

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE –  
UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Cezar Vinícius Würdig Riche

**Relação entre o consumo de  
vancomicina e a concentração inibitória  
mínima de isolados de *Staphylococcus  
aureus* resistentes a meticilina de um  
hospital de Porto Alegre**

**UFCSPA**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Porto Alegre  
2017

**Cezar Vinícius Würdig Riche**

**Relação entre o consumo de  
vancomicina e a concentração inibitória  
mínima de isolados de *Staphylococcus  
aureus* resistentes a metilina de um  
hospital de Porto Alegre**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

**Porto Alegre  
2017**

#### Catálogo na Publicação

Riche, Cezar Vinícius Würdig

Relação entre o consumo de vancomicina e a concentração inibitória mínima de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de um hospital de Porto Alegre / Cezar Vinícius Würdig Riche. -- 2017.

89 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Cícero Armídio Gomes Dias.

1. MRSA. 2. Vancomicina. 3. resistência antimicrobiana. 4. MIC creep. 5. PFGE. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Cícero Dias, que me aceitou para o mestrado, por toda orientação e discussões – agradeço pelo conhecimento e pelo convívio.

Aos amigos e eternos preceptores Diego Falci e Renato Cassol, os quais me orientaram durante a Residência e também me auxiliaram nas diversas fazes deste projeto.

As amigas e colegas de mestrado (Mariana, Adriana, Kauana e Bernard). Em especial a amiga Gabriela, que me acolheu e guiou, mesmo à distância e incondicionalmente de horários. Também as amigas Janira e Neidimar – pelos ouvidos nas horas de angústia.

A Rebeca, minha parceira nas longas jornadas à noite e nos finais de semana. Convivemos muito, trabalhamos e resolvemos problemas. Passado tudo, rimos ao final – tua contribuição foi única nas diversas fases deste trabalho.

Aos demais professores da Microbiologia, técnicas dos laboratório e estagiários, com todos vocês aprendi.

A equipe do laboratório do HNSC por todos os isolados e dados que foram fundamentais para a execução deste projeto, especialmente a Dra. Maria do Carmo e ao Dr. Jorge Ferreira.

As minhas colegas e amigas Alexandra e Paula, pelo grande trabalho que desenvolvemos juntos neste período, e aos colegas e amigos de FAB, que me ajudaram logo de início.

Ao amigo Gustavo, que dedicou muito de seu tempo para me auxiliar, com tua ajuda fizemos um grande trabalho.

Aos guris (Cássio, Diego, Francis, Klaus e Felipe), pelo estímulo desde o início e por me ajudar a relaxar quando necessário.

Meu especial agradecimento à minha família, vocês tem a minha eterna gratidão! Não só por este mestrado, mas pelo apoio em toda a jornada até aqui.

Muito obrigado!

## Resumo

O *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) é um importante patógeno humano e a bacteremia causada por este agente é uma condição comum que apresenta elevada mortalidade. A vancomicina tem sido a droga de escolha para tratamento dessas infecções nos últimos 50 anos. Apesar disso a resistência a este antimicrobiano não é comum. O aparecimento de isolados com elevada concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina (CIM  $\geq$  1,5 mg/L) tem sido relatado em diferentes centros médico no mundo, este é um fato preocupante pois pode colocar em falha o tratamento destas infecções – este fenômeno tem sido chamado de “*vancomycin MIC creep*”. O objetivo deste trabalho é determinar a existência de “*MIC creep*” para vancomicina, bem como sua correlação com o consumo de vancomicina, em isolados de hemoculturas de pacientes internados no Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, RS. O período do estudo foi de junho de 2012 a fevereiro de 2016. Foram mensurados o consumo de vancomicina, em dose diária definida (DDD), a ocupação hospitalar por 100 pacientes-dia e a CIM de vancomicina dos isolados. Foram realizadas comparação das proporções, análise de variância (ANOVA) e de correlação (coeficiente de Pearson). A caracterização dos isolados de MRSA foi através da identificação do gene *mecA*, testes de susceptibilidade a antimicrobianos, determinação da presença do gene *lukS-lukF* e tipagem do elemento *SCCmec*. A verificação de clonalidade foi feita por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Os resultados evidenciaram aumento estatisticamente significativo da moda, de 1,0 a 2,0 mg/L ( $p=0,003$ ) e da média geométrica, variando de 0,791 até 1,966 mg/L ( $p=0,0003$ ), da CIM para vancomicina nos isolados. Também foi evidenciado o aumento da proporção de isolados de MRSA com CIM para vancomicina  $>$  1,0 mg/L, de 6,5% para 100% ( $p=0,001$ ). Estes dados sugerem a existência do fenômeno de “*MIC creep*” para vancomicina nos isolados de MRSA, não havendo correlação com o consumo de vancomicina ( $r=0,524$ ;  $p=0,128$ ). Esse fato sugere que esta condição não foi influenciada pela emergência de resistência pelo consumo do antimicrobiano. Perfis de resistência a mais de um antimicrobiano foram observados em dos 51,8% dos isolados. Não foi observada resistência para linezolida, ceftarolina e vancomicina – apesar de muitos isolados apresentarem CIM  $\geq$  1,5 mg/L para vancomicina. Através da caracterização dos isolados foi

