
2. Bannerman TM. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinicas Microbiology. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007.v.1:390-411.
3. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Update 2003; 6:41-52.
4. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, et al. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1492-1502.
5. Sakoulas G, Moellering RC. Increasing antibiotic resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. Clin Infect Dis 2008; 46(5):360-367.
6. Lodise TP, Miller CD, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, Stellrecht K. Predictors of high vancomycin MIC values among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2008 Nov;62(5):1138-41. doi: 10.1093/jac/dkn329.
7. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Staphylococcus* e Cocos Gram Positivos Relacionados. In: Microbiologia Médica. 6ªed. Rio de Janeiro: Mosby; 2009. p.209-223.
8. Trabulsi, LR. et al.; Microbiologia. 4 ed., Atheneu, 2004.

9. Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflamatio. Lancet 2002; 2:171-179. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2008 Nov;62(5):1138-41. doi: 10.1093/jac/dkn329.
10. Scheffers DJ and Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. Microbiol Mol BiolVer 2005; 69(4):585-607.
11. Tavares W. Mecanismo de Ação dos Antimicrobianos. In: Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos. 3°ed. São Paulo: Atheneu;2001. p. 33-50.
12. Geisel R, Schmitz FJ, Fluit AC, Labischinski H. Emergence, mechanism, and clinical implications of reduced glucopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*. EurClinMicrob Infect 2001;20:685-697.
13. Klein E, Smith DL, and Laxminarayan. Hospitalizations and Deaths Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. Emerg Infect Dis 2007; 13(12):1840-1846.
14. Sader HS, Jones RN, Silva JB; SENTRY Participants Group (Latin America). Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 Nov;44(3):281-8.
15. Rybak MJ & LaPlante KL. *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A Review*. Pharmacotherapy 2005; 25(1):74-85.
16. Bratu S, Eramo A, Kopec R, Coughlin E, Ghitan M, Yost R, Chapnick EK, Landman D, Quale J. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. Emerg Infec Dis 2005; 11(6):806-812.

17. Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 2004;32:470-485.
18. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis*. 2006;42:389-391.
19. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M; SENTRY Participants Group. 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*. 2001 May 15;32
20. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50(1):59-69.
21. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis*. 2004 Feb;8(1):25-79.
22. Otter JA, French GL. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect*. 2011 Nov;79(3):189-93.
23. Reyes J, Rincon S, Diaz L *et al*. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(12):1861-7.

24. Kalil AC, Van Schooneveld TC, Fey PD, Rupp ME. Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2014 Oct 15;312(15):1552-64.
25. de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:860–8.
26. Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CM, Primo MG, de Abreu Batista LJ. Bacteremias at a teaching hospital: etiology, antimicrobial susceptibility pattern and risk factors for mortality. *Rev Assoc Med Bras*. 2007 Jan-Feb;53(1):34-8.
27. Painter KL, Krishna A, Wigneshweraraj S, Edwards AM., What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends Microbiol*. 2014 Oct 6. pii: S0966-842X(14)00181-4.
28. Hawkins C, Huang J, Jin N, Noskin GA, Zembower TR, Bolon M. Persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia. An analysis of risk factors and outcomes. *Arch Intern Med* 2007;167:1861-7.
29. Khatib R, Johnson LB, Sharma M, Fakhri MG, Ganga R, Riederer K. Persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia: Incidence and outcome trends over time. *Scand J Infect Dis* 2009;41:4-9.
30. Welsh KJ, Skrobarcek KA, Abbott AN, et al. Predictors of relapse of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia after treatment with vancomycin. *J Clin Microbiol* 2011;49:3669-72.
31. Deresinski S. Counterpoint: vancomycin and *Staphylococcus aureus*—an antibiotic enters obsolescence. *Clin Infect Dis*. 2007;44(12):1543-1548.

