

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

Prevalência da Concentração Inibitória Mínima elevada da vancomicina e a relação desta com o desfecho de pacientes com pneumonia causada por *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes.

DENISE PIRES MACHADO

Porto Alegre

2012

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

Prevalência da Concentração Inibitória Mínima elevada da vancomicina e a relação desta com o desfecho de pacientes com pneumonia causada por *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes.

DENISE PIRES MACHADO

Orientador: Prof. Dr. Luciano Zubaran Goldani

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre

2012

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre 2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Pires Machado, Denise

Prevalência da Concentração Inibitória Mínima elevada da vancomicina e a relação desta com o desfecho de pacientes com pneumonia causada por *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes. / Denise Pires Machado. -- 2012.

81 f.

Orientador: Luciano Zubaran Goldani.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Vancomicina. 3. Mortalidade. 4. Pneumonia. 5. Concentração inibitória mínima. I. Zubaran Goldani, Luciano, orient. II. Título.

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

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Dr. Rodrigo Pires dos Santos pela confiança, pelo apoio imprescindível durante todas as etapas da realização deste estudo e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas Fernanda de Paris e Rodrigo Minuto Paiva pela disponibilidade e pela realização das técnicas moleculares para detecção dos genes *agr II* e *mecA*.

Ao estagiário Bruno Jung pela revisão dos prontuários dos pacientes.

A alguns colegas que contribuíram para a realização deste trabalho: André Muller, Daniela Martins, Dariane Pereira, Fabiano Naguel, Leandro Perez, Thiago Lisboa e Valério Aquino.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Souza Kuchenbecker pelas oportunidades que me proporcionou enquanto foi chefe da CCIH do HCPA, que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional, pelo incentivo, confiança, reconhecimento do meu trabalho e pelo exemplo de profissionalismo e ética.

A amiga Maria Izoete Vieira (*in memoriam*) por sempre ter me incentivado a crescer profissionalmente.

A minha mãe Marta Maria Pires Machado por estar sempre ao meu lado.

## RESUMO

**Introdução:** Pneumonias causadas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) estão associadas com uma alta mortalidade em pacientes internados em Centros de Terapia Intensiva (CTI). Não é incomum que ocorra falha no tratamento de pneumonia por MRSA com vancomicina. Alguns estudos têm mostrado que há uma relação entre mortalidade em infecções por MRSA e concentrações inibitórias mínimas (CIM) elevadas para vancomicina por Etest®, apesar dos isolados serem sensíveis à vancomicina (CIM  $\leq 2\mu\text{g/mL}$ ), conforme o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).

**Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar as CIMs para vancomicina em pacientes com diagnóstico de pneumonia por MRSA, descrever a relação entre a CIM da vancomicina obtido por Etest® e microdiluição em caldo com mortalidade em 30 dias em pacientes com pneumonia por MRSA internados em um hospital terciário, acadêmico, no sul do Brasil.

**Métodos:** Estudo prospectivo de coorte. Foram incluídos todos os pacientes com pneumonia adquirida no hospital (*hospital acquired pneumonia* - HAP) e pneumonia associada à ventilação (*ventilator associated pneumonia* - VAP) por MRSA entre Junho de 2009 e Dezembro de 2011. A CIM da vancomicina do primeiro isolado do trato respiratório foi determinado por Etest® e microdiluição em caldo. As variáveis selecionadas para serem analisadas incluíram idade, sexo, comorbidades, dosagem sérica de vancomicina, escore APACHE II (*Acute Physiological and Chronic Health*

*Evaluation II*) e a presença do *accessory gene regulator II (agr II)*. O desfecho principal foi morte em 30 dias.

**Resultados:** Foram incluídos 85 pacientes. A mortalidade em 30 dias foi de 42,4%. Em sessenta e oito pacientes (80,1%) as CIMs da vancomicina obtidos por Etest® foram menores ou iguais a 1,0µg/mL, enquanto todas as CIMs (N=85) obtidas por microdiluição em caldo foram ≤1,0µg/mL. Não houve correlação entre as CIMs por Etest® e microdiluição em caldo com morte em 30 dias. Quarenta e seis isolados de MRSA (54,1%) foram positivos para o locus *agr II*. A média da vancomicina sérica foi 20,7µg/mL (12,0 – 29,0) e a média do escore APACHE II foi 23,0 (17,5 – 29,0). O escore APACHE II foi relacionado com mortalidade em 30 dias.

**Conclusões:** As CIMs da vancomicina obtidas por Etest® e microdiluição em caldo não foram associadas com altos níveis de mortalidade em pacientes com pneumonia grave por MRSA.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Staphylococcus aureus*, vancomicina, mortalidade, pneumonia, Etest®, microdiluição em caldo.

## ABSTRACT

**Background:** Pneumonias due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are associated with significant mortality in Intensive Care Units (ICU) patients. Vancomycin treatment failure in MRSA pneumonia patients is not uncommon. Some reports found a link between high mortality in MRSA infections and higher vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) by Etest®, despite the susceptibility of the isolates (MIC  $\leq$ 2,0 $\mu$ g/mL), according to the *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).

**Objectives:** The purpose of this study was evaluate vancomycin MICs in patients with MRSA pneumonia, describe the relationship between vancomycin MIC generated by Etest® and broth microdilution with 30-day mortality in MRSA pneumonia patients.

**Methods:** We conducted a prospective cohort study. All patients with MRSA hospital acquired pneumonia (HAP) and ventilator-associated pneumonia (VAP) admitted in ICU between June 2009 and December 2011 were included. Vancomycin MIC for the first isolate of the respiratory tract was determined by Etest® and broth microdilution. The variables selected for the analysis included age, sex, comorbid conditions, vancomycin serum trough concentration, APACHE II (Acute Physiological and Chronic Health Evaluation II) score and the presence of the accessory gene regulator II (*agr* II). The primary outcome was mortality at 30-day.

**Results:** Eithy five patients were included. All case mortality at the 30-day was 42.4%. Sixty eight of the patients (80.1%) of the vancomycin MICs generated by Etest® were equal or below 1.0 $\mu$ g/mL. While all MICs generated

by broth microdilution were  $\leq 1.0\mu\text{g/mL}$ . MICs generated by Etest® and broth microdilution were not associated with 30-day mortality. Forty six isolates of MRSA (54.1%) from patients were positive for *agr* II. The median serum vancomycin was  $20.7\mu\text{g/mL}$  (12.0 – 29.0) and the median APACHE II score was 23.0 (17.5 – 29.0). The APACHE II score was related to 30-day mortality.

**Conclusions:** Vancomycin MICs by Etest® and broth microdilution were not associated with higher mortality levels in patients with severe MRSA pneumonia.

**KEYWORDS:** *Staphylococcus aureus*, vancomycin, mortality, pneumonia, Etest®, broth microdilution



## LISTA DE TABELA

Tabela 1. Estudos em pneumonias que avaliam a associação entre desfecho clínico e CIM da vancomicina.....	30
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

*agr* – *assessory gene regulator*

APACHE II – *Acute Physiological and Chronic Health Evaluation II*

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATS – *American Thoracic Society*

AUC – *área sob a curva (area under the curve)*

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

AUC/MIC – *area under the curve/minimal inhibitory concentration*

BSI – *infecção na corrente sanguínea (bloodstream infection)*

CI – *intervalo de confiança (confidence interval)*

CIM – *concentração inibitória mínima*

CLSI – *Clinical Laboratory Standard Institute*

COPD – *doença pulmonar obstrutiva crônica (chronic obstructive pulmonary disease)*

CTI – *Centro de Tratamento Intensivo*

DNase – *desoxirribonuclease*

HAP – *pneumonia adquirida no hospital (hospital acquired pneumonia)*

HCPA – *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*

HR – *hazard ratio*

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

ICU – *Intensive Care Unit*

IDSA – *Infectious Diseases Society of America*

IQR – intervalo interquartil (*interquartil range*)

MIC – *minimal inhibitory concentration*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*)

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

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

PFGE – *pulsed field gel eletrophoresis*

PVL – leucocidina de *Panton Valentine* (*Panton Valentine leucocidine*)

SCCmec – *Staphylococcal cassette chromosome mec*

SD – desvio padrão (*standard deviation*)

VAP - pneumonia associada à ventilação mecânica (*ventilator associated pneumonia*)

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

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

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

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Características gerais do gênero <i>Staphylococcus</i> spp. ....	16
2.2 Importância clínica das infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
2.3 Resistência aos antibióticos.....	18
2.3.1 Resistência à meticilina.....	18
2.3.2 Resistência à vancomicina.....	19
2.4 Mecanismos de resistência à vancomicina em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2.4.1 Síntese da parede celular .....	21
2.4.2 Mecanismo de ação da vancomicina .....	23
2.4.3 Mecanismos de resistência à vancomicina .....	23
2.5 Detecção de resistências à vancomicina em <i>Staphylococcus aureus</i> no laboratório de microbiologia.....	25
2.6 Tratamento das infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes .....	26
2.7 Relação entre a CIM da vancomicina e o tratamento das infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes .....	27
2.8 Relação entre o locus <i>agr</i> e a ocorrência de falha terapêutica/mortalidade em pacientes com infecção por MRSA. ....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS .....	35
4.1 Objetivo geral.....	35
4.2 Objetivos específicos .....	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
6. ARTIGO I.....	48
7. ARTIGO II.....	56
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	76
9. ANEXOS.....	77
9.1 Formulário de dados MRSA.....	77
9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	81

## 1. INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo de alta prevalência nos hospitais do mundo inteiro e está associado com altas taxas de morbidade, mortalidade e custos hospitalares (1). Ele, frequentemente, causa sérias infecções como endocardites, pneumonias, osteomielites e bacteremias (2).

Na década de 1950 foi criada a primeira penicilina semissintética, a meticilina, para o tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina. Entretanto, no ano de 1961, começaram a aparecer as primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente à meticilina (MRSA), o que reduziu as opções terapêuticas para o tratamento das infecções por este microrganismo (3).

A vancomicina, por muito tempo, foi uma das únicas alternativas para tratar infecções por MRSA. Seu uso nos hospitais aumentou muito, o que fez surgir cepas com resistência intermediária a este antimicrobiano, com concentração inibitória mínima (CIM) entre 4,0 a 8,0µg/mL (3). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado falha terapêutica e aumento da mortalidade dos pacientes tratados com vancomicina, mesmo que essas cepas de MRSA estejam dentro da faixa de sensibilidade recomendada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI),  $CIM \leq 2,0\mu\text{g/mL}$  (1, 4, 5).

Alguns autores recomendam que isolados de MRSA com CIM para vancomicina, maiores que 1,0µg/mL sejam tratados com outra opção terapêutica como linezolida ou daptomicina. Esses estudos usam a metodologia de Etest® para determinar a CIM da vancomicina, enquanto o

CLSI recomenda métodos dilucionais (4, 5). Alguns estudos também demonstram que os valores da CIM por Etest® podem ser de uma a duas diluições maiores que a CIM obtido por microdiluição em caldo (6).

Em vista disso, nosso estudo se propôs verificar a prevalência das CIMs de vancomicina elevadas, próximas ou no ponto de corte determinado como sensível pelo CLSI, em pneumonias por MRSA em nossa instituição e determinar se estas CIMs se associaram com maior mortalidade.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Características gerais do gênero *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* spp. faz parte da família *Micrococaceae*. São cocos Gram-positivos, podem se apresentar isolados ou aos pares, em cadeias curtas ou agrupados. Eles se reproduzem por fissão binária em todos os planos espaciais, o que resulta em um agrupamento das células bacterianas que lembra cachos de uvas, o que é característico quando as células são cultivadas *in vitro* e observadas por microscopia óptica (2, 7).

