



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**ESTUDO DO PERFIL POPULACIONAL DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA DE ORIGEM COMUNITÁRIA E
HOSPITALAR EM HOSPITAL TERCIÁRIO, NA BUSCA DE AMOSTRAS
hVISA**

Bruno Siqueira Prudente

Uberlândia – MG

Março 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**ESTUDO DO PERFIL POPULACIONAL DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA DE ORIGEM COMUNITÁRIA E
HOSPITALAR EM HOSPITAL TERCIÁRIO, NA BUSCA DE AMOSTRAS
hVISA**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte de obtenção
do título de Mestre.

Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo
(Orientador)

Prof. Dra. Karinne Spirandelli Carvalho
(Co-orientadora)

Bruno Siqueira Prudente
(Orientando)

Uberlândia – MG

Março 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- P971e
2015 Prudente, Bruno Siqueira, 1979-
Estudo do perfil populacional de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina de origem comunitária e hospitalar em hospital terciário, na busca de amostras hVISA / Bruno Siqueira Prudente. - 2015.
51 p.
- Orientador: Geraldo Batista de Melo.
Coorientadora: Karinne Spirandelli Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Staphylococcus aureus* - Teses. 3. Infecção hospitalar - Teses. 4. Vancomicina - Teses. I. Melo, Geraldo Batista de, 1952-. II. Carvalho, Karinne Spirandelli, 1975-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

AGRADECIMENTO

Ao fim dessa trajetória, olho pra trás e percebo o quanto a vida tem sido generosa comigo. Sinto enorme gratidão pela vida e por tudo que vivenciei até aqui. Assim, agradeço inicialmente a Deus pela vida, pela inspiração e por tudo que me provê.

Aos meus amores, Andrezza e Manuella por toda alegria e força que me deram, além do companheirismo, inspiração e incentivos.

A minha Mãe Teresa, meu pai Fuca e meus irmãos Thiago e Danillo por toda ajuda e apoio que me deram.

A minha sogra Áurea e sogro Aloysio por todo empenho e cuidado que tiveram com minha filha durante minhas ausências.

Aos meus orientadores Dr. Geraldo e Dra. Karinne por toda ajuda, compreensão e paciência que tiveram comigo.

A Claudete, Luceleide, Lucélia e Ricardo por toda ajudam e dicas que me deram para que eu concluísse o mestrado em tempo hábil.

Aos meus amigos Sabrina e Everton que sempre me ajudaram nessa batalha.

Aos meus amigos Livia e Juliano pela acolhida inicial na cidade de Uberlândia.

A CAPES, pela bolsa de estudo.

A todos os amigos e familiares, que torcem por mim e são fundamentais na minha vida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS.....	14
3 JUSTIFICATIVA	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 O HOSPITAL E LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO PROJETO...	16
4.2 DEFINIÇÕES.....	16
4.3 MODELO DE ESTUDO.....	18
4.4 CRITÉRIO DE INCLUSÃO.....	18
4.5 COLETA DE DADOS.....	19
4.6 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.....	19
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
5 RESULTADOS.....	23
6 DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÃO.....	36
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Resumo

Infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) são cada vez mais comuns, tanto em ambiente hospitalar como na comunidade. A vancomicina é o principal antimicrobiano utilizado no tratamento destas infecções e, devido à utilização frequente, já é possível observar cepas com sensibilidade diminuída. Com o objetivo de avaliar a presença de amostras de *Staphylococcus aureus* com heterorresistência intermediária a vancomicina (hVISA) em amostras de MRSA obtidas de pacientes em uso terapêutico desse antimicrobiano, internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), em Uberlândia MG, foi realizado um estudo de coorte retrospectivo incluindo 96 pacientes (48 pacientes que foram à óbito e 48 pacientes que evoluíram para alta), entre setembro de 2006 e setembro de 2008. A investigação da ocorrência de MRSA foi realizada a partir de pele, tecidos moles incluindo pus, infecção de sítio cirúrgico e corrente sanguínea; de pacientes internados ou atendidos no ambulatório do hospital que apresentaram diagnóstico de infecção por MRSA. As amostras selecionadas foram testadas quanto à sensibilidade à vancomicina pelas técnicas de diluição em agar e a heterorresistência, pela análise do perfil populacional, da área sob a curva (PAP-AUC). A concentração inibitória mínima (MIC) de 93,7% das amostras exibiram o MIC para vancomicina entre 1 e 2 µg/mL e 2% mostraram um MIC de 3 µg/mL. O fenótipo hVISA ocorreu em mais de 25% das amostras de MRSA, evidenciando uma alta prevalência, embora no MIC convencional indicasse susceptibilidade à vancomicina. A prevalência de mortalidade foi significativa ($P = 0.001$), nos portadores do fenótipo hVISA. A presença de amostras heterorresistentes à vancomicina representa um risco potencial no futuro. Portanto estudos multicêntricos devem ser realizados em nosso país para esclarecer taxas de prevalência e determinar a relevância clínica deste fenótipo.

Palavras-chave: Infecção Hospitalar. Mortalidade. Heterorresistência. Vancomicina. MRSA. hVISA.

Abstract

Infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are increasingly common, both in hospitals and in the community. Vancomycin is mainly used in treatment of microbial infections and, due to its indiscriminate use emerged strains with decreased susceptibility. In order to assess the presence of *S. aureus* with intermediate heteroresistant vancomycin (hVISA) in samples of MRSA from patients in the therapeutic use of this antimicrobial at the Clinical Hospital of Uberlândia Federal University (HC-UFU) in Uberlândia MG, we conducted a retrospective cohort study including 96 patients (48 patients who died and 48 patients discharged), between September 2006 and September 2008. The investigation of the occurrence of MRSA was performed from skin, soft tissues including pus, surgical site infection and bloodstream; inpatient or outpatient clinic of the hospital that were diagnosed with MRSA infection. Selected samples were tested for sensitivity to vancomycin by agar dilution techniques and heteroresistant by analysis of the population profile, in the area under the curve (AUC - PAP). The minimum inhibitory concentration (MIC) of 93.7 % of the samples exhibited MIC to vancomycin between 1 and 2 µg/mL and 2% showed an MIC of 3 µg/mL. The hVISA phenotype occurred more than a quarter of the samples of MRSA, although showing a high prevalence in conventional MIC indicated susceptibility to vancomycin. The prevalence of mortality was significant ($P = 0.001$), in patients with hVISA phenotype. The presence of vancomycin heteroresistant samples represents a potential risk in the future, and clinically supported multicenter studies should be performed in our country to clarify prevalence rates and to determine the clinical relevance of this phenotype.

Keywords: Hospital Infection. Mortality. Heteroresistance. Vancomycin. MRSA. VISA.

1-INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* foi descrito pela primeira vez há mais de 120 anos pelo médico escocês sir Alexander Ogston, que reconheceu seu papel em infecções de pele e sepse (CUNHA; USTULIN, 2011). A resistência a antimicrobianos foi relatada logo depois do lançamento da penicilina, em 1941 (KIRBY, 1945). Decorrido apenas seis anos, 50% das amostras hospitalares já se mostravam resistentes e, esta resistência, logo se tornou mundial (GUNES et al., 2012). Essa proporção posteriormente aumentou para cerca de 80 a 90% nos Estados Unidos (CDC, 2002).

No Brasil, pesquisas feitas na Faculdade de Medicina de Botucatu, evidenciou que 93% das amostras de *S. aureus* são resistentes a penicilina (MARTINS et al., 2010).

A meticilina tornou-se comercialmente disponível em 1961, e no mesmo ano, no Reino Unido, já havia relatos de resistência a esta droga (BARBER, 1961).

O mecanismo de resistência à meticilina utilizado por *S. aureus* está relacionado com a produção de proteínas ligadoras de penicilina de baixa afinidade (Penicillin Binding Protein - PBP) PBP2a ou 2', que é codificada pelo gene *mecA* (NAVES et al., 2012; WERTH et al., 2013). Esse gene é carregado por um elemento genético móvel, Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, (*SCCmec*) (TURLEJ, 2011) que confere resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (HOWDEN et al., 2010) além de, usualmente carrear outros genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, incluindo macrolídeos, fluorquinolonas, clindamicina e rifampicina, entre outros, resultando em multirresistência das amostras (NAVES et al., 2012).

O primeiro elemento *SCCmec* foi identificado em uma amostra japonesa de *S. aureus*, N315, em 1999, e logo depois mais dois *SCCmec* de diferentes amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) foram determinados (ITO et al.,

2001). A partir da análise estrutural detalhada do SCC*mec*, estes elementos foram classificados como tipos I, II e III (ITO et al., 2001). Posteriormente, novos tipos de SCC*mec*, como SCC*mec* IV (MA et al., 2002), SCC*mec* V (ITO et al., 2004), SCC*mec* VI (OLIVEIRA et al., 2006), SCC*mec* VII (BERGLUND et al., 2008), SCC*mec* VIII (ZHANG et al., 2009), SCC*mec* IX, SCC*mec* X (MCCARTHY; LINDSAY, 2010), SCC*mec* XI (TURLEJ, 2011) também foram identificados.