possível identificar o SCCmec tipo IV como o mais frequente (77,7%), estando presentes os subtipos IVa e IVc. Também evidenciada elevada presença do gene *lukS-lukF* entre isolados (62,9%). O estudo por PFGE pode evidenciar a presença de cinco complexos clonais entre os isolados bacterianos. Também pode-se avaliar a ausência do *Brazilian endemic clone* (BEC), uma linhagem antes circulante, mas não mais evidenciada. Estes achados não podem confirmar a existência de disseminação clonal de MRSA no HNSC e uma possível associação com o “*MIC creep*” para vancomicina, no entanto sugerem a existência de novas linhagens de MRSA que as previamente descritas em Porto Alegre.

**PALAVRAS-CHAVE:** MRSA, vancomicina, resistência antimicrobiana, MIC creep e PFGE.

## Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major human pathogen. Bloodstream infections are a common condition among MRSA clinical syndromes and usually presents with high mortality. Vancomycin has been the cornerstone of therapy in MRSA infections. Besides being used for more than 50 years, resistance is uncommon. Worldwide reports have documented an increase in minimum inhibitory concentration (MIC) for vancomycin – this phenomenon has been referred as vancomycin “MIC creep”. It is a concerning situation because elevations in vancomycin MIC values may be associated with increased treatment failure. The study aimed to assess the existence of vancomycin MIC creep among blood cultures isolates from patients admitted at Hospital Nossa Senhora da Conceição, and to determine whether a correlation exists between vancomycin consumption. The analyzed period was from June 2012 to February 2016. Vancomycin consumption was expressed in defined daily doses (DDD) per 100 patient-days and vancomycin MIC from isolates were evaluated. Comparison of proportions, analysis of variance (ANOVA) and Person correlation coefficient analysis were performed. MRSA isolates characterization was performed through antimicrobial susceptibility tests, genes *mecA* and *lukS-lukF* detection and *SCCmec* typing. The analysis of chromosomal DNA similarity of the isolates was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The results evidenced increases in vancomycin geometrical mean from 0.791 to 1.966 mg/L ( $p=0.0003$ ) and modal MIC from 1.0 to 2.0 mg/L ( $p=0.003$ ). Proportion of isolates with vancomycin MIC above 1 mg/L increased as well, from 6.5% to 100% ( $p=0.001$ ). This study suggests the presence of vancomycin “MIC creep” phenomenon among this isolates, and absence of correlation with vancomycin consumption ( $r=0.524$ ;  $p=0.128$ ). These finding suggests that this condition was not influenced by emergency of resistance by antimicrobial consumption. Resistance profiles to more than one antimicrobial were observed among 51.8% of the isolates. No resistance was detected to linezolid, ceftaroline and vancomycin – although many isolates presented with vancomycin MIC  $\geq 1.5$  mg/L. Through the molecular characterization was possible to identify *SCCmec* type IV as the most frequent (77.7%), with subtypes IVa and IVc being detected. There was also a high frequency of gene *lukS-lukF* (62.9%). The PFGE evidenced the presence of five

clonal clusters among the isolates. It was also possible to evaluate the absence of the Brazilian endemic clone (BEC), a previously circulating strain but no longer evidenced. These findings can not confirm the existence of clonal dissemination of MRSA in HNSC and a possible correlation with the vancomycin “MIC creep”. However they suggest the existence of new MRSA strains, other than the previously described in Porto Alegre.