32. Holland TL, Arnold C, Fowler VG Jr. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *JAMA*. 2014 Oct 1;312(13):1330-41.
33. Gould IM. Treatment of bacteraemia: meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA). *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jun;42 Suppl:S17-21.
34. Kaasch AJ, Barlow G, Edgeworth JD, et al. *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a pooled analysis of five prospective, observational studies. *J Infect* 2014; 68: 242–51.
35. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 362–86.
36. Steinkraus G, White R, Friedrich L. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin susceptible clinical methicillin-resistant *S aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(4):788-794.
37. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 May;45(5):1323-36.
38. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):4961-7.
39. Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights. *Int J Med Microbiol*. 2013 Aug;303(6-7):350-9.

40. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother*. 2013 Jun;45(2):117-36.
41. Chen X, Wang WK, Han LZ, Liu Y, Zhang H, Tang J, Liu QZ, Huangfu YC, Ni YX. Epidemiological and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection in Shanghai, 2009-2011. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e72811.
42. Velasco C, López-Cortés LE, Caballero FJ, Lepe JA, de Cueto M, Molina J, Rodríguez F, Aller AI, García Tapia AM, Pachón J, Pascual A, Rodríguez-Baño J; SAEI/SAMPAC MRSA-BSI Group. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia in Southern Spain. *J Hosp Infect*. 2012 Aug;81(4):257-63.
43. Martins A, Riboli DF, Pereira VC, Cunha M de L. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. *Braz J Infect Dis*. 2014 May-Jun;18(3):331-5.
44. Perez LR, D'Azevedo PA. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in south Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008 May-Jun;50(3):135-7
45. Nagarajan R. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 33:1477-1481.
46. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, and Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42:199-209.

47. Lutz L, Machado A, Kuplich N, Barth AL. Clinical failure of vancomycin treatment Staphylococcus aureus infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2003;7(3):224-228.
48. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42(1):25–34.
49. Mavros MN, Tansarli GS, Vardakas KZ, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Impact of vancomycin minimum inhibitory concentration on clinical outcomes of patients with vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(6): 496-509.
50. Jacob JT, DiazGranados CA. High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Int J Infect Dis*. 2013;17(2):e93-e100.
51. Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafer JC, Moellering RC Jr, Craig WA, Billeter M, Dalovisio JR, Levine DP. Therapeutic monitoring of vancomycin in adults summary of consensus recommendations from the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2009 Nov;29(11):1275-9.
52. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*. 1997 Dec 6;350(9092):1670-3.
53. Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS, Cui L, Hiramatsu K, Mamizuka EM. Isolation in Brazil of nosocomial Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001 Jul;22(7):443-8.

54. Ruef C. Epidemiology and Clinical Impact of Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection* 2004; 32(6): 315-327.
55. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK; Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Méd.* 2003; 348: 1342-1347.
56. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet.* 2013 Jul 20;382(9888):205.
57. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TS, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med.* 2014 Apr 17;370(16):1524-31. doi: 10.1056/NEJMoa1303359.
58. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute 2011; Wayne, PA
59. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, *et al.* Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:2864-2867.
60. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR and Sinto SI. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.* 2°ed. São Paulo: SARVIER, 2004.
61. Walsh TR, and Howe RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56: 657-675.

62. Rodvold KA, McConeghy KW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Infect Dis*. 2014 Jan;58 Suppl 1:S20-7.
63. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, J Rybak M, Talan DA, Chambers HF. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin Infect Dis*. 2011 Feb 1;52(3):285-92.
64. McConeghy KW, Bleasdale SC, Rodvold KA. The empirical combination of vancomycin and a β -lactam for *Staphylococcal* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2013 Dec;57(12):1760-5.
65. Wi YM, Kim JM, Joo EJ, et al. High vancomycin minimum inhibitory concentration is a predictor of mortality in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40:108–13.
66. Kullar R, Davis SL, Levine DP, Rybak MJ. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. *Clin Infect Dis* 2011; 52:975–81.
67. Murray KP, Zhao JJ, Davis SL, Kullar R, Kaye KS, Lephart P, Rybak MJ. Early use of daptomycin versus vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia with vancomycin minimum inhibitory concentration >1 mg/L: a matched cohort study. *Clin Infect Dis*. 2013 Jun;56(11):1562-9.
68. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, Lomaestro BM, Stellrecht K. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3315-20.

69. Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, Alamo D, Ortega M, Lopez J, Mensa J. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 15;46(2):193-200.
70. van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):755-771.
71. Van Wamel WJ, Van Rossum G, Verhoef J, Vandembroucke-Grauls CM, Fluit AC. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (agr)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 163, p. 1-9, Jun. 1998.
72. Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G, Johnson JK, Harris AD, Shardell MD, McGregor JC, Thom KA, Perencevich EN. Increased mortality with accessory gene regulator (agr) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Mar;55(3):1082-7.
73. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG, Moellering RC, Novick RP, Lucindo N, Yeaman MR, Bayer AS. 2005. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (agr) function. *Antimicrob. Agents Chemother*. 49:2687–2692.
74. Sakoulas G, G M Eliopoulos, R C, Moellering, Jr, Novick, L. Venkataraman, C. Wennersten, P. C. DeGirolami, M. J. Schwaber, and H. S. Gold. 2003. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (agr) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptides resistance? *J. Infect. Dis*. 187:929–938.
75. Albur MS, Bowker K, Weir I, MacGowan A. Factors influencing the clinical outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Mar;31(3):295-301.

76. Moise-Broder PA, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Schentag JJ, Forrest A, Moellering Jr RC. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis* 2004;38:1700-1705.
77. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135–136.
78. Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 40, p. 135-136, 1997
79. Wichelhaus TA, Hunfeld KP, Böddinghaus B, Kraiczy P, Schäfer V, Brade V. Rapid molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001 May; 22(5):294-8.
80. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:426-439.
81. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 1997; 35:339-346.
82. Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H, Almeida JS. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 11, p. 5483-90, Nov. 2005.

83. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002, 46: 2155-61.70.

84. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol*. 2002 Nov;40(11):4060-7.

6. ARTIGO

Association between accessory gene regulator polymorphism and mortality among critically ill patients receiving vancomycin for nosocomial MRSA bacteremia: a cohort study

Angélica B. Cechinel, Denise P. Machado, Dariane C. Pereira, Regis G. Rosa,
Luciano Z. Goldani,
Infectious Diseases Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Address correspondence to:

Luciano Z. Goldani PhD. MD
Section of Infectious Diseases
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Ramiro Barcelos 2350
Porto Alegre, RS 90630000
Brazil
Email: lgoldani@ufrgs.br

Abstract

Background: The polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus* is known to play an important role in controlling the production of virulence factors. Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with group II *agr* are shown to be predictive of vancomycin failure therapy. However, the impact of group II *agr* expression on mortality of patients with severe MRSA infections is not well established.

Objective: The aim of this study was to evaluate the association between *agr* polymorphism and all-cause in-hospital mortality among critically ill patients receiving vancomycin for nosocomial MRSA bacteremia.

Methods: A retrospective cohort was performed at a 30-bed general intensive care unit (ICU) of a tertiary referral hospital in Southern Brazil. All cases of documented bacteremia by MRSA requiring treatment in the ICU between May 2009 and November 2011 were evaluated. Cox proportional hazards regression was performed to evaluate whether *agr* polymorphism (determined by PCR) were associated with all-cause in-hospital mortality. Covariates included age, APACHE-II score, initial C-reactive protein plasma levels, initial serum creatinine levels, vancomycin minimum inhibitory concentration, vancomycin serum levels and time to effective antibiotic administration.

Results: In total, 21 patients were evaluated during the study period. The prevalence of group I and group II *agr* expression were 52.4% and 47.6%, respectively. No case of bacteremia by MRSA group III or group IV *agr* was documented. The mean APACHE II of the study population was 24.3 (standard deviation 8.5). The overall cohort mortality was 66.6% (14 patients). After

multivariate analysis, initial plasma c-reactive protein levels ($P=0.01$), initial serum creatinine levels ($P=0.008$) and expression of group II *agr* ($P=0.006$) were positively associated with all-cause in-hospital mortality. Patients with bacteremia by MRSA with group II *agr* expression had their risk of death increased by 12.6 times when compared with those with bacteremia by MRSA with group I *agr* expression.