As amostras hospitalares de MRSA estão disseminadas por todo o mundo e sua prevalência continua a aumentar nos Estados Unidos, onde é responsável por pelo menos um terço de todas as infecções por *S. aureus* (KLEVENS et al., 2007). Sozinho, o MRSA causou mais mortes em 2005 do que a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (KLEVENS et al., 2007).

Em 2005, a taxa de mortalidade estimada por MRSA foi de 6,3 por 100.000 indivíduos internados (KLEVENS et al., 2007). MRSA é também causa frequente de infecções invasivas (CAMARGO; GILMORE, 2008). Estima-se que a incidência destas infecções (31,8 por 100.000 indivíduos) tenha sido superior à de outros importantes patógenos bacterianos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* (CAMARGO; GILMORE, 2008).

No Brasil, a frequência de MRSA é sempre alta em hospitais de grande porte (TRINDADE et al., 2005). Estudos realizados em hospitais universitários brasileiros demonstraram que MRSA é responsável por 40 a 70% das infecções por *S. aureus* (SADOYAMA; GONTIJO FILHO, 2000; TRINDADE et al., 2005).

Entre os fatores de risco para infecções por MRSA estão: doenças crônicas, diálise, malignidade, exposição prolongada a agentes antimicrobianos, especialmente cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, idade avançada, diabetes

dependente de insulina, tabagismo, obesidade, dermatite e hospitalização prolongada (PARK et al., 2012).

A investigação rotineira das principais áreas afetadas por MRSA dentro do hospital é considerada como uma estratégia eficaz para o controle desse micro-organismo, além de representar maior custo benefício para o hospital, uma vez que o custo do controle desse micro-organismo é inferior ao do tratamento das infecções por MRSA (MELO et al., 2009; SHANG et al., 2011).

O aumento das infecções hospitalares por MRSA foi acompanhado pela resistência a vários antimicrobianos, como aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos e tetraciclina (GUNES et al., 2012). A preocupação se concentra no surgimento de micro-organismos com resistência à vancomicina, já que a vancomicina é o tratamento de escolha para MRSA (van HAL et al., 2011; RICHTER et al., 2011).

Após o aparecimento de MRSA em 1961, a vancomicina tornou-se o sustentáculo da terapia para infecções graves por esse micro-organismo (CUNHA; USTULIN, 2011). Disponibilizada a partir de 1958 (HOWDEN et al., 2010) é um antimicrobiano inibidor da síntese da parede celular em *S. aureus* e outros organismos Gram-positivos (LEVINE, 2006; RICHTER et al., 2011). Enquanto antimicrobianos β -lactâmicos inibem a síntese da parede celular através da ligação à transpeptidase, sítio ativo da PBP, a vancomicina atua por um mecanismo diferente. A ligação ocorre no C-terminal D-Ala-D-Ala do resíduo precursor de peptidoglicano e forma um complexo não covalente, estável, que impede a utilização do precursor para a síntese da parede celular (van HAL et al., 2011).

Desde 1960, a vancomicina tem sido amplamente utilizada em muitos países para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas (HIRAMATSU et al., 2001; SILVESTRE, 2013). Seu uso frequente em infecções por MRSA vem,

gradualmente, selecionando amostras de MRSA com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos, o que levou à identificação no Japão, em 1997 de uma cepa de MRSA com resistência intermediária à vancomicina (HIRAMATSU et al., 1997).

O CLSI, (Clinical and Laboratory Standards Institute) definiu os pontos de cortes de concentração inibitória mínima (MIC) para vancomicina de *S. aureus* há mais de 20 anos atrás (CLSI, 2009). Os pontos de corte foram: suscetível, com $MIC \leq 4 \mu\text{g/ mL}$, intermediário, com MIC entre 8 e $16 \mu\text{g/ mL}$, e resistente com $MIC \geq 32 \mu\text{g/ mL}$ (CLSI, 2009).

Em 1997 no Japão, foi isolado um MRSA com MIC para vancomicina de $8 \mu\text{g/ mL}$, denominada Mu50, (*S. aureus* com resistencia intermediária a vancomicina, ATCC 700699) a partir de uma infecção de ferida operatória de um indivíduo de 4 meses de idade, que foi submetido à cirurgia cardíaca, onde o uso de vancomicina não curou a infecção, e uma amostra com um MIC para vancomicina de $4 \mu\text{g/ mL}$ que abrigou subpopulações que apresentaram um MIC superior, em uma taxa maior do que 1 em 10^6 células, designada Mu3 (h-VISA, ATCC 700698) (HIRAMATSU et al., 1997).

A cepa Mu3 foi isolada em 1996 do escarro de um paciente de 64 anos com pneumonia por MRSA e que teve falha terapêutica com o uso de vancomicina (HIRAMATSU et al., 1997).

Atualmente, as seguintes siglas são utilizadas para os fenótipos de resistência encontrados nos hospitais: VSSA (Vancomycin-sensitive *S. aureus*), com $MIC \leq 2 \mu\text{g/ mL}$, VISA (Vancomycin-intermediate *S. aureus*), com MIC variando entre 4 e $8 \mu\text{g/ mL}$ para as amostras de resistência intermediária; VRSA (Vancomycin-resistant *S. aureus*), com $MIC \geq 16 \mu\text{g/ mL}$ e hVISA (Heteroresistant VISA), que consiste no isolado com $MIC \leq 2 \mu\text{g/ mL}$ quando testados por métodos de rotina mas, que apresentam subpopulações, da ordem de uma em cem mil unidades formadoras de colônias (UFC)

com MIC entre 4 e 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MELO et al., 2009; RICHTER et al., 2011; CLSI, 2012; WANG, 2013).

A alteração realizada para os pontos de corte foi justificada pela observação da associação entre o MIC para vancomicina de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a falha no tratamento e também o aumento da detecção de amostras heterorresistentes (WANG, 2013).

O método padrão para a detecção de hVISA é a análise do perfil populacional (PAP) da área sob a curva (AUC), contudo, um certo número de métodos substitutos para a detecção de hVISA também estão disponíveis, tais como o macrométodo ϵ -test (MET) e o uso de meios de culturas acrescidos de vancomicina, vendidos comercialmente (HOWDEN et al., 2010). A definição de VISA é mais simples, tal como é definido com base no MIC para vancomicina, enquanto que a definição de hVISA é mais difícil e não é bem padronizada (MANFREDINI et al., 2011; van HAL et al., 2011).

A prevalência de hVISA varia significativamente e algumas destas diferenças podem muito bem ser explicadas pelas diferenças laboratoriais em relação a definições e estratégias de ensaio, no entanto, verifica-se que as taxas de hVISA podem variar globalmente (HOWDEN et al., 2010).

Por exemplo, Hiramatsu e colaboradores (2001), detectaram amostras de hVISA em até 20% dos MRSA em um hospital japonês, mas estudos posteriores em outros hospitais japoneses contestaram este resultado pela não detecção de amostras de hVISA entre 6.625 amostras testadas (IKE et al., 2001; ARAKAWA et al., 2004).

Após os primeiros relatos de VISA e hVISA no Japão não demorou muito para que este fenótipo fosse reconhecido em todo o mundo (HIRAMATSU et al., 2001). Amostras de *S. aureus* (predominantemente MRSA) demonstrando o fenótipo hVISA já foram relatados em muitos países dos Estados Unidos (BOYLE et al., 2001; WALSH,

HOWE, 2002), da Europa (van GRIETHUYSEN et al., 2003), da Ásia (SONG et al., 2004; MAOR et al., 2007), da Oceania (GEMMELL, 2004; HOWDEN et al., 2010), e da América do Sul (OLIVEIRA et al., 2001; MELO et al., 2009).

Pesquisas feitas com amostras de MRSA de cinco regiões dos Estados Unidos, evidenciaram taxas de 15% de hVISA (RICHTER et al., 2011; SATOLA et al., 2011).

Na Austrália, van Hal e colaboradores (2011), encontraram 12% de hVISA entre 458 amostras de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea. Horne e colaboradores (2009), encontraram 13% de hVISA a partir de hemocultura e quando todas as amostras clínicas de MRSA foram testadas pelo método PAP-AUC, uma taxa aproximadamente de 50% de hVISA foi observada.

Altas taxas de mortalidade em pacientes infectados por amostras de hVISA, também já foram observadas por Takata e colaboradores (2013), que encontraram 18,5% de hVISA em amostras sanguíneas e evidenciaram taxa de mortalidade 80% maior no grupo infectado por hVISA em comparação com o grupo controle.

Uma análise realizada com isolados de MRSA a partir de pacientes com pneumonia identificou entre eles 21% de hVISA (WANG et al., 2013). Quando analisada a mortalidade em 30 dias observou-se 37% para amostras de MRSA e 63% entre os hVISA (WANG et al., 2013).

Com o surgimento de amostras de hVISA, opções de tratamento para pacientes infectados com estas amostras tornaram-se limitadas (BAE et al., 2009; CHEN et al., 2011). Este fenótipo tem sido isolado mais frequentemente em todo o mundo e são interpretados como suscetíveis à vancomicina utilizando a determinação de testes de MICs convencionais, mas contém uma sub-população de células que podem crescer na presença de concentrações $\geq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$ vancomicina (HIRAMATSU et al., 2001; MILLER et al., 2012).

