



# *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina em um Hospital Universitário Brasileiro

Melo, G.B.<sup>2\*</sup>; Melo, M.C.<sup>1</sup>; Carvalho, K.S.<sup>2</sup>; Gontijo Filho, P.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário do Triângulo, UNITRI, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

Recebido 16/02/2009 / Aceito 24/06/2009

## RESUMO

**Infecções hospitalares por *Methicillin-Resistant S. aureus* (MRSA) e *Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci* (MRCoNS) estão entre as mais frequentes mundialmente, justificando um aumento significativo no uso de vancomicina. Com o objetivo de avaliar a presença de estafilococos resistentes aos glicopeptídeos em pacientes em uso terapêutico desse antimicrobiano, internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG, foi realizado um estudo longitudinal prospectivo incluindo 41 pacientes, 21 adultos e 20 crianças, entre dezembro de 2000 e março de 2002. O monitoramento microbiológico foi realizado por meio de swabs coletados a partir da cavidade bucal e reto e cultivo primário em Ágar Manitol Salgado acrescido de 6 mg/mL de oxacilina. Amostras selecionadas foram testadas quanto à sensibilidade aos glicopeptídeos pelas técnicas de gel difusão e diluição em ágar e a análise de heterorresistência, pela semeadura utilizando inóculo correspondente à escala 0,5 de McFarland (108 UFC/mL) e análise do perfil populacional. Um único paciente, nefropata em programa de hemodiálise apresentou-se colonizado com uma amostra do fenótipo *Vancomycin-Intermediate S. aureus* (VISA) (CIM = 8 µg/mL) e em doze, foram isoladas amostras de estafilococos heterorresistentes, correspondendo oito hVISA e quatro hVICoNS. O estudo do perfil populacional, confirmou a presença de subpopulações de células resistentes, sendo seis hVISA e duas hVICoNS. A presença de amostras heterorresistentes à vancomicina pode representar um risco potencial no futuro.**

**Palavras-chave:** Infecção hospitalar. Estafilococos resistentes à vancomicina. Heterorresistência.

## INTRODUÇÃO

Os estafilococos com resistência à meticilina/oxacilina situam-se entre os agentes de infecção hospitalar mais frequentes, sendo responsáveis por mais da metade das estafilococias hospitalares (CDC, 1997; Chambers, 2001), acarretando um aumento no uso de vancomicina (Hiramatsu et al., 1997; Tenover et al., 2001; Gemmell, 2004). No Brasil a situação é agravada pela pouca utilização de critérios microbiológicos de diagnóstico de infecções hospitalares (Gontijo Filho, 2002) e o consequente uso empírico desse antimicrobiano (Pannuti & Grinbaum, 1995; Couto et al., 1998; Oliveira et al., 2001).

Amostras de *S. aureus* e, principalmente, de estafilococos coagulase negativos resistentes à meticilina/oxacilina com sensibilidade diminuída aos glicopeptídeos foram relatadas em hospitais no Japão, Estados Unidos e Europa, a partir do final da década de 80 (Tenover et al., 2001). Atualmente, as seguintes siglas são utilizadas para os fenótipos de resistência encontrados nos hospitais: VISA (*Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) (CIM para Vancomicina entre 4 e 8 mg/mL e VICoNS (*Vancomycin-intermediate coagulase negative S. Staphylococci*), para as amostras de resistência intermediária; VRSA (*Vancomycin-resistant S. aureus*) para aquelas com CIMs de vancomicina <sup>3</sup> 16 mg/mL e hVISA/hVICoNS (heterorresistentes) para aquelas que apresentam subpopulações da ordem de uma em cem mil unidades formadoras de colônias com CIMs entre 4 e 8 mg/mL (Marchese et al., 2000; Tenover, 2000; Tenover et al., 2001). Recentemente, foi descrito uma amostra de VRSA isolada em cateter de um paciente diabético, submetido a hemodiálise, em que foi identificado a presença do cluster de genes vanA (CDC, 2002).

Infecções hospitalares por esses microrganismos no Brasil foram relatadas inicialmente em São Paulo (Del'Alamo et al., 1999) e no Rio de Janeiro (Nunes, 2000). Posteriormente, foi descrito um surto por VISA em um hospital em São Paulo, com o isolamento de quatro amostras em uma unidade de queimados (Oliveira et al.,

*Autor correspondente:* Geraldo Batista de Melo - Laboratório de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade Federal de Uberlândia - UFU - Bloco 4C - Piso Superior - Campus Umuarama - Uberlândia - MG, Brasil - Telefone: (34) 3218-2332 e-mail: geraldom@umuarama.ufu.br

2001). Este estudo buscou avaliar amostras de *S. aureus* e estafilococos coagulase negativos, isolados de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia em uso terapêutico de vancomicina, quanto à resistência aos glicopeptídeos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População estudada

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, que oferece assistência terciária e possui 450 leitos.