Conclusion: Expression of group II *agr* poses risk for mortality in critically ill patients with bacteremia by MRSA treated with vancomycin. Alternative antimicrobial agents including daptomycin and linezolid for treatment of MRSA bacteremia expressing group II *agr* should be considered in this setting.

Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is well recognized as a major cause of nosocomial infection worldwide. Its strong adaptive power to antibiotics has resulted in the emergence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) [1, 2]. Resistance to methicillin and other β -lactam antibiotics is caused by the *mecA* gene, which is situated on a mobile genetic element, the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) [3]. Although the origin of MRSA is not fully understood, it is suspected that methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) acquired the *mecA* gene through horizontal transfer from coagulase-negative staphylococci. Recent studies have shown that overall in-hospital mortality rates for patients with bloodstream infections due to MRSA are in the range of 30% but can be as high as 65% in some centers [4, 5]. A thorough knowledge of the epidemiology and the molecular epidemiology of MRSA strains are required to develop effective strategies to prevent the spread of MRSA.

The aim of the present study was to evaluate the association between *agr* polymorphism and all-cause in-hospital mortality among critically ill patients receiving vancomycin for nosocomial MRSA bacteremia.

Methods

A retrospective cohort was performed at a 30-bed general intensive care unit (ICU) of a tertiary referral hospital in Southern Brazil. The medical records of all cases of documented bacteremia by MRSA required vancomycin treatment in the ICU between May 2009 and November 2011 were evaluated. MRSA bacteremia was defined as the presence of at least one positive blood culture for MRSA in a blood sample from a patient with clinical findings consistent with infection [6]. Blood cultures were performed by inoculating 5-10mL of blood into a flask of the automatic commercial system Bactec/Alert[®](Vitek system). Positive cultures were further sub-cultured in Müller-Hinton Agar (Isofar Ltda, Brazil) supplemented with 5% of human blood and incubated for 24-48h at 35 ± 2°C in the hospital microbiology laboratory. Initial susceptibility testing for oxacillin resistance was performed according to CLSI guidelines, using a 30 µg cefoxitin disc in Mueller-Hinton agar [7]. Individual isolates were stored in trypticase soy broth with 20% glycerol at -80°C until MIC testing was performed. The MICs of vancomycin were determined in duplicate by reference broth microdilution method, as recommended by CLSI, using in house prepared panels. The following dilutions of vancomycin were tested: 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, and 0.125 mcg/mL. MICs for daptomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin, and tigecycline were determined by the Etest (bioMérieux), according to the manufacturer's guidelines (AB Biodisk). Daptomycin, quinupristin-dalfopristin, and linezolid resistance was defined as an isolate with an MIC greater than 1 mcg/mL, 1 mcg/mL, and 4 mcg/mL, respectively. Tigecycline is not standardized by CLSI [7, 8]. A suspension of each isolate in

Mueller-Hinton broth, adjusted to the density of a 0.5 McFarland standard, was swabbed in three directions to ensure uniform growth onto Mueller-Hinton agar plates. The MIC was read where inhibition of growth intersected the E-test strip. When small colonies grew within the zone of inhibition or a haze of growth occurred around MIC endpoints, the highest MIC intersection was recorded. MRSA isolates were characterized by of molecular typing techniques. The typing of staphylococcal cassette chromosome mec types (SCC*mec*) was performed using the multiplex PCR method described by Boye et al., four sets of primers were used for amplification of the target DNA [9]. PCR was also used to characterize *accessory gene regulator (agr)* based on the method described by Gilot et al., which were developed a method for typing of agr group by a PCR reaction involving a primer common to all groups, and four primers, specific for each group agr (agr I-IV) [10].

