Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Avaliação da redução da sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à vancomicina no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Larissa Lutz

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Dissertação de Mestrado

2003

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Avaliação da redução da sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à vancomicina no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Larissa Lutz

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Dissertação de Mestrado

2003

"A mente é como um pára-quedas,

só faz sentido quando pode abrir-se"

James Dewar, físico escocês

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Afonso Luís Barth pela orientação segura e sempre presente em todos os momentos da execução deste trabalho, por ter propiciado crescimento profissional e pessoal através deste e de outros trabalhos e do convívio desde minha formação na graduação.

Às colegas da Unidade de Pesquisa Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Daniela, Gabriela, Kátia e Jaqueline, pela amizade, incentivo e auxílio técnico.

Aos colegas da Unidade de Microbiologia Parasitária do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio em coletar as amostras, e pelo apoio e estímulo na realização deste trabalho.

Aos colegas do Comitê de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Dr. Adão Machado e à Nádia Kuplich, pelo auxílio na coleta de dados dos pacientes e pelo estímulo na realização deste trabalho.

À Usha pela amizade, incentivo e pelos seus ensinamentos.

Aos colegas do Instituto de Cardiologia pelo incentivo.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Moema Queiroz e à Christiane de Queiroz Lopes, pelo auxílio técnico na realização da microscopia eletrônica de transmissão.

À professora Gelsa Engler da Faculdade de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo incentivo na realização da microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Cícero Dias pelo fornecimento do sal da vancomicina utilizado nos experimentos.

Aos meus pais, que estimularam a busca pelo conhecimento e que, sempre presentes com seu amor incondicional, têm facilitado esta caminhada.

Às minhas irmãs, Letícia e Vanessa, e toda minha família pelo amor, pelo apoio e estímulo constantes.

Ao Norberto pelo amor, compreensão, apoio e paciência.

A todos meus amigos, em especial à Marina e à Taísa, pela amizade e apoio.

A todos os que auxiliaram na execução deste trabalho e que estiveram presentes neste momento: obrigada.

Instituições que contribuíram para a execução deste trabalho: Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre”.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS 7

INTRODUÇÃO 8

REVISÃO DA LITERATURA 11

Características da bactéria 11

Patogenicidade do *S. aureus* 15

Importância clínica das infecções por *S. aureus* 17

Epidemiologia e resistência antimicrobiana do *S. aureus* 19

Definições de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina 25

h-VRSA e seu significado clínico 27

Métodos de detecção de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina 31

Mecanismos de resistência do *S. aureus* à vancomicina 38

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA 44

OBJETIVOS 56

ARTIGOS 57

Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary hospital in southern Brazil 58

Versão em português do artigo: “Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary hospital in southern Brazil” 70

Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin at a university hospital in southern Brazil 81

Versão em português do artigo: “Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin at a university hospital in southern Brazil” 100

ANEXO 113

ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain-Heart Infusion

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CFU - Colony Forming Unit (Unidades Formadoras de Colônias)

EUA - Estados Unidos da América do Norte

GISA - Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* com Resistência Intermediária aos Glicopeptídeos)

h-VRSA – heteroresistant-VRSA (*Staphylococcus aureus* Heteroresistente à Vancomicina)

MH – Mueller Hinton

MIC - Minimal Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)

MRSA - Methicillin-Resistant *S. aureus* (*S. aureus* Resistente à Meticilina)

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

NNIS - National Nosocomial Infections Surveillance

PBP - Penicillin Binding Protein (Proteína Ligante de Penicilina)

SAHV – *Staphylococcus aureus* Heteroresistant to Vancomycin (*Staphylococcus aureus* Heteroresistente à Vancomicina)

SARSV – *Staphylococcus aureus* com Reduzida Suscetibilidade à Vancomicina

VISA - Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* com Resistência Intermediária à Vancomicina)

VRSA - Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* Resistente à Vancomicina)

VSSA - Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* Sensível à Vancomicina)

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais bem como de infecções comunitárias, que podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (4;25). O *S. aureus* é uma bactéria que apresenta várias propriedades que podem contribuir para sua habilidade em causar doenças, como a produção de um exopolissacarídeo (cápsula) que protege o microrganismo da quimiotaxia ou fagocitose por células polimorfonucleares e facilita a aderência às células do hospedeiro aos dispositivos protéticos (40;44).

Além de sua virulência, o *S. aureus* tem demonstrado uma capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos originalmente ativos contra a espécie (59). Resistência à penicilina (devido à produção de β-lactamase) foi descrita em *S. aureus* logo após o uso clínico destes antibióticos e disseminou-se nos anos 50 (70). O desenvolvimento de penicilinas estáveis a β-lactamases não alterou este quadro desde que *S. aureus* resistentes a estes antibióticos (methicillin-resistant *S. aureus* [MRSA]) foram descritos em 1961 (5). Nos anos 80, devido à disseminação de MRSA, a vancomicina tornou-se o antibiótico de escolha para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (21).

Em 1996, um isolado de *Staphylococcus aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina, também denominado *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA), foi relatado no Japão (38). Um ano depois, outros dois casos foram descritos nos Estados Unidos (Michigan e New Jersey) (14;15) e, posteriormente, um terceiro caso foi relatado em New York (62). Relatos subseqüentes deste tipo de microrganismo foram descritos em todo o mundo inclusive no Brasil (3;41;49;50;57;61;75) e isto indica que a emergência de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina tem se tornado uma questão global (36).

Apesar da terapia com vancomicina ter falhado na maioria dos pacientes infectados com estes microrganismos, não é claro se estes estafilococos deveriam ser designados como resistentes aos glicopeptídeos, pois os níveis de vancomicina requeridos para inibir o crescimento destes mantêm-se relativamente baixos (8 mg/L). Cabe ressaltar que diferentes "breakpoints" são usados na literatura internacional para estabelecer resistência à vancomicina (55;73).

Atualmente, além dos *S. aureus* denominados VISA, existe uma outra categoria de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina que se constitui de estafilococos com resistência heterogênea à vancomicina (h-VRSA). Estes últimos aparentam ser suscetíveis à vancomicina mas contêm subpopulações com MIC aumentado (≥ 4 mg/L) da vancomicina conforme a metodologia de análise populacional simplificada originalmente descrita (37). O primeiro isolado h-VRSA foi descrito por Hiramatsu et al. (37) e denominado Mu3, o qual apresentava uma estabilidade relativamente alta em meio livre de vancomicina. h-VRSA semelhantes ao Mu3 podem apresentar níveis de 0 a 26% de prevalência dependendo das definições e métodos empregados para triagem e confirmação (2;27;29;30;37;39).

Além disso, diversos métodos laboratoriais, os quais ainda não foram internacionalmente padronizados, são adotados para avaliar a resposta *in vitro* de *S. aureus* à vancomicina (8;13;16;26; 37;51;73;78;80;81). Tem sido evidenciado que o método de disco difusão (Kirby-Bauer), utilizado na rotina da maioria dos laboratórios de microbiologia clínica, pode não detectar VISA bem como h-VRSA. Os sistemas automatizados não têm apresentado melhor desempenho, apesar de terem sido submetidos a atualizações para detectar *S. aureus* com estes perfis de resistências (26;74). Em vista disso, alguns métodos têm sido propostos como triagem para h-VRSA, como a determinação do MIC da vancomicina por microdiluição em caldo Mueller Hinton (MH) ou por Etest em agar MH, bem como crescimento em placas de triagem de agar "brain-heart infusion" (BHI) contendo vancomicina e posterior

confirmação do MIC da vancomicina para a subpopulação (37;73). Outros autores propõem a identificação de h-VRSA através da técnica do Etest utilizando um meio nutricionalmente rico (BHI) e um inóculo bacteriano concentrado (81). Contudo, estas metodologias carecem de padronização o que dificulta o estabelecimento de uma rotina laboratorial de identificação de *Staphylococcus aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina (h-VRSA e VISA).

A reduzida susceptibilidade à vancomicina tem sido observada em estafilococos que mostram resistência à oxacilina, em geral, isolados de pacientes que não responderam à terapia com vancomicina (3;41;49;69). Contudo, também tem sido relatado h-VRSA sensível à oxacilina isolado de paciente que não foi submetido a tratamento prévio com vancomicina (8). Permanece controverso, então, se o isolamento de h-VRSA está relacionado com a aparente falha terapêutica da vancomicina, bem como com a resistência à oxacilina. Contudo, a presença de h-VRSA pode ser um importante indicador do declínio da efetividade clínica da vancomicina nos hospitais (36). Portanto, o reconhecimento laboratorial destes padrões de resistência e suas implicações clínicas tornam-se cada vez mais relevantes.

REVISÃO DA LITERATURA

Características da bactéria

A denominação *Staphylococcus* foi primeiramente utilizada para designar células bacterianas de forma circular (cocóide) em arranjos irregulares semelhantes a cachos de uva observadas em um abscesso por Dr. Ogston em 1881. No entanto, foi somente quatro anos mais tarde que o gênero *Staphylococcus* foi adequadamente descrito por Rosenbach (18).

Até 1999 este gênero pertencia à Família *Micrococcaceae*, a qual incluía também os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus*, e *Aerococcus* (18). Contudo, resultados mais recentes de estudos de composição do DNA, hibridização DNA-rRNA, e análise comparativa de oligonucleotídeos da porção 16S do rRNA, demonstraram que os gêneros da Família *Micrococcaceae* apresentam diferenças na composição do DNA, na composição da parede celular, nos ácidos graxos entre outras características, o que faz com que esse grupo não seja coerente filogeneticamente. O gênero *Staphylococcus* é mais estreitamente relacionado com o mais recentemente descrito gênero *Macrococcus*, contudo, ele também tem uma relação muito forte com os gêneros *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Gamella*, *Listeria*, *Planococcus*, e *Brochothrix*. Recentemente, estes gêneros estão sendo agrupados juntamente com o *Staphylococcus* e muitos outros gêneros na Família *Bacillacea* (4;42-44).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 35 espécies e 17 subespécies que estão distribuídas na natureza, muitas fazendo parte da microbiota normal de mamíferos e aves (4). Algumas espécies são encontradas como agentes etiológicos de infecções em animais, principalmente domésticos, sendo que 17 espécies podem ser isoladas de materiais clínicos humanos. As principais espécies de importância

clínica no ser humano são o *Staphylococcus aureus*, o *Staphylococcus epidermidis,* o *Staphylococcus haemolyticus*, o *Staphylococcus lugnudensis* e o *Staphylococcus saprophyticus*. Entre estes, o *S. aureus* se destaca como a espécie mais importante como patógeno humano (43;44).

O *S. aureus* apresenta um conteúdo de guanina e citosina (G+C) de 30 a 39 mol% o que o diferencia do gênero *Micrococcus* (conteúdo de G+C de 66 a 75 mol%) (18;42;43). Vários carboidratos e aminoácidos são usados como fontes de carbono e de energia por este microrganismo. Uma variedade de carboidratos (incluindo a glicose) é usada aerobicamente produzindo acetato e dióxido de carbono. A necessidade de diferentes aminoácidos pode mudar devido ao meio mínimo de subcultivo. O *S. aureus* pode crescer em um grande intervalo de temperatura (10-45°C) e de pH (4-9); mas seu crescimento é ótimo a 37°C e em pH 7,0-7,5. Ele pode crescer em altas concentrações de sal ou sacarose e apresenta-se geralmente sensível a desinfetantes, à lisostafina bem como a ácidos graxos (18).

Macroscopicamente, as colônias de *S. aureus* em meio sólido podem apresentar diâmetro de 1 a 3 mm após 24 horas de incubação a 34 - 37°C, ou de 3 a 8 mm após 72 horas de incubação a 34 - 37°C. São usualmente opacas, convexas, de consistência cremosa e coloração branca ou amarelada (significado de *aureus* no Latim) normalmente devido à presença de carotenóides na membrana citoplasmática (18). A espécie produz hemólise predominantemente do tipo beta e as cepas produtoras de grande quantidade de exopolissacarídeos (cápsula), o que não é o padrão predominante, têm aspecto mucóide (25;44;77).

Algumas cepas de *S. aureus* podem conter subpopulações que possuem a característica de formar colônias pequenas, cerca de dez vezes menores que a cepa originária. Esta variante está relacionada a infecções persistentes e à resistência antimicrobiana (a eficiência de antibióticos que agem na parede celular é reduzida). Acredita-se que uma deficiência no sistema de transporte de elétrons na membrana

celular dessa bactéria favoreça tanto sua sobrevivência intracelular quanto sua maior resistência antimicrobiana (53).

A parede celular dos estafilococos confere forma, rigidez e funciona como uma barreira em relação ao meio externo, tendo como principal função a proteção contra lise osmótica. Seu componente básico é o peptideoglicano, representando até 50% do peso da parede celular, o qual pode medir até 80 nm de espessura. A estrutura básica do peptideoglicano é composta de polissacarídeos, onde em média 10 a 16 subunidades alternadas de N-acetilglicosamina são ligadas ao ácido N-acetilmurâmico. Cadeias laterais compostas de pentapeptideos do ácido murâmico formam pontes de pentaglicina, que ligam a L-lisina de uma cadeia com a D-alanina da outra cadeia pentapeptídica. Esta ligação entre os pentapeptideos é específica do *S. aureus.* Ligados à matriz de peptideoglicano estão o ácido teicóico e o ácido lipoteicóico que correspondem cerca de 40% do peso da parede bacteriana. Estas duas moléculas auxiliam na estabilidade da parede celular (mantendo sua associação com a membrana citoplasmática), funcionam como quelates obtendo íons para o funcionamento da célula e participam da interação e aderência com mucosas e outras superfícies (77).

As características mais utilizadas para a identificação do *S. aureus* são a presença de proteína A extracelular, o fator de aglutinação ("clumping factor"), a enzima coagulase extracelular (coagulase livre) e a enzima catalase. A proteína A é responsável pela inibição da resposta imune devido à combinação não específica com algumas imunoglobulinas humanas. A coagulase livre é secretada extracelularmente e reage com uma substância no plasma chamada "coagulase reacting-factor (CRF)" para formar um complexo que, posteriormente, reage com fibrinogênio para formar fibrina. O fator de aglutinação, designado de "coagulase ligada", embora não se constitua em uma enzima, é uma estrutura ligada à parede celular que reage diretamente com o fibrinogênio no plasma, causando rápida aglutinação (40).

O teste da catalase diferencia o gênero *Staphylococcus* do gênero *Streptococcus*, enquanto que o teste da coagulase, tanto a coagulase livre como a ligada, além da fermentação do manitol, diferenciam o *S. aureus* dos *Staphylococcus* spp coagulase-negativos (43).

Patogenicidade do *S. aureus*

O *S. aureus* apresenta várias propriedades que podem contribuir para sua habilidade em causar doenças (25;44). Evidências clínicas de sua virulência foram demonstradas em 1941 por Skinner e Keefer que observaram uma associação direta entre mortalidade e bacteriemia por *S. aureus* (68). A virulência do *S. aureus* deve-se a diversos fatores celulares e extracelulares, entre os quais se destacam: a cápsula (exopolissacarídeo), os peptideoglicanos, o ácido teicóico, a proteína A, as enzimas catalase, coagulase livre, coagulase ligada ("clumping factor") e a fibrinolisina, toxinas estafilocócicas e as exoproteínas (18;40;44).

A cápsula protege o microrganismo da quimiotaxia ou fagocitose por células polimorfonucleares. Além disso, a cápsula pode facilitar a aderência dos microrganismos às células do hospedeiro a aos dispositivos protéticos (40;44). Os isolados clínicos de *S. aureus* foram classificados em oito tipos, de acordo com a imunotipificação do polissacarídeo capsular; 70 a 80% dos isolados clínicos importantes pertencem aos sorotipos capsulares 5 ou 8. Esses dois tipos capsulares, em particular o tipo 8, também estão associados a outros fatores de virulência do *S. aureus* como, por exemplo, a produção da toxina da síndrome do choque tóxico. Além disso, um grande número de *S. aureus* resistentes à oxacilina expressam o sorotipo 5 (9).

Os peptideoglicanos e o ácido teicóico são constituintes da parede celular que, além de conferir rigidez à parede celular do *S. aureus*, também são fatores de virulência em alguns microrganismos. Os primeiros ativam complemento, inibem a quimiotaxia das células inflamatórias e estimulam a produção de anticorpos; o segundo tem função de aderência da bactéria nas superfícies mucosas. A proteína A é outro fator de virulência por inibir a resposta imune, como descrito anteriormente (44).

A enzima catalase inativa o peróxido de hidrogênio tóxico e os radicais livres formados pelo sistema mieloperoxidase das células fagocitárias após a fagocitose. As enzimas coagulase livre e coagulase ligada podem agir encapsulando a célula bacteriana com fibrina e evitando a opsonização e a fagocitose. A fibrinolisina pode destruir a fibrina e permitir a disseminação da infecção em tecidos adjacentes (18).

As toxinas estafilocócicas e as exoproteínas são elaboradas durante o crescimento da bactéria em alimentos contaminados. Pertencendo à família destas exoproteínas estão as enterotoxinas (A, B, $C_{1,2,3}$, D e E), que causam intoxicação alimentar, e a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) que causa sérios efeitos sistêmicos, podendo ainda agir como superantígenos, desde que entrem na circulação sistêmica, levando à imunossupressão. Mais limitadas em atividade estão as toxinas epidermolíticas (ETAs) e as esfoliantinas A e B, que atacam a epiderme causando esfoliações observadas na necrólise epidérmica tóxica (TEN) e na síndrome estafilocócica da pele escaldada (SSSS). O maior efeito patogênico destas toxinas epidermolíticas ocorre em um sítio distante do sítio da infecção. Diferentemente das enterotoxinas e toxinas esfoliativas, as toxinas danosas à membrana produzem seus efeitos no sítio da infecção. A α-toxina (lábil ao calor) é o maior fator patogênico que produz danos teciduais após o estabelecimento da infecção (44).

Há muitos outros fatores que podem ser responsáveis por doenças estafilocócicas; contudo, as informações sobre a importância destes fatores isoladamente são conflitantes, sendo mais provável uma associação de fatores para a virulência do *S. aureus* (18;40).

Importância clínica das infecções por *S. aureus*

Staphylococcus aureus é uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais bem como de infecções comunitárias, que podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (4;25). Como patógeno hospitalar, o *S. aureus* tem sido a maior causa de morbidade e mortalidade (4). Segundo o sistema de vigilância "Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance (SCOPE)" a taxa de mortalidade por infecções sistêmicas em hospitais norte-americanos foi de 27%, destes 27% o *S. aureus* foi responsável por uma taxa de mortalidade de 25% (79).

O *S. aureus* é um patógeno oportunista, podendo colonizar intermitentemente (30 a 70%) ou permanentemente (10 a 40%) as pessoas sadias. Este microrganismo habita a nasofaringe, pele e mais raramente a vagina, reto e região perianal. A partir destes locais ele pode colonizar qualquer outra região do corpo humano tendo, inclusive, acesso a tecidos subjacentes quando houver quebra das barreiras de proteção cutâneo-mucosas (4;18;25).

A infecção pode desenvolver-se localmente envolvendo o folículo piloso (foliculites) ou pode espalhar-se mais profundamente causando bolhas (furúnculos). A infecção por *S. aureus* que envolve a epiderme é chamada de impetigo e caracteriza-se por produção de vesículas. Mais gravemente, o microrganismo pode invadir os tecidos e atingir a corrente sangüínea. Uma vez na corrente sangüínea, o microrganismo dissemina-se pelos demais órgãos e pode causar endocardite, osteomielite, bacteriemia, artrite séptica, abscesso epidural, abscesso cerebral, pneumonia e choque séptico (25).

Mesmo que o microrganismo não alcance a corrente sangüínea, podem ocorrer síndromes específicas resultantes das toxinas produzidas pelo *S. aureus* como a síndrome do choque tóxico, a síndrome da pele escaldada e a gastroenterite alimentar

(1). Nestes casos, o microrganismo pode permanecer relativamente localizado, mas a produção de toxinas causam efeitos sistêmicos. A síndrome do choque tóxico apresenta sérios efeitos sistêmicos que incluem febre, descamação e hipotensão, podendo levar ao choque e morte. Na síndrome da pele escaldada, que geralmente acomete neonatos, as toxinas esfoliativas causam escamação extensiva da pele por produzir um efeito no paciente semelhante à queimadura (25). Os sintomas mais comuns da intoxicação alimentar estafilocócica incluem vômitos e diarréia, que ocorrem duas a quatro horas após a ingestão da toxina (4).