**Keywords:** MRSA, vancomycin, antimicrobial resistance, MIC creep and PFGE.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Mecanismo de resistência do <i>S. aureus</i> a meticilina.....	15
FIGURA 2 – Tipos de SCC <i>mec</i> mundialmente predominantes.....	17
FIGURA 3 – Epidemiologia e cenários de circulação do MRSA.....	19
FIGURA 4 – Mecanismo de resistência do <i>S. aureus</i> a vancomicina - VISA.....	21
FIGURA 5 – Mecanismo de resistência do <i>S. aureus</i> a vancomicina - VRSA.....	22
FIGURA 6 – Esquema da estrutura genética dos elementos SCC <i>mec</i> .....	25
FIGURA 7 – Evolution of MIC geometrical mean and modal MIC trough time, considering both methodologies.....	48
FIGURA 8 – Molecular characterization and cluster analysis of MRSA isolates.....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SCC <i>mec</i> typing and antimicrobial resistance according to PFGE patterns.....	62
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of variance
BEC	Brazilian endemic clone
BMD	Broth microdilution
DDD	Dose diária definida
DDD	Defined daily doses
CA-MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina adquirido na comunidade
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
HIV	Human immunodeficiency virus
HNSC	Hospital Nossa Senhora da Conceição
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
MDC	Microdiluição em caldo
MIC	Minimum inhibitory concentration
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PLV	Leucocidina de Pantón-Valentine
SCC <sub>mec</sub>	Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
UPGMA	Unweighted pair-group method using arithmetic averages
VISA	<i>S. aureus</i> com susceptibilidade intermediária a vancomicina
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
VRSA	<i>S. aureus</i> resistente a vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
1.2 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos.....	13
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	14
1.4 Epidemiologia do MRSA.....	16
1.5 Vancomicina.....	20
1.6 Determinação da suscetibilidade a vancomicina.....	23
1.7 Cassete cromossômico estafilocócico (SCC <i>mec</i> ) .....	24
1.8 Tipagem Molecular do MRSA.....	26
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>29</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>43</b>
<b>4. OBJETIVO</b> .....	<b>44</b>
4.1 Objetivo Geral.....	44
4.2 Objetivos Específicos.....	44
<b>5. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	<b>45</b>
5.1 Manuscrito I.....	45
5.2 Manuscrito II.....	50
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>64</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>66</b>
7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA.....	66
7.2 Produção Científica Complementar.....	73
7.3 Normas para publicação - The Brazilian Journal of Infectious Diseases.....	79

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica (coco) Gram positiva, que se apresenta em aglomerados microscópicos, podendo também se apresentar como células únicas ou aos pares. O *S. aureus* pertence à Família *Staphylococcaceae* e ao Gênero *Staphylococcus*, este gênero apresenta 49 espécies e o *S. aureus* é considerado o patógeno mais importante e também o mais virulento (Sakai, 2004; Becker and von Eiff, 2011).

O *S. aureus* tem em suas características a produção da enzima catalase e a maioria de seus isolados produz a enzima coagulase (o teste da coagulase já foi utilizado para diferenciar de outros integrantes do gênero *Staphylococcus*), é anaeróbio facultativo, não produz esporos e é imóvel. O *S. aureus* cresce em meios de cultura não seletivos e as suas colônias são lisas, arredondadas e brilhantes, costumam apresentar pigmentação amarela, mas podendo também ser brancas ou acinzentadas. Quando cultivados em ágar sangue produzem uma zona difusa de hemólise ( $\beta$ -hemólise) ao redor das suas colônias (Chambers, 1997).

É um conhecido patógeno humano e nestes tem o seu reservatório natural. A colonização assintomática por este agente é muito comum, sendo a nasofaringe, o períneo e a pele (principalmente com presença de lesões ou solução de continuidade) são as regiões mais comumente colonizadas (Otto, 2010).

A colonização por *S. aureus* pode ser transitória ou persistente, sendo que, aproximadamente 20% da população mundial apresenta colonização persistente. As crianças são mais comumente colonizadas e este processo pode ocorrer logo após o nascimento. A transmissão ocorre principalmente pelo contato com indivíduos e a colonização é um dos principais fatores de risco para infecção pelo *S. aureus* (Chambers, 2001).