O relato do aparecimento de resistência à vancomicina, medicamento de escolha para tratamento de hVISA, associado às suas altas taxas de infecções hospitalares, tornam indispensáveis adoção de medidas de controle para esse patógeno em ambientes hospitalares (GUNES et al., 2012). Procedimentos preventivos devem ser adotados, tais como: isolamento dos casos positivos de hVISA, uso racional de antimicrobianos, controle dos portadores e medidas educativas, bem como vigilância em UTIs (PARK et al., 2012).

O aumento da frequência de hVISA, o aparecimento de amostras resistentes à vancomicina e os elevados índices de morbidade e mortalidade, tornam esse micro-organismo um grave problema de saúde pública, principalmente em ambientes hospitalares (TAKATA et al., 2013).

2-OBJETIVOS

2.1-OBJETIVO GERAL

Analisar a heterorresistência à vancomicina em amostras de MRSA através da análise do perfil populacional bacteriano e a mortalidade para hVISA.

2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1-Analisar a heterorresistência à vancomicina de amostras de MRSA associadas a infecções hospitalares no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HU-UFU).

2.2.2-Evidenciar os fatores de risco dessas infecções para o prognóstico de morte.

2.2.3-Associar heterorresistência com eficiência da antibioticoterapia.

3-JUSTIFICATIVA

As amostras de MRSA estão disseminadas por todo o mundo e sua prevalência continua a aumentar (RICHTER et al., 2011; WANG et al., 2013).

Desde 1960, a vancomicina tem sido amplamente utilizada para o tratamento de infecções causadas por MRSA (HIRAMATSU et al., 2001; SILVESTRE, 2013). Seu uso frequente vem, gradualmente, selecionando amostras com suscetibilidade reduzida a este glicopeptídeo (HIRAMATSU et al., 2001).

O aumento da frequência de hVISA, o aparecimento de amostras resistentes à vancomicina e os elevados índices de morbidade e mortalidade, tornam esse micro-organismo um grave problema de saúde pública, principalmente em ambientes hospitalares (TAKATA et al., 2013). Estes fatores justificam a necessidade de elucidar se a susceptibilidade *in vitro* à vancomicina de amostras clínicas de MRSA está correlacionada com o resultado correspondente em pacientes clínicos.

Devido à rápida disseminação mundial de amostras hVISA somada ao impacto negativo da terapêutica antimicrobiana utilizada, é fundamental o esclarecimento da epidemiologia das infecções por este micro-organismo.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Hospital e local de desenvolvimento do projeto

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, da Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do ICBIM.

4.2- Definições

Bacteremia primária: definida pela presença de pelo menos um dos sinais e sintomas relacionados: febre, hipotensão, oligúria, quando de cultura de sangue positiva, sem outros focos reconhecidos (CDC/NHSN, 2013).

Bacteremia secundária: definida como sepse que ocorra na presença de um sítio anatómico extra-vascular infectado (CDC/NHSN, 2013).

CA-MRSA: MRSA de origem comunitária isolado de infecções em pacientes sem fatores de risco clássicos, com perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos considerados como marcadores fenotípicos e carregando *SCCmec* IV ou V (MILLAR et al., 2007).

HA-MRSA: MRSA isolado a partir de infecções em pacientes com pelo menos um fator de risco, usualmente multirresistente e carregando *SCCmec* I, II, III ou IV (MILLAR et al., 2007; OTTER e FRENCH, 2010).

hVISA: isolado de *S. aureus* com MIC para vancomicina $\leq 2\mu\text{g/mL}$ quando testados por métodos de rotina, mas que, apresentam subpopulações na ordem de uma em cem mil unidades formadoras de colônias com MIC entre 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ (Intermediário) (HIRAMATSU et al., 2001).

Infecção comunitária: é definida como toda infecção diagnosticada microbiologicamente nas primeiras 48 horas de internação quando, não puder ser associada a internações ou procedimentos hospitalares prévios (CDC/NHSN, 2013).

Infecção de pele e tecidos moles: lesões com drenagem purulenta, febre, dor e rubor no local; a cultura da secreção, quando do isolamento de micro-organismos deve ser em cultura pura, ou isolamento de micro-organismo no sangue (CDC/NHSN, 2013).

Infecção de sítio cirúrgico: infecções diagnosticadas no período de 30 dias após a cirurgia desde que a infecção esteja localizada apenas em pele ou tecido subcutâneo no local da incisão, apresentando drenagem purulenta e com características clínicas de febre, rubor e edema (CDC/NHSN, 2013).

Infecção hospitalar: é definida como toda infecção adquirida 72 horas após a admissão do paciente no hospital ou após 48 horas, quando da presença de cateter vascular central ou prótese ventilatória, e que se manifesta durante o tempo de internação ou após a sua alta, quando essa estiver diretamente relacionada com a internação ou com procedimentos hospitalares (CDC/NHSN, 2013).

Mortalidade hospitalar: número de óbitos em até 30 dias após o diagnóstico microbiológico de infecção (CDC/NHSN, 2013).

Terapia antimicrobiana inapropriada: quando o micro-organismo isolado apresentar resistência *in vitro* ao antibiótico utilizado no tratamento do paciente e/ou ausência de terapia durante as primeiras 24h após o diagnóstico microbiológico de infecção (CDC/NHSN, 2013).

4.3- Modelo de estudo

Este estudo foi realizado com amostras provenientes de uma tese de doutorado intitulado “OCORRÊNCIA DE SCCmec TIPO IV DE *Staphylococcus aureus* EM INFECÇÕES COMUNITÁRIAS E HOSPITALARES EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MINAS GERAIS” , um estudo de coorte longitudinal prospectivo de amostras coletadas no período de Setembro de 2006 a Setembro de 2008. A investigação foi realizada a partir de amostras clínicas de pacientes com infecção de sítio cirúrgico e corrente sanguínea, internados no ambulatório do hospital, que apresentaram diagnóstico de infecção por *S. aureus*. As amostras obtidas a partir do laboratório do HC-UFU permaneceram armazenadas em tubos contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) e glicerina (10%) e congeladas a -20°C para estudos posteriores.

4.4- Critério de inclusão

Durante o período de estudo foram isoladas 492 amostras de *S. aureus* e estas submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de disco difusão em Agar (CLSI, 2009) evidenciando 286 (58,0%) amostras de *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) e 206 (42,0%) amostras de MRSA.

Das 206 amostras de MRSA obtidas de 206 pacientes, foram selecionadas 96 amostras para o presente estudo, pois foram obtidas de pacientes que fizeram o uso de

vancomicina durante o tratamento, sendo: 48 amostras obtidas a partir pacientes que evoluíram para alta e 48 amostras obtidas de pacientes que foram a óbito.

4.5- Coleta de dados

As informações para o preenchimento das fichas clínicas e epidemiológica contendo o perfil demográfico e fatores de risco (intrínsecos e extrínsecos) relacionados aos pacientes foram obtidas no Setor de Prontuários do HC-UFU.

4.6- Técnicas microbiológicas

4.6.1- Cultivo primário

As amostras foram novamente cultivadas em Agar TSA (Tryptic Soy Agar) e após crescimento as colônias foram submetidas aos testes fenotípicos para identificação realizada pelas características morfo-tintoriais (coloração de Gram), fermentação do manitol, e teste de catalase e coagulase ligada.

4.6.2- Sensibilidade “in vitro” aos antimicrobianos

- **Teste de triagem em Agar incorporado de oxacilina e NaCl**

Foram utilizadas placas de Agar Mueller-Hinton (MHA) contendo 6 µg/mL de oxacilina em pó e 4,0% de NaCl onde foram cultivadas as amostras de *S. aureus* para a identificação daquelas resistentes à oxacilina, de acordo com as indicações do CLSI (2012). Os inóculos foram preparados por subcultivos em caldo Mueller-Hinton e os “spots”, correspondendo a 2µL de cada isolado, aplicados na superfície do Agar com auxílio do aplicador de Steers. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e a leitura definida pela presença (resistência) ou ausência (sensibilidade) de crescimento.

Os controles utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC29213, como amostra sensível e *Staphylococcus aureus* ATCC43300, como amostra resistente.

- **Determinação da concentração inibitória mínima para oxacilina e vancomicina**

O MIC para oxacilina e vancomicina foi avaliado pelo método de diluição em agar (CLSI, 2012).

Preparo da solução estoque do antimicrobiano. A quantidade necessária do antimicrobiano a ser utilizada, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência (}\mu\text{g/mg)}}$$

Para cada antimicrobiano foi preparada uma solução estoque na concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$.

Número de diluições por placa. Foram utilizadas as concentrações de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ a 256 $\mu\text{g/mL}$ para a oxacilina e de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$ para vancomicina.

Preparo da suspensão bacteriana. A partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, preparou-se uma solução bacteriana na escala 0,5 de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), sendo o inóculo final necessário de 10^4 UFC por ponto de 5 a 8 mm de diâmetro. Por utilizarmos um aplicador de Steers com pontas de 3mm que aplicam 2 μL , a suspensão de McFarland 0,5 deve ser diluída 1:10 em solução salina estéril para obter uma concentração de 10^7 UFC/mL, concentração esta determinada por espectrofotometria. O inóculo final foi aproximadamente 10^4 UFC por ponto.