Alguns fatores podem tornar os indivíduos mais predisponentes a desenvolver sérias infecções por *S. aureus*, tais como: defeitos na quimiotaxia dos leucócitos que podem ser congênitos (ex: Síndrome de Wiskott-Aldrich, de Down e de Job) e adquiridos (ex: diabetes mellitus e artrite reumatóide); defeitos na opsonização pelos anticorpos (ex: hipogamaglobulinemia); defeitos na morte intracelular da bactéria após fagocitose (ex: doença granulomatosa crônica); ferimentos na pele (ex: queimaduras, incisões cirúrgicas e eczema); presença de corpos estranhos (ex: suturas e próteses); infecções por outros agentes, particularmente vírus (ex: Infuenza); doenças crônicas subjacentes, tais como doenças malignas, doenças cardíacas e mesmo o alcoolismo; administração terapêutica ou profilática de antibióticos. Sob estas circunstâncias, o *S. aureus* pode causar uma variedade de processos infecciosos desde infecções de pele, relativamente benignas, até infecções sistêmicas, que comprometem a vida (44).

Epidemiologia e resistência antimicrobiana do *S. aureus*

Desde os primeiros surtos por *S. aureus* da década de 50, este microrganismo tem sido o patógeno nosocomial proeminente. Um levantamento feito pelo "National Nosocomial Infections Surveillance" (NNIS) em 1993 demonstrou que o *S. aureus* era a causa de 12% das 70.411 infecções nosocomiais, sendo a primeira espécie que causa infecções em sítios cirúrgicos (19%), pneumonia (20%) e infecções em outros sítios (17%) (24). Os patógenos mais comuns de infecções cirúrgicas relatadas pelo NNIS entre 1986 e 1997 foram três bactérias Gram-positivas: *Enterococcus* sp (15%), Estafilococo coagulase-negativa (13%) e *S. aureus* (11%). A maioria das bacteriemias foi devido ao Estafilococo coagulase-negativo (34%), seguindo pelo *S. aureus* (13%) e *Enterococcus* sp (13%). O principal patógeno em casos de pneumonia foi o *S. aureus* (17%) (56).

Um estudo do "SENTRY Antimicrobial Surveillance Program" para monitorar a prevalência de patógenos e os padrões de resistência aos antimicrobianos em infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade nos EUA, Canadá e América Latina em 1997, relata que o *S. aureus* é o patógeno mais freqüente (22,6%) em infecções sistêmicas nos hospitais participantes, em segundo lugar está a *E. coli* (18,4%), e em terceiro lugar, os Estafilococos coagulase-negativos (13,2%). Considerando apenas os hospitais da América Latina, o *S. aureus* aparece em primeiro lugar seguido dos Estafilococos coagulase-negativos e depois dos *Enterococcus* sp (60). Em pacientes com diagnóstico de pneumonia nos hospitais participantes do SENTRY na América Latina, *S. aureus* foi o segundo patógeno mais freqüente (24%), logo após à *Pseudomonas aeruginosa* (26%) (47). Em outro levantamento do SENTRY de 1997 a 1998, *S. aureus* foi o agente etiológico mais freqüente (31%) das infecções de pele e tecidos moles (28). Este microrganismo foi o

segundo mais freqüente agente etiológico de infecções nosocomiais sistêmicas nos EUA, conforme resultados do “SCOPE Surveillance Program” (52).

Outro estudo envolvendo 49 hospitais norte-americanos durante 3 anos detectou mais de 10.000 infecções sistêmicas nosocomiais. As bactérias gram-positivas somaram 64% dos casos, as bactérias gram-negativas somaram 27% e 8% foram causadas por fungos. Os microrganismos mais comuns foram os Estafilococos coagulase-negativos (32%), *S. aureus* (16%) e enterococos (11%) (23).

Estes índices de prevalência do *S. aureus* em infecções nosocomiais estão relacionados com a eficiência da sua transmissibilidade por contato. A maioria dos estudos envolvendo ambientes hospitalares inanimados sugere que *S. aureus* persiste em superfícies em hospitais. Em salas cirúrgicas, amostras de superfícies têm sido usadas para avaliar o potencial de contaminação. Estes estudos sugerem que o meio ambiente está relacionado com a contaminação, mas que, principalmente, serve como uma via de passagem para a colonização entre as pessoas (40).

Quando um paciente é colonizado por *S. aureus*, este microrganismo pode disseminar-se pelo contato pessoa-pessoa, particularmente através das mãos das pessoas ou pelo descamamento da pele da pessoa colonizada. Os fatores que promovem a colonização por *S. aureus* incluem repetidas infecções respiratórias, hospitalização prolongada, uso de seringas (em usuários de drogas injetáveis), diabetes, pacientes que requerem hemodiálise e eczemas de pele entre outros. A administração de antibióticos pode alterar a flora normal que conseqüentemente propicia a colonização bacteriana. A colonização por *S. aureus* é um importante fator de risco, já que geralmente precede uma infecção (40).

Outro grande problema relacionado ao *S. aureus* é a sua capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos originalmente ativos contra a espécie. No final de 1930, as sulfonamidas ofereciam o primeiro desafio a este patógeno, porém, elas não se mostraram muito efetivas devido a sua pobre performance clínica contra

infecções piogênicas. No início da década de 40, a introdução da benzilpenicilina (penicilina G) resolveu temporariamente o problema das infecções estafilocócicas, mas o uso contínuo deste antibiótico ocasionou a seleção de cepas resistentes (12). O principal mecanismo de resistência à penicilina G se deve à ação de enzimas denominadas β-lactamases, as quais destróem o anel β-lactâmico e inativam o antibiótico. Atualmente quase a totalidade dos isolados clínicos de *S. aureus* são resistentes à penicilina G (48).

O desenvolvimento de penicilinas semi-sintéticas mais resistentes à ação de β-lactamases (meticilina e oxacilina) permitiu que o problema de resistência do *S. aureus* fosse temporariamente resolvido. No entanto, *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram identificados imediatamente após a introdução da meticilina na prática clínica. A resistência à meticilina foi denominada intrínseca devido ao fato de não estar relacionada à produção de β-lactamases mas sim à alteração estrutural da proteína ligante de penicilina ("Penicillin Binding Protein – PBP"), a qual apresenta uma atividade vital durante o processo de transpeptidação na formação da parede celular bacteriana (17;71).

Desde os primeiros surtos de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) na década de 60 (7), este microrganismo vem tornando-se responsável por um número cada vez maior de infecções nosocomiais. Segundo o NNIS, o percentual de infecções devidas aos MRSA cresceu de 2,4% em 1975 para 29% em 1991 (58) e passou de 50% em 1999 (http://www.cdc.gov/ncidod/hip/aresist/mrsa.htm - consultado em outubro/2003). No estudo do "SENTRY Antimicrobial Surveillance Program", em 1997, o percentual de MRSA entre os *S. aureus* foi de 26,9% nos EUA, 29,2% na América Latina e 4,0% no Canadá, evidenciando um padrão de resistência aumentado nos EUA e América Latina com relação ao Canadá (60). De 1997 a 1998, 31% dos *S. aureus* isolados de pele e tecidos moles de pacientes dos hospitais participantes da América Latina no programa do SENTRY eram resistentes à meticilina (28). A

resistência à meticilina chegou a 50% em *S. aureus* de pacientes com diagnóstico de pneumonia nestes mesmos hospitais em 1998 (47). Conforme resultados do "SCOPE Surveillance Program" 26% dos *S. aureus* de infecções nosocomiais sistêmicas nos EUA eram MRSA (52). Valores semelhantes de resistência à oxacilina em *S. aureus* foram encontrados no estudo de Edmond et al. (23). Em outro levantamento do SENTRY nos centros do hemisfério ocidental, o Brasil aparece em quarto lugar em prevalência de MRSA entre os *S. aureus* (45,3% no Chile, 42,7% na Argentina, 34,2% nos EUA, 33,7% no Brasil, 11,4% no México, 8,6% na Colômbia e 5,7% no Canadá) (22).

Entre os inúmeros aspectos que se associam à alta incidência de MRSA nos hospitais estão o aumento de morbidade e mortalidade dos pacientes infectados, o problema do controle da disseminação desta bactéria dentro dos hospitais (6) e o alto custo que o combate a este tipo de infecção acarreta (10), fatores estes que classificam o problema como um dos mais importantes no âmbito das infecções hospitalares.

Um agravamento do problema de controle da resistência de estafilococos surgiu em maio de 1996, com o primeiro caso clínico de MRSA com suscetibilidade reduzida à vancomicina, também denominado *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) no Japão (38). Em seguida, dois casos foram descritos nos EUA (Michigan e New Jersey) (14;15;69) e logo após, um terceiro caso em New York (62). Casos subseqüentes deste tipo de isolado foram descritos em todo o mundo (França (61), Itália (50), Coréia (41), Tailândia (75) e Brasil (3;49;57)), indicando que a emergência de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina está se tornando uma questão global (36).

Sem um estudo epidemiológico apropriado, fatores de risco não podem ser determinados, porém pode-se identificar características comuns nos casos de MRSA com níveis intermediários de resistência à vancomicina do Japão e EUA e considerar

como potenciais fatores de risco (Tabela 1). A maioria destes pacientes estavam sendo ou tinham sido submetidos à diálise recentemente; a maioria tinha infecção recorrente por MRSA em cateter venoso central ou materiais protéticos associados a bacteriemias, que foram tratadas com vancomicina; e muitos tinham exposição prévia prolongada à vancomicina (26).

Em uma tentativa de estabelecer fatores de risco para bacteriemia por *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina, um estudo caso-controle demonstrou que admissão em unidades de terapia intensiva e o uso prévio de vancomicina e/ou β-lactâmicos são mais comuns em pacientes com bacteriemia devido ao *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina (80).

Atualmente, além dos *S. aureus* denominados VISA, existe uma outra categoria de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina que se constitui de estafilococos com resistência heterogênea à vancomicina (h-VRSA). Estes últimos aparentam ser suscetíveis à vancomicina mas contêm subpopulações na freqüência de pelo menos 10^{-6} com MIC aumentado ($\geq$ 4 mg/L) para a vancomicina conforme a metodologia de análise populacional simplificada originalmente descrita (37). O primeiro h-VRSA foi descrito por Hiramatsu et al. (37) e determinado como Mu3, o qual apresenta uma estabilidade relativamente alta em meio livre de vancomicina.

Estes h-VRSA representam 5 a 26% dos MRSA em hospitais universitários no Japão (37), apesar destes percentuais não terem sido confirmados por outros autores japoneses (27;39). Os h-VRSA representam 8,2% de 85 MRSA estudados na Alemanha (29) em contraste com 0% observado na Inglaterra e País de Gales (2). Mais recentemente, na Holanda, Griethysen et al. detectaram 19 (7,6%) de 250 MRSA como prováveis h-VRSA. Destes, 15 foram classificados como h-VRSA de acordo com a metodologia de análise populacional modificada (30).

Tabela 1

Definições de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina

Ainda não existe concenso sobre a terminologia para estafilococos com reduzida suscetibilidade à vancomicina, já que os termos VRSA, h-VRSA, VISA e GISA têm sido usados, muitas vezes, para descrever amostras de *S. aureus* com as mesmas características. Esta dificuldade em utilizar o termo apropriado reflete também o estado de incertezas sobre o significado clínico de tais microrganismos. Além disso, são utilizados diferentes "breakpoints" para estabelecer resistência e uma variedade de métodos laboratoriais não padronizados para determinar a resposta *in vitro* destes microrganismos à vancomicina (26;72;73;80).

O termo VRSA, ou *S. aureus* resistente à vancomicina, sugere a falha da vancomicina em erradicar a infecção pelo *S. aureus* quando administrada em doses apropriadas. Nos EUA, este termo é reservado aos *S. aureus* cujo MIC da vancomicina é $\geq$ 32 mg/L, mas em outros lugares do mundo, como no Japão, é empregado aos *S. aureus* cujo MIC da vancomicina é $\geq$ 8 mg/L (72).

O "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)" estabeleceu como sensível (VSSA), intermediário (VISA), e resistente (VRSA) aqueles estafilococos cujo crescimento é inibido por concentrações de vancomicina $\leq$ 4 mg/L; 8 a 16 mg/L, e $\geq$ 32 mg/L, respectivamente (55). Os termos VISA, ou *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina, e GISA, ou *S. aureus* com resistência intermediária aos glicopeptídeos, foram derivados deste critério. O termo GISA parece mais acurado uma vez que a maioria dos casos já relatados eram intermediariamente resistentes tanto à vancomicina como à teicoplanina; porém, o termo VISA é mais comumente utilizado (72).

Na França, o "Comité de l'Antibiogramme de la Société Française Microbiologie" publicou "breakpoints" similares aos estabelecidos pelo NCCLS. Contudo, usando os critérios interpretativos da "British Society for Antimicrobial

Chemotherapy", *S. aureus* inibidos por concentrações inibitórias mínimas (MIC) da vancomicina $\leq$ 4 mg/L são considerados sensíveis (VSSA) e por MIC $\geq$ 8 mg/L da vancomicina são reportados como resistentes à vancomicina (VRSA) (73).

Além disso, a expressão "heteroresistant VRSA" (h-VRSA) tem sido usada para determinar *S. aureus* que contêm uma subpopulação capaz de crescer em placas de agar contendo 4 mg/L de vancomicina em 48 horas, e que o MIC da vancomicina para esta subpopulação seja, pelo menos, 8 mg/L (37). Outros autores consideram h-VRSA aqueles *S. aureus* que apresentam um MIC da vancomicina $\geq$ 8 mg/L através do método do Etest utilizando um meio nutricionalmente rico (BHI) e um inóculo bacteriano concentrado (8;78;81).

h-VRSA e seu significado clínico

A expressão “resistência heterogênea” já foi utilizada para descrever a resposta não uniforme de diversas bactérias a vários antibióticos, tais como os β-lactâmicos (17). No momento atual em que a resistência aos antimicrobianos é assunto em evidência, o conceito de heteroresistência é importante não somente para predizer a efetividade clínica da terapia para um paciente em particular, mas também para a detecção de tendências de resistências emergentes. O fato de testes de suscetibilidade convencionais não detectarem a heteroresistência, não deve ser motivo para se negligenciar a sua importância do ponto de vista clínico e epidemiológico (36).

A complexidade da heteroresistência pode ser exemplificada pela teoria de Hiramatsu, o qual propõe que existam dois tipos de h-VRSA, aqueles estáveis e os instáveis (Figura 1) (36). h-VRSA podem sobreviver à pressão seletiva do uso da vancomicina, mas retornam ao estado de VSSA quando a pressão é removida (h-VRSA instável). Há, portanto, ciclos de seleção e reversão entre VSSA e h-VRSA instável. Por outro lado, quando h-VRSA não retorna a VSSA é denominado h-VRSA estável. Os *S. aureus* instáveis expressam heteroresistência diretamente após serem isolados de pacientes que estavam sob terapia com glicopeptídeos, mas o fenótipo tende a se perder durante a estocagem em meio livre de vancomicina, contribuindo para a subestimação da prevalência de h-VRSA. h-VRSA estáveis poderiam prevalecer mais facilmente no ambiente hospitalar e, eventualmente, causar mais falhas na terapia com vancomicina e gerar VRSA em uma freqüência mais alta durante a terapia do que os h-VRSA instáveis. Contudo, a presença de h-VRSA pode ser um importante indicador do declínio da efetividade clínica da vancomicina nos hospitais (36).

Vários estudos indicam que o fenótipo de resistência à vancomicina é instável em isolados clínicos de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina (SARSV). Em um estudo de Boyle-Vavra et al. (11), três GISA dos EUA (MIC da vancomicina 8 mg/L) e dois do Japão (MIC da vancomicina 8 e 2 mg/L) foram cultivados diariamente em agar nutriente sem vancomicina. Após 15 dias de passagens no meio não seletivo, foram obtidos isolados bacterianos sensíveis à vancomicina e teicoplanina de cada GISA. Yasuyoshi et al. (39), em um estudo similar, observaram que nenhum isolado de *S. aureus* que cresceu em meio seletivo contendo vancomicina foi confirmado como sendo h-VRSA após três dias de passagens seriadas em meio livre deste antibiótico. Experimentos com 16 SARSV de diferentes partes do mundo mostraram que o MIC da vancomicina retornou aos níveis de sensibilidade (2 mg/L) após 10 a 84 dias de passagens seriadas em meio livre de antibiótico. Quinze dos 16 SARSV foram revertidos para sensível, mas ainda expressavam resistência heterogênea à vancomicina similar ao isolado Mu3. A exposição destes *S. aureus* à 4 mg/L de vancomicina, contudo, selecionou h-VRSA a altas freqüências. Estes dados sugerem que, mesmo que um h-VRSA não se dissemina como um fenótipo de resistência estável, pois tende a retornar ao estado de heteroresistência à vancomicina, pode rapidamente reverter-se ao fenótipo VRSA quando exposto novamente à vancomicina (19).

Do ponto de vista biológico, o estado de h-VRSA parece ser uma adaptação ecológica de sucesso do *S. aureus* por busca da sobrevivência contra a pressão de vancomicina. Apesar da vancomicina suprimir o crescimento de 99,9% da população de h-VRSA, uma pequena porção da população sobrevive e cresce na presença de 4 mg/L de vancomicina, o que é semelhante ao limite máximo da concentração de vancomicina encontrada na maioria dos tecidos do organismo humano. Esta população de h-VRSA dispende muita energia para produzir a parede celular mais espessa para sobreviver à pressão de vancomicina e quando a pressão de

vancomicina é aliviada (diminuição da concentração), as células retornam ao estado inicial para conservar energia. Portanto, o *S. aureus* pode não necessitar da aquisição de genes específicos de resistência à vancomicina, desde que associado à pressão seletiva estejam limitadas as concentrações teciduais e a atividade citolítica da vancomicina (36).

O uso indiscriminado de cefalosporinas de terceira geração no início dos anos 80 levou a um aumento significativo de MRSA, surgindo primeiramente os hetero-MRSA. Do mesmo modo, h-VRSA e VRSA surgiram concomitantemente ao aumento do emprego da terapia com vancomicina. Existem alguns mecanismos genéticos em comum que conferem tanto hetero e homo-conversão de resistência à meticilina como conversão de VSSA para h-VRSA (36). Sieradski e Tomasz (67) relataram um fenômeno no qual o aumento da resistência à vancomicina é associado à redução de resistência à meticilina em um isolado de VRSA produzido em laboratório pela inativação da atividade da PBP e um drástico decréscimo nas ligações cruzadas dos peptideoglicanos. Estes estudos indicam a complexidade da resistência do *S. aureus* a diferentes antibióticos.

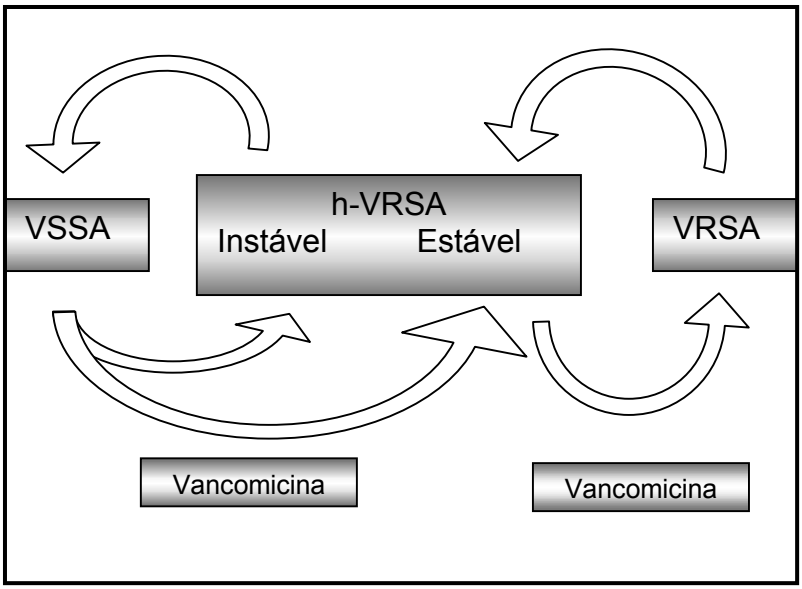


Figura 1: h-VRSA como protagonista da resistência dos estafilococos aos glicopeptídeos. Adaptado de Hiramatsu K (36).

Métodos de detecção de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina

A recente descrição de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina (VISA e h-VRSA) gerou uma grande preocupação na comunidade científica, no sentido de como lidar com esta bactéria desde a sua detecção laboratorial até o manejo do paciente infectado. Os microbiologistas clínicos devem inteirar-se dos procedimentos que podem ser utilizados para detectar corretamente SARSV em amostras clínicas (51).

Uma característica que tem sido observada em SARSV é a morfologia colonial heterogênea na cultura primária de amostras clínicas. Este aspecto é particularmente evidente no segundo dia de incubação, quando colônias pequenas crescem entre colônias de tamanho usual na placa de meio de cultura, apresentando aspecto de crescimento misto. No entanto, quando as colônias pequenas são examinadas, é confirmada a identificação de *S. aureus* com MIC da vancomicina mais elevado que o das colônias maiores usuais da mesma amostra (Figura 2) (51).