Statistical analysis

The results were described as frequency (%) in the case of discrete variables. Clinical and microbiological characteristics and therapeutic interventions were included in the univariate and multivariate analyses. Cox proportional hazards regression was performed to evaluate whether *agr* polymorphism (determined by PCR) were associated with all-cause 30-day hospital mortality. Covariates included age, APACHE-II score (acute physiological assessment and chronic health evaluation), initial C-reactive protein plasma levels, initial serum creatinine levels, vancomycin minimum inhibitory concentration, and time to effective antibiotic administration. All variables with a *P* value <0.10 in the univariate analysis were included in the stepwise multiple logistic regression to

identify potential factors associated with mortality. In the multivariate model, independent variables were eliminated from the highest to the lowest *P* value but remained in the model if the *P* value was < 0.05.

The study was approved by the Ethics and Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Because no direct patient contact was planned, the requirement for informed consent was waived.

Results

In total, 21 patients were evaluated during the study period. The baseline characteristics are shown in Table 1. The prevalence of group I and group II *agr* expression were 52.4% and 47.6%, respectively. No case of bacteremia by MRSA group III or group IV *agr* was documented. The mean APACHE II of the study population was 24.3 (standard deviation 8.5). The overall cohort mortality was 66.6% (14 patients). Distribution of specific antibiotic minimum inhibitory concentrations (MICs) to vancomycin, linezolid, daptomycin, quinupristin-dalfopristin, and tigecycline for MRSA blood isolates is presented in Table 2. Except for three isolates, the MIC for tigecycline was high and was not interpreted, MRSA isolates were overall susceptible for all the antimicrobials. The majority of the MRSA isolates presented vancomycin MICs between 1.0 to 1.5 mcg/ml. Univariate analysis of possible relevant factors in patients associated with mortality in patients with MRSA bacteremia are shown in Table 3. After multivariate analysis, initial plasma c-reactive protein levels ($P=0.10$), initial serum creatinine levels ($P=0.008$) and expression of group II *agr* ($P=0.006$) were positively associated with all-cause in-hospital mortality (table

4). Patients with bacteremia by MRSA with group II *agr* expression had their risk of death increased by 12.6 times when compared with those with bacteremia by MRSA with group I *agr* expression. In-hospital mortality of critically ill patients with MRSA bacteremia treated with vancomycin according *accessory gene regulator (agr)* polymorphism are shown in Figure 2.

Discussion

MRSA comprised nearly 60% of *S. aureus* organisms isolated in US intensive care units (ICUs) in 2003 [11]. In Latin America, rates of MRSA surpassed 50% in over half of the countries, and a similar situation was observed in many institutions from the Asia-Pacific region [12]. In Brazil, the Antimicrobial Surveillance Program (SENTRY) described a prevalence of MRSA bacteraemia of 30.9% in hospitalized patients between 1997 and 2000, but in large Brazilian teaching hospitals, up to 73% of clinically significant *S. aureus* bacteremia were caused by methicillin resistant strains [13, 14].

The majority of patients were infected with MRSA isolates had MICs ≤ 1.5 $\mu\text{g/mL}$ against vancomycin. Therefore, we could not find any association between 30-day mortality and MRSA vancomycin MICs. Even considering the important comorbidities and high APACHE II scores typically present in ICU patients, the overall mortality of our patients with MRSA bacteremia treated with vancomycin was considered high. Recently, infections due to isolates with high but susceptible vancomycin minimum inhibitory concentrations have been associated with additional treatment failures and patient mortality [15]. These poorer outcomes may in part be explained by severity of comorbidities and

inability of attaining appropriate vancomycin levels in these patients. However, assumptions that these poor outcomes are solely due to failure to achieve optimal serum levels of vancomycin are premature. The availability of effective alternatives further erodes the position of vancomycin as first-line therapy. The emergence of resistance and cost considerations, however, favor a more measured approach when using alternative antimicrobials. However, our MRSA isolates did not present high MICs (> 2 mcg/ml) and the serum levels of vancomycin attained by our patients were within the optimal range (data not shown). In addition, all MRSA strains isolated from the blood of our patients were susceptible to the available alternative antimicrobials. Although uncommon, it is important to mention that MRSA resistance to new antibiotics such as linezolid and daptomycin has been described in clinical settings [16, 17].