Inoculação, incubação e interpretação dos resultados. Os inóculos foram aplicados na superfície do Agar com auxílio do aplicador de Steers. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e a leitura do MIC foi registrada como a menor

concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento, descartando qualquer colônia única ou turvação leve causada pelo inóculo.

4.6.3- Heterorresistência à vancomicina

A heterorresistência à vancomicina das amostras foram avaliadas segundo proposta de Hiramatsu e colaboradores (1997) com algumas modificações (WOOTTON; WALSH, 2001). O inóculo foi preparado em caldo BHI “overnight” e a densidade de crescimento ajustada com salina estéril às seguintes concentrações: 6×10^8 UFC/mL (Correspondente ao padrão da suspensão de McFarland 2), 3×10^8 UFC/mL (Correspondente ao padrão da suspensão de McFarland 1) e 1.5×10^8 UFC/mL (Correspondente ao padrão da suspensão de McFarland 0.5) . As 3 concentrações resultantes foram semeadas em agar BHI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) contendo de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina (SIGMA Chemical Co. St. Louis. MO. USA) com auxílio do aplicador de Steers (2 μL). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e o crescimento das diferentes amostras, nas diluições anteriormente mostradas e em 8 concentrações do antimicrobiano foram identificadas e plotadas em gráfico semilogarítmico no programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad; San Diego, CA, USA). Com esse mesmo programa foi feito a razão da área sob a curva (AUC) de cada amostra, posteriormente dividi-se essas razões pelo valor da área sob a curva da cepa padrão Mu3 (média AUC de $21,06 \pm 2,47$) (ATCC 700698).

A área sob a curva é uma medição integrada de um efeito mensurável . Ela é utilizada como uma medida de efeito cumulativo da droga na farmacocinética. Para cada região, Prism mostra a área em unidade de tempo do eixo X e do eixo Y. Prisma também mostra cada região como uma fração da área total em todas as regiões

combinadas. A área é calculado usando a regra trapezoidal. Isso simplesmente conecta uma linha reta entre cada conjunto de pontos adjacentes que definem a curva. Em seguida, Prism identifica o pico de cada região. Este é reportado como as coordenadas X e Y do ponto mais alto da região e as duas coordenadas x, que representam o início eo fim da região. A área é, portanto, $\Delta X \cdot (Y_1 + Y_2) / 2$. Prism utiliza esta fórmula repetidamente para cada par adjacente dos pontos que definem a curva.

Todas as amostras foram analisadas em duplicatas.

Foi definido VSSA como uma relação $PAP / AUC < 0.9$, hVISA como uma relação ≥ 0.9 (WOOTTON et al., 2001; WALSH et al., 2001).

Um fator-chave na definição de hVISA desta forma é a reprodutibilidade da relação PAP / AUC para estirpe de referência Mu3. Na descrição original, Mu3 foi testada em 16 ocasiões e deu resultados muito reprodutíveis (média AUC de $21,06 \pm 2,47$) (HOWDEN et al., 2010).

4.7- Análises Estatísticas

Para a análise estatística foi realizadas comparações univariadas para as diferenças entre proporções pelos testes Qui2 e exato de Fisher ($N < 5$). A regressão logística multivariada foi usada quando houvesse significância estatística na análise univariadas. O risco relativo (RR) e o intervalo de confiança (IC) 95% foram calculados de acordo com método padrão. A significância estatística foi definida como um $P < 0,05$. Os fatores de risco potenciais para infecção/colonização foram realizados pela dicotomização, “presente versus ausente” por meio de tabelas 2x2 analisado pelo programa Epi Info, versão 6.03 (CDC; WHO, 1996).

5-RESULTADOS

Avaliação dos fatores de risco relativos aos pacientes e tipos de infecções associados aos dois grupos (alta e óbito) são mostrados na Tabela 1. Os dois grupos foram bem pareados, evidenciado com a não significância estatística ($P < 0,05$) quando comparados entre si.

Entre as infecções por MRSA predominaram as de corrente sanguínea, sendo 66,6% para o grupo de alta e 62,5% para o grupo de óbito (Tabela 1), o gênero masculino também predominou entre os dois grupos, sendo 72,9% no grupo de alta e 68,7% no grupo de óbito (Tabela 1).

Também na Tabela 1, observamos que 100% das infecções por MRSA no grupo de óbito foram de origem hospitalar, já no grupo de alta verificamos 6% das infecções como sendo de origem comunitária.

No grupo de alta 21% dos pacientes apresentavam idade ≥ 60 anos enquanto que no grupo de óbito essa porcentagem subiu para 37%, mas sem significado estatístico (Tabela 1).

Ainda na tabela 1, verificamos que 37% dos pacientes do grupo de alta já haviam sido internados previamente, enquanto que esse valor sobe para 39% em relação ao grupo de óbito, porém, mais uma vez sem significado estatístico (Tabela 1).

O estudo dos fatores de risco extrínseco dos pacientes é mostrado na Tabela 2, e mostram que os dois grupos estão bem pareados e com apenas uma significância estatística entre os pacientes, que ocorreu entre os pacientes que fizeram uso de cefalosporina de 3º e 4º geração no grupo que foram a óbito ($P = 0.03$).

Evidenciou em 100% dos pacientes fazendo uso de vancomicina como único tratamento ou com associações, no grupo de alta, 25% dos pacientes receberam vancomicina como único tratamento e no grupo de óbito esse número cai para 17% (Tabela 2).

Tabela 1. Dados clínicos, demográficos e fatores de risco intrínsecos relacionados aos pacientes de alta e óbito com infecção por MRSA.

Características	Pacientes Alta N=48(%)	Pacientes Óbitos N=48(%)	P	RR (IC 95%)
Gênero (M /F)	35(73)/ 13(27)	33(69)/ 15(31)	0.63/0.65	0.91 (0.59- 1.38) / 1.10 (0.72-1.68)
Idade: média (V)	39 (0-90)	48 (0-85)	-	-
Idade ≥ 60 anos	10(20.8)	18(37.5)	0.18	1.46 (0.99-2.14)
Tempo de internação: média (V)	40 (0-148)	55 (0-180)	-	-
Tempo de internação UTI ≥21 dias	35(73)	41(85.4)	0.60	1.08 (0.81-1.44)
Internação Prévia	18(37.5)	19(39.5)	0.83	1.04 (0.70-1.57)
Doença de base:				
Isquemia	7(14.5)	5(10.4)	0.53	0.81 (0.40-1.64)
SIDA	3(6.2)	3(6.2)	0.66	1.00 (0.44-2.29)
Neoplasia	3(6.2)	6(12.5)	0.24	1.38 (0.83-2.30)
Pneumonia	4(8.3)	3(6.2)	0.50	0.85 (0.35-2.04)
Queimadura	2(4.1)	1(2)	0.50	0.66 (0.13-3.31)
Sepse	4(8.3)	2(4.1)	0.33	0.65 (0.21-2.06)
Insuficiência Renal	4(8.3)	5(10.4)	0.50	1.12 (0.60-2.09)
Trauma	10(20.8)	6(12.5)	0.27	0.71 (0.37-1.39)
Diabetes Mellitus	2(4.1)	5(10.4)	0.21	1.48 (0.88-2.48)
Abdome Agudo	3(6.2)	6(12.5)	0.24	1.38 (0.83-2.30)
Osteomielite	4(8.3)	2(4.1)	0.33	0.65 (0.21-2.06)
Aquisição:				
Hospitalar	45(93.7)	48(100)	0.12	-
Comunitária	3(6.2)	0(0)	0.12	-
Sítio de Infecção:				
Sangue	32(66.6)	30(62.5)	0.66	0.91 (0.61-1.37)
PAV	6(12.5)	6(12.5)	1.0	1.00 (0.55-1.83)
ISC	5(10.4)	6(12.5)	0.74	1.10 (0.62-1.97)
Pele e Tecidos Moles	5(10.4)	6(12.5)	0.74	1.10 (0.62-1.97)

M, masculino; F, feminino; V, variação; PAV, pneumonia associada à ventilação; ISC, infecção de sítio cirúrgico.

Em relação aos procedimentos invasivos, cateter vascular central e sonda vesical foram os procedimentos mais realizados no grupo de alta e no grupo de óbitos, onde a porcentagem foi de 67.6% e 62.5% respectivamente, seguidos pelo tubo endotraqueal, onde os dados mostram que foram realizados em 52% dos pacientes do grupo de alta e 41.6% no grupo de óbito (Tabela 2).

Verificamos ainda que 25% dos pacientes do grupo de alta e 31% no grupo de óbitos não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico.

Tabela 2. Estudos dos fatores de risco extrínsecos relacionados aos pacientes de alta e óbito com infecção por MRSA.