Isolados clínicos de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina não tinham sido descritos anteriormente talvez porque o teste de suscetibilidade pelo método de disco difusão (Kirby-Bauer) pode não detectar estes microrganismos. Logo após a detecção e confirmação dos primeiros casos de SARSV no mundo, tornou-se evidente que este método não é sensível o suficiente para detectar a sutil diminuição da suscetibilidade à vancomicina em *S. aureus* (55;74).

Tenover e colaboradores (74) avaliaram vários métodos de detecção de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina e à teicoplanina. Eles observaram que os métodos de disco difusão convencionais com discos de vancomicina não têm capacidade de detectar SARSV. Assim, para a detecção acurada destas variantes, é necessário utilizar um método quantitativo que determine o MIC da vancomicina. No entanto, eles sugeriram que a avaliação da diminuição dos

halos em torno dos discos de teicoplanina poderia ser um teste útil como método de triagem.

Os *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina podem não ser discriminados dos *S. aureus* sensíveis à vancomicina somente pelos valores de MIC. Os valores de MIC para SARSV encontram-se entre 2 e 4 mg/L, mas 7 a 9% de VSSA também apresentam MIC de 2 mg/L (37).

O uso de métodos automatizados, como os painéis rápidos do MicroScan (Dade Behring), também não identificam realmente estes microrganismos (74). No entanto, algumas modificações no software do aparelho automatizado Vitek (versão 7.01, bioMérieux) melhoraram a habilidade deste sistema detectar SARSV (26).

O "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" recomenda estratégias para testes adicionais para a detecção da diminuição da suscetibilidade à vancomicina em *S. aureus* (Figura 3) (13;16;51). Segundo o CDC, o laboratório clínico de microbiologia deveria utilizar um algoritmo pelo qual os métodos de rotina poderiam identificar *S. aureus* que podem necessitar de testes adicionais (testes confirmatórios) para a detecção de SARSV. Este algoritmo deveria considerar a população de pacientes que o laboratório atende, os métodos de rotina utilizados, os recursos disponíveis e os requirimentos do departamento de saúde pública. Em laboratórios em que MRSA são infreqüentemente detectados por disco difusão, a determinação do MIC da vancomicina como triagem e testes confirmatórios somente em isolados com MIC inicial da vancomicina $\geq$ 4 mg/L seria o recomendado. Contudo, em laboratórios em que o percentual de MRSA detectado é alto (40%, por exemplo), deveria-se utilizar métodos confirmatórios em todos os MRSA como inocular todos os MRSA em placas de triagem com agar contendo vancomicina (13;16;26).

O CDC adota três critérios para identificar *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina (testes confirmatórios): 1) MIC da vancomicina por microdiluição em caldo Mueller-Hinton (MH) de 8 a 16 mg/L, após 24 h completas de

incubação; 2) MIC da vancomicina por Etest ≥ 6 mg/L em agar MH; e 3) crescimento em placas de agar BHI comerciais contendo 6 mg/L de vancomicina em 24 h. Colônias capazes de crescer nessas placas de triagem e que apresentem um MIC de 8 mg/L são determinadas h-VRSA (26;73).

Por outro lado, Hiramatsu et al. (37) sugerem o uso de 10 μL de um inóculo de 10^8 CFU/mL em agar BHI contendo 4 mg/L de vancomicina como triagem para h-VRSA. As placas devem ser incubadas a 35°C, e o crescimento bacteriano é avaliado em 24 e 48 h. Se houver crescimento confluente em 24 h, o isolado é considerado um potencial VISA. Se o crescimento bacteriano não for aparente em 48 h, o isolado é considerado sensível à vancomicina (VSSA). O isolado é designado como um possível h-VRSA quando um número contável de colônias for aparente em 48 h. Um MIC da vancomicina ≥ 8 mg/L confirmariam as colônias como h-VRSA, com uma estabilidade persistindo pelo menos após 9 dias de repiques em meio livre do antibiótico.

Outros estudos propõem a metodologia do Etest usando agar BHI, um inóculo bacteriano mais concentrado (2,0 de McFarland) e 48 h de incubação a 35°C (Etest macrométodo [Etest-M]) como triagem para h-VRSA. Um MIC da vancomicina ≥ 8 mg/L indicaria h-VRSA neste método (Figura 4) (8;78;81). Walsh et al. (78) estabeleceram que esse método é confiável e sensível pra detectar resistência aos glicopeptídeos, bem como heteroresistência.

Ike et al. (39) estudaram o efeito do inóculo e do meio de cultura na suscetibilidade à vancomicina e observaram que MRSA crescendo em agar BHI apresentam níveis de resistência mais elevados que daqueles crescendo em agar MH. Portanto, o uso de inóculo mais concentrado e/ou um meio de cultura nutricionalmente mais rico (como o BHI) promove resultados de aumento da resistência à vancomicina.

Hanaki e Hiramatsu (31) avaliaram a suscetibilidade à vancomicina em um isolado clínico de MRSA com várias condições de testes de suscetibilidade aos

antimicrobianos. Eles observaram que o MIC da vancomicina para este isolado era de 8 mg/L pelos métodos de diluição em agar e macrodiluição em caldo segundo as normas do NCCLS. No entanto, o MIC aumentou consideravelmente (32 mg/L) quando a bactéria foi testada em meios enriquecidos com aminoácidos.

O fato de que as moléculas de glicopeptídeos podem ficar retidas nas camadas já formadas de peptideoglicano na parede celular do *S. aureus*, torna muito mais difícil a realização de testes acurados de susceptibilidade aos glicopeptídeos do que testes para outros antibióticos. As variações do inóculo (o número de células bacterianas) e o meio contendo glicopeptídeo, podem afetar a concentração do antibiótico livre, resultando em variações nos valores de MIC (36).

A avaliação morfométrica do espessamento da parede celular bacteriana usando imagens fotográficas obtidas após microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Figura 5) tem sido proposta para auxiliar na investigação de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina (20;32). Cui et al. (19) estabeleceram que o espessamento da parede celular é um fator comum entre h-VRSA obtidos de diferentes países, uma vez que encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre o espessamento da parede celular e o MIC da vancomicina.

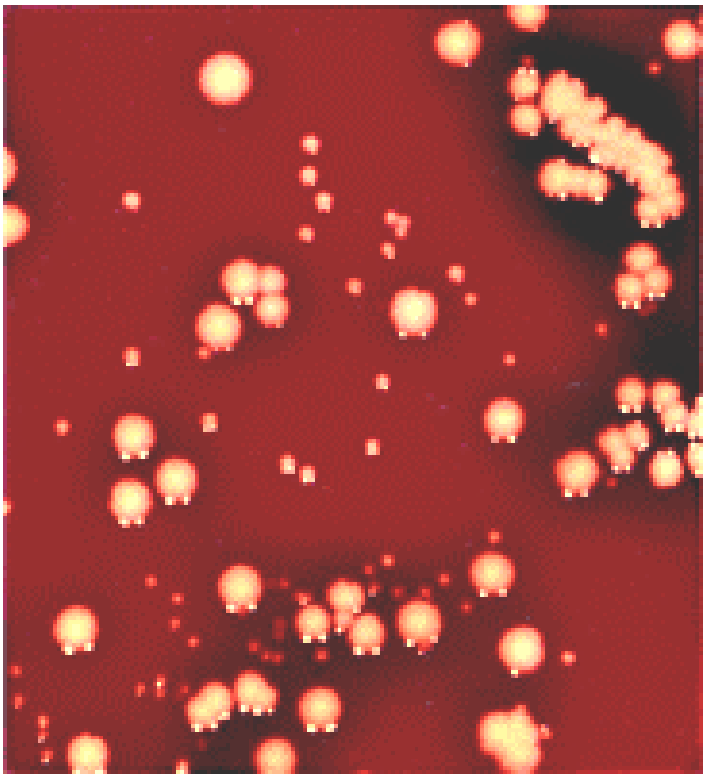


Figura 2: Morfologia heterogênea das colônias de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina (51).

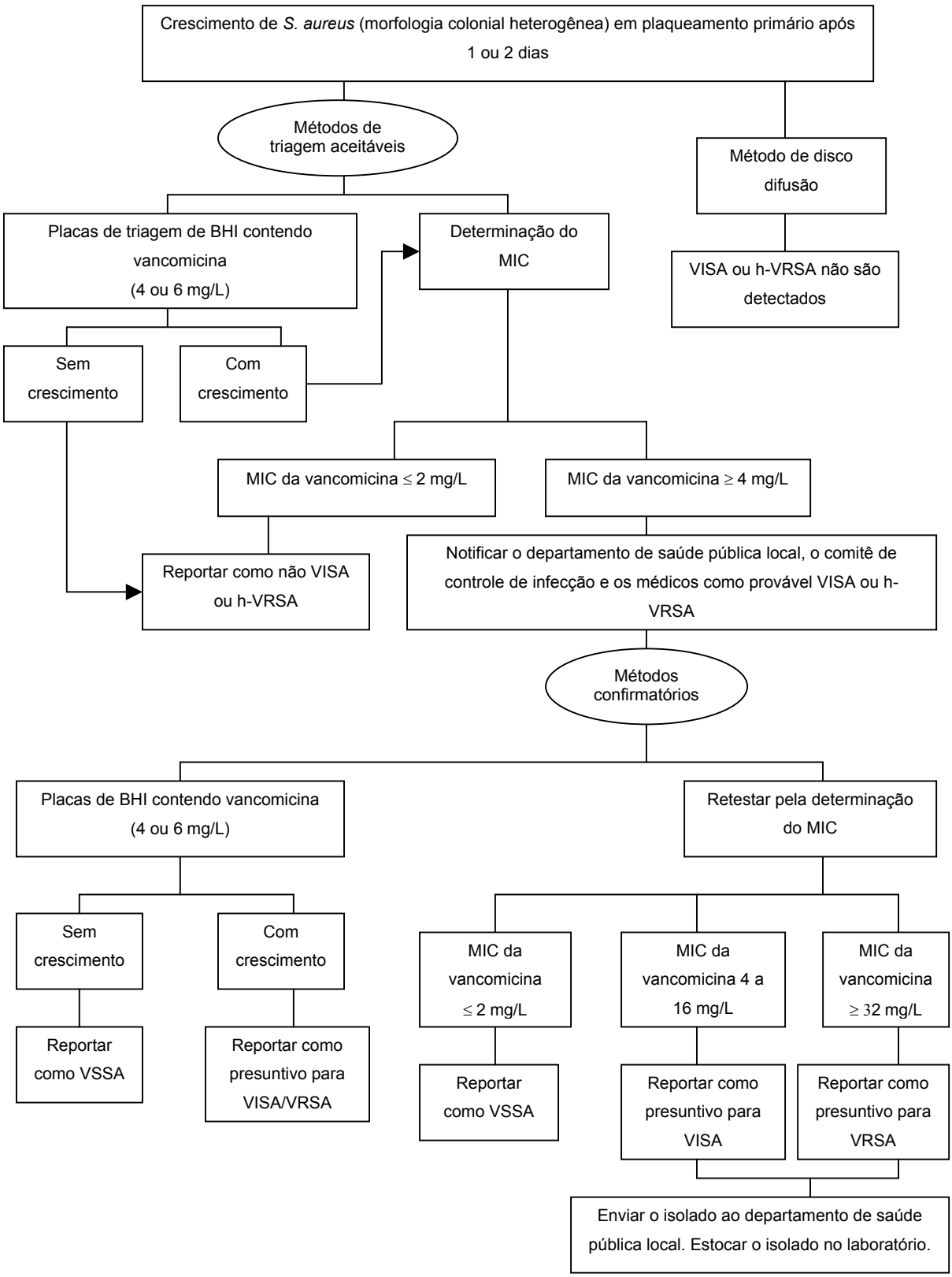


Figura 3: Algoritmo para detecção e confirmação de VISA e h-VRSA conforme proposto pelo CDC. Adaptado de Marlowe et al. (51) e de http://www.cdc.gov/ncidod/hip/lab/.htm - consultado em outubro/2003.

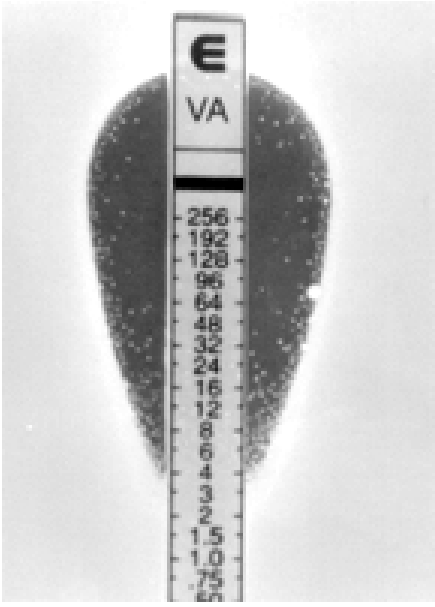


Figura 4: Resultado típico do Etest macrométodo do *S. aureus* Mu50. As microcolônias aparecem somente após as placas terem sido incubadas por 48 h (78).

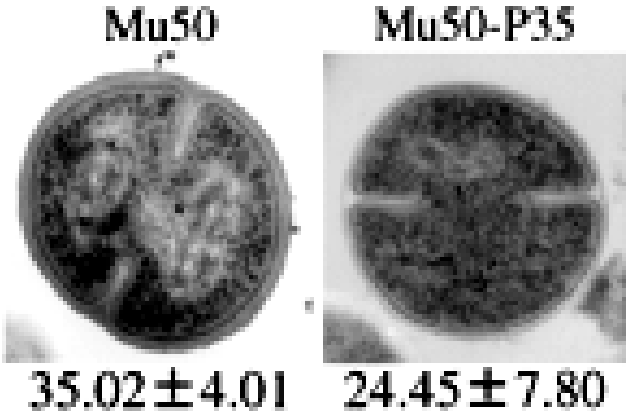


Figura 5: Espessamento da parede celular bacteriana de um isolado SARSV (Mu50) e o isolado após passagens em meio sem vancomicina (Mu50-P35), usando imagens fotográficas obtidas após microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os valores abaixo das figuras correspondem às médias e aos SDs do espessamento da parede celular em nanômetros (19).

Mecanismos de resistência do *S. aureus* à vancomicina

Os glicopeptídeos, assim como os antibióticos β-lactâmicos, exercem seus efeitos antimicrobianos inibindo a síntese da parede celular do *S. aureus*. A célula bacteriana tem uma pressão osmótica alta e para que se multiplique em um meio com uma pressão externa baixa, ela precisa sintetizar continuamente uma estrutura extracelular chamada peptideoglicano ou mureína, a qual previne a ruptura da célula devido a sua forma rígida. A produção do peptideoglicano se inicia com a síntese do componente monomérico (monômero de mureína) dentro da célula bacteriana; este, em seguida, é transferido para fora da célula por carreadores lipídicos presentes na membrana citoplasmática (36).

As enzimas glicosiltransferase e transpeptidase, também chamada de proteína ligadora de penicilina (penicillin-binding protein - PBP), localizadas na membrana citoplasmática, transformam o monômero de mureína em uma estrutura gigante de peptideoglicano. A glicosiltransferase polimerisa os monômeros de mureína para produzir cadeias nascentes de peptideoglicano. Em seguida, a transpeptidase liga as cadeias de peptideoglicano recém-formadas às cadeias de peptideoglicano já existentes nas células de *S. aureus* (ligação cruzada). Quando a ponte interpeptídica é formada, o terminal D-alanina do monômero de mureína é desligado do peptideoglicano completado. Cerca de 20% dos resíduos de D-alanil-D-alanina permanecem não processados pelas PBP (35).

Os glicopeptídeos ligam-se aos resíduos de D-alanil-D-alanina do monômero de mureína. O monômero de mureína ligado à vancomicina não serve como substrato para a enzima glicosiltransferase. Há duas classes de sítios de ligação da vancomicina na célula do *S. aureus*: 1) os resíduos de D-alanil-D-alanina nas camadas completadas de peptideoglicano ou na cadeia nascente de peptideoglicano; e 2) os monômeros de mureína localizados na membrana citoplasmática que servem de

substrato para a enzima glicosiltransferase. A ligação dos glicopeptídeos aos sítios alvos já formados (D-alanil-D-alanina nas camadas completadas de peptideoglicano) não inibe a síntese de novos peptideoglicanos, embora elas possam interferir na formação da ponte cruzada mediada pelas PBP. Por outro lado, a ligação dos glicopeptídeos aos monômeros de mureína na membrana citoplasmática inibe completamente a síntese do peptideoglicano, e a célula para de se multiplicar.

Contudo, para que as moléculas de glicopeptídeo liguem-se a estes sítios alvos na membrana citoplasmática, elas precisam passar através de cerca de 20 camadas de peptideoglicano sem serem retidas nestes sítios. Como há vários sítios de D-alanil-D-alanina nas camadas de peptideoglicanos já formadas, muitas moléculas de glicopeptídeos podem ser retidas nestas camadas, o que compromete a efetividade terapêutica dos glicopeptídeos. Por exemplo, se um grande número de células de *S. aureus* está presente no tecido infectado do paciente, as moléculas de glicopeptídeo podem ser absorvidas por suas paredes celulares e a concentração tecidual do glicopeptídeo será menor que a requerida como limiar terapêutico. Por esta razão, têm sido requeridas medidas para diminuir o número de células bacterianas no organismo do paciente, como a eliminação cirúrgica de um abscesso ou a drenagem de pus, o que tornaria a terapia com glicopeptídeos mais efetiva (36). Este fato, de que muitas moléculas de glicopeptídeos podem ser retidas pelas camadas já formadas de peptideoglicano, também pode afetar a realização dos testes de susceptibilidade *in vitro* aos glicopeptídeos (36), como comentado anteriormente.

Antes da descrição do primeiro isolado clínico de SARSV, o chamado Mu50 (32), a resistência à vancomicina foi relatada em um isolado clínico de *Staphylococcus* sp coagulase-negativo (63;64;76) e em um *S. aureus* mutante selecionado *in vitro* (66). Um aumento da produção de PBP2 foi descrito por Shlaes et al. em um isolado clínico de *S. aureus* resistente à teicoplanina (65) e por Moreira et al. em um isolado de *S. aureus* resistente à vancomicina mutante selecionado *in vitro*

(54). Sieradsky et al. (67) estudaram um isolado de *S. aureus* com alta resistência à vancomicina, obtido laboratorialmente por pressão seletiva, e observaram que este isolado apresentava uma diminuição da atividade autolítica da parede celular, sendo que a desregulação do "turnover" da parede celular resultou em um espessamento excessivo e irregular da mesma.

O mecanismo de resistência à vancomicina foi avaliado nos isolados clínicos Mu50 e Mu3. Observou-se que estes microrganismos não carregavam os genes de resistência à vancomicina encontrados nos Enterococos resistentes à vancomicina (VRE), gen *van*A, *van*B e *van*C1-3 (32). Contudo, ambos os isolados produziam mais quantidade de PBP2 e 2' quando comparados com controles de *S. aureus* sensíveis à vancomicina e resistentes ou não à meticilina (34). Foram realizados exames bioquímicos e de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de células do Mu50 e foi sugerido que estas células produzem quantidades aumentadas de peptideoglicano; ou seja, foi observado que havia mais monômeros de mureína e mais camadas de peptideoglicano na parede celular desta bactéria (provavelmente de 30 a 40 camadas segundo a avaliação do espessamento da parede celular observado pela TEM) (32;34).

As composições dos peptideoglicanos dos isolados clínicos Mu50 e Mu3 foram comparadas e observou-se que, com relação ao isolado Mu3, a parede celular do isolado Mu50 apresentava maior quantidade de muropeptídeos não-amidados e diminuição das ligações cruzadas dos peptideoglicanos com uma significativa diminuição da relação dímero/monômero de muropeptídeos. Foi possível observar também que os peptideoglicanos do Mu50 retêm mais moléculas de vancomicina que do isolado Mu3 (33) e que dos controles de *S. aureus* sensíveis à vancomicina (34). Além disso, observou-se um aumento dos resíduos livres de D-alanil-D-alanina na parede celular do Mu50, devido à ativação da síntese da parede celular.

O aumento de muropeptídeos não-amidados e a redução das ligações cruzadas dos peptideoglicanos da parede celular podem contribuir para a resistência à vancomicina aumentando o consumo de moléculas de vancomicina e reduzindo a quantidade de vancomicina que alcança a membrana citoplasmática onde encontra-se o sitio de ação deste antibiótico (33). Mais moléculas de vancomicina são retidas nas camadas de peptideoglicano antes que atravessem a membrana citoplasmática onde a síntese do peptideoglicano ocorre. Então, uma maior concentração de vancomicina seria necessária para saturar todos os monômeros de mureína que são produzidos em quantidade aumentada em um isolado de Mu50 (36).

Além do mecanismo de retenção da vancomicina, designado “affinity trapping”, Cui et al. (20) sugeriram que a estrutura das camadas externas do peptideoglicano mais espesso misturados com a vancomicina (“mesh structure”) é destruída pelas próprias moléculas de vancomicina retidas. Isso previne futuras penetrações de moléculas de vancomicina na parte interna das camadas da parede celular (conhecido como fenômeno de bloqueio – “clogging phenomenon”).