Consistiu em um estudo longitudinal prospectivo com 41 pacientes, incluindo 20 crianças, admitidas na Clínica Pediátrica, e 21 pacientes adultos cirúrgicos, em uso terapêutico de vancomicina, no período de dezembro de 2000 a março de 2002. Adicionalmente, foram incluídos 30 pacientes com diagnóstico microbiológico de sepse por *S. aureus* (16) ou estafilococos coagulase negativos (14), resistentes a metilina/oxacilina. A pesquisa de colonização foi realizada pelo monitoramento microbiológico do paciente durante o uso do antimicrobiano e a de infecção estafilocócica retrospectiva, pela consulta aos prontuários dos pacientes e visita ao laboratório de microbiologia do hospital para obtenção dos dados e das amostras. A inclusão do paciente foi realizada mediante o consentimento do pai/responsável ou acompanhante. Uma ficha clínica individual foi preenchida com os dados demográficos, diagnóstico clínico e fatores de risco intrínsecos e extrínsecos.

### Técnicas Microbiológicas

Espécimes clínicos de cavidade bucal e reto foram obtidos por meio de swabs, nas primeiras 24 horas de tratamento com vancomicina e repetidas em intervalos semanais até a alta ou óbito do paciente, considerando o uso de vancomicina por, pelo menos, dez dias. Os swabs foram transportados em tubos contendo BHI (Infuso Cérebro Coração, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) ao laboratório de microbiologia e cultivados em Ágar Manitol Salgado (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) acrescido de 6 mg/mL de oxacilina, incubado a 37° C por 48 horas. A caracterização de gênero e espécie foi realizada por testes clássicos, incluindo: características morfo-tintórias pelo método de Gram, fermentação de manitol, coagulase e catalase. Posteriormente foram testadas para a sensibilidade aos antimicrobianos pelas técnicas de difusão em Ágar (CLSI, 2006) e de diluição em Ágar (CLSI, 2006). Adicionalmente, a heterorresistência à vancomicina e à teicoplanina das amostras foi avaliada segundo proposta de Hiramatsu et al. (1997) com algumas modificações. O inóculo foi preparado pela cultura em BHI "overnight" ajustando a suspensão bacteriana à

concentração de  $>10^8$  UFC/mL, e 100 mL foram diluídos em série ( $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$ ) e semeados em placas de Ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) contendo de zero a 10 mg/mL de vancomicina ou teicoplanina. As placas foram incubadas a 37°C por 24/48 horas e o número de colônias foram contadas e plotadas em gráfico semilogarítmico.

Para a análise estatística foram realizadas comparações univariadas pelos testes Qui<sup>2</sup> e exato de Fisher ( $N < 5$ ) para as diferenças entre proporções e t Student para diferenças entre médias. Os fatores de risco potenciais para infecção/colonização foram realizados pela dicotomização, "presente versus ausente" por meio de tabelas 2x2 analisados pelo programa Epi Info, versão 6.03 (CDC & WHO, 1996).

## RESULTADOS

Amostras de estafilococos com resistência a metilina/oxacilina foram isoladas a partir de 32 (78,04%) dos 41 pacientes incluindo 21 (51,21%) e 18 (43,90%) colonizados por MRSA e MRCoNS, respectivamente, conforme mostra a Tabela 1. A justificativa da utilização de vancomicina pelo diagnóstico microbiológico foi observada em apenas 30% das crianças infectadas e no total dos pacientes, a terapêutica com esse glicopeptídeo foi correta, em apenas 20% dos mesmos, quando considerado a interpretação do resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Foram detectados oito pacientes com hVISA (19,51%) e quatro (9,75%) com hVCoNS. Em um paciente colonizado inicialmente com hVISA, quando de uma segunda coleta, o fenótipo foi VISA, com CIM de 8 mg/mL para vancomicina.

Entre os oito pacientes que se apresentaram com *S. aureus* com heterorresistência à vancomicina, seis eram adultos com idade média de 43,5 anos e duas crianças. As características desses pacientes estão apresentadas na Tabela 2, sendo que apenas em dois, com bacteremia e infecção de sítio cirúrgico, o uso de vancomicina não foi empírico e, coincidentemente evoluíram para o óbito. O tempo médio de utilização de vancomicina no momento do isolamento foi de 15,25 dias e o de internação nestes pacientes de 40,25 dias.