Características	Pacientes Alta N=48(%)	Pacientes Óbitos N=48(%)	P	RR (IC 95%)
Antibiótico terapia				
VAN	12(25)	8(16.6)	0.31	0.76 (0.43-1.35)
VAN + Associações	36(75)	40(83.3)	0.31	1.32 (0.74-2.34)
≥ 3	15(31.2)	20(41.6)	0.28	1.24 (0.84-1.85)
Carbapenêmicos	13(27)	17(35.4)	0.37	1.21 (0.81-1.81)
Cefalosporina (1° e 2° geração)	5(10.4)	2(4.1)	0.23	0.55 (0.17-1.81)
Cefalosporina (3° e 4° geração)	15(31.2)	25(52)	0.03	1.52(1.03-2.26)*
Penicilinas (OXA/ AMP)	6(12.5)/ 1(2)	7(15.5)/ 2(4.1)	0.76/0.55	1.09 (0.63-1.89) 1.35 (0.59-3.08)
Fluoroquinolonas	6(12.5)/	11(23)	0.18	1.38 (0.91-2.11)
Aminoglicosídeos	4(8.3)	1(2)	0.16	0.39 (0.07-2.26)
Clindamicina	6(12.5)/	3(6.25)	0.29	0.64 (0.25-1.66)
UTI de internação				
UTI adulto	16(33.3)	15(31.2)	1.00	1.05 (0.69-1.60)
Clínica médica	9(18.7)	10(20.8)	1.00	0.94 (0.55-1.58)
Neonatal	6(12.5)/	6(12.5)/	0.75	1.00 (0.55-1.83)
Queimados	4(8.3)	3(6.25)	1.00	1.16 (0.59-2.27)
Moléstias infecciosas	3(6.25)	6(12.5)/	0.48	0.64 (0.25-1.60)
Pronto socorro	10(20.8)	8(16.6)	0.79	1.14 (0.71-1.83)
Procedimentos invasivos:				
3	12(25)	14(29.1)	0.64	1.11 (0.72-1.70)
CVC	32(66.6)	30(62.5)	0.66	0.91 (0.61-1.37)
TET	25(52)	20(41.6)	0.30	0.81 (0.54-1.22)
SV	33(68.7)	30(62.5)	0.51	0.87 (0.58-1.31)
Nenhum	2(4.1)	2(4.1)	0.69	1.00 (0.37- 2.72)
Procedimentos Cirúrgicos:				
Nenhum	12(25)	15(31.2)	0.49	1.16 (0.76-1.76)
Drenagem	10(20.8)	8(16.6)	0.60	0.87 (0.50-1.52)
Debridamento	8(16.6)	5(10.4)	0.37	0.74 (0.36- 1.52)
Amputação	2(4.1)	2(4.1)	0.69	1.00 (0.37-2.72)
Laparotomia	2(4.1)	3(6.25)	0.50	1.21 (0.58-2.56)
Traqueostomia	4(8.3)	5(10.4)	0.50	1.12 (0.60-2.09)

VAN, vancomicina; OXA, oxacilina; AMP, ampicilina; CVC, cateter vascular central; TET, tubo endotraqueal; SV, sonda vesical;

Na tabela 3 verificamos que os valores do MIC para vancomicina (45/48) ficaram entre 1 e 2 µg/mL entre os pacientes de alta. Para os pacientes de óbitos predominou o MIC de 2µg/mL (62.5%), onde esse valor dobrou em relação ao MIC de 1 µg/mL (31.2%). Para todos os MICs, não foram encontrados significância estatística.

Ainda na tabela 3, foi demonstrado 2 amostras com MIC para vancomicina de 3.0 µg/ mL entre os pacientes de óbito, mostrando sensibilidade reduzida a este glicopeptídeo.

Tabela 3. MICs para vancomicina para amostras de MRSA isoladas de pacientes internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

MICs Diluição em Agar	Amostras Pacientes Alta n=48 (%)	Amostras Pacientes Óbito n=48 (%)	<i>P</i>	RR (IC 95%)
0,25 µg/mL	3 (6,2)	1 (2)	0.300	0.49 (0.09-2.70)
1 µg/mL	24 (50)	15 (31,2)	0.061	0.66 (0.42-1.05)
2 µg/mL	21 (43,7)	30 (62,5)	0.065	1.47 (0.96-2.25)
3 µg/mL	0	2 (4,1)	0.240	2.04 (1.66-2.51)

A análise do perfil populacional revelou uma alta porcentagem de heterorresistência no grupo de óbitos, onde a heterorresistência a vancomicina foi predominante, chegando a crescer mais de três vezes em relação ao grupo de alta ($P=0.001$) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise do perfil populacional das 96 amostras de MRSA dos pacientes de alta e óbito internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

Concentrações do inóculo	Amostras hVISA Pacientes Alta n=48 (%)	Amostras hVISA Pacientes Óbito n=48 (%)	<i>P</i>	RR (IC 95%)
6×10^8 UFC/mL	6 (12,5)	21 (43)	0.001	1.99 (1.39-2.84)
3×10^8 UFC/mL	0	0	-	-
1.5×10^8 UFC/mL	0	0	-	-

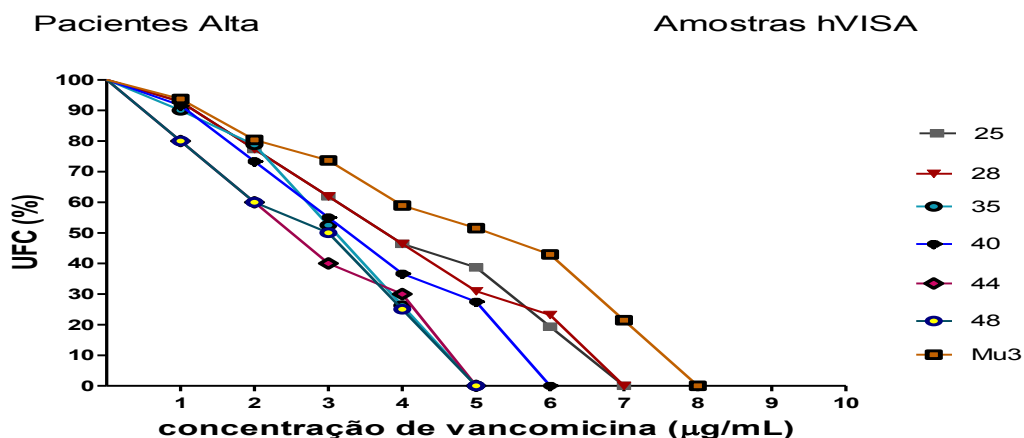
Nos dois grupos as amostras hVISA evidenciaram 83.3% com MIC de 2 µg/mL, e para os pacientes de alta 62% (Tabela5).

Tabela 5. Prevalência de hVISA encontrada em cada concentração de MIC para as amostras dos pacientes de alta e óbito internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

MIC	Pacientes de alta N (48) /hVISA (6)	Pacientes de óbito N (48) /hVISA (21)
0,25 µg/mL	3/0	1/0
1 µg/mL	24/1	15/6
2 µg/mL	21/5	30/13
3 µg/mL	0/0	2/2

Observando a curva de morte pela análise do perfil populacional pela a área sob a curva (PAP-AUC), foi constatado que no grupo de alta o perfil de resistência foi menor do que o observado no grupo de óbito (Figura 1; A e B).

A



B

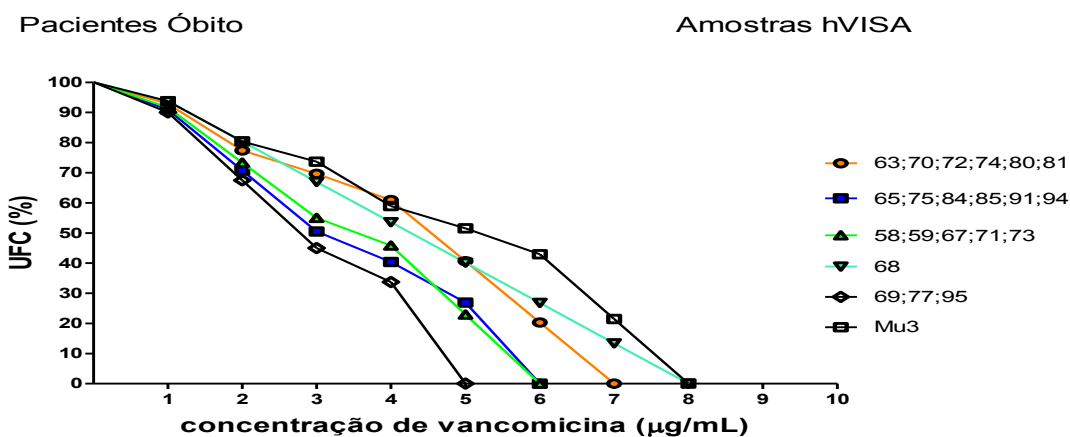


Figura 1. PAP-AUC das 6 amostras de MRSA de pacientes que evoluíram para alta, internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008 (A), PAP-AUC das 21 amostras de MRSA de pacientes que evoluíram para óbito, internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008 (B).