Segundo Hiramatsu (36), a parede celular mais expessa, presumivelmente devido ao aumento da quantidade de peptideoglicano, é a característica fundamental de todos os isolados clínicos com reduzida suscetibilidade à vancomicina até então reportados em vários países. Isto é confirmado pelo resultado de um estudo que demonstrou existir um espessamento significativamente maior nas paredes celulares de 16 *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina de sete países que VSSA quando medidas por TEM. Além disso, *S. aureus* sensíveis à vancomicina (MIC < 4 mg/L) obtidos destes SARSV, após passagens em meio livre de vancomicina, apresentaram decréscimo do espessamento da parede celular. Por outro lado, estes últimos, quando submetidos à pressão seletiva, tornaram-se resistentes novamente e readquiriram uma parede celular mais espessa (19). Portanto, como o espessamento da parede celular e a resistência à vancomicina estão diretamente relacionados em

amostras de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina, confirma-se a hipótese que o espessamento da parede celular é o maior contribuinte para a resistência de *Staphylococcus aureus* à vancomicina.

Teoricamente, há duas formas diferentes de espessamento das camadas de peptideoglicano. Uma é a produção de quantidade aumentada de peptideoglicano, como é visto no isolado Mu50; e a outra é a redução do "turnover" do peptideoglicano, neste caso, novas camadas de peptideoglicano são sempre produzidas na superfície da membrana citoplasmática e substituem as camadas externas mais velhas, que são eventualmente lançadas para fora da superfície celular. Enzimas autolíticas (enzimas que hidrolisam o peptideoglicano) são envolvidas neste processo de perda (36).

Há outros fatores que contribuem para a resistência à vancomicina no isolado Mu50, ainda que com menor grau que o espessamento da parede celular. A produção aumentada de monômeros de mureína nas células do Mu50 é associada com o decréscimo no nível de glutamato intracelular. A glutamina é consumida pelo aumento da atividade de uma das enzimas chaves (glicosamina 6-fosfato sintetase) na via da síntese de monômeros de mureína. Isto resulta no aumento da síntese de monômeros de mureína estruturalmente alterados (a forma não-amidada) que são substratos inefetivos para a formação da ponte cruzada pelas PBP. O resultado final destes eventos seqüenciais é um aumento da proporção de resíduos de D-alanil-D-alanina nas camadas de peptideoglicano. São encontrados de duas a quatro vezes mais resíduos de D-alanil-D-alanina em unidade de peso de peptideoglicano purificado em uma célula de Mu50 comparados com VSSA, o que significa que uma única célula de Mu50, com o espessamento da parede celular uma a cinco vezes maior, pode reter cerca de três a seis vezes mais moléculas de vancomicina do que um isolado de VSSA (36).

Segundo o estudo de Cui et al. (20), a redução da ligação cruzada do peptideoglicano não é a única causa da resistência aos glicopeptídeos; sua

contribuição é efetiva somente quando o isolado tem um espessamento de parede celular. O espessamento da parede celular é considerado, então, o pré-requisito para a resistência à vancomicina. Neste estudo também foi observado que o monômero de mureína não-amidado tem afinidade de ligação com a vancomicina aumentada comparado com o monômero de mureína normal. Portanto, a produção de monômeros de mureína anormais também contribui para a resistência à vancomicina do isolado Mu50 aumentando a afinidade em reter e bloquear o peptideoglicano misturado com a vancomicina.

As bases genéticas para a heteroresistência à vancomicina ainda não estão bem elucidadas. Já foram identificados alguns genes novos cuja expressão é aumentada ou diminuída nos isolados clínicos Mu3 e/ou Mu50, comparando com isolados sensíveis à vancomicina. Um estudo recente comparou as sequências genômicas dos isolados Mu50 e do N315 (um MRSA sensível à vancomicina muito relacionado ao Mu50 com poucas diferenças fenotípicas incluindo a resistência à vancomicina) e observou-se que 96% das sequências de nucleotídeos eram idênticas entre os dois isolados (46). Kuroda et al. (45) estudaram também genes regulatórios cujas alterações poderiam levar à aceleração da síntese da parede celular do Mu50.

Acredita-se que o elemento carreador do gene *mec*A, o SCC*mec*, não é necessário para a resistência à vancomicina. A deleção deste elemento nos isolados clínicos Mu50, Mu3 e outros isolados h-VRSA japoneses não altera o nível e os perfis de resistência à vancomicina (36). A recente descrição de um isolado MSSA resistente à vancomicina pode indicar que a resistência à vancomicina não está necessariamente associada à resistência à oxacilina (8).

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

(1) Archer GL. *Staphylococcus aureus:* A well-armed pathogen. Clin Infect Dis 1998; 26:1179-1181.

(2) Aucken HM, Warner M, Ganner M, Johnson AP, Richardson JF, Cookson B.D. et al. Twenty months of screening for glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2000; 46:639-640.

(3) Baiocchi SA, Tognim MCB, Baiocchi OCG, Sader HS. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45:149-152.

(4) Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus,* and other catalase positive cocci that grow aerobically. In: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D. C.: ASM Press, 2003: 384-403.

(5) Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol 1961; 14:385.

(6) Barret SP, Mummery RV, Chattopadhyay B. Trying to control MRSA causes more problems than it solves. J Hosp Infect 1998; 39:85-93.

(7) Benner EJ, Kayser FH. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 1968; ii:741-744.

(8) Bobin-Dubreux S, Reverdy M-E, Nervi C, Rougier M, Bolmström A, Vandenesch F et al. Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus s*usceptible to methicillin and in vitro selection of a

vancomycin-resistant derivative. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(1):349-352.

(9) Boutonnier A, Nato F, Bouvet A, Lebrun L, Audurier A, Mazie JC et al. Direct testing of blood culture for detection of the serotype 5 and 8 capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1989; 27(5):989-993.

(10) Bowler I, Storr JA. Costs of endemic MRSA. J Hosp Infect 1998; 40:159.

(11) Boyle-Vavra S, Berke SK, Lee JC, Daum RS. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus c*linical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(2):272-277.

(12) Brumfitt W, Miller JH. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 1989; 320(18):1188-1196.

(13) Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. Morbid Mortal Weekly Rep 1997; 46(27):626-628, 635.

(14) Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States, 1997. Morbid Mortal Weekly Rep 1997; 46(33):765-766.

(15) Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States, 1997. Morbid Mortal Weekly Rep 1997; 46(35):813-815.

(16) Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory capacity to detect antimicrobial resistance, 1998. Morbid Mortal Weekly Rep 2000; 48(51):1167-1171.

(17) Chambers HF. Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10:781-791.

(18) Cookson BD. *Staphylococcus aureus*. In: Emmerson AM, Hawkey PM, Gillespie SH, editors. Principles and pratice of clinical bacteriology. West Sussex, England: John Wiley & Sons, 1997: 109-129.

(19) Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41(1):5-14.

(20) Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(9):2276-2285.

(21) Cunha BA. Vancomycin. Med Clinics North America 1996; 79:817-831.

(22) Diekema DJ, Pfaller MA, Shmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN et al. 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 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32(Suppl 2):S114-S132.

(23) Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States Hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis 1999; 29:239-244.

(24) Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev 1993; 6(4):428-442.

(25) Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Sthaphylococcus, Micrococcus,* and similar organisms. In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, editors. Bailey & Scott´s Diagnostic Microbiology. St Louis: Mosby, 1998: 607-618.

(26) Fridkin SK. Vancomycin-Intermediate and -Resistant *Staphylococcus aureus*: What the Infectious Disease Specialist Needs to Know. Clin Infect Dis 2001; 32:108-115.

(27) Fujino T, Mori N, Kawana A, Kawabata H, Kuratsuji T, Kudo K et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo hospital in 2000. Jpn J Infect Dis 2001; 54:91-93.

(28) Gales AC, Jones RN, Pfaller MA, Gordon KA, Sader HS. Two-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial resistance patterns among organisms isolated from skin and soft tissue infections in Latin American hospitals: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-98. SENTRY Study Group. Int J Infect Dis 2000; 4(2):75-84.

(29) Geisel R, Schmitz F-J, Thomas L, Berns G, Zetsche O, Ulrich B et al. Emergence of heterogeneous intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in the Düsseldorf area. J Antimicrob Chemother 1999; 43:846-848.

(30) Griethuysen AV, Veen AV, Buiting A, Walsh T, Kluytmans J. High Percentage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates with Reduced Susceptibiity to Glycopeptides in The Netherlands. J Clin Microbiol 2003; 41(6):2487-2491.

(31) Hanaki H, Hiramatsu K. Evaluation of reduced vancomycin susceptibility of MRSA strain Mu50 with various conditions of antibiotic susceptibility tests. Jpn J Antibiot 1997; 50(9):794-798.

(32) Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. J Antimicrob Chemother 1998; 42:199-209.

(33) Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakami K, Hiramatsu K. Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. J Antimicrob Chemother 1998; 42(3):315-320.

(34) Hanaki H, Labischinski H, Sasaki K, Kuwahara-Arai K, Inaba Y, Hiramatsu K. Mechanism of vancomycin resistance in MRSA strain Mu50. Jpn J Antibiot 1998; 51(3):237-247.

(35) Hiramatsu K. Vancomycin resistance in staphylococci. Drug Resist Updates 1998; 1:135-150.

(36) Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. The Lancet Infectious Diseases 2001; 1:147-155.

(37) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350:1670-1673.

(38) 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; 40:135-146.

(39) Ike Y, Arakawa Y, Ma X, Tatewaki K, Nagasawa M, Tomita H et al. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Sthaphylococcus aureus s*trains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. J Clin Microbiol 2001; 39(12):4445-4451.

(40) John FJ, Barg NL. *Staphylococcus aureus*. In: Mayhall CG, editor. Hospital epidemiology and infection control. Galveston, Texas: Williams & Wilkins, 1997: 271-289.

(41) Kim M-N, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. J Clin Microbiol 2000; 38(10):3879-3881.

(42) Kloos WE. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. The Staphylococci in Human Disease. New York: Churchill Livingstone Inc., 1997: 113-138.

(43) Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999: 264-282.

(44) Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WCJ. The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organisms. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WCJ, editors. Atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, USA: Lippincott, 1997: 539-576.

(45) Kuroda M, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. Biochem Biophys Res Commun 2000; 269:485-490.

(46) Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2001; 357(9264):1225-1240.

(47) Lewis MT, Gales AC, Sader HS, Pfaller MA, Jones RN. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from latin american patients with a diagnosis of pneumonia: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998). Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 37(1):63-74.

(48) Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1998; 8:557-578.

(49) Lutz L, Machado A, Kuplich N, Barth AL. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary hospital in southern Brazil. Braz J Infect Dis 2003; 7(3):227-231.

(50) Marchese A, Balistreri G, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. Heterogeneous Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Strains Isolated in a Large Italian Hospital. J Clin Microbiol 1999; 38(2):866-869.

(51) Marlowe EM, Cohen MD, Hindler JF, Ward KW, Bruckner DA. Practical strategies for detecting and confirming vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*: a tertiary-care hospital laboratory's experience. J Clin Microbiol 2001; 39(7):2637-2639.

(52) Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mec*A) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30(3):205-214.

(53) McNamara PJ, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. Int J Antimicrob Agents 2000; 14(2):117-122.

(54) Moreira B, Boyle-Vavra S, Jonge BLM, Daum RS. Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(8):1788-1793.

(55) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania. 2000.

(56) Nichols RL. Postoperative infections in the age of drug - resistant Gram-positive bacteria. Am J Med 1998; 104(5A):11S-16S.

(57) Oliveira GA, DeII'Aquila AM, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS, Cui L et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Infect Control Hosp Epidemiol 2001; 22(7):443-448.

(58) Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP, Banerjee S, Henderson TS, Tolson JS et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. Infect Control Hosp Epidemiol 1992; 13(10):582-586.

(59) Paulsen IT, Firth N, Skurray RA. Resistance to antimicrobial agents other than beta-lactams. In: Crossley KB, Archer GL, editors. The staphylococci in human disease. New York, N. Y.: Churchill Livingstone, 1997: 175-212.

(60) Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML et al. Survey of blood stream infections attributable to Gram-positive cocci: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin American from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 33:283-297.

(61) Ploy MC, Grelaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 1998; 351(9110):1212.

(62) Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, Maupin PS, Tenover FC, Hill BC et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin

isolated from a patient with fatal bacteremia. Emerg Infect Dis 1999; 5(1):147-149.

(63) Sanyal D, Johnson AP, George RC, Cookson B.D., Williams AJ. Peritonitis due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Lancet 1991; 337(8732):54.

(64) Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. N Engl J Med 1987; 316(15):927-931.

(65) Shlaes DM, Shlaes JH, Vincent S, Etter L, Fey PD, Goering RV. Teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases expression of penicillin-binding protein 2 complex. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(11):2432-2437.

(66) Sieradzki K, Tomasz A. A highly vancomycin-resistant laboratory mutant of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1996; 142(2-3):161-166.

(67) Sieradzki K, Tomasz A. Inibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus.* J Bacteriol 1997; 179(8):2557-2566.

(68) Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. Arch Intern Med 1941; 68:851-875.

(69) Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Dunn BR et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 1999; 340(7):493-501.

(70) Spink WW, Ferris V. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of staphylococci. Science 1945; 102:221.

(71) Tavares W. Resistência Bacteriana. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos. São Paulo: Editora Atheneu, 2001: 104-113.

(72) Tenover FC. Inplications of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 1999; 43 (Suppl 1):S3-S7.

(73) Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2001; 7(2):327-332.

(74) Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol 1998; 36(4):1020-1027.

(75) Trakulsomboon S, Danchaivijitr S, Rongrungruang Y, Dhiraputra C, Susaemgrat W, Ito T et al. First Report of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin in Thailand. J Clin Microbiol 2001; 39(2):591-595.

(76) Veach LA, Pfaller MA, Barrett M, Koontz FP, Wenzel RP. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. J Clin Microbiol 1990; 28(9):2064-2068.

(77) Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including Toxic Shock Syndrome). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone Inc., 2000: 2069-2092.

(78) Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Ho P, Wootton M, Howe RA et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2001; 39(7):2439-2444.

(79) Wenzel RP, Edmond MB. The Impact of Hospital-Acquired Bloodstream Infections. Emerg Infect Dis 2001; 7(2):174-177.

(80) Wong SSY, Ho PL, Woo PCY, Yuen KY. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. Clin Infect Dis 1999; 29:760-767.

(81) Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. J Antimicrob Chemother 2001; 47:399-403.

OBJETIVOS

Geral

Determinar a prevalência de isolados clínicos de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina em pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Específicos

Descrever o primeiro caso de falha clínica na terapia com vancomicina de uma infecção por *S. aureus* em um paciente internado no HCPA.

Avaliar a resposta *in vitro* à vancomicina de *S. aureus* isolados de pacientes internados no HCPA, usando o método convencional de disco difusão (Kirby-Bauer) e a determinação da concentração inibitória mínima da vancomicina.

Avaliar métodos de triagem para detectar *S. aureus* heteroresistentes à vancomicina (h-VRSA) em pacientes internados no HCPA.

January 7, 2003

Dear Dr. Afonso Luís Barth,

Based on the careful review of your manuscript entitled "*CLINICAL FAILURE OF VANCOMYCIN TREATMENT OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS INFECTION IN A TERTIARY HOSPITAL IN SOUTHERN BRAZIL*", the Editorial Board of the BJID is pleases to accept it for publication in the BJID. as soon as possible you will receive the galley proff for your conference and in which number of BJID the article will be published.

Sincerely yours,

Heloisa Carvalho
Submissions Manager

BJID - The Brazilian Journal of Infectious Diseases
Rua Alfredo Magalhães, n. 04 Barra CEP 40140-140 Salvador-Ba
Telefax (71) 264-2971/3326 - E-mail: bjid@cpunet.com.br

Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary hospital in southern Brazil

Larissa Lutz*, Adão Machado†, Nadia Kuplich† and Afonso Luís Barth*‡

*Unidade de Pesquisa Biomédica, ‡Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia Clínica

†Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Author for correspondence:

Afonso Luís Barth,

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Unidade de Pesquisa Biomédica - Serviço de Patologia Clínica

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre, RS, Brazil,

90.035-003

Phone: (+51) 33168607

FAX: +51 33168310

E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Abstract

We describe a case of clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection and the laboratory characteristics of the organism in a tertiary referral university hospital in southern Brazil. An 11 month old male patient presented with pneumonia and *S. aureus* was isolated from his respiratory tract. Initial treatment with oxacillin and gentamicin was ineffective. Vancomycin was added to the regimen as the patient worsened but after the 30th day of vancomycin treatment *S. aureus* was isolated from the blood with a minimum inhibitory concentration (MIC) for vancomycin of 4 mg/L. After pre-incubation with vancomycin the isolate displayed an increase in the expression of vancomycin resistance and colonies grew in the presence of up to 12 mg/L of vancomycin. Based on these results, and considering that the patient had not responded to vancomycin, the isolate was considered to be *S. aureus* heteroresistant to vancomycin (SAHV). The SAHV proved to be similar, by DNA macrorestriction analysis, to methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) isolates from other patients in the hospital who had responded to vancomycin treatment. Our findings underline the need to improve methods in the clinical laboratory to detect the emergence of clinically vancomycin resistant *S. aureus*. The fact that the isolate emerged in the blood 30 days after of vancomycin treatment was initiated suggests that the organism was originally an MRSA that had acquired the ability to circumvent the mechanism of action of vancomycin.

Key Words: *S. aureus*, resistance, vancomycin.

Introduction

Staphylococcus aureus is one of the most common causes of nosocomial and community acquired infection. Since the emergence of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), the glycopeptide vancomycin has been the only uniformly effective treatment of staphylococcal infections [1]. In May 1996, Hiramatsu and colleagues [2] described the first clinical isolate of *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. One year later, two similar organisms were reported in United States [3]. The main feature of these isolates was that they exhibited decreased susceptibility to vancomycin *in vivo* after prolonged exposure to the drug [2]. The minimal inhibitory concentraction (MIC) of vancomycin was 8 mg/L for these three isolates but other *S. aureus* with a lower MIC for vancomycin (4 mg/L) may also display resistance *in vivo*. The latter are termed *S. aureus* with heteroresistance to vancomycin and have been reported to account for up to 20% of MRSA isolates from Japanese university hospitals [4]. Isolates of *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin were also described elsewhere, including Brazil [5-8]. The presence of such organisms may explain the failure of vancomycin for the treatment of some MRSA infections.

We examined a case of clinical failure of vancomycin treatment of *S. aureus* infection in a tertiary referral university hospital in southern Brazil and we investigated the laboratory characteristics of this bacteria.

Materials and Methods

Bacteriological cultures were prepared according to conventional diagnostic methods. Briefly, blood cultures were performed by the Bactec® system (Becton Dikinson, Sparks, USA) and colonial appearance after subculture on to brain-heart infusion agar containing 5% of sheep blood-BAP (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) was used to screen for staphylococci. *Staphylococcus aureus* was confirmed by the

coagulase test. Isolates were tested for susceptibility to penicillin (10 μg), oxacillin (1 μg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 μg), erythromycin (15 μg), gentamicin (10 μg), clindamycin (2 μg), rifampin (5 μg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 μg) and vancomycin (30 μg) by the disc diffusion method according to NCCLS [9]. The minimal inhibitory concentration (MIC) of amoxicillin-clavulanate, amikacin and vancomycin was determined by the Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). A heavy inoculum of *S. aureus* (adjusted to a turbidity equal to McFarland 2.0) was subcultured on to brain-heart infusion (BHI) agar (Oxoid) containing a range of vancomycin (Sigma, St. Louis, Mo) concentrations [10] in order to test the effect of pre-incubation with vancomycin on the expression of vancomycin resistance by the *S. aureus* isolate. The colonies which grew in the presence of vancomycin were inoculated on to blood agar plates (Oxoid) without vancomycin and incubated at 35°C for 24h. This procedure was repeated daily for 18 days. At days 3, 6, 12 and 18 of passage, vancomycin MIC by Etest was determined. Serial passages were discontinued when the MIC of vancomycin had decreased to the initial MIC [11]. Macrorestriction analysis of chromosomal DNA with *Sma*I followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed as previously described [12].