As espécies do gênero *Staphylococcus* spp. são imóveis, produzem a enzima catalase (que as diferencia do gênero *Streptococcus* spp.), são aeróbias ou anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos e conseguem sobreviver nos mais variados ambientes (2, 7).

A identificação das espécies de estafilococos de importância clínica é baseada em uma variedade de características fenotípicas convencionais, como o aspecto macroscópico da colônia em meio sólido, presença de pigmento e hemólise em ágar sangue, resistência a novobiocina, fermentação do manitol e a produção de desoxiribonuclease (DNase). Entretanto, a capacidade de coagular o plasma continua sendo a prova mais realizada nos laboratórios de microbiologia clínica para distinguir a espécie *Staphylococcus aureus* das demais espécies (2, 7).

A espécie *Staphylococcus aureus* é produtora de diversos fatores de virulência, entre os quais se encontram a coagulase, que torna o microrganismo resistente a fagocitose e opsonização, DNase, adesinas, hemolisinas, toxinas, tal como a toxina da síndrome do choque tóxico,



esfoliatinas, responsáveis pela síndrome da pele escaldada, e leucocidinas. A leucocidina denominada leucocidina de *Panton Valentine* (PVL) é um dos principais fatores de virulência de cepas de *Staphylococcus aureus* comunitárias. A PVL causa a destruição dos leucócitos, necrose dos tecidos e está associada à pneumonia necrotizante (2, 8, 9, 10).

## **2.2 Importância clínica das infecções causadas por *Staphylococcus aureus***

Apesar de colonizar as narinas, nasofaringe, pele e mucosas de cerca de 20 à 40% dos adultos saudáveis, o *Staphylococcus aureus* pode, em determinadas situações, causar um grande número de infecções (2, 10).

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes de infecções nosocomiais e na comunidade (11, 12). Ele é responsável por infecções de pele e tecidos moles, infecções relacionadas ao uso de próteses e cateteres venosos, sítios cirúrgicos, cardiovasculares, bacteremias, pneumonias, e meningites (11, 13). Esta espécie também causa a síndrome da pele escaldada e a síndrome do choque tóxico, devido à produção de toxinas que causam danos à epiderme e efeitos sistêmicos, respectivamente (14).

Segundo dados do programa SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* que monitora a prevalência dos patógenos e os padrões de resistência aos antimicrobianos em vários centros de terapia, o *Staphylococcus aureus* está entre os agentes mais frequentemente isolados de corrente sanguínea, trato respiratório inferior, pele e tecidos moles em centros médicos dos Estados Unidos, Canadá e América Latina (15). No Brasil, ele foi o microrganismo mais isolado em infecções de corrente sanguínea,

representando 20,2% dos 2.218 isolados estudados e o segundo patógeno mais isolado de pacientes com pneumonia (24,9% dos casos), depois da *Pseudomonas aeruginosa* (30,5%) (16).

## **2.3 Resistência aos antibióticos**

### **2.3.1 Resistência à meticilina**

Para tratar as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, no início da década de 60 surgiram às penicilinas sintéticas como a meticilina e a oxacilina. Entretanto, em 1961, foi documentado o surgimento do primeiro *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na Europa (3, 17, 18, 19, 20). Desde então o aparecimento destas cepas começou a ser identificado no mundo inteiro, principalmente nos Centros de Terapia Intensiva (CTI), onde a taxa de infecção por MRSA fica em torno de 59,3% - 64,4% (21, 22). Segundo os dados do programa SENTRY (de janeiro de 2003 à dezembro de 2008) a taxa de infecções por MRSA na América Latina estava em torno de 40%, sendo no Brasil de 32,7% (23).

Os isolados de MRSA são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos, pois expressam um receptor com baixa afinidade a estes antibióticos. A resistência à oxacilina é resultado da ação de genes cromossômicos que codificam modificações no receptor de ação dos beta lactâmicos, as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que são enzimas constitutivas das bactérias que participam da síntese da parede celular (24, 25, 26).

O MRSA tem a capacidade de sintetizar uma variante da PBP2, a PBP2a ou PBP2', que, apesar de manter sua função fisiológica, tem baixa afinidade pelos antibióticos beta lactâmicos. Esta PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, que faz parte de um elemento genético móvel, encontrado em todos os isolados com este tipo de resistência, denominado *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) (24, 25, 26). Já foram descritos 8 tipos de SCC*mec*, que diferem entre si no número de genes que carregam e em sua arquitetura gênica. Alguns tipos de SCC*mec* contêm genes que determinam resistência a outros grupos de antibióticos além dos beta lactâmicos, tal como macrolídios, lincosaminas, estreptograminas, aminoglicosídeos e tetraciclina. Assim, quando uma célula de *Staphylococcus aureus* adquire estes SCC*mec*, ela, de uma vez só, adquire um fenótipo de multirresistência aos antibióticos, exceto o SCC*mec* IV que determina resistência somente a oxacilina (26).

### **2.3.2 Resistência à vancomicina**

A vancomicina é um glicopeptídeo, foi descoberta no ano de 1956 pelo laboratório Eli Lilly, obtida a partir da bactéria *Streptomyces orientalis*, que produzia uma substância que inibia o crescimento de microrganismos Gram positivos. Ela possuía cor marrom e era conhecida como lama do Mississippi. Em 1958 o U.S. Food and Drug Administration aprovou o uso clínico da vancomicina e ela vem sendo usada no tratamento de infecções causadas por cocos Gram positivos, inclusive MRSA (27, 28).

O uso excessivo de vancomicina em hospitais pode trazer outros problemas sérios, como o aparecimento de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE) e cepas de *Staphylococcus aureus* com

resistência intermediária, heterorresistência ou resistência total aos glicopeptídeos (3, 27, 28, 29, 30, 31).

No ano de 1996, no Japão, foi identificado o primeiro *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina (VISA; CIM = 8,0µg/mL) denominado Mu50. O microrganismo foi isolado de uma secreção de ferida cirúrgica de um paciente pediátrico que havia feito uma cirurgia cardíaca e estava fazendo uso de vancomicina apresentando falha terapêutica (32). No ano seguinte, foi isolado também no Japão, do escarro de um homem de 64 anos com pneumonia, o primeiro isolado com heterorresistência à vancomicina (hVISA; CIM = 4µg/mL e subpopulações com CIM ≥8,0µg/mL), que ficou conhecido como Mu3 (33). Estes isolados não possuíam o gene *vanA* que causa resistência à vancomicina em *Enterococcus* spp.. Estudos *in vitro* têm sugerido que o uso prolongado de vancomicina pode causar alterações estruturais e metabólicas na bactéria, o que leva a um espessamento na parede celular, limitando a penetração da droga. Nos anos subsequentes, o isolamento de cepas VISA foi também relatado nos Estados Unidos, França e Coreia (3, 27, 28, 31, 34, 35).

No ano de 2001, foi relatado o isolamento de cepas VISA no Brasil por Oliveira *et al*, sendo o primeiro isolamento na América Latina (36). No Hospital de Clínicas de Porto Alegre foi reportado um caso de falha terapêutica à vancomicina em uma criança de 11 meses com pneumonia por MRSA. Inicialmente o *Staphylococcus aureus* foi isolado de uma amostra de derrame pleural e iniciou tratamento com oxacilina e gentamicina. O paciente desenvolveu sepse e 10 dias depois um isolado de MRSA com sensibilidade somente à vancomicina cresceu em uma cultura de aspirado traqueal. Trinta

dias após o uso deste antimicrobiano, o mesmo isolado de MRSA cresceu em uma hemocultura com CIM = 4,0µg/mL por microdiluição em caldo. Vancomicina foi administrada em infusão contínua para atingir um nível sérico de 30,0 – 40,0µg/mL. Após 107 dias de tratamento, o paciente deixou o hospital com sequelas pulmonares. O isolado de MRSA era sensível à vancomicina, porém, quando incubado com este antimicrobiano, ele aumentou a expressão de resistência, havendo crescimento de colônias na presença de até 12,0µg/mL de vancomicina. Baseando-se nestes resultados, o isolado de *Staphylococcus aureus* foi considerado heterorresistente à vancomicina (37).

Em 2002 foi identificada, em Michigan, a primeira cepa de *Staphylococcus aureus* com altos níveis de resistência à vancomicina (VRSA; CIM  $\geq 1.024\mu\text{g/mL}$ ), isolada de um paciente que fazia uso prolongado de vancomicina. Este microrganismo continha o gene *vanA*, sugerindo que houve transferência de material genético de um *Enterococcus* spp. que possuía este gene de resistência, já que o paciente também tinha infecção por VRE. Até o momento, somente nove casos de VRSA foram reportados nos Estados Unidos (27, 28, 35, 38).

## **2.4 Mecanismos de resistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus***

### **2.4.1 Síntese da parede celular**

A parede celular das bactérias Gram positivas é responsável por dar forma e rigidez à célula bacteriana. O peptídeoglicano, também conhecido como mureína, é um polímero grande que compreende cerca de 60% da

parede celular, sendo o restante constituído de ácidos teóicos, ribonucleato de magnésio e carboidratos. Este polímero possibilita a manutenção da alta pressão osmótica presente no citoplasma da bactéria e também permite que ela retenha nutrientes, proteínas essenciais e ácidos nucléicos em seu interior (39, 40).

A síntese do peptídeoglicano inicia-se no citoplasma, com a formação de UDP-N-acetilmuramilpentapeptídeo. Este composto é o ácido N-acetilmurâmico ligado a um pentapeptídeo, composto pelos aminoácidos L-alanina, ácido D-glutâmico, L-lisina, D-alanina e D-alanina (39, 40, 41).

As etapas seguintes da síntese do peptídeoglicano ocorrem na superfície interna da membrana celular. O N-acetilmuramilpentapeptídeo liga-se à N-acetilglicosamina. A L-lisina do pentapeptídeo recebe uma cadeia de aminoácidos formada pela adição de 5 glicinas, chamada pentaglicina (39, 40).

Este dissacarídeo, com um pentapeptídeo e uma pentaglicina, é translocado para a porção externa da membrana citoplasmática, onde, então, é polimerizado. Esta é chamada reação de transglicosilação. Logo após, ocorrem as reações de traspeptidação, catalizadas pelas PBPs. Nesta reação há a formação de ligações cruzadas pela transpeptidação dos terminais peptídicos, ligando as cadeias de peptídeoglicano dentro de uma camada, bem como entre outras camadas (39, 40).

O processo de formação do peptídeoglicano é complexo. Ao mesmo tempo em que há síntese, há a atuação de enzimas que degradam o peptídeoglicano formado, conferindo plasticidade à macromolécula rígida que compõe a parede celular (42).

A diferença entre o que é sintetizado e o que é degradado é que vai determinar se a bactéria está acumulando parede celular (quando a célula está em divisão ou crescimento) ou não (39).

#### **2.4.2 Mecanismo de ação da vancomicina**

Assim como os beta lactâmicos, os glicopeptídeos agem inibindo a síntese da parede celular da célula bacteriana, todavia por outro mecanismo de ação que não o bloqueio de uma determinada enzima envolvida no metabolismo da parede celular e sim o bloqueio de um substrato (D-alanil-D-alanina) (39).

A vancomicina liga-se à porção D-alanil-D-alanina do precursor peptídeoglicano através de pontes de hidrogênio, formando um complexo volumoso, que impede a ação das enzimas transpeptidase e transglicosilase em seu substrato. O resultado é que a síntese de peptídeoglicano fica comprometida, o que leva ao enfraquecimento da parede celular, tornando a bactéria susceptível à lise (39, 40, 43).

Devido a seu alto peso molecular, a vancomicina atua apenas do lado externo da célula bacteriana, não conseguindo penetrar até o citoplasma (43).