6-DISCUSSÃO

De resistência bacteriana à antimicrobianos é mundialmente notado. Em alguns micro-organismos ainda aparecem a heterorresistência. Em 96 amostras de MRSA encontramos taxas mais altas de hVISA nas amostras dos pacientes que foram à óbito (43%), enquanto que nas amostras dos pacientes que evoluíram para alta (12,5%). A incidência significativamente maior no grupo que evoluiu para óbito nos alerta quanto à importância da heterorresistência como uma possível causa de falha no tratamento com vancomicina. Em nosso estudo 64.5% das 96 amostras de MRSA são de origem sanguínea, e a porcentagem de óbitos entre o grupo hVISA foi de 59.2.7%, em um estudo similar, Takata e colaboradores (2013), encontraram 18,5% de hVISA em 162 amostras sanguíneas e evidenciaram 79% ($P = 0.004$) de mortalidade no grupo infectado por hVISA em comparação com o grupo não heterorresistente, embora com uma taxa de hVISA menor, a mortalidade foi semelhante. Wang e colaboradores (2013), analisando 122 amostras de pneumonia por MRSA, identificaram 21% das amostras como sendo hVISA, e a mortalidade em 30 dias foi de 37% para MRSA e 63% para hVISA ($P = 0.003$), no referido estudo o tratamento com vancomicina foi considerado fator de risco independente para hVISA ($P = 0.04$).

Entre as 96 amostras obtidas de pacientes com infecção por MRSA encontramos 27 (28%) de heterorresistência. Taxas semelhantes às nossas também foram observadas por Bae e colaboradores (2012), pesquisando 65 amostras de MRSA nos EUA e mais sete diferentes países da Oceania e Europa. Estes autores encontraram 19 amostras de hVISA (29%). Sara e colaboradores (2011), Satola e colaboradores (2011), analisando amostras de MRSA de 5 locais geograficamente diferentes nos Estados Unidos, encontraram taxas menores para hVISA (15%).

Neste estudo, 92.6% das amostras de hVISA apresentaram MIC para vancomicina entre 1 e 2 µg/mL e 2 amostras com MIC de 3µg/mL. De acordo com Leonard e colaboradores (2009) e Musta e colaboradores (2009), de 30 a 49% das amostras de *S. aureus* com MICs para vancomicina de 2 µg/ mL, são amostras hVISA e cerca de 60% a 80% das amostras de MRSA com um MIC para vancomicina de 3 µg/mL são hVISA (HORNE et al., 2009; MUSTA et al., 2009) em nossos dados, encontramos 100% de hVISA entre as amostras com MICs de 3 µg/mL.

Analisando 268 bacteremias por MRSA, Park e colaboradores (2012), encontraram 38% de amostras hVISA e os fatores associados com a presença de hVISA foram MIC $\geq$ 2µg/mL (OR: 9.98) e terapia primária com vancomicina (OR: 3.04). Chen e colaboradores (2011), pesquisaram 559 amostras de MRSA com MIC para vancomicina de 2µg/mL e evidenciaram 40% de hVISA.

Os MICs para vancomicina de nossas amostras de hVISA estão dentro da faixa suscetíveis ($\leq$ 2µg / mL), entretanto observamos que estas amostras incluem subpopulações que apresentam reduzida susceptibilidade à vancomicina. Estes organismos são clinicamente importantes, porque eles persistem latentes e são capazes de se tornarem VISA durante a terapia com vancomicina em pacientes infectados com amostras de hVISA (LIU e CHAMBERS. 2003. LULITANOND et al., 2005; van HAL et al., 2012).

Hiramatsu demonstrou que amostras hVISA associado com uma mudança sutil no MIC de vancomicina pode afetar a eficiência do tratamento com vancomicina “in vitro”. O que evidenciamos com nossos achados “in vivo”. Usando a cepa Mu3 (hVISA com um MIC para vancomicina de 2 µg/ mL), 10 µg/ mL de vancomicina foram necessários para suprimir completamente o crescimento, ao passo que em amostras de VSSA com

MIC para vancomicina de 1 µg/ mL, 2 µg de vancomicina/ mL suprimiu o crescimento com o mesmo grau (HIRAMATSU, 2001).

O teste que utilizamos para verificar os MICs para vancomicina das 96 amostras de MRSA foi à macrodiluição em Agar (CLSI, 2012), pois existe uma sutil variabilidade, mas potencialmente importante nos resultados do MIC para vancomicina quando são obtidos com diferentes métodos (PRAKASH et al., 2008; SADER et al., 2009; RICHTER et al., 2011; GUNES et al., 2012).

Em estudos feito com amostras de hVISA e VSSA, avaliados quanto a resistência à vancomicina pelo método de microdiluição em caldo e ϵ test, os MICs pelo ϵ test foram mais elevados que da microdiluição em caldo (LEONARD et al., 2009; MANFREDINI et al., 2011).

Nós analisamos MICs para vancomicina de amostras de MRSA de pacientes internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008, embora com poucos dados anteriores sobre os MICs para vancomicina de amostras anteriores à 2006 (MELO et al., 2003) verificarmos que os MICs para vancomicina estão aumentando (MIC creep).

O termo "MIC creep" para vancomicina é freqüentemente usado (STEINKRAUS et al., 2007; GOULD, 2008; MILLER et al., 2012), este fenômeno tem sido demonstrado numa série de Centros nos Estados Unidos (RYBAK et al., 2008). Na França, o aumento nos MICs de glicopeptídeos foram observados ao longo de 20 anos (ROBERT et al., 2006).

O significado clínico de hVISA e VISA tem sido difícil de se determinar claramente, isto é devido, em parte, às diferenças nas definições e detecção laboratorial, mas predominantemente pela ausência de estudos bem controlados (RICHTER et al., 2011; van HAL & PATERSON, 2011; HOWDEN et al., 2013).

Limitações do nosso estudo incluem o pequeno número de amostras e o estudo retrospectivo, de modo que as associações observadas não podem conferir valor preditivo clínico. Para esse controle seria importante a realização de um estudo prospectivo.

Em nosso estudo observamos 28 % de MRSA evidenciando heterorresistência, e este número cresce para 43 % no grupo que evoluíram para óbito, Shang e colaboradores (2011), encontraram 60% de mortalidade para pacientes infectados com amostras hVISA versus 17% para o grupo não hVISA ($P= 0.025$), já Bae e colaboradores (2012), analisando 65 amostras de MRSA em 8 países, encontraram 19 amostras hVISA (29%) e verificaram que estas causam bacteremia persistente em maior grau do que amostras MRSA (68% versus 37% $P= 0.029$), além de causarem falência cardíaca (47% versus 20% $P=0.033$).

No presente estudo os fatores extrínsecos, intrínsecos e dados demográficos foram aproximadamente pareados, sem significado estatístico, sendo assim não foi possível relatar fatores de risco relacionados à mortalidade além daquela atribuída a heterorresistência. Utilizamos amostras de pacientes que fizeram o uso de vancomicina como principal tratamento ou vancomicina associada a outro antimicrobiano, no intuito de verificar a ocorrência de falha no tratamento em relação ao uso do glicopeptídeo em amostras de MRSA, especialmente hVISA.

Não surpreendentemente, os principais fatores de risco para a infecção por VISA e hVISA parecem ser infecção por MRSA e exposição à vancomicina (CHARLES et al., 2004; MELO. 2009; van HAL et al., 2012).

Park e colaboradores (2012), estudando 268 amostras de MRSA isolados de bacteremia, identificaram 101 amostras hVISA (38%), a mortalidade foi similar entre os dois grupos (45/101 versus 65/167 $P=0.36$) e os fatores de risco independentes

associados a presença de hVISA foram: MIC para vancomicina $\geq 2\mu\text{g/mL}$ (OR 9.98; IC95%, 4.22 – 23.59) e terapia primária com vancomicina (OR 3.04; IC95%, 1.49 – 6.17).

Em nosso estudo, optamos por trabalhar com MRSA, e não analisamos as amostras MSSA, devido à incidência menor de hVISA neste último fenótipo, embora relatado predominantemente para MRSA, o fenótipo hVISA pode ser detectado entre as amostras de MSSA (GARNIER et al., 2006; ALOS et al., 2008).

Em uma instituição francesa, que avaliou 2.300 amostras de *S. aureus*, descobriu-se que 11% das amostras eram hVISA, e destas, 7 dos 255 hVISA foram amostras de MSSA (GARNIER et al., 2006).

Estudos realizados nos Estados Unidos têm detectado taxas muito baixas de hVISA, no entanto, uma variedade de métodos foram utilizados para a detecção (KOSOWSKA-SHICK et al., 2008; PARK et al., 2012).

Em nosso estudo utilizamos a metodologia do PAP-AUC para a identificação das amostras de hVISA, visto que vários estudos já evidenciaram sua alta especificidade e sensibilidade perante outros métodos, sendo ele considerado o "padrão ouro" (WOOTTON et al., 2007; SATOLA et al., 2011; van HAL et al., 2011), e embora um grande número de métodos são úteis para a detecção de VISA, a maioria não são adequados para identificação de amostras hVISA, o que faz com que os testes laboratoriais e interpretação do significado clínico de hVISA, seja difícil (LIU e CHAMBERS, 2003; RICHTER et al., 2011).