A Tabela 3 mostra os dados correspondentes aos quatro pacientes que forneceram isolados de hVCoNS. A utilização de vancomicina variou entre os mesmos, com um paciente cirúrgico em uso por 71 dias e uma média de 30,25 dias quando do isolamento. O tempo de internação desses pacientes foi também, mais longo com uma média de 59,50 dias, portanto muito superior ao observado naqueles cujos isolados eram de hVISA. A exemplo do verificado com o grupo de pacientes com hVISA, em apenas um dos quatro pacientes, o tratamento não foi empírico (paciente neurocirúrgico).

Tabela 1 - Relação entre colonização por estafilococos resistentes, diagnóstico etiológico de infecção e adequação da terapêutica com vancomicina.

Pacientes	Colonização		Diagnóstico etiológico		Tratamento adequado		
	N	N	%	N	%	N	%
Adultos	21	17	80,95	12	57,14	05	23,80
Crianças	20	15	75,00	06	30,00	03	15,00
Total	41	32	78,04	18	43,90	08	19,51

Tabela 2 - Características clínicas de pacientes com *S. aureus* com resistência à vancomicina

Paciente Amostra Sítio	Unidade de internação	Idade (a)*** Sexo (M/F)	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico etiológico	Uso de vancomicina antes do isolamento de VISA (d)	Tempo de hospitalização (d)	Evolução
5/09-B*	Cl. Pediátrica	8/F	Leucemia, neutropenia febril	----	28	60	Alta
13/16-A	CC Neurológica	30/M	Hemorragia subaracnóide, celulite, sepse	CoNS	11	33	Óbito
16/17-A	CC Traumatológica	48/M	Abdome agudo, pneumonia	----	18	37	Alta
24/28-B	CC Neurológica	40/F	Pneumonia	----	13	24	Alta
33/42-B	CC Traumatológica	79/M	Infecção sítio cirúrgico	MRSA	06	39	Óbito
42/45-B	CC Urológica	46/F	Pielonefrite	----	17	19	Alta
46/46-A	CC Traumatológica	18/M	Pneumonia	----	16	51	Alta
56/34-B	Cl. Pediátrica	2/F	Sepse	----	13	59	Alta

\* B – bucal, A – anal, \*\* d – dias, \*\*\* a – anos, CoNS – estafilococos coagulase negativos, MRSA – *S. aureus* Resistente a Meticilina.

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com estafilococos coagulase negativos com resistência a vancomicina

Paciente Amostra Sítio*	Unidade de internação	Idade (a)*** Sexo (M/F)	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico etiológico	Uso de vancomicina antes do isolamento de VCoNS (d)	Tempo de hospitalização (d)	Evolução/ Destino
4/07-A	CC Neurológica	17/M	Abscesso peritoneal	CoNS, <i>C. tropicalis</i>	19	90	Alta
20/23-B	CC Traumatológica	63/M	Osteomielite	<i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i>	71	94	Alta
23/26-B	Cl. Pediátrica	1/F	Leucemia, neutropenia febril	----	12	18	Óbito
25/29-B	Cl. Pediátrica	0,3/F	Meningite	----	19	36	Alta

\* A – anal, B – bucal, \*\* a – anos, d – dias, \*\*\* M – masculino, F - feminino

Na avaliação dos preditores para colonização por VISA, nenhum dos fatores intrínsecos foi significativo (Tabela 4), ao contrário do observado nos fatores extrínsecos quando do uso de três ou mais antimicrobianos, cirurgia e três ou mais procedimentos invasivos ( $P < 0,05$ ).

A relação de variáveis epidemiológicas clássicas como tempo e espaço com os tipos de microrganismos definidos pelo espectro de resistência aos antimicrobianos está na Tabela 5. Pode-se verificar uma ligação entre esses itens em quatro isolados de *S. aureus* ao contrário do observado com os de estafilococos coagulase negativos, onde os espectros de resistência foram distintos. Não foi observada relação com as unidades de internação, excetuando-se nesse último item as duas crianças internadas no setor de isolamento da Clínica Pediátrica. Contrariamente ao que é referido na literatura, a boca (58,33%) superou o intestino (41,66%)

como sítio de colonização por estafilococos resistentes à vancomicina.

A avaliação de amostras de MRSA (17) e de MRCoNS (20) com sensibilidade reduzida à vancomicina foi realizada pelas técnicas de CIM e detecção de heterorresistência, como mostrado na Tabela 6. Em relação aos isolados de *S. aureus*, apenas uma amostra apresentou uma CIM de 8 mg/mL, com comportamento de VISA. A CIM90 para as amostras deste microrganismo foi de 4 mg/mL, mas oito apresentaram heterorresistência, crescendo numa concentração de vancomicina acima de 5 mg/mL, a exemplo de quatro amostras de MRCoNS.