#### **2.4.3 Mecanismos de resistência à vancomicina**

O mecanismo de resistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus* que leva a um fenótipo VISA (CIM entre 3,0 e 15,0µg/mL de vancomicina) e hVISA não é totalmente conhecido. Diversos estudos sugerem que seja devido ao sequestro da vancomicina, causado pelo espessamento da parede celular e,

consequente, aumento do número de sítios de ligação D-alanil-D-alanina, o que impede que o antimicrobiano atinja seu sítio de ação (3, 28, 34, 37, 42, 44, 45).

Cepas de hVISA apresentam uma CIM da vancomicina  $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$ , todavia, a cepa contém sub populações de células que apresentam CIM  $\geq 4,0\mu\text{g/mL}$ , numa frequência de aproximadamente  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  células. Por estarem presentes em número muito reduzido, estas células não são detectadas nos inóculos utilizados nos métodos recomendados pelo CLSI (3, 27, 28, 46, 47, 48).

A prevalência de casos de *Staphylococcus aureus* com alto nível de resistência à vancomicina (com CIMs que variam de  $16,0\mu\text{g/mL}$  à  $1.024\mu\text{g/mL}$ ) é muito baixa e, em todos os casos, os pacientes já faziam o uso da vancomicina e eram colonizados ou infectados por VRE. Os genes *van* dos *Enterococcus* spp. encontram-se muitas vezes em elementos móveis, tal como plasmídeos e umas das maiores preocupações é quanto à disseminação destes genes de resistência à vancomicina para a espécie de *Staphylococcus aureus* (27, 36, 38).

O entendimento do mecanismo de resistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus* seria muito importante para a escolha do tratamento das infecções por MRSA, assim como a detecção de cepas VISA e hVISA, que é complexa, também é de grande importância. Vários estudos com o objetivo de identificar quais eventos genéticos são responsáveis pela redução da sensibilidade à vancomicina já foram conduzidos, mas todos conseguiram apenas contribuir para o entendimento do mecanismo e não elucidá-lo por completo (47).



## 2.5 Detecção de resistências à vancomicina em *Staphylococcus aureus* no laboratório de microbiologia

Desde 2009, o CLSI não recomenda mais o uso de disco de vancomicina para testar a sensibilidade de isolados de *Staphylococcus* spp., devido à baixa acurácia deste teste em detectar isolados com resistência intermediária ou plena, nem mesmo isolados que apresentem heterorresistência à vancomicina (49, 50). A nova recomendação é determinar a concentração inibitória mínima por métodos de diluição (macrodiluição em tubo, microdiluição em caldo, agar diluição) e o uso de meio BHI contendo 6µg/mL de vancomicina (48, 49, 50). Há também como alternativa o uso da fita de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia) ou o uso de sistemas automatizados como MicroScan, Phoenix, e Vitek2 (51).

As CIMs de vancomicina preconizadas pelo CLSI para isolados de *Staphylococcus aureus* são:  $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$  é considerado sensível, de 4,0 – 8,0µg/mL intermediário e  $\geq 16,0\mu\text{g/mL}$  resistente (49).

Os métodos de diluição determinam, quantitativamente, a menor concentração do antimicrobiano necessário para inibir o crescimento *in vitro* do microrganismo. Estes métodos não são muito usados em laboratórios de rotina pois, não são práticos, sendo mais utilizado em pesquisas.

A determinação da CIM da vancomicina pela fita de Etest® é o método quantitativo mais utilizado, por ser de fácil execução, embora o preço dessas fitas seja elevado. Alguns estudos recentes têm mostrado que a CIM obtida pelo Etest® pode ser uma ou até duas diluições maiores que a obtida pela

microdiluição em caldo, podendo classificar cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis à vancomicina como intermediárias (6, 51, 52, 53).

## **2.6 Tratamento das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes**

A maioria das cepas de MRSA apresentam resistência a diferentes classes de antimicrobianos, o que torna o tratamento das infecções causadas por este microrganismo complicado, devido ao número limitado de opções terapêuticas (54).

A droga de escolha para o tratamento de uma infecção por MRSA depende do perfil de sensibilidade de cada isolado, mas, em geral, um glicopeptídeo é uma boa opção terapêutica para estas cepas multirresistentes. Até o momento, apenas dois glicopetídeos estão disponíveis no mercado brasileiro para o uso humano, a vancomicina e a teicoplanina (54, 55).

A *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) recomenda que pacientes com infecção por isolados de MRSA com CIM da vancomicina  $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$  (sensível) devam ser tratados com vancomicina, independente da CIM. Se o paciente não estiver respondendo ao tratamento, deve-se considerar a possibilidade de troca de antimicrobiano (56).

A razão da área sob a curva (AUC) pelo CIM (AUC/CIM) é o melhor parâmetro farmacodinâmico para mensurar a atividade da vancomicina no tratamento de infecções por MRSA. Entretanto, muitas vezes é difícil obter várias dosagens séricas do paciente para determinar a AUC e poder calcular a

AUC/CIM. Então, dosar a vancomicina sérica no vale, após a quarta dose, é a melhor maneira de realizar o seu monitoramento terapêutico (54, 57).

Um consenso publicado no ano de 2009 pela *American Society of Health - System Pharmacists*, *Infectious Diseases Society of America* e pela *Society of Infectious Diseases Pharmacists* recomenda que se mantenham concentrações da vancomicina, no vale, de 15,0 – 20,0µg/mL para pacientes com infecções complicadas por MRSA que tenha CIM  $\leq 1,0\mu\text{g/mL}$ . Desta forma, é possível se obter AUC/CIM  $\geq 400$ , que prediz sucesso terapêutico e erradicação do microrganismo (54, 55, 56).

A *American Thoracic Society* (ATS) recomenda que a dose inicial da vancomicina para pacientes com pneumonia por MRSA seja de 15,0mg/kg a cada 12 horas, a fim de obter uma concentração sérica no vale de 15,0 – 20,0µg/mL (58).

Novos antimicrobianos que atuam contra infecções por MRSA já foram lançados no mercado, ampliando as opções terapêuticas. Entre eles, estão o lipopeptídeo daptomicina, indicado principalmente para o tratamento de bacteremias, e a oxazolidinona linezolida. A linezolida é indicada para o tratamento de pneumonias nosocomiais. MRSA resistente a linezolida é raro, porém, já foram descritos casos (28, 55, 56, 59). Outras drogas que também tem ação contra MRSA são quinopristina/dalfopristina e tigeciclina (28).

## **2.7 Relação entre a CIM da vancomicina e o tratamento das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* metilina resistentes**

A vancomicina tem sido uma das únicas opções para o tratamento das infecções provocadas por cepas de MRSA. Entretanto, relatos de falha

terapêutica e aumento da mortalidade têm sido reportados, apesar da sensibilidade apresentada *in vitro* (3, 4, 5, 27, 60, 61, 62). Moise e colaboradores relataram falha terapêutica em 40% dos pacientes com pneumonia por MRSA que fizeram o uso de vancomicina. Estes isolados apresentavam-se sensíveis a este antimicrobiano (63).

Estudos têm demonstrado que a falha no tratamento ocorre quando as CIMs estão próximas ou no ponto de corte determinado como sensível pelo CLSI (4, 5, 60). Sakoulas e colaboradores observaram uma menor eficácia no tratamento de bacteremias com vancomicina de isolados de MRSA que apresentavam CIMs da vancomicina entre 1,0 e 2,0 $\mu$ g/mL, quando comparados com isolados que apresentavam CIMs menores que 0,5  $\mu$ g/mL (60).

Lodise e colaboradores, em um estudo retrospectivo de coorte com 92 pacientes que receberam vancomicina para o tratamento de bacteremia por MRSA, relataram que os pacientes que obtiveram CIMs da vancomicina  $\geq 1,5\mu$ g/mL estavam associados com maior risco de mortalidade (4). Soriano e colaboradores obtiveram resultados semelhantes em um estudo prospectivo com 414 pacientes com bacteremia, CIMs da vancomicina  $\geq 1,0\mu$ g/mL estavam associados com maior risco de mortalidade (5). Um estudo de caso controle avaliou a efetividade da vancomicina comparada com a daptomicina no tratamento de bacteremias por MRSA com CIMs da vancomicina  $>1,0\mu$ g/mL. Um total de 118 pacientes foram tratados com vancomicina e 59 com daptomicina. Dos 118 pacientes tratados com vancomicina, em 102 (86%) a CIM foi de 1,5 $\mu$ g/mL e em 16 (14%) foi de 2,0 $\mu$ g/mL. Falha terapêutica, definida como mortalidade, falha microbiológica, e/ou recorrência foi menor no grupo tratado com daptomicina (31% *versus* 17%). A mortalidade em 60 dias também

foi menor no grupo da daptomicina (20% *versus* 9%). Estes resultados mostraram que a daptomicina estava associada com melhor desfecho clínico dos pacientes, comparada com a vancomicina, para o tratamento de bacteremias por MRSA com CIMs da vancomicina  $>1,0\mu\text{g/mL}$  (64). Todos esses estudos utilizaram a metodologia de Etest® para determinar a CIM da vancomicina (4, 5, 64).

Haque e colaboradores avaliaram 158 isolados de MRSA, de pacientes com pneumonia, e 115 (72,8%) apresentavam CIM da vancomicina  $\geq 1,5\mu\text{g/mL}$  por Etest®. A mortalidade em 28 dias foi de 32,3%. Heterorresistência à vancomicina foi demonstrada em 21,5% dos isolados, e não estava associada com mortalidade. A conclusão do estudo foi que a mortalidade aumenta a medida que a CIM aumenta  $1,0\mu\text{g/mL}$ , mesmo que a CIM do isolado de MRSA esteja dentro dos limites de sensibilidade (1). Choi e colaboradores analisaram, retrospectivamente 70 pacientes com pneumonia nosocomial por MRSA. Trinta e quatro pacientes (48,6%) apresentaram CIM da vancomicina  $\geq 1,5\mu\text{g/mL}$  e 36 pacientes (51,4%)  $\leq 1,0\mu\text{g/mL}$ . A mortalidade em 28 dias foi de 32,9% e não apresentou diferença significativa entre os grupos que tinha CIM da vancomicina  $\geq 1,5\mu\text{g/mL}$  e  $\leq 1,0\mu\text{g/mL}$  (65). Um estudo multicêntrico, duplo cego, avaliou a atividade da telavancina *versus* vancomicina no tratamento de pneumonia hospitalar causada por cocos Gram positivos. Um total de 1.503 pacientes foram randomizados 1:1 com telavancina e vancomicina. Dos 133 isolados de MRSA 79% apresentaram CIMs de vancomicina  $\leq 0,5\mu\text{g/mL}$  e 74% CIMs  $\geq 1,0\mu\text{g/mL}$  por microdiluição em caldo. Pneumonias causadas somente por MRSA com CIM da vancomicina  $\geq 1,0\mu\text{g/mL}$  tiveram índices de cura

significativamente maior com telavancina comparada com o tratamento com vancomicina (diferença no tratamento de 12.5%) (66).

Tabela 1. Estudos em pneumonias que avaliam a associação entre desfecho clínico e CIM da vancomicina.

Referência	N MRSA	CIM Método	Mortalidade % (n)			Falha terapêutica		
			CIM vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ )		
			<1.5	$\geq 1.5$	P	<1.5	$\geq 1.5$	P
Choi <i>et al</i> <sup>(65)</sup>	70	Etest <sup>®</sup>	17% (6/36)	12% (4/34)	.62	36% (13/36)	65% (22/34)	.03
Haque <i>et al</i> <sup>(1)</sup>	158	Etest <sup>®</sup>	23% (10/43)	36% (41/115)	ND	-	-	-
Rubinstein <i>et al</i> <sup>(66)</sup>	133	Microdiluição	-	-	-	$\leq 0.5$ 79% (22/28)	$\geq 1.0$ 74% (78/105)	P ND

Tabela adaptada de van Hal *et al* (2012). ND – não descrito.