Case report

An 11 month old male patient was admitted to the Paediatric Intensive Care Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre in June 1998. The infant presented with secondary sepsis due to pneumonia at admission. *Staphylococcus aureus* was isolated from pleural fluid and oxacillin (200 mg/kg/day) and gentamicin (75 mg/kg/day) were given, since the isolate displayed *in vitro* susceptibility to these antibiotics. Despite treatment, the patient developed septicaemia and multiple organ failure, and after ten days *S. aureus*, susceptible only to vancomycin and rifampin, was recovered from a tracheal aspirate. Oxacillin was replaced by vancomycin (60 mg/kg/day), however

rifampin was not used as the patient had significant hepatic dysfunction. After 25 days of vancomycin treatment the patient worsened and *S. aureus* was again isolated from the blood. The dose of vancomycin was increased to achieve a serum concentration of maximum recommended levels (10 mg/L at trough and 40 mg/L at peak). After a short period of clinical improvement, the patient again worsened and *S. aureus* was isolated from the blood on the 30th day of vancomycin treatment. This isolate remained resistant to oxacillin and susceptible to vancomycin according to the disc diffusion method. The MIC of vancomycin proved to be 3 mg/L by the Etest, but was reported as 4 mg/L according to the recommendation of the manufacturer. The Public Health Laboratory Service (PHLS) in London, UK, confirmed that the isolate was a MRSA based on the presence of *mec*A gene and that the MIC for vancomycin was 4 mg/L by microdilution method. At this point vancomycin was administered in continuous infusion to obtain constant serum levels of 30 to 40 mg/L. Amikacin was administered in a single daily dose of 20 mg/kg, because at the peak of the infusion serum levels were 68 mg/L, higher than the MIC for this *S. aureus* (62 mg/L). Amoxicillin-clavulanate was administered in four daily doses of 50 mg/L, because the serum level obtained by this mode of administration (120 mg/L at the peak) was also higher than the MIC for the organism (32 mg/L). The patient stabilised and amikacin was withdrawn from the treatment after 21 days. After 107 days of vancomycin treatment, the patient left the hospital with serious pulmonary sequels. He was tracheostomized and in the ensuing months had numerous respiratory problems. His left lung, which was strongly damaged, was removed although the right lung also had significant residual lesions. The patient was re-admitted to hospital in May 2000 but he subsequently died of pneumothorax. From the time of the first admission of the patient to our hospital, no bacterium, other than *S. aureus*, was obtained from the microbiological cultures of the specimens that were collected.

Laboratory findings

The *S. aureus* obtained from the blood culture of the patient after 30 days of vancomycin treatment displayed a heterogeneous colonial morphology on BAP (Figure 1). The isolate was considered susceptible to vancomycin, but it was resistant to all other antibiotics according to the disc diffusion method, and the MIC for vancomycin was 4 mg/L. After pre-incubation with vancomycin the isolate increased the expression of vancomycin resistance and the colonies grew in the presence of up to 12 mg/L of vancomycin (Figure 2). The colonies were further inoculated onto blood agar plates without vancomycin for 18 days and at days 3, 6, 12 and 18 of passage vancomycin MIC by Etest was 12, 8, 8 and 2 mg/L, respectively. According to these results the isolate was considered to be a *S. aureus* heteroresistant to vancomycin (SAHV).

The PFGE pattern of *Sma*I – digested genomic DNA of this SAHV was compared with DNA digests of MRSA from three other patients hospitalised during the same period, who had responded satisfactorily to vancomycin treatment. The DNA patterns were very similar (Figure 3) as the SAHV differed from the three MRSA by less than six bands [13].

Discussion

We have described the characteristics of a *S. aureus* isolate obtained from a patient who did not respond to vancomycin treatment. It has been suggested that therapeutic failure of vancomycin treatment is associated with low level resistance, or heteroresistance, to vancomycin [6]. The *S. aureus* described here displayed a borderline MIC for vancomycin and was considered susceptible to vancomycin by the disc diffusion method. This is a case for concern [14]. The routine susceptibility tests did not correlate with the clinical resistance of the isolate. Neither the disc diffusion nor the MIC determination proved to be good parameters for the detection of *S. aureus*

with reduced susceptibility to vancomycin. This suggests that it is necessary to improve clinical methodology to detect the emergence of *S. aureus* clinically resistant to vancomycin. We were able to increase the vancomycin resistance in our isolate by passing it through increasing concentrations of this antibiotic. After serial passaging in the media with vancomycin, the *S. aureus* was able to grow in the presence of up to 12 mg/L of the antibiotic; the MIC reverted to a level lower than the original (4 mg/L), after multiple passage of the isolate in medium free of the vancomycin. This profile is compatible with that of isolates that have been classified as heteroresistants [11]. This method may not be specific for detection of heteroresistant *S. aureus* and has to be used with caution for isolates that are not involved with clinical failure of vancomycin therapy [15]. However, if the phenomenon of vancomycin resistance after pre-incubation also occurs *in vivo*, it may explain the therapeutic failure of vancomycin treatment in this case.

On the other hand, the SAHV described in this study was very similar in DNA patterns to other MRSA from our hospital that were clinically susceptible to vancomycin. This finding, taken together with the fact that the *S. aureus* was obtained from the patient's blood after 30 days of vancomycin treatment, indicates that the bacterium was originally an MRSA that acquired the ability to circumvent the mechanism of action of vancomycin.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Tyrone L. Pitt for critical review of the manuscript. We also thank the staff of Central Public Health Laboratory, Colindale, UK, for confirming the MIC of vancomycin and PCR detection of the *mec*A gene in the isolate.

References

1. Pfaller M.A., Jones R.N., Doern G.V. et al. The SENTRY Participants Group. Survey of blood stream infections attributable to Gram-positive cocci: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin American from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis **1999**; 33: 283-97.

2. Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T. et al. Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother **1997**; 40: 135-46.

3. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomicyn - United States, 1997. Morbid Mortal Weekly Rep **1997**; 46: 765-6.

4. Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet **1997**; 350: 1670-3.

5. Turco T.F., Melko G.P., Williams J.R. Vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Pharmacother **1998**; 32: 758-60.

6. Ploy M.C., Grelaud C., Martin C. et al. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet **1998**; 351: 1212.

7. Rotun S.S., McMath V., Schoonmaker D.J. et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. Emerg Infect Dis **1999**; 5: 147-9.

8. Oliveira G.A., DeII'Aquila A.M., Masiero R.L. et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Infect Control Hosp Epidemiol **2001**; 22: 443-8.

9. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighth Informational Supplement M100-S8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, **1998**.

10. Howe R.A., Wootton M., Walsh T.R. et al. Expression and detection of hetero-vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother **1999**; 44: 675-8.

11. Boyle-Vavra S., Berke S.K., Lee J.C., Daum R.S. Reversion of the Glycopeptide Resistance Phenotype in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother **2000**; 44: 272-7.

12. Kaufmann M.E., Pitt T.L. Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. In: Chart H., ed. Methods in Practical Laboratory Bacteriology. London: CRC Press. **1994.**

13. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol **1995**; 33: 2233-9.

14. Tenover F.C., Lancaster M.V., Hill B.C. et al. Characterization of Staphylococci with Reduced Susceptibilities to Vancomycin and Other Glycopeptides. J Clin Microbiol **1998**; 36: 1020-7.

15. Aucken H.M., Warner M., Ganner M. et al. Twenty months of screening for glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother **2000**; 46: 639-40.

FIGURE 1: Colonial morphology of *Staphylococcus aureus* heteroresistant to vancomycin (SAHV) on brain-heart infusion agar containing 5% sheep blood.

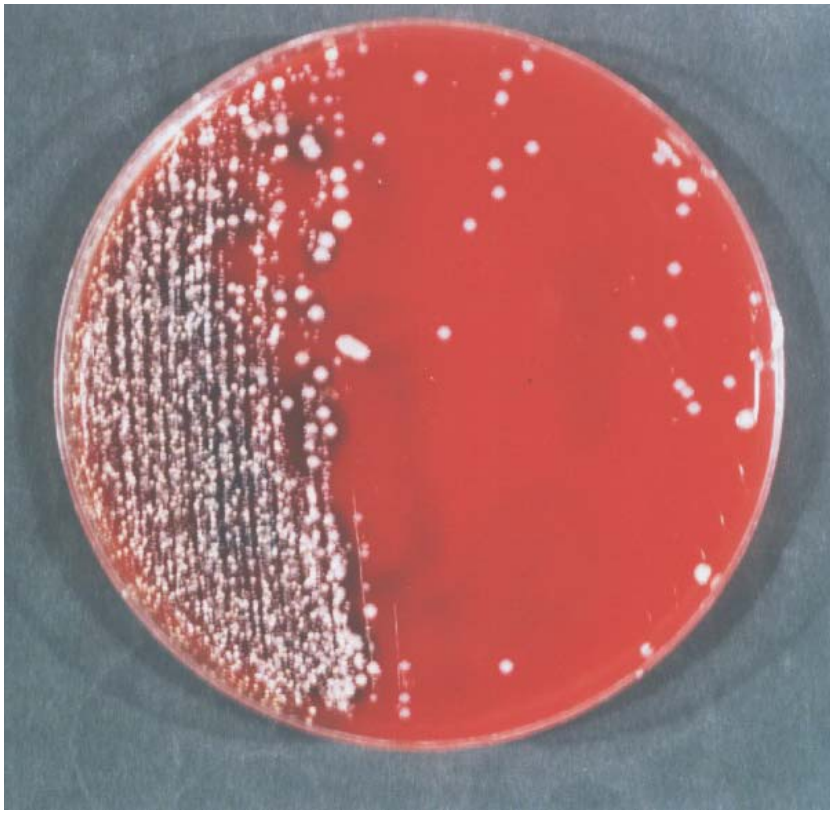


FIGURE 2: Minimum inhibitory concentration of vancomycin (mg/L) for *Staphylococcus aureus* heteroresistant to vancomycin (SAHV) after pre-incubation with vancomycin.

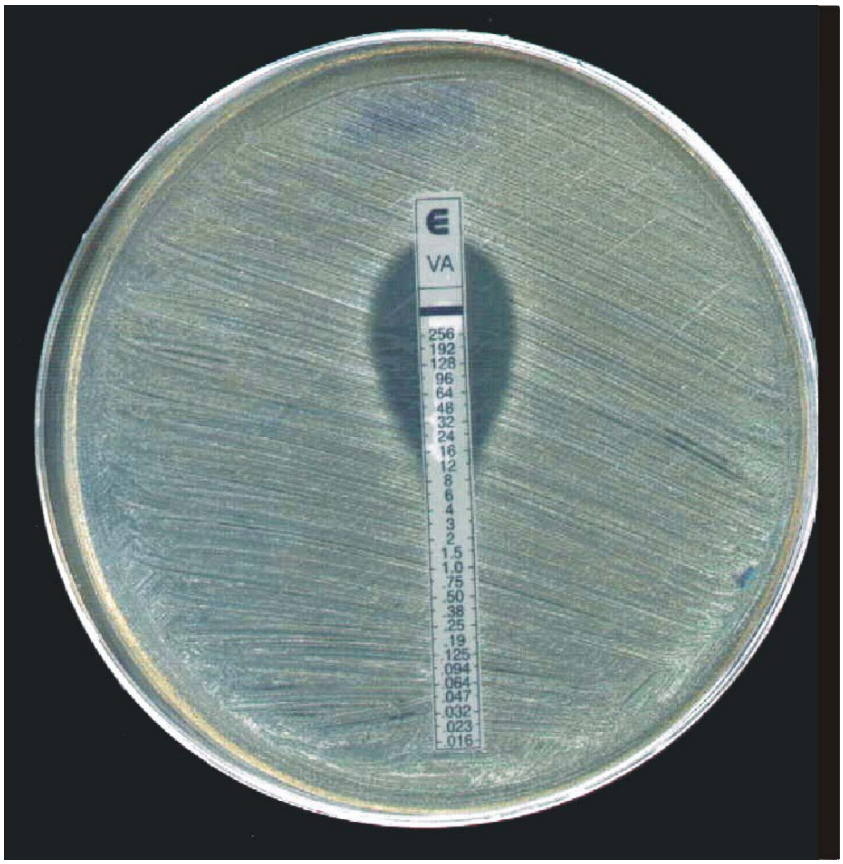
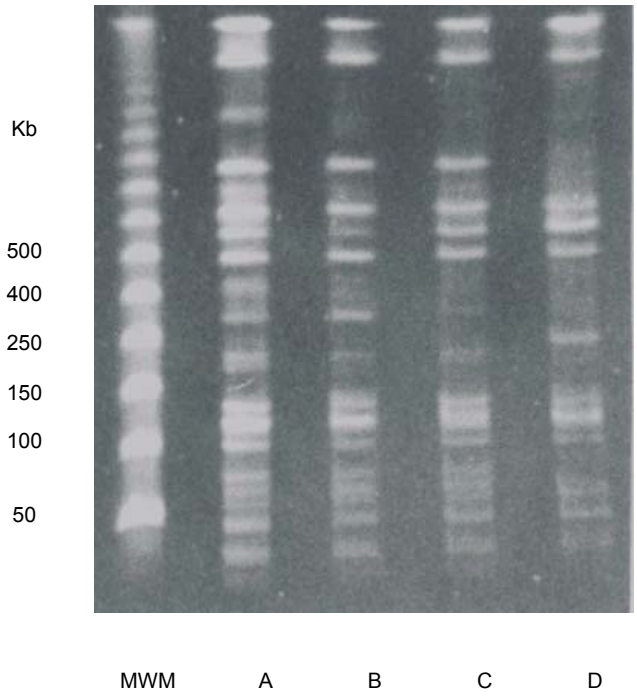


FIGURE 3: Macrorestriction profile of *Staphylococcus aureus* heteroresistant to vancomycin - SAHV (D) and three methicillin resistant *S. aureus* - MRSA (A, B and C) isolates from inpatients at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. MWM = Molecular Weight Marker (lambda ladder of 48.5Kb).



Versão em português do artigo: "Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary hospital in southern Brazil"

Falha clínica no tratamento de infecção por *Staphylococcus aureus* com vancomicina em um hospital terciário no sul do Brasil

Resumo

Descrevemos um caso de falha clínica do tratamento com vancomicina de uma infecção por *Staphylococcus aureus* e as características laboratoriais do microrganismo em um hospital terciário universitário de referência no sul do Brasil. O paciente de 11 meses de idade apresentava pneumonia e *S. aureus* foi isolado do trato respiratório. O tratamento inicial com oxacilina e gentamicina foi inefetivo. Vancomicina foi adicionada ao regime tão logo o paciente piorou mas, após o trigésimo dia de tratamento com vancomicina, *S. aureus* foi isolado do sangue com uma concentração inibitória mínima (MIC) da vancomicina de 4 mg/L. Após a pré-incubação com vancomicina, o isolado apresentou um aumento na expressão da resistência à vancomicina e colônias cresceram na presença de mais de 12 mg/L de vancomicina. De acordo com estes resultados, e considerando que o paciente não respondeu ao tratamento com vancomicina, o isolado foi considerado como *S. aureus* heteroresistente à vancomicina (SAHV). O SAHV apresentou-se similar, pela análise de macrorestrição do DNA, aos *S. aureus* resistentes á meticilina (MRSA) isolados de outros pacientes hospitalizados, que responderam ao tratamento com vancomicina. Nossos achados reforçam a necessidade de aprimorar os métodos laboratoriais para detectar a emergência de *S. aureus* clinicamente resistentes à vancomicina. O fato do isolado emergir no sangue 30 dias após o início do tratamento com vancomicina, sugere que o microrganismo era originalmente um MRSA que adquiriu a habilidade de driblar o mecanismo de ação da vancomicina.

Introdução

Staphylococcus aureus é uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Desde a emergência de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), o glicopeptídeo vancomicina tem sido o tratamento uniformemente efetivo contra infecções estafilocócicas [1]. Em maio de 1996, Hiramatsu e colegas [2] descreveram o primeiro isolado clínico de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina. Um ano após, dois microrganismos similares foram descritos nos EUA [3]. O principal fator em comum destes isolados era que eles exibiram decréscimo da suscetibilidade à vancomicina *in vivo* após prolongada exposição a este antibiótico [2]. A concentração inibitória mínima (MIC) da vancomicina foi de 8 mg/L para estes três isolados, mas outro *S. aureus* com um MIC mais baixo da vancomicina (4 mg/L) também apresentou resistência *in vivo*. Este último foi determinado como *S. aureus* com heteroresistência à vancomicina e tem sido relatado que este tipo de isolado pode somar mais que 20% dos MRSA isolados em hospitais universitários japoneses [4]. *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina também foram descritos em outras partes do mundo, incluindo o Brasil [5-8]. A presença de tais microrganismos pode explicar a falha da vancomicina no tratamento de algumas infecções por MRSA.

Examinamos um caso de falha clínica no tratamento com vancomicina de uma infecção por *S. aureus* em um hospital terciário universitário de referência no sul do Brasil, e investigamos as características laboratoriais desta bactéria.

Materiais e Métodos

As culturas bacterianas foram realizadas de acordo com métodos de diagnóstico convencionais. Brevemente, hemoculturas foram processadas pelo sistema Bactec® (Becton Dikinson, Sparks, USA) e a aparência colonial após

subcultura em agar “brain-heart infusion” contendo 5% de sangue de carneiro - BAP (Oxoid, Basingstoke, UK) foi utilizada como triagem para estafilococos. *S. aureus* foi confirmado pelo teste da coagulase. Os isolados foram testados para a suscetibilidade à penicilina (10 μg), oxacilina (1 μg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 μg), eritromicina (15 μg), gentamicina (10 μg), clindamicina (2 μg), rifampicina (5 μg), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 μg) e vancomicina (30 μg) pelo método de disco difusão de acordo com o NCCLS [9]. A concentração inibitória mínima (MIC) da amoxicilina-clavulanato, amicacina e vancomicina foi determinada pelo Etest (AB Biodisk, Solna, Suécia). Para testar o efeito da pré-incubação com vancomicina na expressão da resistência do *S. aureus* à vancomicina, um inóculo bacteriano concentrado (ajustado a uma turbidez equivalente à 2,0 de McFarland) foi subcultivado em agar “brain heart infusion” (BHI) (Oxoid) contendo concentrações graduais de vancomicina (Sigma, St. Louis, Mo) [10]. As colônias que cresceram em presença de vancomicina foram inoculadas em placas de agar sangue (Oxoid) sem vancomicina e incubadas a 35°C por 24 h. Este procedimento foi repetido por 18 dias. Nos dias 3, 6, 12 e 18 de passagens, o MIC da vancomicina foi determinado pelo Etest. As passagens seriadas foram descontinuadas quando o MIC da vancomicina decresceu ao MIC inicial [11]. A análise de DNA cromossomal por macrorestrição com *Sma*I seguida de eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE) foi realizada conforme descrito previamente [12].

Caso clínico

Um paciente de 11 meses de idade foi admitido na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em junho de 1998. O paciente apresentou sepsis secundária à pneumonia, no momento da admissão. *S. aureus* foi isolado do líquido pleural e oxacilina (200 mg/kg/dia) e gentamicina (75 mg/kg/dia) foram administradas, já que o isolado apresentou sensibilidade *in vitro*

a estes antibióticos. Apesar do tratamento, o paciente desenvolveu septicemia e falha de múltiplos órgãos e, após dez dias, *S. aureus* sensível somente à vancomicina e rifampicina, foi recuperado do aspirado traqueal. A oxacilina foi substituída pela vancomicina (60 mg/kg/dia), porém rifampicina não foi utilizada pois o paciente apresentava disfunção hepática significativa. Após 25 dias de tratamento com vancomicina, o paciente apresentou piora clínica e *S. aureus* foi novamente isolado, desta vez, do sangue do paciente. A dose da vancomicina foi aumentada para alcançar uma concentração sérica nos níveis máximos recomendados (10 mg/L no vale e 40 mg/L no pico). Após um curto período de melhora clínica, o paciente novamente piorou e *S. aureus* foi isolado no sangue no trigésimo dia de tratamento com vancomicina. Este isolado permaneceu resistente à oxacilina e sensível à vancomicina de acordo com o método de disco difusão. O MIC da vancomicina foi de 3 mg/L pelo Etest, mas foi reportado como 4 mg/L de acordo com as recomendações dos fabricantes. O "Public Health Laboratory Service (PHLS)" em Londres, UK confirmaram que o isolado era um MRSA, baseado na presença do gene *mec*A, e que o MIC da vancomicina foi 4 mg/L pelo método de microdiluição. Neste momento, a vancomicina foi administrada em infusão contínua para manter os níveis séricos constantes em 30 a 40 mg/L. A amicacina foi administrada em dose única de 20 mg/kg, pois o pico dos níveis de infusão sérica era de 68 mg/L, mais elevado que o MIC para este *S. aureus* (62 mg/L). Foram administradas quarto doses diárias de 50 mg/L de amoxicilina-clavulanato, pois o nível sérico obtido por este modo de administração (120 mg/L no pico) foi também mais elevado que o MIC para este microrganismo (32 mg/L). O paciente estabilizou-se e a amicacina foi retirada do tratamento após 21 dias. Após 107 dias de tratamento com vancomicina, o paciente deixou o hospital com sérias seqüelas pulmonares. Ele foi traqueostomizado e teve numerosos problemas respiratórios nos meses seguintes. O seu pulmão esquerdo, que estava grosseiramente danificado, foi removido, apesar do pulmão direito também

apresentar lesões residuais significativas. O paciente foi readmitido no hospital em maio de 2000, porém foi subseqüentemente a óbito por pneumotórax. Desde a primeira admissão do paciente em nosso hospital, nenhuma bactéria, além de *S. aureus*, foi obtida de culturas microbiológicas dos materiais clínicos coletados.