As Figuras 1a e 1b ilustram a análise populacional de amostras de *S. aureus* quanto à subpopulações de células resistentes à vancomicina e teicoplanina, respectivamente, com quatro dos oito isolados contendo subpopulações

Tabela 4 - Colonização por MRSA e MRCoNS heterorresistentes a vancomicina em pacientes em uso terapêutico de vancomicina no HC-UFU.

Variáveis	Pacientes colonizados				P
	Sim (N=32)			Não (N=9)	
	hVISA (8)	hVCoNS (4)	VSSA/VSCoNS (20)		
Adultos	6	2	9	4	0,20
Crianças	2	2	11	5	0,20
Sexo (M/F)	4/4	2/2	9/11	4/5	-
Idade (variação)	33,4(2-79)	20,3(0,3-63)	25,6(0,5-79)	15,7(0,4-40)	-
Unidade de Internação					
Pediatria					
Onco-hematologia	1	1	3	3	0,77
Geral	1	1	6	2	0,46
Cirúrgica					
Neurológica	2	1	5	2	0,95
Traumatológica	3	1	3	2	0,26
Urológica	1	0	3	0	0,84
Fatores de risco intrínsecos					
Tempo de internação	36,0(15-59)	40,7(18-60)	36,9(19-60)	23,5(11-38)	-
Reinternação	3	1	8	1	0,88
Imunocomprometimento	4	1	4	2	0,17
Fatores de risco extrínsecos					
≥3 antimicrobianos	4	3	6	1	0,03
Cefalosporina de 3ª geração	3	4	2	7	0,10
Cirurgia	7	3	10	4	0,04
Procedimentos invasivos					
Cateter vascular central	4	1	7	4	0,82
Cateter vascular periférico	8	4	19	5	0,12
Respirador	5	0	5	0	0,10
Dreno	4	2	3	5	0,17
≥3 procedimentos	7	4	13	4	0,01

Tabela 5 - Isolados de *S. aureus* e estafilococos coagulase negativos resistentes a vancomicina, quanto a: data de isolamento, localização do paciente, sítio de isolamento e espectro de resistência aos antimicrobianos

Amostra	Localização: Clínica/Leito	Data do isolamento (d/m/a)**	Sítio anatômico	Espectro de resistência***
<b>MRSA</b>				
09-A	Pediatrica/Oncologica/212	27/03/01	Intestino	Amp, Em, Gm, Ox, Sxt, Tet
16-A	CC-I/Neurologica/123	23/04/01	Intestino	Amp, Cd, Em, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
17-A	CC-I/Traumatologica/150	16/04/01	Intestino	Amp, Cd, Em, Gm, Ox, Nor, Tet
28-O	CC-I/Neurologica/113	28/05/01	Boca	Amp, Cd, Em, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
42-O	CC-I/Traumatologica/102	13/11/01	Boca	Amp, Cd, Em, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
45-O	CC-I/Urologica/127	28/01/02	Boca	Amp, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
46-A	CC-I/Traumatologica/123	17/11/01	Intestino	Amp, Cd, Em, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
34-O	Pediatrica/204	26/11/01	Boca	Amp, Cd, Em, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
<b>MRCoNS</b>				
07-A	CC-I/Neurologica/116	10/04/01	Intestino	Amp, Cd, Em, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
23-O	CC-I/Traumatologica/104	02/05/01	Boca	Amp, Cd, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
26-O	Pediatrica/Isolado/213	28/05/01	Boca	Amp, Gm, Ox, Nor, Sxt, Tet
29-O	Pediatrica/Isolado/232	11/06/01	Boca	Amp, Cd, Em, Gm, Ox, Nor, Sxt

\*CC-I – Clínica Cirúrgica I  
 \*\*d – dia, m – mês, a – ano  
 \*\*\*Amp – Ampicilina, Cd – Clindamicina, Em – Eritromicina, Gm – Gentamicina, Ox – Oxacilina, Nor – Norfloxacina, Sxt – Sulfametoxazol-Trimetoprima, Tet – Tetraciclina. (Técnica de gel difusão)

Tabela 6 - CIMs de vancomicina de amostras de MRSA e MRCoNS de pacientes colonizados no HC-UFU, no período de dezembro de 2000 a março de 2002.