Uma metanálise publicada por van Hal e colaboradores avaliou 22 estudos que relacionavam resposta clínica e CIMs da MRSA que estavam causando infecção. Os pesquisadores encontraram que CIMs elevados da vancomicina estão associados com aumento da mortalidade em pacientes com bacteremia por MRSA. Entretanto, este resultado não foi encontrado em outras infecções por MRSA. Os pacientes com bacteremia por MRSA com CIM da vancomicina por Etest<sup>®</sup>  $\geq 2,0\mu\text{g/mL}$  estavam associados com maior mortalidade. Já uma CIM da vancomicina por Etest<sup>®</sup> de  $1,5\mu\text{g/mL}$  ou  $\leq 1,0\mu\text{g/mL}$  não apresentou associação com mortalidade. van Hal e colaboradores recomendam que os laboratórios utilizem a metodologia de

Etest® para a determinação da CIM da vancomicina para isolados de MRSA que estejam causando bacteremia e que os clínicos usem outras opções terapêuticas quando a CIM for  $\geq 2,0 \mu\text{g/mL}$  (67).

Uma possível explicação para a falha da vancomicina, quando a CIM está próxima do ponto de corte de sensibilidade, pode ser a presença de cepas heterorresistentes. Appelbaum et al sugere que cepas de *Staphylococcus aureus*, com CIMs que variam de  $1,0 \mu\text{g/mL}$  a  $2,0 \mu\text{g/mL}$  isoladas de pacientes que estão tendo falha no tratamento com vancomicina, devem ser investigadas para a possível ocorrência de heterorresistência (24). Sancak e colaboradores mostraram que a heterorresistência estava presente em 46 (17,9%) de 256 amostras de MRSA isoladas de diferentes espécimes clínicos. Os valores das CIMs da vancomicina para os isolados heterorresistentes variaram de  $0,125 - 4,0 \mu\text{g/mL}$ . Doze dos 46 pacientes com hVISA receberam tratamento prévio com vancomicina ou teicoplanina (68). Outro estudo mostrou que 255 (11%) de 2.300 isolados de *Staphylococcus aureus* apresentavam heterorresistência à vancomicina, incluindo 7 *Staphylococcus aureus* metilina sensíveis e 248 MRSA (69). Os resultados da tipagem molecular realizada por *pulsed field gel eletrophoresis* (PFGE) mostraram que 238 cepas pertenciam ao mesmo clone. Nos Estados Unidos a média das CIMs da vancomicina é  $1,0 \mu\text{g/mL}$  para cepas de *Staphylococcus aureus*, como mostram alguns estudos de vigilância, o que torna inviável pesquisar heterorresistência em todos os casos. A prevalência de heterorresistência varia de 0 a  $>50\%$ , ficando difícil estabelecer a importância dela nesses casos (28, 70).

## **2.8 Relação entre o locus *agr* e a ocorrência de falha terapêutica/mortalidade em pacientes com infecção por MRSA.**

Outra possibilidade para explicar a diminuição da sensibilidade de alguns isolados de MRSA à vancomicina seria o tipo de locus *agr* (*accessory gene regulator*) presente nos *Staphylococcus aureus*. O locus *agr* tem atividade de quorum-sensing, é responsável pela produção de fatores de aderência, biofilme e fatores de virulência da bactéria. Este locus é composto por 5 genes (*hld*, *agrB*, *agrD*, *agrC*, *agrA*). Polimorfismos nos genes *agrD* e *agrC* faz com que ocorram quatro tipo de locus *agr* em *Staphylococcus aureus* (I, II, III e IV) (47, 71).

Sakoulas e colaboradores descrevem que isolados de *Staphylococcus aureus* pertencentes ao grupo *agr* II têm uma maior predisposição a desenvolverem diminuição de sensibilidade à vancomicina (72, 73). Isto ocorre porque estes isolados apresentam uma maior produção de biofilme e uma redução na autólise celular, que teriam efeito protetor para a bactéria na presença de vancomicina, dificultando a chegada da droga no seu sítio de ação (28, 47).

Moise-Broder e colaboradores avaliaram 87 pacientes que receberam vancomicina para o tratamento de infecções por cepas de MRSA. Quarenta e cinco tiveram falha no tratamento com este antimicrobiano. Destes 45, 31(68,9%) tinham a presença do *agr* II, mas a sua presença não estava associada com mortalidade em 30 dias (73).

A disfunção do locus *agr* é medida pela ausência total da produção de delta hemolisina. Schweizer e colaboradores relataram que de 814 pacientes



com bacteremia por *Staphylococcus aureus*, 181 (22%) tinham o locus *agr* disfuncional e estava associado com maior mortalidade (74). Tsuji e colaboradores, em um ensaio *in vitro*, expuseram cepas de *Staphylococcus aureus* com *agr* I-IV a diferentes concentrações de vancomicina e observaram que tanto as cepas que tinham *agr* funcional e disfuncional desenvolveram resistência ao antimicrobiano. Porém as que tinham o *agr* disfuncional desenvolveram de quatro a cinco vezes mais resistência que as com *agr* funcional (75). O mesmo autor relatou que 48% dos isolados de MRSA hospitalares possuem o locus *agr* disfuncional, que pode ser clinicamente relevante (76).

Isolados de *Staphylococcus aureus* com um locus *agr* disfuncional tendem a secretar um menor número de fatores de virulência, sendo, portanto, menos agressivos e talvez menos letais que os com sistema *agr* funcional, o que leva a serem expostas por mais tempo à vancomicina, dando tempo para o surgimento de tolerância e, eventualmente, resistência (47, 67).

Entretanto, mais estudos se fazem necessários para confirmar se realmente há uma relação entre falha terapêutica da vancomicina e o aumento da mortalidade em pacientes infectados por MRSA e a presença do locus *agr*.

### 3. JUSTIFICATIVA

*Staphylococcus aureus* metilina resistente se tornou um problema nos Centros de Terapia Intensiva (CTI) do mundo inteiro. Estudos têm demonstrado que cepas de MRSA estão associadas com maior mortalidade em pacientes com infecção por este microrganismo, principalmente em pneumonias. Nos últimos anos, tem sido evidente o aparecimento de *Staphylococcus aureus* metilina resistente com concentração inibitória mínima elevada, próxima ou no ponto de corte determinado como sensível pelo CLSI, (CIM  $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$ ). Estes dados sugerem que a vancomicina teria uma atividade reduzida no tratamento de cepas de MRSA com CIMs elevadas, estando associado com maior mortalidade.

Portanto, se faz necessário um estudo, em nossa instituição, para determinar as concentrações inibitórias mínimas da vancomicina dos isolados de MRSA do trato respiratório e correlacionar com mortalidade em pacientes com pneumonia.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

O objetivo deste estudo é avaliar a concentração inibitória mínima da vancomicina de isolados de MRSA, em pacientes com pneumonias por MRSA internados no CTI do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e correlacionar com mortalidade.

### **4.2 Objetivos específicos**

4.2.1 Avaliar a relação entre as CIMs obtidas pelas metodologias de Etest® e microdiluição em caldo;

4.2.2 Avaliar o desfecho morte em 30 dias dos pacientes com as diferentes CIM identificadas;

4.2.3 Avaliar a relação do nível sérico da vancomicina, CIM e o desfecho morte em 30 dias.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haque N, Zuniga LC, Peyrani P, Reyes K, Lamerato L, Moore CL et al. Relationship of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration to Mortality in Patients With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospital – Acquired, Ventilator – Associated, or Health – Care Associated Pneumonia. *Chest* 2010;138(6):1356-1362.
2. Bannerman TM. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinicas Microbiology*. 9<sup>th</sup>ed. Washington:ASM Press;2007. v.1:390-411.
3. Sakoulas G, Moellering RC. Increasing antibiotic resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Infect Dis* 2008;46(5):360-367.
4. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, Lomaestro BM et al. Relationship between Vancomycin MIC and Failure among Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia Treated with Vancimycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(9):3315-3320.
5. Soriano A, Marco F, Martinez JÁ, Pisos E, Almela M, Dimova VP et al. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Infect Dis* 2008;46:193-200.
6. Prakash V, Lewis JS, Jorgensen JH. Vancomycin MICs for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Differ Based upon the Susceptibility Test Method Used. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008;52(12):4528.

7. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Staphylococcus* e Cocos Gram Positivos Relacionados. In: Microbiologia Médica. 6<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro: Mosby; 2009. p. 209-223.
8. Ribeiro A, Dias C, Silva – Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RNS et al. First Report of Infection with Community – Acquired Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Infect 2005;43(4):1985-1988.
9. Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N. A Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. J Clin Microbiol 2005;43(7):3356-3363.
10. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 2005;40:562-573.
11. Klein E, Smith DL, Laxminarayan. Hospitalizations and Deaths Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. Emerg Infect Dis 2007;13(12):1840-1846.
12. Whitener CJ, Park SY, Browne FA, Parent LJ, Julian K, Bozdogan B et al. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Absence of Vancomycin Exposure. Clin Infect Dis 2004;38:1049-1055.
13. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004;39:309-317.

14. Winn Jr W, Allen S, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Cocos Gram Positivos Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados. In: Diagnóstico Microbiológico. 6ªed. Rio de Janeiro:Guanabara;2008:617-666.
15. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN et al. Survey of infections due to *Staphylococcus aureus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001;32:114-132.
16. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2005-2008). Braz J Infect Dis 2009;13(2):90-98.
17. Finland M. Emergence of antibiotic-resistant bacteria. N Engl J Med 1955;253:909–22.
18. Parker MT, Jevons MP. A survey of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Postgrad Med J 1964;40:170–178.
19. Bauer AL. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. JAMA 1960;173(5):475-480.
20. Boyce JM, Cookson B, Christiansen K, Hori S, Vuopio-Varkila J, Kocagöz S et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis 2005;5:653-663.

21. Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-485.
22. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis* 2006;42:389-391.
23. Sader HS, Moet GJ, Jones RN. Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin American hospitals. *J Chemother* 2009;21(6):611-620.
24. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(1):16-23.
25. Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(1):3-8.
26. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 2003;6:41-52.
27. Tenover FC, Moellering Jr RC. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretative criteria for *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2007;44:1208-1215.

28. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson L. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(1):99-139.
29. Charles PGP, Ward PB, Johnson PDR, Howden BP, Grayson ML. Clinical Features Associated with Bacteremia Due to Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2004;38:448-451.
30. Howden BP, Johnson PDR, Ward PB, Stinear TP, Davies JK. Isolates with Low-Level Vancomycin Resistance Associated with Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(9):3039-3047.
31. Ruef C. Epidemiology and Clinical Impact of Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection* 2004;32(6):315-327.
32. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135–136.
33. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S et al. Dissemination in Japanese hospitals of strain of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997;350:1670-1673.
34. 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.

35. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med 2003;348:1342-1347.

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

37. Lutz L, Machado A, Kuplich N, Barth AL. Clinical failure of vancomycin treatment *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. Braz J Infect Dis 2003;7(3):224-228.

38. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002;51:565–567.

39. Tavares W. Mecanismo de Ação dos Antimicrobianos. In: Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos. 3ªed. São Paulo: Atheneu;2001. p. 33-50.

40. Geisel R, Schmitz FJ, Fluit AC, Labischinski H. Emergence, mechanism, and clinical implications of reduced glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*. Eur Clin Microb Infect 2001;20:685-697.