In our study, *agr* II MRSA was associated with increased mortality in patients with bacteremia. The *accessory gene regulator (agr)* is a quorum-sensing regulator in *S aureus* that is responsible for biofilm production and the expression of adherence and virulence factors. Previous studies have found that MRSA isolates with an *agr* II polymorphism may influence the clinical efficacy of vancomycin [18, 19]. *SCCmec* type II has been shown to be a marker for disease severity and mortality [20]. Most of our MRSA isolates were nontypeable (53%). Eleven isolates (38%) carried an *SCCmec* element type III and IV. Because of the small sample sizes, we could not evaluate in our multivariable logistic regression model the association of *SCCmec* type with-hospital mortality.

Several points must be considered when analyzing our data. We were not able to control for other mortality risk factors in our sample. In addition, the observations in this study are subject to limitations due to the fact that the data was obtained from a retrospective analysis.

In conclusion, expression of group II *agr* poses risk for mortality in critically ill patients with bacteremia by MRSA treated with vancomycin. Alternative antimicrobial agents including daptomycin and linezolid for treatment of MRSA bacteremia expressing group II *agr* should be considered in this setting.

Acknowledgments

This study was supported in part by CNPq (Brazilian Council of Research) and FIPE (grant support of Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

References

1. Stryjewski ME, Corey GR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. Clin Infect Dis. 2014;58 Suppl 1:S10-9.
2. Gould IM. MRSA bacteraemia. Int. J. Antimicrob. Agents 2007; 30 (Suppl 1): S66–S70
3. Ganga R, et al. Role of SCCmec type in outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single medical center. J. Clin. Microbiol. 2009; 47: 590–595 \
4. de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:1598-605.
5. Gomez J, et al. Predictors of mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia: the role of empiric antibiotic therapy. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2007; 26: 239–245.
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003;31:1250-6.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 8th ed. CLSI document M7-A8. *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2008; Wayne, PA.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17th informational supplement. M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.
9. Boye K1, Bartels MD, Andersen IS, Møller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. Clin Microbiol Infect. 2007;13:725-7.
10. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. J Clin Microbiol. 2002;40:4060-7.
11. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004; 32:470–85.
12. Guzman-Blanco M, Mejia C, Isturiz R, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. Int J Antimicrob Agents 2009; 34:304–8.
13. Sader H, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY participants. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin America and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis 2004;8:25-79.
14. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari C. Antimicrobial susceptibility of Gram-Positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). The Braz J Infect Dis 2009;13:90-98.

15. Ribas RM, Freitas C, Gontijo-Filho PP. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary care hospital: Risk factors, overall mortality and antimicrobial resistance. *Int J Med Medical Sci* 2009;1:412-417.
16. Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:4-11.
17. Patel JB, Jevitt LA, Hageman J, McDonald LC, Tenover FC An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2006;42:1652-3.
18. Moise-Broader PA, Sakoulas G, Eliopoulos, et al. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1700-5.
19. de Sanctis JT, Swami A, Sawarynski K, Gerasymchuk L, Powell K, Robinson-Dunn B, Carpenter CF, Sims MD. Is there a clinical association of vancomycin MIC creep, agr group II locus, and treatment failure in MRSA bacteremia? *Diagn Mol Pathol*. 2011 ;20:184-8.
20. Han JH, Edelstein PH, Bilker WB, Lautenbach E. The effect of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type on clinical outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect*. 2013; 66:41-7.

Table 1. Characteristics of the patients with MRSA bacteremia.