Achados Laboratoriais

O *S. aureus* obtido da hemocultura do paciente após 30 dias de tratamento com vancomicina apresentou morfologia colonial heterogênea no BAP (Figura 1). O isolado foi considerado sensível à vancomicina mas resistente a todos os demais antibióticos testados de acordo com o método de disco difusão, e o MIC da vancomicina foi de 4 mg/L. Após a pré-incubação com vancomicina, o isolado apresentou um aumento na expressão da resistência à vancomicina e colônias cresceram na presença de mais de 12 mg/L de vancomicina (Figura 2). As colônias foram então inoculadas em placas de agar sangue sem vancomicina por 18 dias e nos dias 3, 6, 12 e 18 de passagens o MIC da vancomicina pelo Etest foi de 12, 8, 8 e 2 mg/L, respectivamente. De acordo com estes resultados, o isolado foi considerado como *S. aureus* heteroresistente à vancomicina (SAHV).

O padrão de digestão de DNA genômico com *Sma*I por PFGE do SAHV foi comparado com os padrões de digestão de MRSA de três outros pacientes hospitalizados durante o mesmo período e que responderam satisfatoriamente ao tratamento com vancomicina. Os padrões de digestão de DNA foram muito similares (Figura 3), sendo que o SAHV diferiu dos outros isolados por menos de 6 bandas [13].

Discussão

Descrevemos as características de um *S. aureus* obtido de um paciente que não respondeu ao tratamento com vancomicina. Tem sido sugerido que falhas terapêuticas no tratamento com vancomicina estão associadas a baixos níveis de

resistência ou heteroresistência à vancomicina [6]. O *S. aureus* descrito apresentou um MIC “borderline” para a vancomicina e foi considerado sensível à vancomicina pelo método de disco difusão. Este é um caso a ser considerado [14]. Os testes de suscetibilidade de rotina não correlacionam-se com a resistência clínica do isolado. O método de disco difusão e a determinação do MIC não parecem ser bons parâmetros para a detecção de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina. Isto sugere que é necessário aprimorar as metodologias clínicas para detectar a emergência de *S. aureus* clinicamente resistente à vancomicina. Foi utilizado neste estudo um método para aumentar a resistência à vancomicina em nosso isolado, passando-o em concentrações crescentes de antibiótico. Após as passagens seriadas em meio contendo vancomicina, o *S. aureus* foi capaz de crescer na presença de mais de 12 mg/L do antibiótico, e o MIC reverteu-se a níveis abaixo do original (4 mg/L) após as múltiplas passagens do isolado em meio livre de vancomicina. Este perfil é compatível com isolados que têm sido classificados como heteroresistentes [11]. Este método pode não ser específico para detecção de *S. aureus* heteroresistente à vancomicina e deve ser usado com cautela para isolados que não estão envolvidos com falha clínica da terapia com vancomicina [15]. Contudo, pode-se especular que se o fenômeno da resistência à vancomicina após a pré-incubação também ocorre *in vivo*, isso pode explicar a falha clínica da terapia com vancomicina neste caso.

Por outro lado, o SAHV descrito neste estudo apresentou um padrão de digestão de DNA muito similar aos padrões de outros MRSA do nosso hospital que apresentavam-se clinicamente sensíveis à vancomicina. Este achado, juntamente com o fato de que o *S. aureus* foi obtido do sangue do paciente após 30 dias de tratamento com vancomicina, indica que a bactéria era originalmente um MRSA que adquiriu a habilidade de driblar o mecanismo de ação da vancomicina.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Dr. Tyrone L. Pitt pela revisão crítica do manuscrito. Nós também agradecemos à equipe do “Central Public Health Laboratory”, Colindale, UK, pela confirmação do MIC da vancomicina e pela detecção do gene *mec*A por PCR no isolado.

FIGURA 1: Morfologia colonial do *Staphylococcus aureus* heteroresistente à vancomicina (SAHV) no agar “brain-heart infusion” contendo 5% de sangue de carneiro.

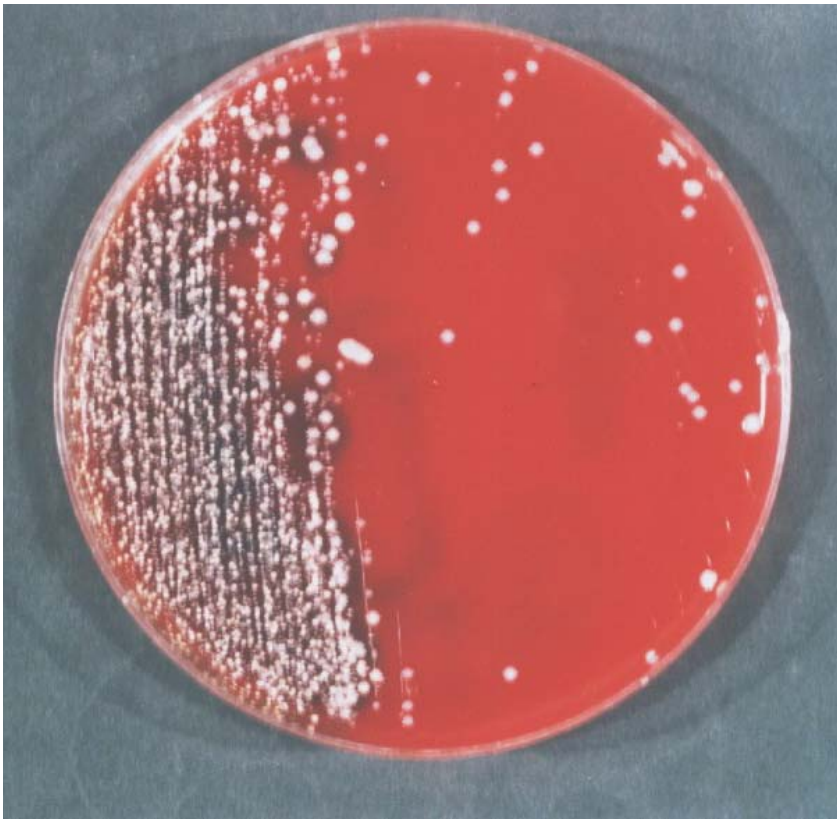


FIGURA 2: MIC da vancomicina (mg/L) do *Staphylococcus aureus* heteroresistente à vancomicina (SAHV) após a pré-incubação com vancomicina.

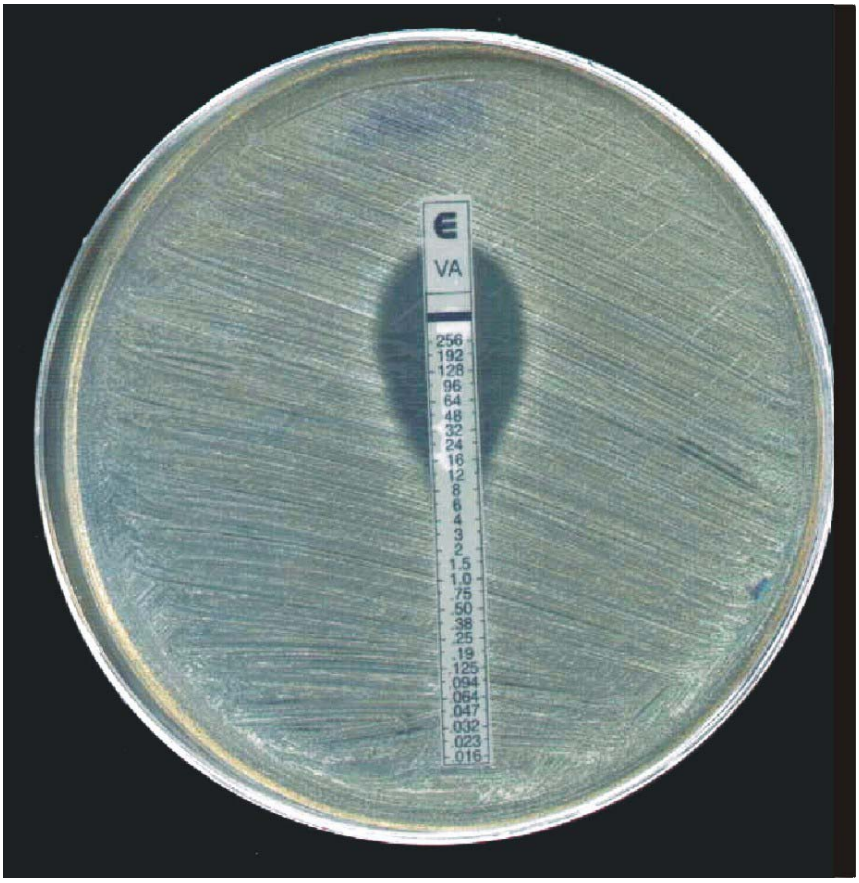
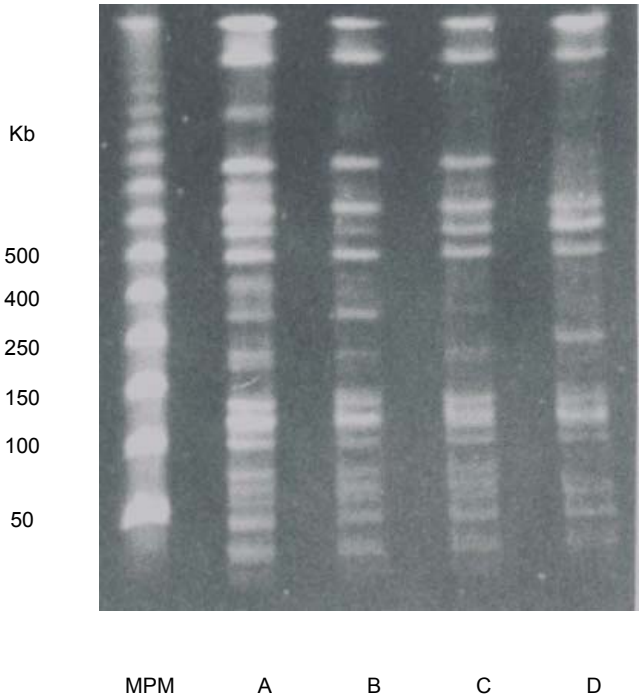


FIGURA 3: Perfis de macrorestrição do *Staphylococcus aureus* heteroresistente à vancomycin - SAHV (D) e três *S. aureus* resistentes à meticilina - MRSA (A, B e C) obtidos de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. MPM = Marcador de Peso Molecular (lambda ladder de 48,5Kb).



De: Christine.L.Perry@gsk.com [mailto:Christine.L.Perry@gsk.com]

Enviada em: terça-feira, 19 de agosto de 2003 10:31

Para: albarth@hcpa.ufrgs.br

Assunto: Journal of Infection Ref: M/S 237/03

Dear Afonso Luis Barth

Re: **237/03**

Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin at a university hospital in Southern Brazil

We confirm receipt of the above Manuscript.

This is being reviewed by our editorial board and we will be in contact with you in due course.

Please use the reference number on all future correspondence.

Yours sincerely

Steve Myint

Editor-in-Chief

Susan Aitken/Christine Perry

Administrator - Journal of Infection

01279 644974/644257

Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin at a university hospital in southern Brazil

Running title: Vancomycin Susceptibility of *S. aureus*

Larissa Lutz‡* and Afonso Luís Barth‡*

‡Unidade de Microbiologia, *Unidade de Pesquisa Biomédica - Serviço de Patologia Clínica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Author for correspondence:

Afonso Luís Barth,

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Unidade de Pesquisa Biomédica - Serviço de Patologia Clínica

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre, RS, Brazil,

90.035-003

Phone: (+51) 33168607

FAX: +51 33168310

E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Objectives: To evaluate the *in vitro* response of *Staphylococcus aureus* to vancomycin using the conventional disc diffusion test and standard minimal inhibitory concentration (MIC) determination as well as to evaluate the screening methods to detect heterogeneously vancomycin-resistant *S. aureus* (h-VRSA) from inpatients at a Brazilian university hospital. **Methods:** Vancomycin MIC was determined using the Etest method for 369 *S. aureus* isolates. h-VRSA screening was performed using a simplified population analysis method and Etest macromethod (Etest-M). h-VRSA cell wall thickness was evaluated after transmission electron microscopy (TEM). Vancomycin previous use was established after retrospective evaluation of patients data records. **Results:** No vancomycin intermediate (VISA) and vancomycin resistant (VRSA) *S. aureus* were identified among isolates. MIC values ranged from 0.25 to 3.0 mg/L by Etest. Three isolates displayed a vancomycin MIC $\geq$ 8 mg/L after vancomycin screening plate, and none had the MIC confirmed after 9 days in drug-free medium. The morphometric study using TEM showed that selected strain cell wall was thicker that control strain cell wall. Fourteen isolates presented a vancomycin MIC $\geq$ 8 mg/L by Etest-M. Only three patients with these selected strains received vancomycin previously. **Conclusion:** h-VRSA routine screening may not be recommended if no clinical data are available to assess the significance of heteroresistance.

Key words

S. aureus, vancomycin, VISA, h-VRSA, VRSA.

Introduction

Staphylococcus aureus is one of the most common causes of both nosocomial and community-acquired infections, which may present high rates of mortality (1). In addition to its virulence, *S. aureus* has demonstrated an impressive ability to become resistant to nearly all antistaphylococcal agents used in clinical practice (2). Resistance to penicillin (due to the production of β-lactamase) was reported in isolates of *S. aureus* soon after the clinical use of this antibiotic and became commonplace by the 1950s (3). The development of β-lactam-stable penicillins did not change this scenario as *S. aureus* resistant to these antibiotics (methicillin-resistant *S. aureus* [MRSA]) were reported in 1961 (4). In the 1980s, because of the widespread occurrence of MRSA, vancomycin became the drug of choice for treatment of nosocomial infections caused by *S. aureus* resistant to methicillin (5). In 1996, *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin (vancomycin intermediate *S. aureus* [VISA]) was reported in Japan (6). One year later, another two cases were described in the United States (Michigan and New Jersey) (7-9) and soon thereafter a third case was reported in New York (10). Subsequent reports of such isolates were described worldwide (France (11), Italy (12), Korea (13), Thailand (14) and Brazil (15)) and this indicates that the emergence of *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin has become a global issue (16).

Although vancomycin therapy appears to have failed in most of the patients infected with these organisms, there is considerable controversy about whether such staphylococci should be designated as resistant to this antibiotic, since the levels of vancomycin required to inhibit the growth of these isolates remained relatively low (8 mg/L). As a matter of fact, the terminology for staphylococci with reduced susceptibility to vancomycin needs further refinement, as different breakpoints are used

to establish resistance (17;18). Moreover, a variety of non-standardized laboratory methods have been adopted to detect the decrease of susceptibility to vancomycin (19;20).

In addition, the expression “heteroresistant VRSA” (h-VRSA) was used to denote isolates of *S. aureus* with a subpopulation that is able to grow on a screening agar plate containing 4 mg/L of vancomycin. h-VRSA is considered definite if the vancomycin broth microdilution MIC of its subpopulation is at least 8 mg/L. It has been described that h-VRSA are widely disseminated and account for 5 to 26% of the MRSA clinical isolates obtained from Japanese university hospitals (21), although these percentages were not confirmed by other Japanese authors (22;23). Other authors considered *S. aureus* as h-VRSA when they display a vancomycin MIC $\geq$ 8 mg/L using the Etest macromethod (Etest-M) that utilizes a rich medium and a heavy inoculum of the isolate (24-26).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* response of *S. aureus* to vancomycin using the conventional disc diffusion test (Kirby-Bauer) and standard MIC determination as well as to evaluate the screening methods for heteroresistant VRSA detection for inpatients at a tertiary university hospital in southern Brazil (Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Materials and Methods

Bacterial isolates. A total of 369 *S. aureus* clinical isolates was obtained from blood cultures of inpatients at Hospital de Clínicas de Porto Alegre between May 1999 and April 2001. Only one isolate per patient within a three-day interval was included in the study. Blood cultures were performed using the Bactec® system (Becton Dikinson, Sparks, USA). The positive blood cultures were subcultured onto a tryptic soy agar containing 5% of sheep blood - BAP (Oxoid, Basingstoke, UK). Colonial appearance on

BAP, Gram stain and the catalase test were used to screen for staphylococci and *S. aureus* was identified by a positive result in the coagulase test (27).

Antibiotic susceptibility tests. The isolates were tested for susceptibility to penicillin (10 μg), oxacillin (1 μg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 μg), erythromycin (15 μg), gentamicin (10 μg), clindamycin (2 μg), rifampin (5 μg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 μg), teicoplanin (30 μg) and vancomycin (30 μg) (Oxoid) by the disc diffusion method using Mueller-Hinton (MH) agar (Difco Laboratory, Detroid, Mich.) according to "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) (17).

The standard Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden) using MH agar, an inoculum adjusted to a turbidity equal to McFarland 0.5 and incubation at 35°C for 24 hours was performed to determine the vancomycin MIC. MIC results using this method were interpreted according to NCCLS breakpoints (17).

Screening for VISA and h-VRSA. To screen isolates with reduced susceptibility to vancomycin, we adopted a simplified method of population analysis according to Hiramatsu et al. (21). This method was performed in duplicate using a volume of 10 μL of 10^8 CFU/mL inoculated onto a brain-heart infusion (BHI) agar plate (Oxoid) containing 4 mg/L of vancomycin (Sigma, St. Louis, Mo). The plates were incubated at 35°C and the cell growth was inspected at 24 and 48 h. If confluent growth appeared within 24 h, the isolate would be considered a potential VISA isolate. If cell growth not appeared within 48 h, the isolate would be considered susceptible to vancomycin (VSSA). The isolate would be designated as a possible h-VRSA if a countable number of colonies was appeared within 48 h. h-VRSA status would be considered definite if the isolate produced subclones with a vancomycin MIC $\geq$ 8 mg/L (standard Etest), and with MIC stability persisting beyond 9 days in a drug-free medium (21).

Screening for h-VRSA was also performed by the Etest macromethod (Etest-M) using BHI agar (Oxoid), a heavy inoculum (McFarland 2.0) of the isolate, and 48 hours of incubation at 35°C as previously described (24). Vancomycin MIC $\geq$ 8 mg/L was used to indicate h-VRSA in this method (25).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Macrorestriction analysis of chromosomal DNA followed by PFGE was performed as previously described (28). The DNA was digested with the enzyme *Sma*I (Gibco BRL, USA) and electrophoresis was performed for 22 h with a DRII countor-clamped homogenous electric field apparatus (Bio-Rad, Richmond, USA) with a pulse time of 5 to 60 s. A lambda ladder (48.5 Kb, Sigma, USA) was used as a molecular weight marker. The separated DNA fragments were photographed after staining with ethidium bromide and the comparison of macrorestriction profiles was performed by visual analysis according to Tenover et al. (29).

Transmission electron microscopy. Cells in the logarithmic growth phase were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.12 M sodium phosphate buffer and treated with 2% osmium tetroxide. Cells were dehydrated with graded concentrations of acetone, and embedded in Durcupan ACM, Epoxy Resin (EMS, Fort Washington, PA). Ultra-thin sections were stained with 2% aqueous uracyl acetate and lead citrate, and then examined with a transmission electron microscope JEM 1200 EX II (JEOL, Peabody, Massachussetts, USA) (30).

Morphometric evaluation of cell wall thickness was performed by using photographs of images obtained at a final magnification of x 40,000. The cell wall thicknesses of 30 cells of each isolate, with nearly equatorially cut surfaces, were measured using Carnoy 2.0 Image Analysis Program (Lab of Plant Systematics K.U. Leuven, Flanders, Belgium), and the results were expressed as the mean $\pm$ SD (31).

Previous use of vancomycin. The previous use of vancomycin was established after retrospective evaluation of the patients data records.

Quality control. *S. aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 29213 were used for quality control of disc diffusion and standard Etest methods, respectively. *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 and a clinical isolate of *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin were used as quality control of the vancomycin screening plates. *S. aureus* ATCC 25923 was submitted to transmission electron microscopy and used in the morphometric evaluation of cell wall thickness.

Results

The susceptibility tests by disc diffusion and the minimal inhibitory concentration (MIC) by standard Etest method were performed for the 369 *S. aureus* isolates. A total of 218 (60.7%) isolates was susceptible to oxacillin (MSSA) but 141 (39.3%) isolates proved to be resistant (MRSA). We were not able to evaluate the susceptibility of oxacillin for 10 isolates. The majority of MRSA (41.9%) was susceptible only to rifampin and vancomycin, but 41.1% of MRSA was susceptible only to vancomcycin. Moreover, all isolates were susceptible to vancomycin (zone inhibition diameters ranging from 15 to 30 mm) according to the disc diffusion method. The majority of the isolates was susceptible to teicoplanin, although seven isolates displayed intermediate zone inhibition values (zone inhibition diameters ranging from 12 to 30 mm) according the disc diffusion method.