Existem algumas populações específicas que são mais propensas a colonização ou infecção pelo *S. aureus*. Estão descritas como populações de risco os pacientes imunossupressos (como os diabéticos insulino-dependentes e portadores do vírus HIV) usuários de drogas injetáveis e pacientes com condições

dermatológicas crônicas. Profissionais da saúde também apresentam maior risco para colonização pelo *S. aureus* (Chambers and Deleo, 2009; Popovich, 2013).

Apesar de usualmente atuar como uma bactéria comensal e colonizadora assintomática, o *S. aureus* está associado a uma gama de síndromes clínicas-infecciosas. Pode causar desde infecções não complicadas de pele e partes moles, como impetigo e foliculite, mas também síndromes graves como: celulite, abscessos, osteomielite, pneumonia, endocardite infecciosa, bacteremia e sepse (Naimi, 2003; Gomez, 2007). Está muito associado a infecções relacionadas a dispositivos invasivos, como cateteres vasculares ou próteses ortopédicas (Gomez, 2007).

## 1.2 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos

O *S. aureus* foi suscetível a penicilina logo que este antibiótico foi lançado, contudo, a descrição do primeiro isolado resistente a penicilina já ocorreu pouco tempo após a início do uso deste antimicrobiano, ainda na década de 1940. A disseminação destas cepas ocorreu primeiramente em hospitais, mas seguiu na comunidade estando amplamente prevalente já na década de 1970 (Ross, 1974). A resistência a penicilina ocorre devido a produção de penicilinase (uma enzima codificada pelo gene plasmidial *blaZ* que degrada o anel beta-lactâmico) esta enzima está amplamente difundida, presente em até 90% dos isolados de *S. aureus* (Lowy, 2003; Hagstrand Aldman, 2017).

Devido à elevada prevalência de isolados resistentes a penicilina, a meticilina (ou oxacilina) passou a ser a droga de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas. A meticilina é uma penicilina semissintética resistente a beta-lactamase, tendo sido introduzida em 1959. Contudo, em 1961 o primeiro isolado de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) já foi descrito (Li, 2016; Liu, 2016).

A meticilina tem seu sítio de ação nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP). As PBPs são transpeptidases responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana. Ao interferir na PBP a meticilina impede a formação completa do peptidoglicano, desencadeando a lise bacteriana (Katayama, 2000). Este é o mesmo sítio de ação dos demais antimicrobianos beta-lactâmicos, assim, a

resistência a meticilina deve ser compreendida como resistência aos beta-lactâmicos, sendo todas as penicilinas e cefalosporinas (Liu, 2016).

Atualmente, somente as cefalosporinas de quinta geração são beta-lactâmicos com ação anti-MRSA, sendo a ceftarolina o único representante disponível para uso clínico (Purrello, 2016). Concomitante a ampla resistência aos beta-lactâmicos, os isolados de MRSA associados a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), muitas vezes, apresentam perfis fenotípicos com resistência a múltiplos antimicrobianos – principalmente aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e macrolídeos (Naimi, 2003).

Além da aquisição de mecanismos de resistência o *S. aureus* expressa uma variedade de fatores de virulência. São exemplos: as proteínas de superfície, a capacidade de produzir biofilme e a produção de enzimas ou toxinas. Uma importante citotoxina é a leucocidina de Panton-Valentine (do inglês: *Panton-Valentine Leukocidin* – PVL). A PVL é responsável pela formação de poros na membrana das células humanas, induzindo a lise celular. Esta citotoxina, quando descrita, foi relacionada a isolados de MRSA associados a infecções comunitárias, chamados de CA-MRSA (Voyich, 2006).

### **1.3 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina**

O surgimento do MRSA foi um desafio importante na terapia estafilocócica. Ele está associado a infecções graves, tanto comunitárias quanto IRAS – sendo muitas destas infecções invasivas. O MRSA é considerado um dos mais patogênicos *superbugs*, quando isolado a partir de bacteremias está associado a elevada taxa de mortalidade, apesar da instituição de medidas terapêuticas apropriadas (Gomez, 2007; Otter and French, 2010).