Variable	N (%)
Age years, mean (SD)	55.5 (17.2)
Female sex, No (%)	9 (45.0)
Type of underlying disease, No (%)	
Diabetes mellitus	6 (28.6)
Malignancy	5 (23.8)
Cardiac failure	3 (14.3)
Chronic renal failure	3 (14.3)
Chronic obstructive pulmonary disease	2 (9.5)
HIV	2 (9.5)
Apache-II score, mean (SD)	24.3 (8.5)
Initial plasma CRP, mg/L, mean (SD)	178.6 (110.8)
Initial serum creatinine, g/dL, mean (SD)	1.7 (1.3)
Genotypic characteristic of blood isolates, No (%)	
<i>agr</i> group	
I	11 (52.4)
II	10 (47.6)
III	0 (0)
IV	0 (0)
SCC <i>mec</i> type	
I	2 (9.5)
II	0 (0)
III	5 (23.8)
IV	3 (14.3)
ND	11 (52.4)
Overall in-hospital mortality, No (%)	14 (66.6)

Note. SD, standard deviation; CRP; c-reactive protein; *agr*, accessory gene regulator; SCC*mec*; staphylococcal cassette chromosome *mec*; ND, not determined.

Figure 1. Distribution of specific antibiotic minimum inhibitory concentrations (MICs) for MRSA blood isolates.

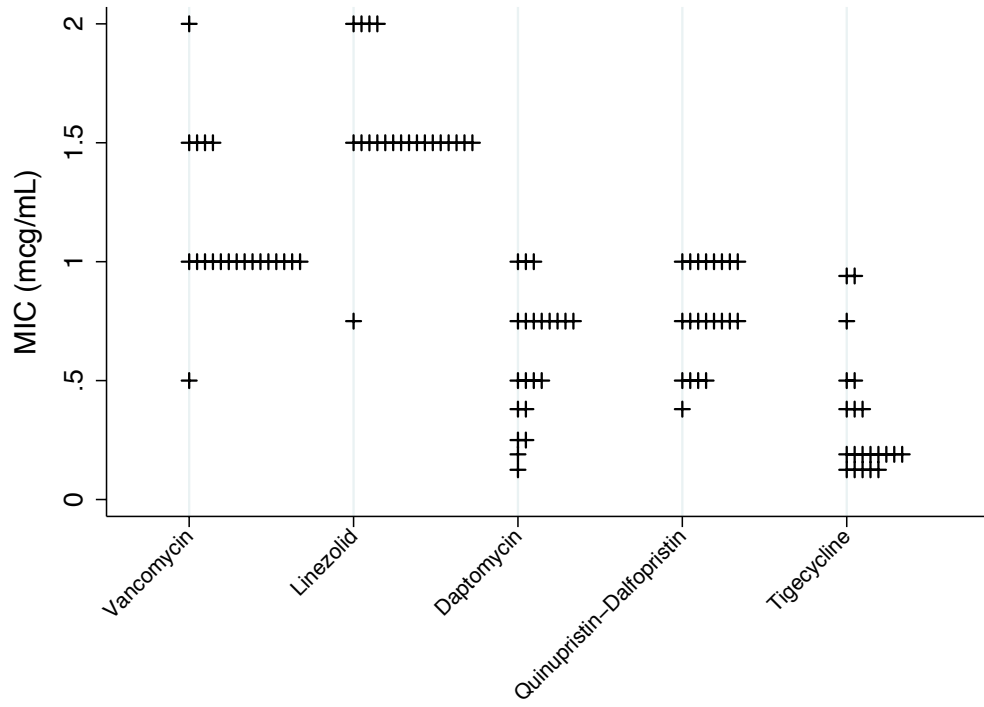


Table 2. Univariate Cox regression analysis of risk factors for in-hospital mortality in critically ill patients with MRSA bacteremia treated with vancomycin.

Variable	Mortality group (n=14)	Survival group (n=7)	HR (95% CI)	P value
Age years, median (SD)	57.1 (13.6)	52.4 (23.8)	1.01 (0.97-1.05)	0.47
Apache-II score, median (SD)	25.0 (9.1)	23.1 (7.8)	1.01 (0.93-1.11)	0.69
Initial plasma CRP, mg/L, median (SD)	226.0 (100.5)	90.6 (69.2)	1.004 (0.99-1.009)	0.07
Initial serum creatinine, g/dL, mean (SD)	1.9 (1.2)	1.2 (1.4)	1.42 (0.99-2.04)	0.05
MIC for vancomycin > 1 mcg/mL, No (%)	1 (7.1)	4 (57.1)	0.23 (0.03-1.85)	0.17
Appropriate vancomycin serum trough levels, No (%)	8 (57.1)	2 (14.2)	3.05 (0.37-25.11)	0.29
Time to vancomycin administration, days, mean (SD)	0.38 (0.96)	2.33 (2.33)	0.66 (0.37-1.16)	0.15
Group II <i>agr</i> specificity, No (%)	8 (57.1)	2 (28.5)	2.80 (0.84-9.38)	0.09