Vancomicina ( mg/mL)	MRSA		MRCoNS	
CIM:	N	%	N	%
0,25	-	-	-	-
0,50	1	5,88	50	25,00
1,00	5	29,41	60	30,00
2,00	5	29,41	50	25,00
4,00	5	29,41	40	20,00
8,00	1	5,88	-	-
Heterorresistência *				
0,50	1	5,88	-	-
1,00	3	17,64	20	10,00
2,00	3	17,64	60	30,00
3,00	-	-	10	5,00
4,00	2	11,76	70	35,00
5,00	-	-	10	5,00
6,00	2	11,76	20	10,00
7,00	-	-	-	-
8,00	5	29,41	1	5,00
9,00	1	5,88	-	-
Total	17	100,00	20	100,00

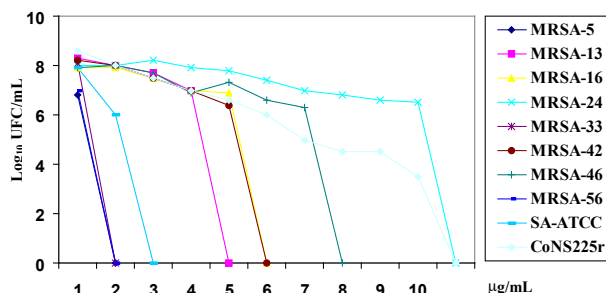


Figura 1a. Análise do perfil populacional das amostras de MRSA que apresentaram heterorresistência à vancomicina.

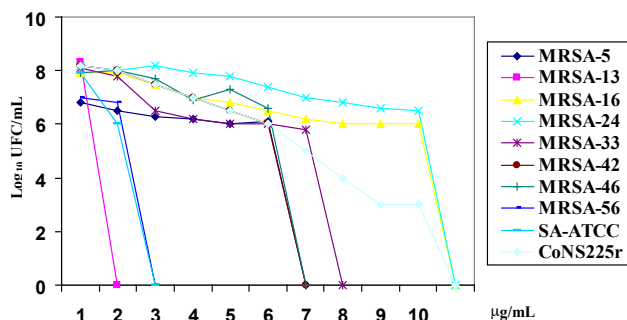


Figura 1b. Análise do perfil populacional das amostras de MRSA que apresentaram heterorresistência a teicoplanina.

resistentes à vancomicina e seis, a teicoplanina, semelhante ao observado com a amostra controle de *S. haemolyticus* resistente a estes glicopeptídeos.

A análise populacional de quatro amostras de estafilococos coagulase negativos, evidenciou comportamento semelhante, com dois isolados contendo subpopulações resistentes à vancomicina e todos com células crescendo em concentrações > mg/mL de teicoplanina, como mostram as Figuras 2a e 2b, respectivamente.

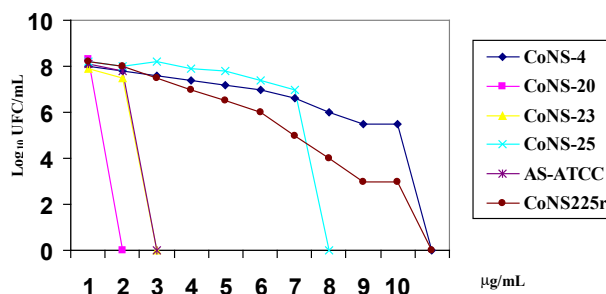


Figura 2a. Análise do perfil populacional dos estafilococos coagulase negativos com heterorresistência a vancomicina.

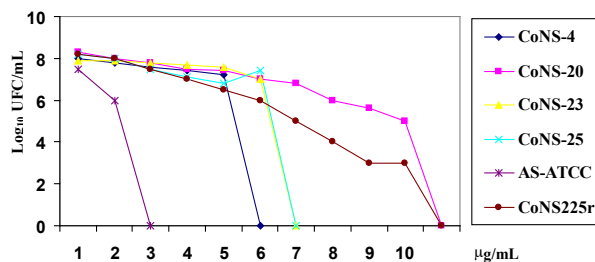


Figura 2b. Análise do perfil populacional das amostras de estafilococos coagulase negativos com heterorresistência a teicoplanina.