Qualquer método para detectar a subpopulação de células resistente presente em uma amostra hVISA é inerentemente mais difícil do que testes padrões de acordo com os critérios do CLSI, porque a subpopulação resistente pode estar presente em uma proporção reduzida quando comparada com a população suscetível (tipicamente 10^{-5} a

10^{-6}) (HOWDEN et al., 2010). Dado o inóculo utilizado para MICs em caldo e diluição em agar, o fenótipo hVISA não será detectado (LIU & CHAMBERS, 2004). Métodos para detectar hVISA, portanto, tendem a contar com um inóculo maior (padrão 2-McFarland do inóculo) suficiente para promover o crescimento da subpopulação resistente e incubação prolongada (geralmente 48 h) ou a utilização de meios mais nutritivos como o agar BHI ou Mueller Hinton com sangue (SATOLA et al., 2011). A metodologia do PAP parece ser o melhor método para a confirmação da presença de hVISA (HOWDEN et al., 2010).

O Macro método ϵ test (MET) utiliza um inóculo maior e uma incubação mais prolongada para detectar hVISA mas deve-se notar que o resultado do MET é apenas um nível de corte (WOOTTON et al., 2007; MAOR et al., 2007).

O recém-lançado ϵ test GRD fornece um novo método para a detecção da susceptibilidade reduzida a vancomicina, e em particular, uma melhoria potencialmente útil em relação ao tempo, com uma leitura inicial realizada após 24 h de incubação, o método envolve o uso de uma tira dupla de Etest que contém vancomicina, teicoplanina, e um suplemento nutricional, um inóculo de padrão 0,5 McFarland, em vez do padrão 2 utilizado para o MET, é utilizado e inoculado em MHA com 5% de sangue (YUSOF et al., 2008; LEONARD et al., 2009).

Dois estudos foram feitos envolvendo diversas metodologia para detecção de amostras hVISA e comparando os resultados com a metodologia do PAP, no primeiro estudo foi encontrados os seguintes valores: MET com sensibilidade de 57% e especificidade de 96% e o GRD com 57% de sensibilidade e 97% de especificidade (SATOLA et al., 2011). No segundo estudo foram encontrados valores divergentes: MET com 89% de sensibilidade e 55% de especificidade já o GRD com 71% de sensibilidade e 94% de especificidade (van HAL et al., 2011).

Na tentativa de desenvolver testes rápidos para detecção de hVISA e VISA, Tajima e colaboradores (2007), utilizaram um ensaio de quimioluminescência induzida por ativos de oxigênio para medir a atividade metabólica de bactérias após exposição a vancomicina ou teicoplanina, em um ensaio com um tempo de resposta de 4 a 6 horas eles foram capazes de detectar hVISA com elevada sensibilidade e especificidade para um conjunto bem definido de amostras de hVISA / VISA e VSSA, no entanto, este ensaio requer validação adicional em um local de rotina.

Optamos em nosso estudo, por passar as amostras de MRSA duas vezes em meio seletivo BHIA com 0.25 µg/ml de vancomicina, para mimetizar situações clínicas, com intuito de ativar o perfil de resistência à vancomicina, visto que manter esse perfil em meio livre de droga, é difícil como demonstrado em outros estudos (PFELTZ et al., 2000; CUI et al., 2003; SIERADZKI & TOMASZ. 2003) além de estarmos trabalhando com amostras congeladas por um longo período. Para muitos pacientes, o fenótipo hVISA ou VISA foi detectado somente após um período prolongado de infecção associado com a falha da terapia por glicopeptídeo (JULIAN et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; GUNES et al., 2011).

Para muitos pacientes, o fenótipo hVISA ou VISA foi detectado somente após um período prolongado de infecção associado com a falha da terapia por glicopeptídeo (JULIAN et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; GUNES et al., 2011).

Uma das dificuldades em trabalhar com estas estirpes no laboratório é a tendência para alguma amostra resistentes, de reverter para um fenótipo mais susceptíveis como ocorreu em um estudo de quatro amostras de VISA (NJ, MI, PC e Mu50), todas as estirpes revertidas para um fenótipo mais susceptíveis ao fim de 15 dias de passagem sobre meio não seletivo, no entanto, três das estirpes mantiveram uma subpopulação que cresceram em 4 µg de vancomicina por mL (PFELTZ et al., 2000).

Muitas amostras com MIC de vancomicina de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ têm sido relatadas em todo o mundo e desenvolvidas em pacientes durante a terapia com vancomicina, demonstraram MICs menores (tão baixo como 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) quando testadas novamente, o que demonstra a instabilidade deste fenótipo de resistência, e uma tendência para algumas amostras, de ter uma redução nos MICs quando a pressão seletiva da vancomicina é removida (TAJIMA et al., 2007).

7- CONCLUSÃO

Observamos que amostras hVISA estão sendo relatadas em todo o mundo. Em nosso país, o número de estudos realizados são limitados , no entanto, nossos dados fornecem os primeiros sinais de alerta da resistência aos glicopeptídeos. MRSA é um agente patogênico extraordinariamente adaptável com uma capacidade comprovada para desenvolver resistência .

O fenótipo hVISA ocorreu em mais de ¼ das amostras de MRSA, evidenciando uma alta prevalência embora no MIC convencional indicasse susceptibilidade à vancomicina.

A prevalência de mortalidade foi significativa ($P = 0.001$), nos portadores do fenótipo hVISA. Trabalhos nesse sentido deverão ser desenvolvidos para aclarar esta importante questão como possível causa de falha terapêutica.

As questões que envolvem a detecção laboratorial e o impacto clínico de amostras hVISA continuam incomodar microbiologistas clínicos e especialistas em doenças infecciosas.

Isolados de hVISA são mais comuns mundialmente do que se pensava e opções de tratamento para infecções por hVISA são limitadas. A identificação rápida desses fenótipos poderão trazer avanços para tratamento e controle desses micro-organismos.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOS JI, GARCIA CP, GARCIA H, et al. Vancomycin MICs did not creep in *Staphylococcus aureus* isolates from 2002 to 2006 in a setting with low vancomycin usage. J. Antimicrob. Chemother 2008; 62: 773-775.

ARAKAWA YY, NAGASAWA M. Where has vancomycin heterogeneously resistant *Staphylococcus aureus* gone? Lancet 2004; 363: 1401-1405.

BAE IG, FEDERSPIEL JJ, MIRO JM, et al. Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility phenotype in bloodstream methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from an international cohort of patients with infective endocarditis: prevalence, genotype, and clinical significance. J Infect Dis 2009; 200: 1355–1366.

BARBER M. Methicillin-resistant *Staphylococci*. J. Clin. Path 1961; 14: 385.

BERGLUND C. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. Antimicrob. Agents. Chemother 2008; 52: 3512–3516.

BOYLE-VAVRA S, CAREY RB, DAUM RS. Development of vancomycin and lysostaphin resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. J. Antimicrob. Chemother 2001; 48: 617–625.

CAMARGO IL, GILMORE MS. *Staphylococcus aureus* - probing for host weakness? J. Bacteriol 2008; 190: 2253–2256.

CAVALCANTI MS. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital, Pernambuco, Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2005; 9: 56-63.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC) & WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Epi info 6: a world processing, database and statistics program for public health. 1996; vs 6.03. Atlanta and Geneve, Switzerland.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Surveillance Definition of Associated Infection. 2013; Protocol Clarifications.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*- Pennsylvania. Morb. Mortal. 2002; 51: 902- 903.

CHAMBERS HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerging Infectious Diseases 2001; 7: 178-182.

CHARLES PG, WARD PB, JOHNSON PD, et al. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis 2008; 38: 448-451.

CHEN H, LIU Y, SUN W, et al. The incidence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* correlated with increase of vancomycin MIC. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 301-303.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard - 7th ed, M7-A8. CLSI. Wayne, PA, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9th ed, M100-S15. CLSI. Wayne, PA, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013; 29: 1-149.

CUI L, MA X, SATO K, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5–14.

CUNHA MLR, USTULIN DR, Antimicrobial resistance in *Staphylococcus spp.* Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. 2011; 68: 714-721.

EGGIMANN P, PITTET D. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 295-309.

GARNIER F, CHAINIER T, WALSH A, et al. A 1 year surveillance study of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* strains in a French hospital. J. Antimicrob. Chemother 2006; 57:146–149.

GEMMELL CG. Glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: is it a real threat? J. Infect. Chemother 2004; 10: 69–75.

GOULD IM. The epidemiology of antibiotic resistance. Int. J. Antimicrob. Agents 2008; 32: 2-9.

GUNEŞ H, ÇETİN ES, KAYA S, et al. Investigation of reduced glycopeptid susceptibility among methicillin resistant *staphylococcus*. African Journal of Microbiology Research 2012; 6: 453-459.

HIRAMATSU K, ARITAKA N, HANAKI H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350: 1670–1673.

HIRAMATSU K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis 2001; 1: 147–155.

HIRAMATSU K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother 1997; 40: 135–136.

HORNE KC, HOWDEN BP, GRABSCH EA, et al. Prospective comparison of the clinical impact of heterogeneous vancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin susceptible MRSA. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 3447–3452.