41. Moellering RC. The specter of glycopeptide resistance: current trends and future considerations. Am J Med 1998;104(5):3-6.

42. Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a Thickened Cell Wall and its Glutamine Nonamidated Component to the Vancomycin Resistance Expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2276-2285.
43. Nagarajan R. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;33:1477-1481.
44. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006;42(1):25–34.
45. Sieradzki K, Tomasz A. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2003;185:7103–7110.
46. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Ho P, Wootton M, Howe RA et al. Evaluation of current methods for detection of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001;39:2439-2444.
47. McCulloch JA. Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos. São Paulo, 2006. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
48. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 8<sup>th</sup>ed. CLSI document M7-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008;Wayne, PA.

49. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute 2009;Wayne, PA.
50. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR and Sinto SI. Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. In: Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3ªed. São Paulo:SARVIER, 2010. p. 315-356.
51. Swenson JM, Anderson KF, Lonsway DR, Thompson A, McAllister SK, Limbago BM et al. Accuracy of Commercial and Reference Susceptibility Testing Methods for Detecting Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2009;47(7):2013-2017.
52. Sader HS, Rhomberg PR, Jones RN. Nine-Hospital Study Comparing Broth Microdilution and Etest Method Results for Vancomycin and Daptomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemother 2009;53(7):3162-3165.
53. Machado DP, Nagel F, Aquino VR, Martins DS, Nazário R, Goldani LZ, Santos RP. Vancomycin minimal inhibitory concentration from broth microdilution and Etest in respiratory tract samples of patients with ventilation-associated pneumonia. J Hosp Infect 2010;76(2):182-184.
54. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, Moellering Jr R, Craig W, Billeter M et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: A consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of América, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Am J Health-Syst Pharm 2009;66:82-98.

55. Giuliano C, Haase KK, Hall R. Use of vancomycin pharmacodynamic properties in the treatment of MRSA infections. *Anti Infect Ther* 2010;8(1):95-106.
56. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clin Infect Dis* 2011;52(3):285-292.
57. Fuchs FD, Kuchembecker RS. Principios Gerais do Uso de Antimicrobianos. In: Fuchs FD, Wannmacher L. *Farmacologia Clínica Fundamentos da Terapeutica Racional*. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara;2010. p. 466-483.
58. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidline for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:388-416.
59. Sanchez Garcia M, De la Torre MA, Morales G, Peláez B, Tolón MJ, Domingo S et al. Clinical outbreak of linezolid - resistant *Staphylococcus aureus* ina intensive care unit. *JAMA* 2010;303:2260-2264.
60. Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J, Forrest A, Moellering Jr RC, Eliopoulos GM. Relationship of MIC and Bactericidal Activity to Efficacy of Vancomycin for Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *J Clin Microbial* 2004;42(6):2398-2402.

61. Lodise TP, Miller CD, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M et al. Predictors of high vancomycin MIC values among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1138-1141.
62. Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:398-408.
63. Moise PA, Schentag JJ. Vancomycin treatment failures in *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16:31-34.
64. Moore C, Osaki-Kiyan P, Haque N, Perri MB, Donabedian S, Zervos MJ. Daptomycin Versus Vancomycin for Bloodstream Infections Due to Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* With a High Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration: A CaseControl Study. *Clin Infect Dis* 2012;54(1):51-58.
65. Choi EY, Huh JW, Lim CM, Koh Y, K SH, Choi SH et al. Relationship between the MIC of vancomycin and clinical outcome in patients with MRSA nosocomial pneumonia. *Int Care Med* 2011;37:639-647.
66. Rubinstein E, Lalani T, Corey GR, Kanafani ZA, Nannini EC, Rocha MG et al. Telavancin versus vancomycin for hospital acquired pneumonia due to gram positive pathogens. *Clin Infect Dis* 2011;52:31-40.
67. van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The Clinical Significance of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in *Staphylococcus aureus* Infections: A Systematic Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011;54(6):755-771.

68. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Hascelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:519-523.
69. Garnier F, Chainier D, Walsh T, Karlsson A, Solmstrom A, Grelaud C et al. A 1 – year surveillance study of glycopeptides – intermediate *Staphylococcus aureus* strains in a French hospital. *J Antimicrobial Chemother* 2006;57:146-149.
70. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001;7:327-332.
71. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, et al. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1492-1502.
72. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Novick RP, Venkataraman L, Wennersten C et al. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: Is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptides resistance? *J Infect Dis* 2003;187:929-938.
73. Moise-Broder PA, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Schentag JJ, Forrest A, Moellering Jr RC. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis* 2004;38:1700-1705.

74. Schweizer ML, Furano JP, Sakoulas G, Johnson JK, Harris AD, Shardell MD et al. Increased Mortality with Accessory Gene Regulator (*agr*) Dysfunction in *Staphylococcus aureus* among Bacteremic Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):1082-1087.

75. Tsuji BT, Rybak MJ, Lau KL, Sakoulas G. Evaluation of accessory gene regulator (*agr*) group and function in the proclivity towards vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1089 – 1091.

76. Tsuji BT, Rybak MJ, Cheung CM, Amjad M, Kaatz GW. Community – and health care – associated methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*: a comparison of molecular epidemiology and antimicrobial activities of various agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;8:41-47.

## 6. ARTIGO I

### **Vancomycin minimal inhibitory concentration from Broth Microdilution and Etest in respiratory tract samples of patients with ventilation associated pneumonia.**

J Hosp Infect 2010;76(2):182-184.

Machado DP<sup>a\*</sup>, Naguel F<sup>bc</sup>, Aquino VR<sup>a</sup>, de Souza Martins D<sup>a</sup>, Nazário R<sup>c</sup>,  
Goldani LZ<sup>d</sup>, dos Santos RP<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Microbiology Unit – Service of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>b</sup>Infection Control Committee, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>c</sup>Intensive Care Unit, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>d</sup>Service of Infectious Diseases, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

\* Denise Pires Machado – corresponding author

Microbiology Unit – Service of Clinical Pathology,

Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350.

PO Box: 90035-903

Porto Alegre, RS – Brazil

denpires@hotmail.com

telephone: 55 51 3359 8452

fax number: 55 51 3359 8310



Infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are a relevant problem in hospitals worldwide.<sup>1</sup> Vancomycin is the treatment of choice for MRSA infections. However, treatment failure is not uncommon, even when MRSA strains are in the susceptible range for vancomycin, minimum inhibitory concentration (MIC)  $\leq 2.0 \mu\text{g/mL}$ . Recent studies have demonstrated increased clinical failure of MRSA infection when isolates have CIMs for vancomycin between  $1.5 \mu\text{g/mL}$  and  $2.0 \mu\text{g/mL}$ .<sup>2, 3</sup>

Some authors have used broth microdilution method, or the Etest commercial product for determining vancomycin MICs. So far, the results have shown that vancomycin MICs generated by Etest are higher than those generated by broth microdilution.<sup>4, 5</sup>

We evaluated the correlation between vancomycin MICs obtained by broth microdilution and Etest. From June 2009 to February 2010, 18 patients with documented MRSA ventilator-associated pneumonia were included.

Isolates were identified according to standard techniques.<sup>6</sup> Vancomycin MICs were determined by broth microdilution using Clinical Laboratory Standards Institute methods, and by Etest method using a 0.5 McFarland inoculum.

The mean age of the patients was  $56.7 \pm 15$  years, and 67% of them were male. Thirty-nine percent of them were immunosuppressed (e.g., HIV, malignancy, organ transplant). The mean APACHE II score at diagnosis was  $22.8 \pm 7.3$ . All patients were on mechanical ventilation. All patients were treated with vancomycin. The mean length of therapy was  $11 \pm 8$  days, with a mean

serum vancomycin level (after the fourth dose) of  $24.9 \pm 14 \mu\text{g/ml}$ . Thirty-day all-cause mortality was 55.6%.

The mean vancomycin MICs was 0.94 and 0.55, generated by Etest and broth microdilution, respectively. Four (22.2%) of the MICs generated by Etest were  $0.5\mu\text{g/mL}$ , while 88.8% (N=16) of those generated by broth microdilution were  $0.5\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.001$ ) – Table I.

Two studies have correlated vancomycin MIC values with prognosis in patients with MRSA infection. A retrospective cohort study of 92 patients who received vancomycin for bacteremia therapy, found that MICs  $\geq 1.5\mu\text{g/mL}$  were associated with higher mortality. Similarly, Soriano et al evaluated prospectively 414 patients with MRSA bacteremia, and patients with vancomycin MICs  $> 1.0\mu\text{g/mL}$  had higher mortality.<sup>2,3</sup>

In our study, most of the patients had low MRSA MIC levels for vancomycin (77.7% of them  $< 1.5 \mu\text{g/mL}$ ) by Etest, a finding in opposition to those of Lodise<sup>3</sup> (28.3%  $< 1.5 \mu\text{g/mL}$ ) and Soriano<sup>2</sup> (26.3%  $< 1.5 \mu\text{g/mL}$ ).

Comparing MIC values determined by both methods, our results are similar to other studies which found that vancomycin MICs generated by Etest are one twofold dilution higher than MICs determined by broth microdilution. Prakash et al analyzed 101 strains and found that 89-98% of vancomycin MICs were between  $1.5\text{-}2.0\mu\text{g/mL}$  by Etest, but only 3% were  $2.0\mu\text{g/mL}$  when determined by broth microdilution.<sup>4</sup> Sader et al analyzed 1800 strain samples and 96.9% of them exhibited vancomycin MICs  $\leq 1.0\mu\text{g/mL}$  by broth microdilution, while 58.3% and 32.1% were 1.5 and  $2.0\mu\text{g/mL}$ , respectively, by Etest method.<sup>5</sup> In our results, only 22% of the MRSA strains had vancomycin

MICs  $\geq 1.5\mu\text{g/mL}$  by Etest, while none were  $\geq 1.5\mu\text{g/mL}$  by broth microdilution. Swenson et al compared commercial and reference (CLSI broth microdilution) susceptibility testing methods for detecting vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA). From a total of 129 samples, Etest had a tendency to categorize susceptible strains as VISA when compared to other methods.<sup>7</sup>

Vancomycin used to be the only choice for treatment of MRSA pneumonia. A randomized trial compared vancomycin with linezolid in patients with pneumonia.<sup>8</sup> Despite favorable lung pharmacokinetics of linezolid, mortality rate was similar between groups and the Food and Drug Administration approved linezolid for treatment of MRSA respiratory infections. Considering our data, and based on the bacteremia studies by Lodise and Soriano,<sup>2, 3</sup> for at least 22% of our patients the therapy with an alternative agent should be offered (linezolid, instead of vancomycin) based on Etest MIC values. Nevertheless, if we consider broth microdilution MIC values, these patients could have been treated with vancomycin, with optimal trough serum concentrations (15-20  $\mu\text{g/mL}$ ).

Swenson et al reported MIC results for 129 samples, but these were not stratified by infection site.<sup>7</sup> The studies by Soriano and Lodise,<sup>2, 3</sup> addressed only patients with MRSA bacteremia. Are these results reproducible in patients with MRSA pneumonia? May the MIC cutoff values of patients with MRSA bacteremia associated with poorer prognosis be extrapolated to patients with pneumonia? Should linezolid be the treatment of choice in patients with pneumonia and MICs, obtained by Etest, greater than 1.0-1.5 $\mu\text{g/mL}$ ?

Many points are still unsolved. The number of patients herein included precludes us to compare mortality rates. Randomized prospective trials with adequate MIC tests methodology must address these questions in the near future. In the meanwhile we are recommending vancomycin for treatment of MRSA respiratory infections in our setting.

**Acknowledgment:**

The authors would like to thank the Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, for partial support of this study.