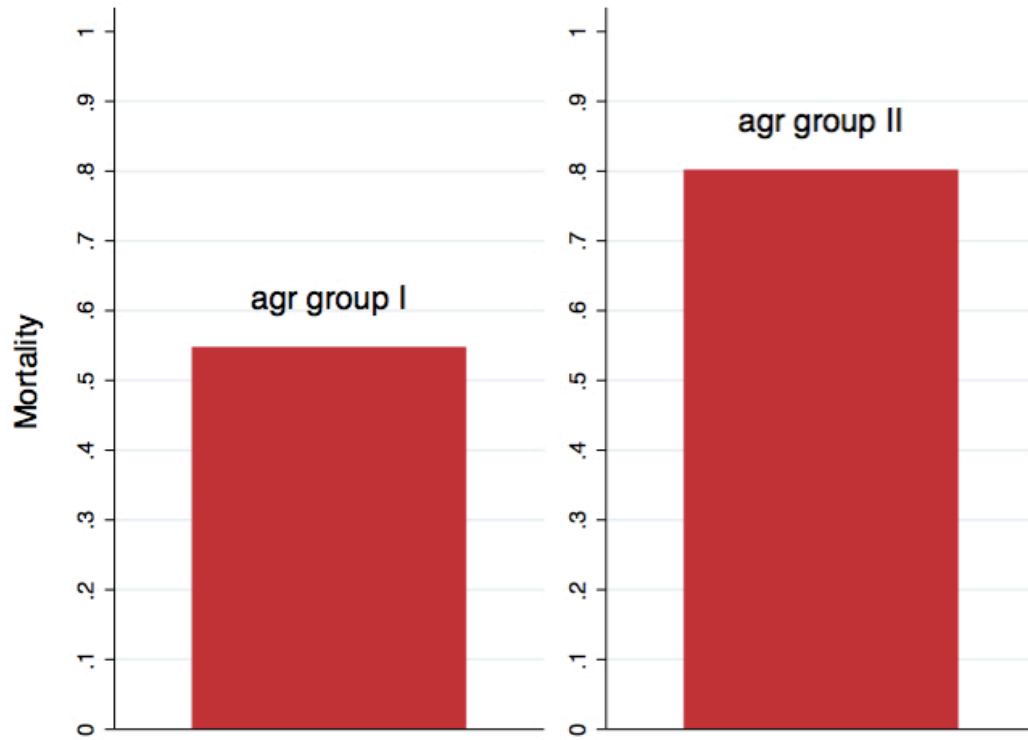
Note. HR, hazard ratio; 95%CI, 95% confidence interval; SD, standard deviation; CRP; c-reactive protein; MIC, minimum inhibitory concentration; *agr*, accessory gene regulator.

Table 3. Multivariate Cox regression analysis of factors associated with in-hospital mortality in critically ill patients with MRSA bacteremia treated with vancomycin.

Variable	Adjusted HR	95% CI	P value
Initial plasma CRP, mg/L	1.01	1.002-1.019	0.01
Initial serum creatinine, g/dL	2.11	1.21-3.68	0.008
Group II <i>agr</i> specificity	12.60	2.07-76.69	0.006

Note. HR, hazard ratio; 95%CI, 95% confidence interval CRP; c-reactive protein; *agr*, accessory gene regulator.

Figure 2. In-hospital mortality of critically ill patients with MRSA bacteremia treated with vancomycin according accessory gene regulator (*agr*) polymorphysm.



- Values expressed as deaths/survivals