HOWDEN BP, DAVIES JK, JOHNSON PD, et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol 2010; 23: 99–139.

HOWDEN BP, PELEG AY, STINEAR TP. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. Infection Genetics and Evolution 2013; 03: 48-56.

IKE Y, ARAKAWA X, MA K, et al. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. J. Clin. Microbiol 2001; 39: 4445-4451.

ITO T, MA F, TAKEUCHI K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother 2001; 45: 1323-1336.

ITO T, KATAYAMA K, ASADA N, et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob. Agents. Chemother 2004; 48: 2637-2651.

JULIAN K, KOSOWSKA-SHICK K, WHITENER C, et al. Characterization of a daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain in a patient with endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 3445–3448.

KIRBY WMM. Properties of a penicillin inactivator extrated from penicillin-resistant *staphylococci*. J Clin Invest 1945; 24: 170–174.

KLEVENS RM. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 2007; 298: 1763–1771.

LEONARD SN, ROSSI KL, NEWTON KL, et al. Evaluation of the Etest GRD for the detection of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides. J. Antimicrob. Chemother 2009; 63: 489–492.

LEVINE DP. Vancomycin: a history. Clin. Infect. Dis 2006; 42: 5–12.

LIU C, CHAMBERS HF. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob. Agents Chemother 2003; 47: 3040-3045.

LULITANOND A, CHANAWONG P, SRIBENJALUX W. et al. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Srinagarind. Antimicrob. Agents Chemother 2005; 51: 2679-2690.

MA XX, ITO C, TIENSASITORN M, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents. Chemother 200; 46: 1147-1152.

MANFREDINI C, PICOLI SU, BECKER AP. Comparação de métodos na determinação de sensibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. J Bras Patol Med Lab 2011; 47: 141-145.

MAOR Y, RAHAV N, BELAUSOV D, et al. Prevalence and characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary care center. J. Clin. Microbiol 2007; 45: 1511-1514.

MARTINS A, PEREIRA VC, CUNHA ML. Oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the university hospital of Botucatu Medical School in Brazil. Chemotherapy 2010; 56: 112-119.

MCCARTHY AJ, LINDSAY JA. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. BMC Microbiol 2010; 10: 173-178.

MELO GB, MELO MC, CARVALHO KS, et al. *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina em um Hospital Universitário Brasileiro. Minas Gerais, Brasil. Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada 2009; 30: 55-61.

MELO GB, RIBAS RM, GONTIJO FILHO PP. Isolados Clínicos de *S. aureus* e *Syaphylococcus* coagulase negativos com susceptibilidade reduzida a vancomicina em pacientes internados no Hospital de Clinicas da Universidade Federal de Uberlândia. Newslab São Paulo 2002; 10: 90-98.

MILLER CE. An association between bacterial genotype combined with a high-vancomycin minimum inhibitory concentration and risk of endocarditis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. Clin Infect Dis 2012; 54: 591-600.

MILLER LG, DIEP BA. Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis 2008; 46: 752–760.

MUSTA AC, RIEDERER K, SHEMES S, et al. Vancomycin MIC plus heteroresistance and the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: trends over 11 years. J Clin Microbiol 2009; 47: 1640–1644.

NAVES KSC, TRINDADE NVT, GONTIJO FILHO PP. Methicillin-*resistant Staphylococcus aureus* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome in non-intensive-care units. Rev Soc Bras Med Trop 2012; 45: 189-193.

OLIVEIRA DC, MILHEIRICO C, LENCASTRE DE H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrob. Agents. Chemother 2006; 50: 3457-3459.

OLIVEIRA GA, AQUILA RA, MASIERO C, et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Infect. Control Hosp. Epidemiol 2001; 22: 443-448.

OLIVEIRA G, OKADA S, GUENTA SR, et al. Avaliação da tolerância a vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina. Journal Brasileiro de Patologia 2001; 37: 239-246.

PARK KH, KIM ES, KIM HS, et al. Comparison of the clinical features, bacterial genotypes and outcomes of patients with bacteremia due to heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-susceptible *S. aureus*. J. Antimicrob Chemother 2012; 67: 1843-1849.

PFELTZ RF, SINGH VK, SCHMIDT JL. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 294–303.

PRAKASH V, LEWIS JS, JORGENSEN JH. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. Antimicrob. Agents Chemother 2008; 54: 4528-4535.

RICHTER SS, SATOLA SW, CRISPEL EK. Detection of *Staphylococcus aureus* with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin (hVISA) in the United States. J Clin Microbiol 2011; 49: 4203–4207.

ROBERT J, BISMUTH R, JARLIER V. Decreased susceptibility to glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983–2002. J. Antimicrob. Chemother 2006; 57: 506-510.

RYBAK MJ, LEONARD SN, ROSSI KL. Characterization of vancomycin-heteroresistant *Staphylococcus aureus* from the metropolitan area of Detroit, Michigan, over a 22-year period (1986 to 2007). J Clin Microbiol 2008; 46: 2950–2954.

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*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 3162–3165.

SADOYAMA G, GONTIJO FILHO PP. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infections in a Brazilian University Hospital. Brazilian Journal of Infectious Diseases 2000; 4: 135-143.

SANCAK B, ERCIS D, MENEMENLIOGLU S, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. J. Antimicrob. Chemother 2005; 56: 519–523.

SATOLA SW, LESSA FC, RAY SM, et al. Clinical and laboratory characteristics of invasive infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates demonstrating a vancomycin MIC of 2 micrograms per milliliter: lack of effect of heteroresistant vancomycin-intermediate *S. aureus* phenotype. J Clin Microbiol 2011; 49: 1583–1587.

SHANG YL, TUN CC, FENG JC, et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hetero-resistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a Taiwan Medical Center. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 2012; 45: 435-441.

SIERADZKI K, LESKI T, DICK J, et al. A. Evolution of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain in vivo: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant *S. aureus* under the impact of antibiotics administered for chemotherapy. J Clin Microbiol 2003; 41: 1687–1693.

SILVESTRE J, PÓVOA P, GONÇALVES E, et al. Is vancomycin MIC creep a worldwide phenomenon? Assessment of *S. aureus* vancomycin MIC in a tertiary university hospital. BMC Research Notes 2013; 6: 65-75.

SONG JH, HIRAMATSU K, SUH JY, et al. Emergence in Asian countries of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Antimicrob. Agents Chemother 2004; 48: 4926-4928.

STEINKRAUS G, WHITE R, FRIEDRICH L. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin- susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001–05. J. Antimicrob. Chemother 2007; 60: 788–794.

TAJIMA Y, KOMATSU M, ITO T, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* strains having reduced susceptibility to vancomycin using a chemiluminescence-based drug-susceptibility test. J. Microbiol. Methods 2007; 70: 434-441.

TAKATA T, MIYAZAKI M, FUTO M, et al. Presence of both heterogeneous vancomycin-intermediate resistance and β -lactam antibiotic-induced vancomycin resistance phenotypes is associated with the outcome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2013; 45: 203-212.

TRINDADE PA, PACHECO RL, COSTA SF, et al. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology 2005; 43: 3435-3437.

TURLEJ A, HRYNIEWICZ W, EMPEL J. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Classification and Typing Methods: an Overview. Polish Journal of Microbiology 2011; 60: 95-103.

VAN GRIETHUYSEN A, VAN'T VEEN A, BUITING A, et al. High percentage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to glycopeptides in The Netherlands. J. Clin. Microbiol 2003; 41: 2487–2491.

VAN HAL SJ, LODISE TI, PATERSON DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentrations in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 2012; 54: 755–771.

VAN HAL SJ, PATERSON DL. Systematic Review and Meta Analysis of the Significance of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates. Antimicrobial agents and Chemotherapy 2011; 55: 405–410.

VAN HAL SJ, LODISE TI, PATERSON DL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility testing: methodology correlations, temporal trends and clonal patterns. J. Antimicrob Chemother 2011; 66: 2284-2287.

WALSH TR, BOLMSTRÖM A, QWAMSTRÖM A. Evaluation of current methods for detection of *Staphylococcus* with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2001; 39: 2439–2444.

WALSH TR, HOWE RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Annu. Rev. Microbiol 2002; 56: 657-675.

WANG Y, HU YJ, XIAO AM, et al. Prevalence and clinical prognosis of heteroresistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in a tertiary care center in China. Chin Med J 2013; 126: 505-509.

WEBSTER DRP, RENNIE CL, BROSNIKOFF LC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Canada. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 177–181.

WERTH BJ, VIDAILLAC C, MURRAY K, et al. Novel combinations of vancomycin plus ceftaroline or oxacillin against methicillin resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA (hVISA). Antimicrob. Agents Chemother 201; 46: 1147-1152.

WOOTTON M, HOWE RA, HILLMAN R, et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 399–403.

YUSOF A, VIDAILLAC C, MURRAY K, et al. Evaluation of a new Etest vancomycin-teicoplanin strip for detection of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA), in particular, heterogeneous GISA. J. Clin. Microbiol 2008; 46: 3042-3047.

ZHANG K, MCCLURE JA, ELSAYED S, et al. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother 2009; 53: 531-540.