The vancomycin MIC by standard Etest ranged from 0.25 to 3.0 mg/L and most isolates (46.1%) displayed a vancomycin MIC of 1.5 mg/L. Therefore, according to the NCCLS breakpoints of MIC, all isolates were also confirmed to be susceptible to vancomycin.

We have compared the values of vancomycin MIC by standard Etest with the values of teicoplanin and vancomycin zone inhibition diameters in the disc diffusion test. Although the 369 isolates of *S. aureus* were not classified as resistant to vancomycin or teicoplanin, only a weak inverse correlation was possible to be

observed between vancomycin MIC and zone inhibition diameters of both discs (Pearson Correlation Coefficient: r= -0.3225 and P<0.001 for vancomycin, r = -0.3282 and P<0.001 for teicoplanin).

Screening for heterogeneously vancomycin-resistant *S. aureus* by a simplified method of population analysis was performed randomly and in duplicate for 142 isolates of *S. aureus*. No isolate displayed confluent growth within 24 h of incubation on BHI agar with 4 mg/L of vancomycin, although one to 100 colonies were seen on the screening plate for 18 isolates (12 MRSA, 5 MSSA and one without this data) after 48 h. The latter were considered as possible h-VRSA and their vancomycin MIC were established (standard Etest). Only three isolates (all MRSA) displayed a MIC ≥ 8 mg/L and were termed selected strains (with suffix S). Comparison of the PFGE patterns of the three selected strains (195-S, 202-S, 242-S) with their parent isolates demonstrated that each pair displayed undistinguishable banding patterns. Moreover, the morphometric study of selected strain 195-S, using transmission electron microscopy (TEM), showed that the cell wall of this strain was approximately twice as thick as that of *S. aureus* ATCC 25923 (Figure). After retrospective evaluation of the patients data records, it was possible to establish that none of these three microrganisms were isolated from patients who had received vancomycin previously. After 9 days in a drug-free medium, the vancomycin MIC of the three selected strains decreased to values below the susceptibility breakpoint (4 mg/L).

We were able to evaluate the response to vancomycin using the Etest macromethod (Etest-M) for the same 142 *S. aureus* submitted to the vancomycin screening plate and we found a range of vancomycin MIC from 0.38 to 16.0 mg/L. A total of 14 isolates (9 MRSA, 4 MSSA and one without this data) presented a vancomycin MIC ≥ 8 mg/L by Etest-M. Seven of these 14 isolates also grew on vancomycin screening plate (two of them displayed vancomycin MIC ≥ 8 mg/L when retested after the screening). Five of these seven isolates were MRSA, but only three

of these five microrganisms were isolated from patients who had received vancomycin previously, considering the results obtained after retrospective evaluation of patients data records (Table).

Discussion

Our study showed that neither vancomycin intermediate (VISA) nor vancomycin resistant (VRSA) isolates were identified among 369 *S. aureus* isolates from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, considering the breakpoints of MIC established by NCCLS. In fact, all isolates also proved to be susceptible to vancomycin by the disc diffusion method. However, it could be consider that the disc diffusion method using vancomycin discs is not sensitive enough to detect VISA (32). In this study we found a weak correlation between the values of the zone inhibition diameters in the disc diffusion method and the values of MIC (by standard Etest), confirming that slight decreases of susceptibility to vancomycin may not be detected by the disc diffusion method.

On the other hand, 18 out of 142 isolates grew on BHI agar plates containing vancomycin and these could be considered putative h-VRSA in our population (21). It should be considered that only three of the 18 putative h-VRSA displayed MIC $\geq$ 8 mg/L when retested for vancomycin MIC using the Etest and none of these displayed a MIC stability persisting beyond 9 days in a drug-free medium. Therefore, if there is heteroresistance to vancomycin among these isolates it is not a stable trait, as also demonstrated by others studies (22;33;34). It has been shown by other authors that h-VRSA isolates may return to susceptible levels (vancomycin MIC $\leq$ 2 mg/L) after serial passages through drug-free medium (16). However, these revertants tended to become h-VRSA at higher frequencies when exposed to vancomycin. This finding indicates that, although the h-VRSA isolates may not disseminate as a stable

resistance phenotype, they can readily revert to h-VRSA when exposed to vancomycin (16;35).

We were able to compare the thickness of the cell wall of one selected strain (195-S) with *S. aureus* ATCC 25923 by transmission electron microscopy and it was possible to show that the strain 195-S had a significantly thicker cell wall than the control strain. Cui et al. (35) established that cell wall thickening is a common feature of h-VRSA strains obtained from different countries as they found a significant statistical correlation between the cell wall thickness and vancomycin MIC. The mechanisms underlying the h-VRSA phenotype are not clear, but it seems likely that thickening of the cell wall is closely associated with the vancomycin resistance mechanism in the h-VRSA strains (30;35;36).

Another test to evaluate the presence of h-VRSA is the Etest macromethod using BHI agar and a heavy inoculum of the isolate (24). In our study, the vancomycin MIC using Etest-M was higher than that using the standard Etest method and a direct trend between both methods was observed. In fact, we found 14 isolates with a vancomycin MIC $\geq$ 8 mg/L using Etest-M and these could also be considered as h-VRSA as proposed by Walsh et al. (25). These authors compared different methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides and found the Etest-M to be a reliable and sensitive screening method for the detection of glycopeptide resistance and heteroresistance. However, the higher MIC by Etest-M could be attributed to the *in vitro* conditions such as a higher inoculum and a nutrient richer medium. Ike et al. (22) studied the effect of inoculum size and medium on sensitivities to vancomycin and they showed that the MIC distribution of the MRSA isolates grown on BHI agar plate indicated a higher level of resistance than those grown on MH agar. Therefore, the use of high inoculum and/or a nutritionally-rich medium (such as BHI) provides results of increased resistance to vancomycin which may not be confirmed or correlated with the clinical outcome.

On the other hand, despite the fact that almost 40% of the isolates in our study are classified as MRSA, five of the isolates which grew on the vancomycin screening plate and that provided MIC $\geq$ 8 mg/L in the Etest macromethod were MSSA. Since these isolates were methicillin-susceptible, the genetic background for development of glycopeptide resistance may not be strictly associated with the *mec*A gene (24).

While h-VRSA has been reported from patients who did not respond to vancomycin therapy (13;37) there have also been reports of h-VRSA susceptible to methicillin from patient who had not received vancomycin previously (24). We were not able to establish a relation between previous use of vancomycin and h-VRSA as the majority of isolates selected by both vancomycin screening plate and Etest-M were obtained from patients who were not receiving vancomycin previously. Whether the isolation of h-VRSA from patients could be related to the apparent failure of vancomycin therapy remains controversial. However, the presence of h-VRSA may be an important indicator of the insidious decline of the clinical effectiveness of vancomycin in the hospitals (16).

Routine screening of *S. aureus* isolates for vancomycin-heteroresistant subpopulations may not be recommended if clinical data are not available to assess the significance of heteroresistance. Such screening may be undertaken as part of research protocols, but results generated using h-VRSA screening methods should not be reported in a patient data record (20).

Acknowledgments

We thank all staff of “Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia Clínica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre”, Brazil, for their help to collect the *S. aureus* isolates. We also thank Moema Queiroz and Christiane de Queiroz Lopes from “Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul”, Brazil, for technical assistance in transmission electron microscopy. This study was partially

supported by “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas de Porto Alegre”, Brazil.

References

(1) Wenzel RP, Nettleman MD, Jones RN, Pfaller MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990s and effective control measures. Am J Med 1991; 91(Suppl.3B):2215-2275.

(2) Paulsen IT, Firth N, Skurray RA. Resistance to antimicrobial agents other than beta-lactams. In: Crossley KB, Archer GL, editors. The staphylococci in human disease. New York, N. Y.: Churchill Livingstone, 1997: 175-212.

(3) Spink WW, Ferris V. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of staphylococci. Science 1945; 102:221.

(4) Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol 1961; 14:385.

(5) Cunha BA. Vancomycin. Med Clinics North America 1996; 79:817-831.

(6) 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; 40:135-146.

(7) Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States, 1997. Morbid Mortal Weekly Rep 1997; 46(33):765-766.

(8) Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States, 1997. Morbid Mortal Weekly Rep 1997; 46(35):813-815.

(9) Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Dunn BR et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 1999; 340(7):493-501.

(10) Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, Maupin PS, Tenover FC, Hill BC et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. Emerg Infect Dis 1999; 5(1):147-149.

(11) Ploy MC, Grelaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 1998; 351(9110):1212.

(12) Marchese A, Balistreri G, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. Heterogeneous Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in a Large Italian Hospital. J Clin Microbiol 1999; 38(2):866-869.

(13) Kim M-N, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. J Clin Microbiol 2000; 38(10):3879-3881.

(14) Trakulsomboon S, Danchaivijitr S, Rongrungruang Y, Dhiraputra C, Susaemgrat W, Ito T et al. First Report of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin in Thailand. J Clin Microbiol 2001; 39(2):591-595.

(15) Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS, Cui L et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Infect Control Hosp Epidemiol 2001; 22(7):443-448.

(16) Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. The Lancet Infectious Diseases 2001; 1:147-155.

(17) NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth Informational Supplement M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA. 2002.

(18) Goldstein F, Soussy C-J, Thabaut A. Report of the Comité de l´Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Definition of the clinical antibacterial spectrum of activity. Clin Microbiol Infect 1996; 2:S40-S49.

(19) Wong SSY, Ho PL, Woo PCY, Yuen KY. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. Clin Infect Dis 1999; 29:760-767.

(20) Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2001; 7(2):327-332.

(21) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350:1670-1673.

(22) Ike Y, Arakawa Y, Ma X, Tatewaki K, Nagasawa M, Tomita H et al. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Sthaphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. J Clin Microbiol 2001; 39(12):4445-4451.

(23) Fujino T, Mori N, Kawana A, Kawabata H, Kuratsuji T, Kudo K et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo hospital in 2000. Jpn J Infect Dis 2001; 54:91-93.

(24) Bobin-Dubreux S, Reverdy M-E, Nervi C, Rougier M, Bolmström A, Vandenesch F et al. Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(1):349-352.

(25) Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Ho P, Wootton M, Howe RA et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2001; 39(7):2439-2444.

(26) Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. J Antimicrob Chemother 2001; 47:399-403.

(27) Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999: 264-282.

(28) Kaufmann ME, Pitt TL. Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. In: Chart H, editor. Methods in Practical Laboratory Bacteriology. London: CRC Press, 1994: 83-92.

(29) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-

field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33:2233-2239.

(30) Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. J Antimicrob Chemother 1998; 42:199-209.

(31) Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(9):2276-2285.

(32) Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol 1998; 36(4):1020-1027.

(33) Boyle-Vavra S, Berke SK, Lee JC, Daum RS. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(2):272-277.

(34) Hubert SK, Mohammed JM, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JEJr, Tenover FC. Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: evaluation of a novel screening method and results of a survey of selected U.S. hospitals. J Clin Microbiol 1999; 37(11):3590-3593.

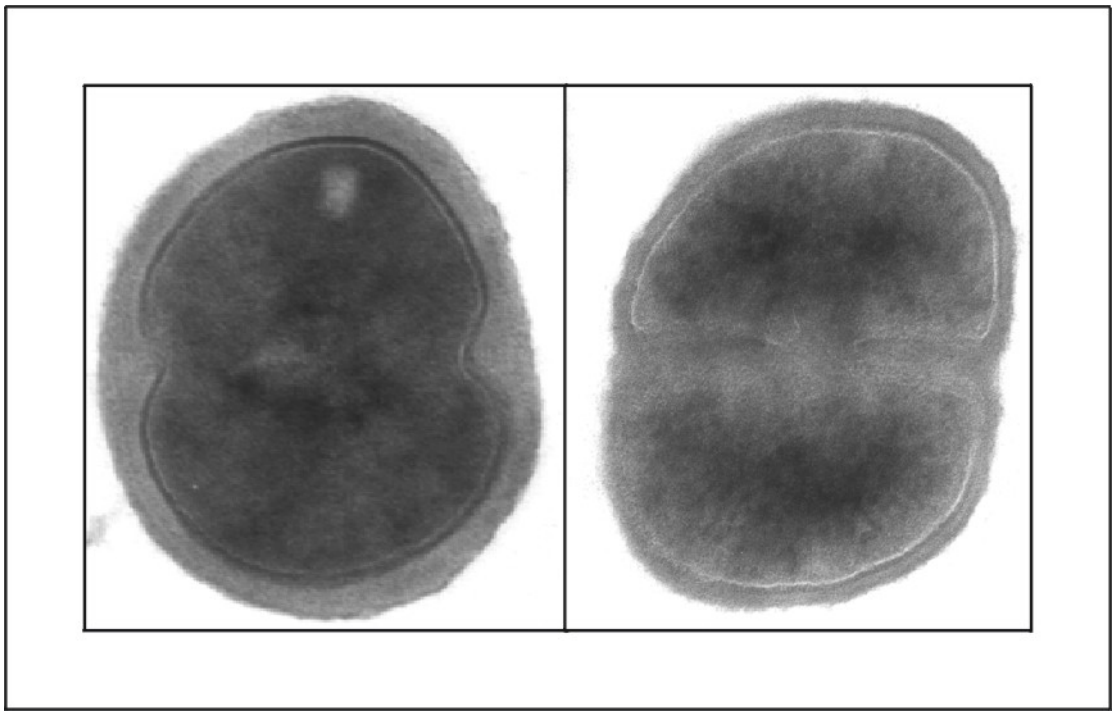
(35) Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41(1):5-14.

(36) Backo M, Gaenger E, Burkart A, Chai Y.L., Bayer AS. Treatment of experimental staphylococcal endocarditis due to a strain with reduced susceptibility in vitro to vancomycin: efficacy of ampicillin-sulbactam. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(10):2565-2568.

(37) Lutz L, Machado A, Kuplich N, Barth AL. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary hospital in southern Brazil. Braz J Infect Dis. In press.

Table: Results of h-VRSA screening, the vancomycin MIC of parent strains by standard Etest and Etest-macromethod, susceptibility of methicillin and previous use of vancomycin.

Isolates	Number of colonies on the vancomycin screening plate (duplicate)	Vancomycin MIC (standard Etest) after screening	Vancomycin MIC of parent strains by standard Etest	Vancomycin MIC of parent strains by Etest-macromethod	Susceptibility of methicillin	Previous use of vancomycin
242	1-1	12.0	1.5	6.0	MRSA	NO
195	20-50	8.0	2.0	16.0	MRSA	NO
202	1-1	8.0	1.5	8.0	MRSA	NO
245	20-20	6.0	2.0	16.0	MRSA	YES
71	1-2	6.0	2.0	40	MRSA	NO
190	5-15	6.0	0.5	6.0	MSSA	NO
209	100-100	4.0	3.0	8.0	MRSA	YES
103	6-12	4.0	1.0	6.0	MRSA	YES
76	100-100	4.0	2.0	12.0	MSSA	NO
203	1-4	4.0	1.5	6.0	MRSA	NO
193	5-6	3.0	1.5	8.0	without data	without data
121	1-1	3.0	2.0	4.0	MRSA	NO
165	1-1	3.0	2.0	3.0	MSSA	NO
171	8-10	3.0	1.5	6.0	MRSA	NO
246	20-20	3.0	1.5	4.0	MSSA	NO
178	1-1	2.0	1.5	3.0	MSSA	NO
179	1-2	1.5	1.5	8.0	MRSA	YES
170	1-1	1.5	1.5	3.0	MRSA	YES



(a) 55.08 ± 6.60 (b) 24.92 ± 3.18

Figure: Transmission electron microscopy of selected strain 195-S (a) and *S. aureus* ATCC 25923 (b). Magnification x 40,000. The values given under each panel are the means and SDs of the cell wall thickness of the cells in nanometers. Note that the selected strain 195-S cell wall was approximately twice as thick as *S. aureus* ATCC 25923 cell wall.

Versão em português do artigo: "Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin at a university hospital in southern Brazil"

Suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* à vancomicina em um hospital universitário no sul do Brasil

Resumo

Objetivos: Avaliar a resposta *in vitro* de *Staphylococcus aureus* à vancomicina usando teste de disco difusão convencional e determinação da concentração inibitória mínima (MIC), bem como avaliar métodos de triagem para detectar *S. aureus* heterogeneamente resistentes à vancomicina (h-VRSA) em pacientes internados em um hospital universitário brasileiro. **Métodos:** O MIC da vancomicina foi determinado usando o método do Etest para 369 isolados de *S. aureus*. A triagem para h-VRSA foi realizada usando um método de análise populacional simplificada e Etest macrométodo (Etest-M). O espessamento da parede celular de um isolado h-VRSA foi avaliado após a microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O uso prévio de vancomicina foi estabelecido após avaliação retrospectiva dos dados clínicos dos pacientes. **Resultados:** Não foram identificados isolados de *S. aureus* com resistência intermediária (VISA) e resistentes (VRSA) à vancomicina nos isolados avaliados neste estudo. Os valores de MIC variaram de 0,25 a 3,0 mg/L pelo Etest. Três isolados apresentaram MIC da vancomicina $\geq$ 8 mg/L após a triagem com placas contendo vancomicina, e nenhum deles teve seu MIC confirmado após 9 dias em meio livre do antibiótico. O estudo morfométrico usando TEM mostrou que a parede celular da cepa selecionada era mais espessa que a parede celular da cepa controle. Quatorze isolados apresentaram um MIC da vancomicina $\geq$ 8 mg/L pelo Etest-M. Somente três pacientes que apresentaram infecção por estas cepas selecionadas receberam

vancomicina previamente. **Conclusão:** Triagem de h-VRSA de rotina pode não ser recomendada se não há dados clínicos que indiquem a significância da heteroresistência.

Palavras chaves

S. aureus, vancomicina, VISA, h-VRSA, VRSA.

Introdução

Staphylococcus aureus é uma das causas mais comuns tanto de infecções nosocomiais como de infecções comunitárias, que podem apresentar altos índices de mortalidade (1). Além da sua virulência, *S. aureus* tem demonstrado uma capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos originalmente ativos contra a espécie (2). Resistência à penicilina (devido à produção de β-lactamase) foi descrita em isolados de *S. aureus* logo após o uso clínico deste antibiótico e disseminou-se nos anos 50 (3). O desenvolvimento de penicilinas estáveis às β-lactamases não alterou este quadro desde que *S. aureus* resistentes a estes antibióticos (methicillin-resistant *S. aureus* [MRSA]) foram descritos em 1961 (4). Nos anos 80, devido à disseminação de MRSA, a vancomicina tornou-se o antibiótico de escolha para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (5). Em 1996, um isolado de *Staphylococcus aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina foi relatado no Japão (6). Um ano depois, outros dois casos foram descritos nos EUA (Michigan e New Jersey) (7-9) e, posteriormente, um terceiro caso foi relatado em New York (10). Relatos subseqüentes deste tipo de isolado foram descritos em todo o mundo (França (11), Itália (12), Coréia (13), Tailândia (14) e Brasil (15)) e isto indica que a emergência de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina tem se tornado uma questão global (16).

Apesar da terapia com vancomicina ter falhado na maioria dos pacientes infectados com estes microrganismos, é controverso se estes estafilococos deveriam ser designados como resistentes aos glicopeptídeos, pois os níveis de vancomicina requeridos para inibir o crescimento destes isolados mantiveram-se relativamente baixos (8 mg/L). De fato, a terminologia de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina requer maiores refinamentos, já que diferentes "breakpoints" são usados para estabelecer resistência (17;18) e diversos métodos laboratoriais não padronizados são adotados para detectar decréscimo de suscetibilidade à vancomicina (19;20).

Além disso, a expressão "heteroresistant VRSA" (h-VRSA) tem sido usada por investigadores japoneses para denotar isolados de *S. aureus* com subpopulação que cresce em presença de 4 mg/L de vancomicina em 48 horas. h-VRSA é confirmado se o MIC da vancomicina da subpopulação for pelo menos 8 mg/L. Tem sido descrito que isolados de h-VRSA estão disseminados e somam de 5 a 26% dos isolados clínicos de MRSA de hospitais universitários japoneses (21), apesar destas percentagens não terem sido confirmadas por outros autores japoneses (22;23). Outros autores consideram *S. aureus* como sendo h-VRSA quando eles apresentarem um MIC da vancomicina $\geq$ 8 mg/L usando o Etest macrométodo (Etest-M), que utiliza um meio rico e um inóculo bacteriano concentrado (24-26).