Potential conflicts of interest: All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

**References:**

- 1- Finks J, Wells E, Dyke TL, *et al.* Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. *Emerg Infect Dis* 2009;**15**:943-945.
- 2- Soriano A, Marco F, Martinez JÁ, *et al.* Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Infect Dis* 2008;**46**:193-200.
- 3- Lodise TP, Graves J, Evans A, *et al.* Relationship between Vancomycin MIC and Failure among Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia Treated with Vancomycin. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008;**52**:3315-3320.
- 4- Prakash V, Lewis JS, Jorgensen JH. Vancomycin MICs for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Differ Based upon the Susceptibility Test Method Used. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008;**52**:4528.
- 5- Sader HS, Rhomberg PR, Jones RN. Nine-Hospital Study Comparing Broth Microdilution and Etest Method Results for Vancomycin and Daptomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2009;**53**:3162-3165.
- 6- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, 7<sup>th</sup> ed. Wayne, PA;2006.
- 7- Swenson JM, Anderson KF, Lonsway DR, *et al.* Accuracy of Commercial and Reference Susceptibility Testing Methods for Detecting Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2009;**47**:2013-2017.

8- Rubinstein E, Cammarata S, Oliphant T, *et al.* Linezolid versus vancomycin in the treatment of hospitalized patients with nosocomial pneumonia: a randomized, double-blind, multicenter study. *Clin Infect Dis* 2001;**32**:402-412.

Table I. Comparison of vancomycin MICs determined by broth microdilution, and Etest.

Vancomycin MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of isolates (%) with MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) determined by	
	Etest	Broth microdilution
<b>0.5</b>	4 (22.2)	16 (88.8)
<b>0.75</b>	6 (33.3)	-
<b>1.0</b>	4 (22.2)	2 (11.2)
<b>1.5</b>	3 (16.6)	-
<b>2.0</b>	1 (5.5)	-

## 7. ARTIGO II

### ***Staphylococcus aureus* MICs by Etest and broth microdilution and 30-day mortality in patients with hospital pneumonia**

Artigo submetido para o Journal of Hospital Infection.

Machado DP<sup>a\*</sup>, Goldani LZ<sup>b</sup>, Paiva RM<sup>c</sup>, de-Paris F<sup>c</sup>, Aquino VR<sup>a</sup>, Lisboa T<sup>de</sup>,  
Jung B<sup>f</sup>, Santos RP<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Microbiology Unit – Service of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>b</sup>Service of Infectious Diseases, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>c</sup>Molecular Biology Unit - Service of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>d</sup>Intensive Care Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>e</sup>Infection Control Committee, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>f</sup>Medicine University, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.



## Summary

**Background:** Pneumonias due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are associated with significant mortality in Intensive Care Units (ICU) patients. Vancomycin is the treatment of choice for MRSA infections; however treatment failure is not uncommon, even when MRSA strains are in the susceptible range for vancomycin.

**Aim:** The purpose of this study was to evaluate the prevalence of the vancomycin minimum inhibitory concentration (MICs) at the high end of the CLSI susceptible range and describe the relationship between vancomycin MIC generated by Etest and broth microdilution with 30-day mortality in MRSA pneumonia patients.

**Methods:** We conducted a prospective cohort study. All patients with MRSA hospital acquired pneumonia (HAP) and ventilator-associated pneumonia (VAP) admitted in ICU between June 2009 and December 2011 were included. Vancomycin MIC was determined by Etest® and broth microdilution. The variables selected for the analysis included age, sex, comorbid conditions, vancomycin serum trough concentration, APACHE II score and the presence of the accessory gene regulator II (*agr II*). The primary outcome was mortality at 30-day.

**Findings:** A total of 85 patients with MRSA pneumonia were included. Sixty eight (80.1%) of the vancomycin MICs generated by Etest were equal or below 1.0µg/mL. While all MICs generated by broth microdilution were ≤1.0µg/mL. All case mortality at the 30-day was 42.4%.

**Conclusion:** Vancomycin MICs by Etest and broth microdilution were not associated with mortality in patients with severe MRSA pneumonia.

### **Keywords**

*Staphylococcus aureus*, vancomycin, mortality, pneumonia, Etest, broth microdilution.

### **Introduction**

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a prevalent nosocomial pathogen worldwide, and is a frequent cause of serious infectious that is associated with significant morbidity, mortality, and high costs of medical care.<sup>1, 2</sup> This microorganism is recognized as a significant cause of pneumonia especially in intensive care units (ICU).<sup>3</sup>

MRSA is usually resistant to most antimicrobial agents available for clinical use.<sup>1</sup> With limited choices for therapy, vancomycin is still the first-line option to treat these infections.<sup>4-6</sup>

However, treatment failure with vancomycin is not uncommon, even when the minimum inhibitory concentration (MIC) is below the susceptibility breakpoint for *Staphylococcus aureus* ( $\leq 2.0\mu\text{g/mL}$ ), as stated by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Some authors suggest that if vancomycin MICs are greater than  $1.0\mu\text{g/mL}$  an alternative option of treatment should be consider.<sup>7-10</sup> These studies used Etest method to correlate elevated MICs and

worst outcomes. Interestingly, the CLSI recommends use of dilution methods for testing *Staphylococcus aureus* MICs for vancomycin.

Furthermore, some studies demonstrated that MICs generated by Etest are one to two-fold dilution higher than MICs determined by broth microdilution.<sup>11-14</sup> The objective of this study was to describe the relationship between vancomycin MIC generated by Etest and broth microdilution with 30-day mortality in patients with MRSA pneumonia admitted to an Intensive Care Unit (ICU).

## **Methods**

### Study design and population

A prospective cohort study was conducted at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a 795-bed, tertiary care, academic hospital located in Porto Alegre, southern Brazil. All patients with MRSA hospital acquired pneumonia (HAP) or ventilator-associated pneumonia (VAP) admitted in the ICU between June 2009 and December 2011 were included.

Adult patients (age  $\geq 18$  years) were included in the study if they met the American Thoracic Society (ATS) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA) definitions for HAP or VAP and had at least one positive MRSA culture isolated from respiratory site.<sup>15</sup> Patients were excluded if they received  $\leq 1$  day of MRSA specific therapy. For patients with multiples MRSA respiratory cultures, the first vancomycin MIC of the index respiratory culture isolate was considered in the analysis.<sup>8, 9</sup>

### Study Variables and Definitions

We collected data related to demographic characteristics, comorbidities and laboratory results. The variables selected for the analysis included age, sex, comorbid conditions, mean vancomycin serum trough concentration for each patient according Rybak et al (vancomycin was dosed per pharmacokinetic protocol of the institution to attain a trough of 15.0-20.0 $\mu$ g/mL).<sup>4</sup> The Acute Physiological and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score was calculated for all patients at the time admission in the ICU to assess the severity of the underlying illness. The comorbidities were divided in groups: chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cardiac disease, gastrointestinal disease, renal disease, diabetes, neurological disease, solid organ transplant, hematologic neoplasia, alcoholism, solid neoplasia, corticosteroids use, HIV disease, bone marrow transplant and other.

Mortality at 30 days was the primary outcome defined as death within 30 days of index MRSA respiratory culture.<sup>8</sup>

#### Laboratory Analysis

Isolates were identified from the respiratory samples according to standard techniques. Initial susceptibility testing for oxacillin resistance was performed according to CLSI guidelines, using a 30 $\mu$ g cefoxitin disc in Mueller-Hinton agar.<sup>16</sup> Individual isolates were stored in trypticase soy broth with 20% glycerol at -80°C until MIC testing was performed. The MICs of vancomycin were determined in duplicate by reference broth microdilution method, as recommended by CLSI, using in house prepared panels. The following dilutions of vancomycin were tested: 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, and 0.125 $\mu$ g/mL.<sup>17</sup> The Etest procedure was performed using Mueller-Hinton agar, with an inoculum

density to a 0.5 McFarland turbidity standard to create a confluent lawn of microbial growth. The cultures were incubated for 24h at a 35°C. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used for quality control (17). Detection of *mecA* and *agr II* gene were performed by PCR using specific primers.<sup>18, 19</sup>

### Statistical Analysis

A descriptive analysis of the variables collected from each patient was performed. Continuous variables are shown as median values and the dispersion measurement as interquartile range (IQR) values. One-way ANOVA analysis with two-sided Bonferroni multiple comparisons test was performed to compare mean differences in MIC levels by Etest and broth microdilution throughout the study period.

Cox-regression analysis was used for univariate analysis of selected variables. Associations were considered statistically significant when *P* value was  $\leq 0.05$ . Multivariate hazard ratios (HR), along with 95% confidence intervals (CI), were calculated using the Cox proportional hazards regression model. We included in the final model, the variables with *P* value  $\leq 0.05$  by univariate analysis or those clinically related to the outcome. Survival analysis was based on Kaplan-Meier method and comparisons of survival curves were made by the log-rank test. Data were analyzed in SPSS 18.0 version program.

### Results

There were 85 patients diagnosed with MRSA pneumonia in the studied period. Of these 64.7% (N=55) were men, the median age was 63 years (IQR 25-75%, 49-75). The median APACHE II score was 23.0 (IQR 25-75%, 17.5-

29.0). From these patients, 88,3% were diagnosed with MRSA VAP - 81.2% (N=69) MRSA was identified by traqueal aspirate, and 7.1% (N=6) by bronchoalveolar lavage. The remaining patients had HAP diagnosed by sputum 10.6%; (N=9), and 1.2% (N=1) by culture of pleural fluid. Forty six (54.1%) isolates of MRSA from patients were positive for *agr* II, and in all isolates were confirmed the presence of gene *mecA*. For seventy patients there were vancomycin serum levels available. The median serum levels of vancomycin were 20.7 (12.0-29.1). Patient clinical and demographic data are shown in Table I.

Comparison of vancomycin MICs by Etest and microdilution are shown in Table II. Sixty-eight (80.1%) of the MICs from patients generated by Etest were equal or below 1.0 $\mu$ g/mL. While all (N=85) MICs from patients generate by broth microdilution were equal or below 1.0 $\mu$ g/mL. The mean levels of MICs by broth microdilution increased from 0.55 $\mu$ g/mL (SD 0.16) in the first six months of the study to 0.78 $\mu$ g/mL (SD 0.26) in the last semester of the study (P=0.04). The MIC levels by Etest did not change during the study period.

Thirty-six patients (42.4%) died in 30 days. The median serum vancomycin levels between survivors and those who died were 20.0 and 20.9 respectively (HR 0.99, IC 95%, 0.97-1.03; P=0.96). Seven patients (9.0%) with MIC  $\geq$ 1.5 by Etest died, while nine patients (11.6%) survived (HR 0.87, IC 95% 0.36-2.10; P=0.76). For microdilution broth, 11 patients (14.1%) with MICs equal to 1.0 died, while 16 (20.5%) survived (HR 1.03, IC 95% 0.51-2.09; P=0.92). The median APACHE II score of those patients who survived was 22.5 (IQR 25-75%, 9.7-26.5), and 25.0 (IQR 25-75%, 19.0-29.0) of those who died

(HR 1.05; IC 95% 1.0-1.09; P=0.03). The presence of *agr* II was not related to 30-days mortality. Data are shown in Table III.

By multiple regression analysis including the following variables: MIC by Etest or broth microdilution, APACHE II score, serum vancomycin levels and presence of locus *agr* II, only APACHE II score was marginally related to all-cause 30-days mortality with HR 1.05, IC 95%, 1.0-1.1 (P=0.03).