## DISCUSSÃO

A exemplo de publicações no Japão (Hiramatsu et al., 1997; Hiramatsu, 2001), Estados Unidos (CDC, 1997; Tenover et al., 2001), Europa (Marchese et al., 2000) e Brasil (Pannuti & Grinbaum, 1995; Wey, 1995; Del'Alamo et al., 1999; Nunes, 2000) foi detectado em cerca de 30% dos nossos pacientes em uso prolongado de vancomicina colonizados por amostras de *S. aureus* e estafilococos coagulase negativo, com resistência a esse antimicrobiano, pertencentes aos fenótipos MRSA e MRCoNS, respectivamente. Como reflexo da gravidade desses pacientes, inferida por variáveis como: tempo de internação médio (34,27 dias), pacientes cirúrgicos (58,53%), infectados (100%), em uso de antimicrobianos de largo espectro de geração recente (53,65%) e três ou mais procedimentos invasivos (68,29%) a frequência de colonização por MRSA e/ou MRCoNS foi de 78,04%. As infecções por MRSA são endêmicas, representando aproximadamente 50% das estafilococcias hospitalares no HC-UFU (Sadoyama & Gontijo Filho, 2000). Esse fato, somado à tradição no uso empírico de antimicrobianos em hospitais de países em desenvolvimento (Wey, 1995; Goldmann & Huskins, 1997; Couto et al., 1998; Gontijo Filho, 2002) tornaram maior o risco de emergência de enterococos e estafilococos resistentes aos glicopeptídeos.

Neste estudo com pacientes em uso terapêutico de vancomicina, em apenas 44% deles havia critérios microbiológicos na definição de infecção e em somente oito (19,51%) a utilização deste antimicrobiano era justificada. Em síntese, esses dados refletem a dificuldade do controle de bactérias resistentes aos antimicrobianos nos hospitais, já que alguns clínicos e cirurgiões não se preocupam em obter espécimes clínicos de pacientes infectados, mesmo considerando a existência de um bom Laboratório de Microbiologia na Instituição. Outros ignoram os dados laboratoriais de sensibilidade quando da decisão quanto à terapia a ser adotada, a disponibilidade na farmácia do hospital de antimicrobianos de amplo espectro, bem como, de que a vancomicina deve ser de uso restrito, a falta de restrições quanto ao uso de medicamentos e, finalmente, o problema da existência de uma microbiota hospitalar resistente.

Ao contrário do observado em relação aos microrganismos de resistência epidemiologicamente importantes, sobre os fatores de risco associados ao desenvolvimento de *S. aureus* e estafilococos coagulase negativos com sensibilidade reduzida à vancomicina, há poucos relatos em função do pequeno número de casos descritos (Hiramatsu et al., 1997; Srinivasan et al., 2002). A exposição à vancomicina coloca-se como o risco mais evidente em todos os pacientes dos quais estes microrganismos foram isolados (Gould, 2008). Entre os fatores de risco intrínsecos valorizados inclui-se a insuficiência renal e infecção prévia por MRSA e/ou

MRCoNS (Tenover et al., 2001; Srinivasan et al., 2002). Na nossa casuística, o único paciente com VISA, era nefropata em programa de hemodiálise e oito (19,51%) infectados por MRSA, mas a maioria (80%) estava colonizada por estafilococos resistentes a meticilina/oxacilina. Os isolados de VISA, hVISA e hVCoNS são, também, usualmente resistentes a outros antimicrobianos, tais como: cefalosporinas, fluorquinolonas e macrolídeos (Srinivasan et al., 2002). Isto ficou evidente no presente estudo, com as amostras caracterizadas como resistentes aos glicopeptídeos, mostrando-se multirresistentes, evidenciando eritromicina e norfloxacinina entre as amostras de MRSA. Os pacientes colonizados diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) dos controles quanto ao uso de  $\geq 3$  antimicrobianos, bem como  $\geq 3$  procedimentos invasivos e uso de cefalosporinas de terceira geração ( $P < 0,05$ ).

As amostras de *S. aureus* com sensibilidade diminuída à vancomicina não são detectadas pela técnica de gel difusão (CDC, 1997), sendo necessário os testes de triagem em Ágar BHI com 6 mg/mL de vancomicina, CIM ou Etest (CDC, 1997; Tenover, 2000; Tenover et al., 2001). Nesta investigação o Etest não foi utilizado.

A detecção de amostras de hVISA e hVCoNS é feita pelo uso de inóculo correspondente à escala 0,5 de McFarland (de  $10^8$  UFC/mL), em placas contendo 4 mg/mL de vancomicina (Hiramatsu et al., 1997). Os fenótipos com resistência à vancomicina apresentam uma tendência à reversão, retornando a níveis de sensibilidade (2 mg/mL) após subcultivos seriados (Hiramatsu, 2001). Isto não foi observado entre as 12 amostras obtidas, considerando, no entanto, que as mesmas foram conservadas em meio contendo 1 mg/mL de vancomicina. É importante assinalar que amostras com essa sensibilidade ainda expressam uma resistência heterogênea à vancomicina e podem reverter a VRSA, VISA, VCoNS, quando expostas a esse antimicrobiano (Hiramatsu, 2001; Ricardo, 2008).