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta *in vitro* de *S. aureus* à vancomicina usando o teste de disco difusão convencional (Kirby-Bauer) e a determinação padrão do MIC, bem como avaliar métodos de triagem para detecção de *S. aureus* heteroresistentes à vancomicina de pacientes internados em um hospital universitário terciário no sul do Brasil (Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Materiais e Métodos

Isolados Bacterianos. Um total de 369 isolados clínicos de *S. aureus* foi obtido de hemoculturas de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre Maio de 1999 e Abril de 2001. Somente um isolado por paciente durante um intervalo de três dias foi incluído no estudo. As hemoculturas foram realizadas usando o sistema Bactec® (Becton Dikinson**,** Sparks, USA). As hemoculturas positivas foram subcultivadas em agar tripticaseína de soja contendo 5% de sangue de carneiro - BAP (Oxoid, Basingstoke, UK). A aparência colonial em BAP, a coloração pelo Gram e o teste da catalase foram usados para triagem de estafilococos e *S. aureus* foi identificado pelo resultado positivo no teste da coagulase (27).

Testes de suscetibilidade aos antibióticos. Os isolados foram testados para a suscetibilidade à penicilina (10 μg), oxacilina (1 μg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 μg), eritromicina (15 μg), gentamicina (10 μg), clindamicina (2 μg), rifampicina (5 μg), sulfametoxazol/trimetoprim (23,75/1,25 μg), teicoplanina (30 μg) e vancomicina (30 μg) (Oxoid) pelo método de disco difusão usando agar Mueller-Hinton (MH) (Difco Laboratory, Detroid, Mich.) de acordo com o "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) (17).

Para determinar o MIC da vancomicina foi realizado o método do Etest (AB Biodisk, Solna, Suécia) usando agar MH, um inóculo ajustado a uma turbidez igual a 0,5 de McFarland e incubação de 35°C por 24 horas. Os resultados dos MIC usando este método foram interpretados de acordo com os "breakpoints" do NCCLS (17).

Triagem para VISA e h-VRSA. Para a triagem de isolados com suscetibilidade reduzida à vancomicina foi utilizado um método simplificado de análise populacional de acordo com Hiramatsu et al. (21). Este método foi realizado em duplicata usando um volume de 10 μL de 10^8 CFU/mL inoculado em placas de agar "brain heart infusion" (BHI) (Oxoid) contendo 4 mg/L de vancomicina (Sigma, St. Louis, Mo). As

placas foram incubadas a 35°C e o crescimento bacteriano foi avaliado em 24 e 48 h. Se um crescimento confluente fosse aparente em 24 h, o isolado poderia ser considerado um VISA em potencial. Se o crescimento não fosse aparente em 48 h, o isolado poderia ser considerado sensível à vancomicina (VSSA). O isolado poderia ser designado como um possível h-VRSA se um número contável de colônias fosse observado em até 48 h. O estado de h-VRSA seria considerado definitivo se o isolado produzisse subclones com um MIC da vancomicina ≥ 8 mg/L (Etest padrão), com uma estabilidade de MIC persistindo por pelo menos 9 dias em um meio livre do antibiótico (21).

Foi realizada também triagem para h-VRSA pelo Etest macrométodo (Etest-M) usando agar BHI (Oxoid), um inóculo bacteriano concentrado (2,0 de McFarland), e 48 horas de incubação a 35°C como descrito previamente (24). Um MIC da vancomicina ≥ 8 mg/L indicaria h-VRSA neste método (25).

Gel de eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE). Foi realizada uma análise de macrorestrição de DNA cromossomal seguida de PFGE como descrito previamente (28). O DNA foi digerido com a enzima *Sma*I (Gibco BRL, USA) e foi realizada a eletroforese por 22 h utilizando o aparelho contador de campo elétrico pulsado homogênio DRII (Bio-Rad, Richmond, USA) com pulso de 5 a 60 s. Foi utilizado como marcador de peso molecular o “lambda ladder” (48,5 Kb, Sigma, USA). Os fragmentos de DNA separados foram fotografados após coloração com brometo de etídio e a comparação dos perfis de macrorestrição foi realizada através de análise visual segundo Tenover et al. (29).

Microscopia eletrônica de transmissão. Células em fase de crescimento logarítmico foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,12 M de tampão fosfato de sódio e tratadas com 2% de tetróxido de osmium. As células foram desidratadas com concentrações graduais de acetona, e embebidas na resina Durcupan ACM, Epoxy Resin (EMS, Fort Washington, PA). Cortes ultra-finos foram colocados em 2% de

acetato de uracila aquoso e citrato de chumbo, e então foram examinados utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 EX II (JEOL, Peabody, Massachussetts, USA) (30).

A avaliação morfométrica do espessamento da parede celular foi realizada utilizando imagens fotográficas obtidas em uma magnificação final de x 40.000. O espessamento da parede celular de 30 células de cada isolado, com superfícies aproximadamente equatoriais, foi medido usando o programa de análise de imagens Carnoy 2.0 (Lab of Plant Systematics K.U. Leuven, Flanders, Belgium), e os resultados foram expressos como a média ± SD (31).

Uso prévio da vancomicina. O uso prévio da vancomicina foi estabelecido após a avaliação retrospectiva dos prontuários médicos dos pacientes.

Controle de qualidade. Foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213 para o controle de qualidade do método de disco difusão e do método do Etest padrão, respectivamente. *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 e um isolado clínico de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina foram utilizados como controle de qualidade das placas de triagem contendo vancomicina. *S. aureus* ATCC 25923 foi submetido à microscopia eletrônica de transmissão e usado na avaliação morfométrica do espessamento da parede celular.

Resultados

Os testes de suscetibilidade pelo método de disco difusão e a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pelo método do Etest padrão foram realizados em 369 *S. aureus*. Um total de 218 (60,7%) isolados apresentou-se sensível à oxacilina (MSSA), mas 141 (39,3%) isolados mostraram-se resistentes (MRSA). Não foi possível avaliar a suscetibilidade à oxacilina de 10 isolados. A maioria dos MRSA (41,9%) apresentou-se sensível somente à rifampicina e vancomcina, mas 41,1% dos MRSA apresentaram-se sensíveis somente à vancomcicina. Além disso, todos os

isolados apresentaram-se sensíveis à vancomicina (diâmetros da zona de inibição variando de 15 a 30 mm) de acordo com o método de disco difusão. A maioria dos isolados apresentou sensibilidade à teicoplanina, apesar de sete isolados apresentarem valores intermediários (diâmetros da zona de inibição variando de 12 a 30 mm) de acordo com o método de disco difusão.

Os MIC da vancomicina pelo Etest padrão variaram de 0,25 a 3,0 mg/L e a maioria dos isolados (46,1%) apresentou um MIC da vancomicina de 1,5 mg/L, portanto, considerando os "breakpoints" do NCCLS para MIC, todos os isolados foram confirmados como sensíveis à vancomicina.

Os valores de MIC da vancomicina pelo Etest padrão foram comparados com os valores de diâmetros da zona de inibição da teicoplanina e da vancomicina no método de disco difusão. Apesar dos 369 *S. aureus* não terem sido classificados como resistentes à vancomicina ou à teicoplanina, foi possível observar somente uma fraca correlação inversa entre os MIC da vancomicina e os diâmetros da zona de inibição de ambos os discos (Coeficiente de Correlação de Pearson r= -0,3225 e P<0.001 para a vancomicina, r = -0,3282 e P<0.001 para a teicoplanina).

A triagem de *S. aureus* heterogeneamente resistente à vancomicina pelo método simplificado de análise populacional foi realizado randomicamente e em duplicata para 142 *S. aureus*. Nenhum isolado apresentou crescimento confluente em 24 h de incubação em agar BHI com 4 mg/L de vancomicina. Contudo, foram observadas de uma a 100 colônias nas placas de triagem de 18 isolados (12 MRSA, 5 MSSA e um sem este dado) após 48 h. Estes últimos foram considerados como possíveis h-VRSA e o MIC da vancomicina para estes isolados foi estabelecido pelo Etest padrão. Somente três isolados (todos MRSA) apresentaram MIC $\geq$ 8 mg/L e foram determinados como cepas selecionadas (com o sufixo S). A comparação dos padrões de macrorestrição do DNA por PFGE destas três cepas selecionadas (195-S, 202-S, 242-S) com seus isolados originais demonstrou que cada par apresentava

padrões de bandas indistingüíveis. Além disso, o estudo morfométrico da cepa selecionada 195-S usando microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrou que a parece celular desta cepa é aproximadamente duas vezes mais espessa que a parede celular do *S. aureus* ATCC 25923 (Figura). Após a avaliação retrospectiva de prontuários médicos destes três pacientes foi possível estabelecer que nenhum dos pacientes recebeu vancomicina previamente à identificação destes microrganismos. Após 9 dias em meio sem vancomicina, o MIC da vancomicina destas três cepas selecionadas decresceu a valores abaixo do "breakpoint" de suscetibilidade (4 mg/L).

Foi possível avaliar a resposta à vancomicina usando o Etest macrométodo (Etest-M) para os mesmos 142 *S. aureus* submetidos à triagem com placas contendo vancomicina e foi obtida uma variação de MIC da vancomicina de 0,38 a 16,0 mg/L. Um total de 14 isolados (9 MRSA, 4 MSSA e um sem este dado) apresentou um MIC da vancomicina $\geq$ 8 mg/L pelo Etest-M. Sete destes 14 isolados também cresceram nas placas de triagem com vancomicina (dois destes apresentaram um MIC da vancomicina $\geq$ 8 mg/L quando retestados após a triagem). Cinco destes sete *S. aureus* eram MRSA, mas somente três destes cinco foram isolados de pacientes que estavam recebendo vancomicina previamente, considerando os resultados obtidos após avaliação retrospectiva dos prontuários médicos dos pacientes (Tabela).

Discussão

Este estudo demonstrou que não foram identificados isolados com resistência intermediária (VISA) ou resistentes (VRSA) à vancomicina em 369 *S. aureus* de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre considerando os "breakpoints" de MIC estabelecidos pelo NCCLS. De fato, todos os isolados também apresentaram-se sensíveis à vancomicina pelo método de disco difusão. Entretanto, deve ser considerado que o método de disco difusão usando discos de vancomicina não é sensível o suficiente para detectar VISA (32). Neste estudo foi encontrada uma

fraca correlação entre os valores de diâmetros de zona de inibição no método de disco difusão e valores de MIC (pelo Etest padrão) confirmando que pequenos decréscimos de sensibilidade à vancomicina podem não ser detectados por este método.

Por outro lado, 18 dos 142 isolados cresceram nas placas de BHI contendo 4 mg/L de vancomicina e puderam ser considerados prováveis h-VRSA na população em estudo (21). Deve ser considerado que somente três dos 18 prováveis h-VRSA apresentaram MIC $\geq$ 8 mg/L quando retestados para o MIC da vancomicina usando o Etest padrão mas nenhum destes apresentou uma estabilidade de MIC persistindo 9 dias em meio livre de antibiótico. Portanto, se estes isolados são heteroresistentes à vancomicina, esta não é uma característica estável, o que tem sido demonstrado também em outros estudos (22;33;34). Tem sido descrito por outros autores que isolados h-VRSA podem retornar a níveis sensíveis (MIC da vancomicina $\leq$ 2 mg/L) após passagens seriadas em meios sem antibiótico (16). Contudo, estes isolados reversíveis tendem a tornar-se h-VRSA em maior freqüencia quando expostos à vancomicina novamente. Estes achados indicam que, apesar de isolados h-VRSA não disseminarem-se como um fenótipo de resistência estável, eles podem realmente reverter-se a h-VRSA quando expostos à vancomicina (16;35).

Neste estudo, foi comparado o espessamento das paredes celulares de uma cepa selecionada (195-S) e do *S. aureus* ATCC 25923 pela microscopia eletrônica de transmissão, e foi possível demonstrar que a cepa 195-S apresentava uma parede celular significativamente mais espessa que a cepa controle. Cui et al. (35) estabeleceram que o espessamento da parede celular é uma característica comum de cepas h-VRSA obtidas de diferentes partes do mundo e eles encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre o espessamento da parede celular e o MIC da vancomicina. Os mecanismos relacionados ao fenótipo h-VRSA não estão esclarecidos, mas parece que o espessamento da parede celular está estreitamente

relacionado com o mecanismo de resistência à vancomicina em isolados h-VRSA (30;35;36).

Outro teste para avaliar a presença de h-VRSA é o Etest macrométodo usando um meio nutricionalmente rico e um inoculo bacteriano concentrado (24). Neste estudo, o MIC da vancomicina usando Etest-M foi maior que aquele usando o Etest padrão e uma direta tendência entre ambos foi observada. De fato, foram encontrados 14 *S. aureus* com MIC da vancomicina $\geq$ 8 mg/L usando o Etest-M e estes poderiam também ser considerados como h-VRSA como proposto por Walsh et al. (25). Estes autores compararam diferentes métodos para detecção de estafilococos com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos e propuseram que o Etest-M é um método de triagem confiável e sensível para a detecção de resistência aos glicopeptídeos, bem como heteroresistência. Entretanto, os MIC mais elevados pelo Etest-M poderiam ser atribuídos às condições *in vitro*, tais como o inóculo bacteriano mais concentrado e um meio nutricionalmente rico. Ike et al. (22) estudaram o efeito da concentração do inóculo e do meio de cultura na sensibilidade à vancomicina e mostraram que a distribuição do MIC de MRSA que crescem em agar BHI apresentam um nível de resistência mais alto que aqueles que crescem em agar MH. O uso de um inóculo bacteriano mais concentrado e/ou um meio nutricionalmente rico (como o BHI) fornece resultados de aumento de resistência à vancomicina que podem não ser confirmados ou correlacionados com resultados clínicos.

Por outro lado, apesar de cerca de 40% dos isolados em nosso estudo terem sido classificados como MRSA, cinco isolados que cresceram na triagem com placas contendo vancomicina e que apresentaram MIC da vancomicina $\geq$ 8 mg/L pelo Etest macrométodo eram MSSA. Considerando que estes isolados eram sensíveis à meticilina, as bases genéticas para o desenvolvimento da resistência aos glcopeptídeos podem não estar estritamente associadas ao gene *mec*A (24).

Enquanto h-VRSA têm sido relatados em pacientes que não responderam à terapia com vancomicina (13;37), têm sido relatado também h-VRSA sensível à meticilina de paciente que não recebeu vancomicina previamente (24). Neste estudo, não foi possível estabelecer uma relação entre o uso prévio de vancomicina e h-VRSA, já que a maioria dos isolados selecionados tanto pela triagem com placas contendo vancomicina como pelo Etest-M foram obtidas de pacientes que não receberam vancomicina previamente. Permanece controverso, então, se o isolamento de h-VRSA de pacientes pode estar relacionado à aparente falha na terapia com vancomicina. Contudo, a presença de h-VRSA pode ser um indicador importante do acentuado declínio da efetividade clínica da vancomicina nos hospitais (16).

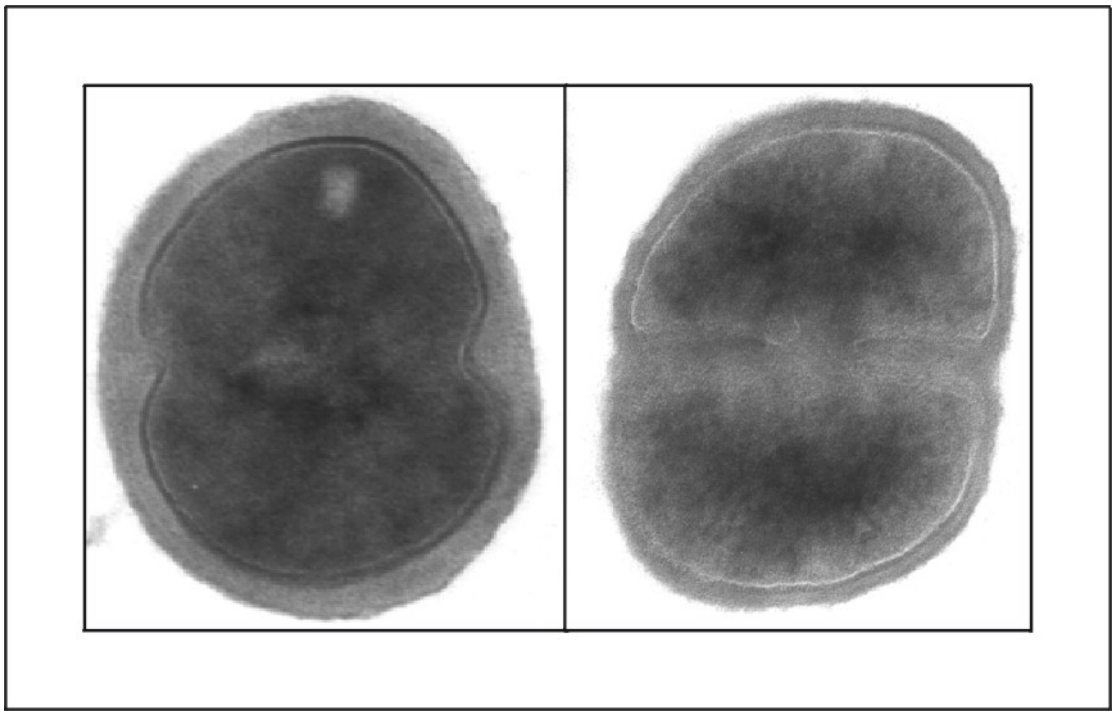
Métodos de triagem de rotina para subpopulações de *S. aureus* heteroresistentes à vancomicina podem não ser recomendados se não houverem dados clínicos que indiquem a significância da heteroresistência. Tais métodos poderiam fazer parte de protocolos de pesquisa, mas os resultados gerados usando métodos de triagem para h-VRSA não deveriam ser reportados nos prontuários médicos dos pacientes (20).

Agradecimentos

Agradecemos a toda a equipe da “Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia Clínica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre”, Brasil, pelo auxílio em coletar os isolados clínicos de *S. aureus*. Agradecemos também à Moema Queiroz e à Christiane de Queiroz Lopes do “Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul”, Brasil, pela assistência técnica na microscopia eletrônica de transmissão. Este estudo foi parcialmente financiado pelo “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas de Porto Alegre”, Brasil.

Tabela: Resultados da triagem para h-VRSA, MIC da vancomicina das cepas originárias pelo Etest padrão e pelo Etest macrométodo, suscetibilidade da meticilina e uso prévio da vancomicina.

Isolados bacterianos	Número de colônias nas placas de triagem com vancomicina (duplicata)	MIC da vancomicina (Etest padrão) após a triagem	MIC da vancomicina das cepas originárias pelo Etest padrão	MIC da vancomicina das cepas originárias pelo Etest macrométodo	Suscetibilidade da meticilina	Uso prévio da vancomicina
242	1-1	12,0	1,5	6,0	MRSA	NÃO
195	20-50	8,0	2,0	16,0	MRSA	NÃO
202	1-1	8,0	1,5	8,0	MRSA	NÃO
245	20-20	6,0	2,0	16,0	MRSA	SIM
71	1-2	6,0	2,0	4,0	MRSA	NÃO
190	5-15	6,0	0,5	6,0	MSSA	NÃO
209	100-100	4,0	3,0	8,0	MRSA	SIM
103	6-12	4,0	1,0	6,0	MRSA	SIM
76	100-100	4,0	2,0	12,0	MSSA	NÃO
203	1-4	4,0	1,5	6,0	MRSA	NÃO
193	5-6	3,0	1,5	8,0	sem o dado	sem o dado
121	1-1	3,0	2,0	4,0	MRSA	NÃO
165	1-1	3,0	2,0	3,0	MSSA	NÃO
171	8-10	3,0	1,5	6,0	MRSA	NÃO
246	20-20	3,0	1,5	4,0	MSSA	NÃO
178	1-1	2,0	1,5	3,0	MSSA	NÃO
179	1-2	1,5	1,5	8,0	MRSA	SIM
170	1-1	1,5	1,5	3,0	MRSA	SIM



(a) 55,08 ± 6,60 (b) 24,92 ± 3,18

Figura: Microscopia eletrônica de transmissão da cepa selecionada 195-S (a) e *S. aureus* ATCC 25923 (b). Magnificação x 40.000. Os valores descritos abaixo de cada painel são as medias e os SDs do espessamento da parede celular em nanômetros. Note que a parede celular da cepa selecionada 195-S era aproximadamente duas vezes mais espessa que a parede celular do *S. aureus* ATCC 25923.

ANEXO

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

As Comissões Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela CONEP como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, reanalisaram o projeto:

Número: 00.108

Título: "AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS À VANCOMICINA NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE."

Autores: Afonso Luis Barth, Larissa Lutz.

- O mesmo foi aprovado, por estar adequado ética e metodologicamente, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e às Resoluções Normativas do GPPG/HCPA. **Os autores deverão encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do Projeto.**

Porto Alegre, 26 de junho de 2000.

Prof. José Roberto Goldim
P/ Coordenação do GPPG e CEP/HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Largo Eduardo Zaccaro Faraco - 90035-003 - Porto Alegre, RS - Brasil
C.G.C.(M.F.): 87.020.517/0001-20 - Telefone (55) 51 - 316.8000 - Telefax (55) 51 - 316.8001 - Caixa Postal 1247
E-mail:hcpa@hcpa.ufrgs.br - Home page: http://www.hcpa.ufrgs.br