Kaplan-Meier curves, is shown in Figure 1, included patients with MRSA respiratory infection stratified by MICs by Etest ( $\leq 1.0\mu\text{g/mL}$  versus  $\geq 1.5\mu\text{g/mL}$ ) and broth microdilution ( $0.5\mu\text{g/mL}$  versus  $1.0\mu\text{g/mL}$ ). There was no difference in survival times related to MICs by Etest (P=0.80; log-rank test) or broth microdilution (P=0.83; log-rank test).

## Discussion

In our study, most of patients had severe disease (by APACHE II score) and VAP. Vancomycin MICs generated by Etest were one-dilution higher than those by broth microdilution as demonstrated by other authors. The great majority of patients had MICs  $\leq 1.0\mu\text{g/mL}$  by both methods. Thirty-day mortality was not associated with MIC levels in our study.

The differences in MIC by Etest and broth microdilution are well determined<sup>11-14</sup> and were demonstrate in this study in patients with MRSA pneumonia. Our prevalence of high MIC levels by Etest or broth microdilution is low. Sader et al, analyzing 1800 MRSA strains from bloodstream infection (BSI), found 96.9% of them with vancomycin MICs  $\leq 1.0\mu\text{g/mL}$ , by broth microdilution.<sup>12</sup> However, Parkash et al, found that 89-98% of samples from BSI, had MIC, by Etest, between  $1.5\mu\text{g/mL}$  and  $2.0\mu\text{g/mL}$ . Haque et al, in

respiratory samples found that most patients had MRSA infection with MIC  $\geq$  1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (72.8%).<sup>9</sup> Besides, our results seem to demonstrate an increase in MIC levels by microdilution through the study period. Sader et al evaluated the MIC Creep isolates collected in nine medical centers in the United States. They have shown increases in MIC creep in three medical centers from 2002 to 2006.<sup>20</sup>

The guideline of the IDSA for treatment of MRSA infection recommends that for isolates with a vancomycin MIC  $\leq 2.0\mu\text{g}/\text{mL}$  (vancomycin susceptible), the patient's clinical response should determine the continued use of vancomycin independent of the MIC.<sup>21</sup> If the patients were not responding, an alternative therapy should be considered, regardless of the MIC. A recent meta-analysis evaluated 22 studies related to clinical response and MICs of MRSA infections; high vancomycin MIC was associated with a higher mortality rate in MRSA, especially in BSI. This concept is somehow misleading and data of this meta-analysis and our data show that. In the meta-analysis, in 8 studies with MIC provided by Etest method, there was no mortality difference comparing patients with MIC of 1.5 and  $\leq 1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ , as confirmed in our study.<sup>22</sup> Besides, we could not show mortality difference comparing MIC of 0.5 and  $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ , by broth microdilution in patients with HAP. Therefore based on the results of this meta-analysis and our data (which shows no mortality difference when MIC are  $\leq 1.5\mu\text{g}/\text{mL}$  by Etest) MIC cut point of  $2.0\mu\text{g}/\text{mL}$ , by Etest, can be associated with worst outcomes. Data on respiratory infections only, did not demonstrate increased mortality rate so far.

Haque et al, evaluated 158 patients with MRSA pneumonia, of these 72.8% had MIC  $\geq 1.5\mu\text{g}/\text{mL}$ . Mortality rate were similar between patients with



MIC  $<1.5\mu\text{g/mL}$  or higher. However a propensity score analysis found an increase in mortality rates with  $1.0\mu\text{g/mL}$  increase in MIC by Etest. However, they did not demonstrated how many of these 115 patients (with MIC  $\geq 1.5\mu\text{g/mL}$ ) had, actually, MIC of  $2.0\mu\text{g/mL}$ . In our study, only 18.8% of patients had MIC= $1.5\mu\text{g/mL}$ , and only one patient had MIC of  $2.0\mu\text{g/mL}$ , by Etest.<sup>9</sup> Therefore, in settings where patients with MRSA pneumonia and vancomycin MIC by Etest  $\leq 1.5\mu\text{g/mL}$  (or broth microdilution  $\leq 1.0\mu\text{g/mL}$ ), there is no difference in mortality regarding MIC levels.

The APACHE II score taking into account clinical and laboratorial variables of both acute and chronic disease provides an estimate of ICU mortality. In our study the median APACHE II score was 23.0, which may explain the high 42% all-cause 30-day mortality levels. Furthermore, APACHE II score were independently associated with mortality in our sample, despite MIC levels by Etest or broth microdilution. Eighty-two percent of patients had vancomycin concentration measured. Target vancomycin levels was equally attained in survivors and those who died ( $20.0\mu\text{g/mL}$  and  $21.0\mu\text{g/mL}$ , respectively). According to Rybak et al, the optimal pharmacodynamic parameter that predicts vancomycin activity is the area under the curve to MIC ratio (AUC/MIC), with a ratio  $\geq 400$ .<sup>4</sup> Considering the vancomycin trough levels and the MIC, an optimal vancomycin exposure (AUC/MIC  $\geq 400$ ), probably was achieved in most of our patients.

The accessory gene regulator (*agr*) is a quorum-sensing regulator in *S. aureus* that is responsible for the expression of adherence factors, biofilm production and virulence factors. Some studies suggest that MRSA isolates with an *agr* II polymorphism could have a relationship to the clinical efficacy of

vancomycin.<sup>19, 23</sup> The presence of *agr* II was not associated higher MICs in our study (data not shown). We found that forty-six (54.1%) isolates of MRSA belonging to *agr* II. As demonstrated by Moise-Broder<sup>19</sup>, the presence of *agr* II was not associated with 30-day mortality in the present study. In the study by Schweizer, the authors found that 22% of patients with MRSA had *agr* dysfunction, and the presence of dysfunction was associated with increased mortality. Mutations causing *agr* dysfunction are associated with changes in the expression of virulence factors. The function can be examined by the delta hemolysin assay.<sup>24</sup> In our study we only detected the *agr* II presence not the gene dysfunction.

Some points must be considered when analyzing our data. We were not able to control for other mortality risk factors in our sample. For example, drug therapy details, like time for antibiotic initiation and adjuvant therapies that could interfere with patient mortality were not controlled. Concomitant respiratory infections were not investigated. Finally as stated by Haque et al, we did not analyze the samples for heteroresistance.

In severe MRSA HAP patients, MIC by Etest or broth microdilution were not associated with higher mortality levels. In settings with low MRSA MIC levels ( $\leq 1.5\mu\text{g/mL}$ , by Etest) prevalence, and optimal vancomycin exposure, mortality rates seem not to be affected by MIC, and probably an “S” means “susceptible”.

## **Acknowledgment**

The authors would like to thank the Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, for partial support of this study.

Potential conflicts of interest: All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

## References

1. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zocolli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz J Infect Dis* 2009;**13**(2):90-98.
2. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson L. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 2010;**23**(1):99-139.
3. Tacconelli E and De Angelis G. Pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical features, diagnosis and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;**15**(3):218-222.
4. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, *et al*. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: A consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health-Syst Pharm* 2009;**66**:82-98.
5. Giuliano C, Haase KK and Hall R. Use of vancomycin pharmacokinetic-pharmacodynamic properties in the treatment of MRSA infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;**8**(1):95-106.
6. Patel N, Pai MP, Rodvold KA, Lomaestro B, Drusano GL, Lodise TP. Vancomycin: We Can't Get There From Here. *Clin Infect Dis* 2011;**52**:969-974.

7. Soriano A, Marco F, Martínez JÁ, Pisos E, Almela M, Dimova VP et al. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Infect Dis* 2008;46:193-200.
8. Lodise TP, Graves J, Evans A, et al. Relationship between Vancomycin MIC and Failure among Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia Treated with Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(9):3315-3320.
9. Haque N, Zuniga LC, Peyrani P, et al. Relationship of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration to Mortality in Patients With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospital – Acquired, Ventilator – Associated, or Health – Care Associated Pneumonia. *Chest* 2010;138(6):1356-1362.
10. Moore CL, Osaki-Kiyan P, Haque NZ, Perri MB, Donabedian S, Zervos MJ. Daptomycin Versus Vancomycin for Bloodstream Infections Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* With a High Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration: A Case-Control Study. *Clin Infect Dis* 2012;54(1):51-58.
11. Prakash V, Lewis JS, Jorgensen JH. Vancomycin MICs for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Differ Based upon the Susceptibility Test Method Used. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008;52(12):4528.
12. Sader HS, Rhomberg PR, Jones RN. Nine-Hospital Study Comparing Broth Microdilution and Etest Method Results for Vancomycin and Daptomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2009;53(7):3162-3165.

13. Swenson JM, Anderson KF, Lonsway DR, *et al.* Accuracy of Commercial and Reference Susceptibility Testing Methods for Detecting Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2009;**47**(7):2013-2017.
14. Machado DP, Nagel F, Aquino VR *et al.* Vancomycin minimal inhibitory concentration from broth microdilution and Etest in respiratory tract samples of patients with ventilation-associated pneumonia. *J Hosp Infect* 2010;**76**(2):182-184.
15. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of América. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**171**:388-416.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S19. *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2009;Wayne, PA.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 8<sup>th</sup>ed. CLSI document M7-A8. *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2008;Wayne, PA.
18. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, *et al.* Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995;**33**:2864-2867.
19. Moise-Broder PA, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Schentag JJ, Forrest A, Moellering Jr RC. Accessory gene regulator group II polymorphism in

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis* 2004;**38**:1700-1705.

20. Sader HS, Fey PD, Fish DN, *et al.* Evaluation of Vancomycin and Daptomycin Potency Trends (MIC Creep) against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected in Nine U.S. Medical Centers from 2002 to 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**53**(10):4127-4132.

21. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, *et al.* Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clin Infect Dis* 2011;**52**(3):285-292.

22. van Hall SJ, Lodise TP and Paterson DL. The Clinical Significance of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in *Staphylococcus aureus* Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012;**54**(6):755-771.

23. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, *et al.* *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: Is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptides resistance? *J Infect Dis* 2003;**187**:929-938.

24. Schweizer ML, Furano JP, Sakoulas G, *et al.* Increased Mortality with Accessory Gene Regulator (*agr*) Dysfunction in *Staphylococcus aureus* among Bacteremic Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;**55**(3):1082-1087.

**Table I.** Clinical and demographic characteristics of patients with MRSA pneumonia.

<b>Patient characteristics</b>	<b>N=85</b>
<b>Age (median years, IQ range)</b>	63 (49-75)
<b>Men</b>	55 (64.7)
<b>Comorbidities</b>	
<b>COPD</b>	73 (85.9)
<b>Cardiac disease</b>	46 (54.1)
<b>Gastrintestinal disease</b>	27 (31.8)
<b>Renal disease</b>	26 (30.6)
<b>Diabetes</b>	23 (27.1)
<b>Neurologic disease</b>	22 (25.9)
<b>Solid Organ Transplant</b>	16 (18.8)
<b>Hematologic neoplasia</b>	9 (10.6)
<b>Alcoholism</b>	8 (9.4)
<b>Solid neoplasia</b>	7 (8.2)
<b>Corticosteroids use</b>	7 (8.2)
<b>HIV disease</b>	5 (5.9)
<b>Bone Marrow Transplant</b>	1 (1.2)
<b>Other</b>	50 (58.8)
<b>Serum vancomycin – N=70 (median, IQR)</b>	20.7 (12.0-29.1)
<b>Presence of <i>agr</i> II</b>	46 (54.1)
<b>APACHE II score (median, IQR)</b>	23 (17.5-29.0)
<b>30-day Mortality</b>	36 (42.4)

Note. Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated. COPD – Chronic Obstructive Pulmonary Disease; *agr* – accessory gene regulator; APACHE – Acute Physiological Assessment and Chronic Health Evaluation.



**Table II.** Comparison of vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) determined by Etest and broth microdilution (N=85).