A sensibilidade reduzida à vancomicina de possíveis amostras heterorresistentes deve ser confirmada pela análise populacional completa (Hiramatsu et al., 1997) porque quando da existência de poucas células resistentes na população, há risco das mesmas escaparem da detecção, quando se utiliza testes simplificados. No presente estudo quando da avaliação das 12 amostras heterorresistentes, a resistência aos dois glicopeptídeos foi ratificada com níveis  $>5$  mg/mL acima, duas amostras de hVCoNS e duas de hVISA não confirmavam a resistência, possivelmente pela estocagem de oito meses e subcultivos na ausência de vancomicina.

O pequeno número de casos descritos na literatura dificulta a compreensão do significado clínico da heterorresistência (Srinivasan et al., 2002; Tiwari & Sen, 2006). Há referência de um único surto por VRSA em um hospital em São Paulo compreendendo quatro amostras, que pertenciam ao mesmo clone caracterizado por eletroforese em campo pulsado. Os pacientes eram

da unidade de queimados, mantidos na mesma enfermaria e um em paciente ortopédico, que recebiam tratamento com vancomicina por mais de uma semana. É importante assinalar que todas estas amostras pertenciam ao chamado clone endêmico brasileiro (Teixeira et al., 1995; Sader et al., 1994), ou seja, não pode ser excluída a possibilidade de cada uma ter sido gerada independentemente após exposição a vancomicina (Oliveira et al., 2001). A metade (quatro) das amostras de *S. aureus* isoladas nesse estudo, com resistência à vancomicina apresentaram-se semelhantes quando comparadas pelo espectro de resistência aos antimicrobianos, sendo que, adicionalmente, grupos de duas mostraram relação temporal e espacial (clínica cirúrgica da traumatologia).

A emergência de um caso de VRSA clinicamente significativa como documentando pode ser indicativo de uma prevalência mais alta e insidiosa de hVRSA, bem como de hVRCoNS no Hospital de Clínicas de Uberlândia. Essa relação é sugestiva da transmissão entre os pacientes adultos internados na clínica cirúrgica da traumatologia. Foi também confirmada pela análise molecular, utilizando-se RAPD-PCR, com os genótipos B, D e C, F apresentando alto grau de similaridade.

Do ponto de vista biológico o status de heterorresistência parece ser uma condição ecológica por parte dos estafilococos para sobreviverem na presença da droga. Embora a vancomicina suprima 99,99% das populações destas amostras, o restante sobrevive e cresce em 4 a 9 mg/mL que é o limite superior (4 mg/mL) da concentração do antimicrobiano atingido na maioria dos tecidos infectados (Hiramatsu, 2001).

A evidência de dois clusters associados a hVISA, num hospital geral universitário, é motivo de preocupação, considerando, particularmente, a precariedade nas práticas de controle de infecção e de uso de antimicrobianos em hospitais brasileiros (Pannuti & Grinbaum, 1995) o que representa um risco potencial para a emergência de microrganismos multirresistentes, como estafilococos e enterococos resistentes à vancomicina (Guzmán-Blanco et al., 2000).

Este estudo relata o primeiro caso de colonização por VISA em Uberlândia, bem como da ocorrência de dois clusters por amostras de hVISA, relacionados por critérios epidemiológicos clássicos e moleculares. Em função das limitadas opções terapêuticas na nossa população de pacientes, o uso prudente de vancomicina e a aderência às medidas de controle de infecção são extremamente necessárias para prevenir a emergência de microrganismos resistentes aos glicopeptídeos e sua disseminação intra hospitalar. Neste estudo, VRSA clinicamente significativa pode ser indicativo de uma prevalência mais alta e insidiosa de hVRSA, bem como de hVRCoNS no Hospital de Clínicas de Uberlândia. Essa relação é sugestiva da transmissão entre os pacientes adultos, internados na clínica cirúrgica da Traumatologia.

## ABSTRACT

*Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci in a Brazilian University Hospital*

***Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Methicillin-resistant Coagulase-negative Staphylococci (MRCoNS) are among the most frequent hospital infections around the world, and are associated with a significant rise in the use of vancomycin. In order to assess the presence of staphylococci resistant to glycopeptides in patients taking this antibiotic in Uberlândia Federal University Hospital, Uberlândia (MG, Brazil), a prospective longitudinal study of 41 patients (21 adults and 20 children) was performed between December 2000 and March 2002. Microbiological monitoring was carried out by means of swabs collected from the oral cavity and rectum, screened by culturing in Salt Mannitol Agar plus 6 µg/mL oxacillin. Selected samples were tested for susceptibility to glycopeptides, by the techniques of gel diffusion and dilution in agar, and for heteroresistance, by seeding with an inoculum at a density of 0.5 on the McFarland scale (10<sup>8</sup> CFU/mL) and performing a population analysis profile (PAP). A single nephropathy patient was colonized with a strain of vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) phenotype (MIC = 8 µg/mL). In twelve patients, heteroresistant staphylococci were isolated, corresponding to eight hVISA and four hVCoNS. The PAP study confirmed the presence of six hVISA and two hVCoNS. The presence of heteroresistant vancomycin samples may pose a potential risk in the future.***

*Keywords:* Hospital infection. *Vancomycin resistant staphylococci.* Heteroresistance.