Vancomycin MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of isolates (%) with MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) determined by	
	Etest	Broth microdilution
<b>0.5</b>	6 (7.1)	56 (65.9)
<b>0.75</b>	14 (16.5)	-
<b>1.0</b>	48 (56.5)	29 (34.1)
<b>1.5</b>	16 (18.8)	-
<b>2.0</b>	1 (1.2)	-

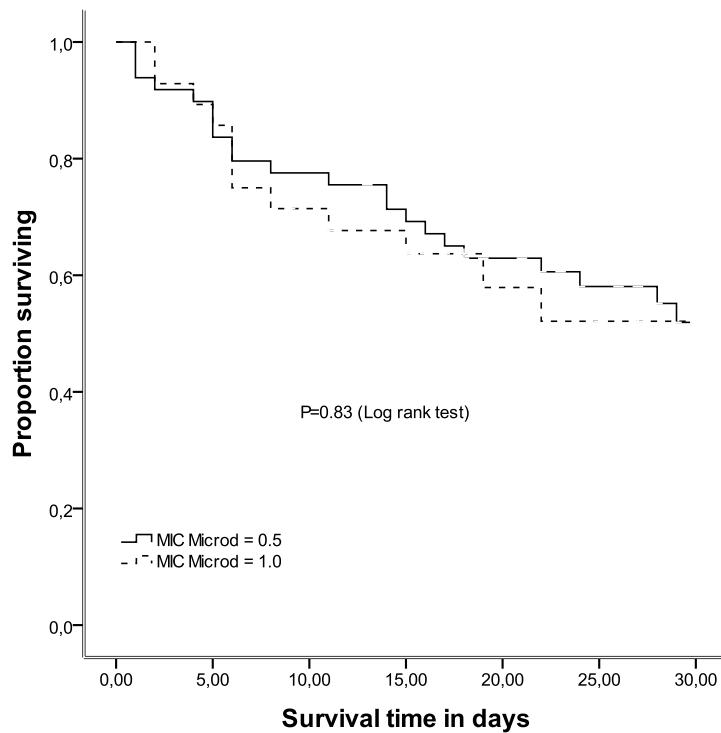
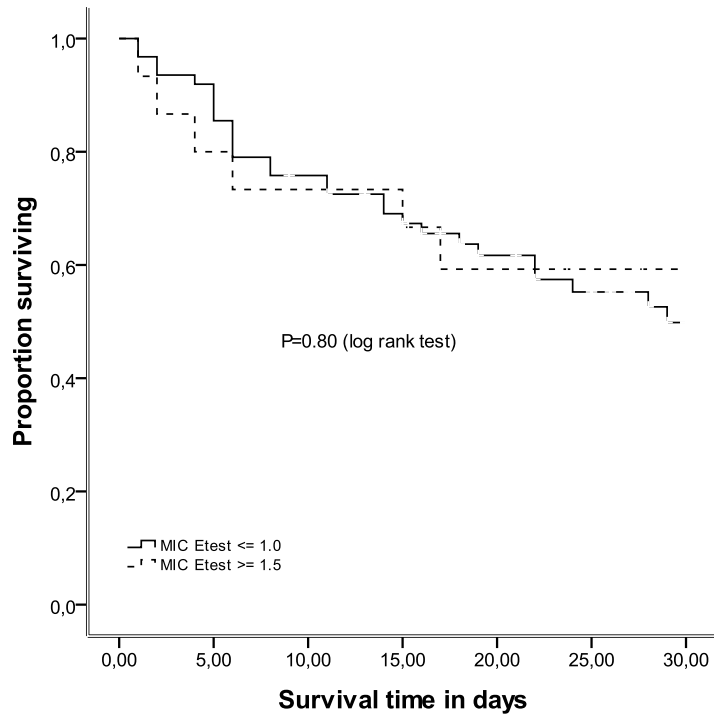
Note. Data are no. (%) of patients.

**Table III.** Comparison of risk factors between survivors and those who died in 30 days.

	<b>Survival</b>	<b>Death</b>	<b>HR</b>	<b>P</b>
<b>MIC Etest</b>				
<b>≤1.0</b>	33 (42.3)	29 (37.2)	1	-
<b>≥1.5</b>	9 (11.6)	7 (9.0)	0.87 (0.36- 2.10)	0.76
<b>MIC Broth Microdilution</b>				
<b>0.5</b>	26 (33.3)	25 (32.1)	1	-
<b>1.0</b>	16 (20.5)	11 (14.1)	1.03 (0.51- 2.09)	0.92
<b>Serum Vancomycin (median, IQR)</b>	20.0 (12.0-27.6)	20.9 (11.8-33.5)	0.99 (0.97- 1.03)	0.96
<b>APACHE II score (median, IQR)</b>	22.5 (9.7-26.5)	25 (19.0-29.0)	1.05 (1.0-1.09)	0.03
<b>Negative for <i>agr II</i></b>	15 (19.2)	19 (24.4)	1	
<b>Presence of <i>agr II</i></b>	27 (34.6)	17 (21.8)	0.60 (0.31- 1.17)	0.13

Note. Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated.

**Figure 1.** The Kaplan-Meier survival estimates of MRSA respiratory infected patients in relation to the MIC by Etest and broth microdilution.



## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Apenas 20% (17/85) dos isolados de MRSA apresentaram CIMs  $\geq 1,5\mu\text{g/mL}$  por Etest®. Nenhum dos isolados apresentou CIMs  $\geq 1,5\mu\text{g/mL}$  por microdiluição em caldo;
- Em ambos os estudos, as CIMs obtidas por Etest® foram de uma a duas diluições maiores do que as obtidas por microdiluição em caldo;
- O nível sérico da vancomicina foi similar entre os pacientes que sobreviveram e os que morreram,  $20,0\mu\text{g/mL}$  e  $20,9\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estes valores estão dentro dos níveis séricos recomendados para infecções graves por MRSA;
- Não houve diferença significativa na mortalidade em 30 dias dos pacientes que tiveram CIMs para vancomicina igual a  $1,5\mu\text{g/mL}$  ou  $\leq 1,0\mu\text{g/mL}$ , indicando que os isolados de MRSA eram realmente sensíveis à vancomicina;
- A presença do locus *agr* II não foi relacionada com CIMs elevadas, assim como maior mortalidade.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Formulário de dados MRSA

<b>Identificação do paciente</b>	
Nome:  Prontuário: _____ Idade ____ Sexo( <b>M</b> )( <b>F</b> )  Raça: _____ Peso: _____  Doença de base:  _____	
<b>Informações sobre a internação HCPA</b>	
Data de internação: __/__/____ Leito internação:  Data da alta (ou óbito) __/__/____  Data internação CTI: __/__/____ Leito internação CTI: _____	
<b>Informações gerais do paciente</b>	
APACHE II: _____  FEBRE: ( ) Sim ( ) Não  IMUNOSSUPRESSÃO: ( ) Sim ( ) Não (Neoplasias, infecções pelo HIV, alguma imunodeficiência)  USO DE CORTICÓIDES OU OUTRAS DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS: _____	
<b>Culturais MRSA</b>	
Data identificação do 1º MRSA: __/__/____ Material clínico: _____	

Data identificação do 2º MRSA: ___/___/___	Material clínico: _____
Data identificação do 3º MRSA: ___/___/___	Material clínico: _____
Data identificação do 4º MRSA: ___/___/___	Material clínico: _____
Data identificação do 5º MRSA: ___/___/___	Material clínico: _____
<b>Outros culturais positivos ( ) Sim ( ) Não</b>	
1-Microrganismo: _____ data: ___/___/___	Material clínico: _____
2-Microrganismo: _____ data: ___/___/___	Material clínico: _____
3-Microrganismo: _____ data: ___/___/___	Material clínico: _____
4-Microrganismo: _____ data: ___/___/___	Material clínico: _____
5-Microrganismo: _____ data: ___/___/___	Material clínico: _____
6-Microrganismo: _____ data: ___/___/___	Material clínico: _____
<b>Vancomicina</b>	
Data início do tratamento vancomicina: ___/___/___	
Data fim tratamento vancomicina: ___/___/___	
Tempo de uso de vancomicina: _____	
NÍVEL SÉRICO VANCOMICINA: _____ data ___/___/___	
(3º dia após a 4º dose)	
<b>Uso de outros antibióticos na internação</b>	

<p>Data inicio1 ___/___/___      data fim 1 ___/___/___      abt 1: _____</p> <p>Data inicio 2 ___/___/___      data fim 2 ___/___/___      abt 2 _____</p> <p>Data inicio 3 ___/___/___      data fim 3 ___/___/___      abt 3: _____</p> <p>Data inicio 4 ___/___/___      data fim 4 ___/___/___      abt 4: _____</p> <p>Data inicio 5 ___/___/___      data fim 5 ___/___/___      abt 5: _____</p> <p>Data inicio 6 ___/___/___      data fim 6 ___/___/___      abt 6: _____</p> <p>Data inicio 7 ___/___/___      data fim 7 ___/___/___      abt 7: _____</p> <p>Data inicio8 ___/___/___      data fim 8 ___/___/___      abt 8: _____</p> <p>Data inicio 9 ___/___/___      data fim 9 ___/___/___      abt 9: _____</p>
<p><b>Realização de Procedimentos invasivos (prévios a identificação do MRSA)</b></p>
<p>( ) Ventilação Mecânica</p> <p>Data inicio ___/___/___      data fim ___/___/___      tempoVM: _____</p> <p>( ) Sondagem de demora</p> <p>Data inicio ___/___/___      data fim ___/___/___      tempo SVD: _____</p> <p>( ) Cateter venoso central</p> <p>Data inicio ___/___/___      data fim ___/___/___      tempo CVC: _____</p>
<p><b>Exames laboratoriais</b></p>
<p>( ) Proteína C Reativa _____</p> <p>Data próximo à cultura MRSA ___/___/___</p> <p>( ) Creatinina _____</p>

	Data próximo à cultura MRSA ___/___/___	
	<b>Desfecho</b>	
	Morte dentro dos 30 dias da primeira cultura positiva ( ) Sim ( ) Não	



## 9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título:** Prevalência da Concentração Inibitória Mínima elevada da vancomicina e a relação desta com o desfecho de pacientes com pneumonia por *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes.

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa em que será avaliada as bactérias resistentes a antibióticos normalmente usados no tratamento de infecções que ocorrem em pacientes internados nos Centros de Terapia Intensiva (CTI).

Este estudo avaliará a quantidade de bactérias resistentes e os resultados serão relacionados com dados clínicos do paciente internado no CTI do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Será necessária a coleta de uma amostra de sangue para o estudo, caso esta não tenha sido solicitada de rotina. A sua participação neste estudo não trará nenhum risco para você e não irá interferir no seu tratamento. A partir dos resultados obtidos com esta amostra poderá ser feito um ajuste da dose do seu antibiótico, a critério do seu médico.

A sua participação é voluntária, não sendo necessária nenhuma forma de pagamento. A decisão de não participar não afetará seu tratamento ou relação com seus médicos de maneira alguma. Informações relacionadas a sua identificação (seu nome) permanecerão confidenciais.

Você pode fazer perguntas a qualquer momento sobre este estudo ao Dr. Luciano Zubaran Goldani (coordenador do projeto) pelo telefone 2101 8152. Em caso de dúvidas adicionais sobre este termo ou seus direitos, favor contactar o **Grupo de Pesquisa e pós-graduação - Comitê de ética GPPG-HCPA**, pelo número **51 21018304**.

Será preciso que você assine duas vias deste termo. Uma ficará com você e a outra com o médico do estudo.

Li e compreendi as informações e estou de acordo em participar do estudo.

---

Nome do paciente ou representante, data e assinatura.

---

Dr. Luciano Zubaran Goldani

Pesquisador Responsável