## REFERÊNCIAS

- Center for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to Vancomycin – United States. MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report. Atlanta. 2002; 51:565-7.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). *S. aureus* with reduce susceptibility to vancomycin – United States. MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report. Atlanta. 1997; 46:765-6.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC) & World Health Organization (WHO). Epi info 6: a word processing, database and statistics program for public health. Vs. 6. 03. Atlanta and Geneve, Switzerland, 1996.

- Chambers HF. The changing epidemiology of *S. aureus*. Emer Infect Dis. 2001; 7(2):178-82.
- CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S16. WAYNE, PA: CLSI, 2006.
- Couto HG, Leles CCV, Lima HV, Assunção UF, Ribas RM, Diogo Filho A, Gontijo Filho PP. Vancomycin use in a Brazilian University Hospital. Comparacion with Hospital Infection Control Practices Advisory Committees Guidelines. In: 6º Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar; 1998. Campos do Jordão:SP. 1998.
- Del'Alamo L, Cereda RF, Tosin I, Miranda EA, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;34(3):185-91.
- Gemmell C. Glycopeptide resistance in *S. aureus*: is it a real threat? J Infect Chemother.2004; 10:69-75.
- Goldmann DA, Huskins WC. Control of Nosocomial Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Strategic Priority for Hospitals Worldwide. Clin Infect Dis. 1997; 24(Suppl 1):39-45.
- Gontijo Filho PP. Definições de infecções hospitalares sem a utilização de critérios microbiológicos e sua consequência na vigilância epidemiológica no Brasil. News Lab. 2002; 53:120-4.
- Gould IM. Clinical relevance of increasing glycopeptide MICs against *S. aureus*. Int J Antimicrob Agents 2008; 31:1-9.
- Guzmán-Blanco M, Casellas JM, Sader HS. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. Infect Dis Clin North Am. 2000; 14(1):67-81.
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *S. aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350(9092):1670-3.
- Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *S. aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis. 2001; 1:147-55.
- Marchese A, Balistreri G, Torroli E, Schito GC. Heterogeneous Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant *S. aureus* Strains Isolated in a Large Italian Hospital. J Clin Microbiol. 2000; 38(2):866-9.
- Nunes APF. *S. aureus* coagulase-negativos: Diferenciação em espécies, diversidade genômica de espécies resistentes à oxacilina e determinação da sensibilidade à glicopeptídeos. [Dissertação] Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.
- Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS, Cui L, Hiramatsu K, Mamizuka EM. Isolation in Brazil of Nosocomial *S. aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. Infect Control Hosp Epidemiol. 2001; 22(7):443-8.
- Pannuti CS, Grinbaum RS. An Overview of Nosocomial Infection Control in Brazil. Infect Control Hosp Epidemiol. 1995; 16(3):170-4.
- Ricardo SB. Elevação de MIC para Vancomicina no *S. aureus*. Prát Hosp. 2008; 60:43-5.
- Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Jones RN. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *S. aureus* in São Paulo, Brasil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. Infect Control Hosp Epidemiol. 1994; 15(5):320-3.
- Sadoyama G, Gontijo Filho PP. Risk Factors for Methicillin Resistant and Sensitive *S. aureus* Infection in a Brazilian University Hospital. Braz J Infect Dis. 2000; 4(2):135-43.
- Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin Resistance in Staphylococci. Clin Microbiol Rev. 2002; 15:430-8.
- Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Figueredo MAS, Tomasz A. Geographic spread of epidemic multiresistant *S. aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol. 1995; 33(9): 2400-4.
- Tenover FC. VRSA, VISA, and GISA: The Dilemma Behind the name game. Clin Microbiol Newsl. 2000; 22(1):49-53.
- Tenover FC, Biddle J W, Lancaster MV. Increasing Resistance to Vancomycin and Other Glycopeptides in *S. aureus*. Emerg Infect Dis. 2001; 7(2):327-32.
- Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. BMC Infect Dis. 2006; 6:156-62.
- Wey SB. Infection control in a country with Annual inflation of 3,600%. Infect Control Hosp Epidemiol. 1995; 16(3):175-8.