O principal mecanismo de resistência a meticilina é através da produção de uma PBP modificada: a PBP2a. As PBPs são peptidases localizadas na membrana celular e estão associadas a formação do peptidoglicano da parede celular. A PBP2a apresenta baixa afinidade com os antimicrobianos beta-lactâmicos, mas apesar de estruturalmente diferente, o peptidoglicano não altera a sua função (de Jonge and Tomasz, 1993; Jarlov, 1997).

Em isolados com resistência a metilina, mas com ausência da PBP2a, pode ocorrer a super-expressão de outras PBPs, também com baixa afinidade a beta-lactâmicos, ou de beta-lactamases. Outro mecanismo também descrito é a presença de maior quantidade de enzima de síntese de peptidoglicano disponível (Jarlov, 1997; Stapleton and Taylor, 2002).

A PBP2a é codificada pelo gene *mecA* – este gene é um elemento do complexo *mec*. Este complexo tem, aproximadamente, 30 a 50kb, e é composto por um gene estrutural (*mecA* e seus homólogos *mecB* ou *mecC*) e dois componentes reguladores da expressão deste gene: *mecR1* e *mecl* (Lowy, 2003). O gene *mecR1* exerce a função de indução do gene *mecA*, esta ocorre após a exposição ao antimicrobiano beta-lactâmico, enquanto o *mecl* é um forte repressor deste gene – figura 1 (Baba, 2002; Liu, 2016).

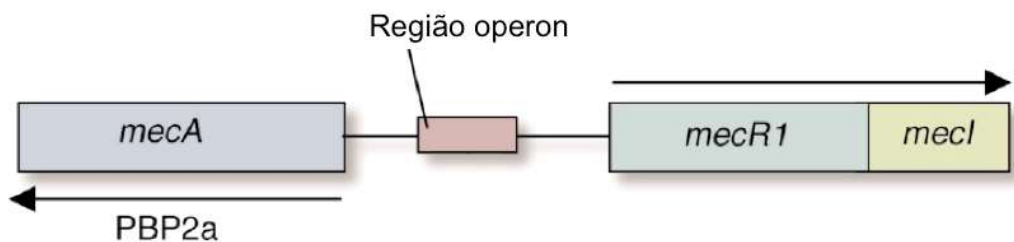


FIGURA (1) – Diagrama do cassete de resistência do *S. aureus* a metilina. Adaptado de Lowy *et al.* 2003.

Existem outros genes também relacionados a expressão do gene *mecA*. Os genes *blaI*, *blaR1* e *blaZ* estão relacionados ao controle de expressão de beta-lactamase, mas devido a um alto grau de homologia com os genes *mecR1* e *mecl*, o gene *mecA* pode sofrer alteração na sua expressão (Zhang, 2001; Baba, 2002). Um conjunto de genes auxiliares denominados fator essencial para a expressão de resistência a metilina (*fem*) também são necessários para a expressão de resistência. Estes genes atuam na síntese desse peptidoglicano modificado e a sua inativação pode reverter essa resistência (de Lencastre, 1994).

É sugerido que a resistência a metilina através do gene *mecA* poderia interferir com a virulência de isolados de MRSA, por uma alteração no “*quorum sensing*” do *locus agr* “*accessory gene regulator*” (Rudkin, 2012). Essas alterações na estrutura da parede celular bacteriana interfeririam no *locus agr*,

este gene que está relacionado a regulação da expressão de fatores de virulência do MRSA (Rudkin, 2012).

O complexo *mec* faz parte de um elemento cromossômico móvel chamado *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). O complexo *mec* apresenta uma considerável variabilidade genômica, que pode se apresentar como um marcador evolucionário dos isolados de MRSA (Naimi, 2003; Schito, 2006; Hiramatsu, 2013).

#### 1.4 Epidemiologia do MRSA

Os fatores de risco para colonização e infecção pelo MRSA são melhores descritos para pacientes que necessitam de cuidados à saúde. Entre os principais fatores de risco temos: uso de antibioticoterapia, uso de cateteres vasculares de longa permanência ou outros dispositivos invasivos, necessidade de terapia renal substitutiva e internações prolongadas (Shorr, 2007; Popovich, 2013).

Esse risco de colonização ou infecção pelo MRSA no cenário hospitalar está diretamente associado ao contato, sua forma de transmissão. Este contato pode ser com outro paciente colonizado, pelo carreamento nas mãos dos profissionais de saúde, com instrumentos ou superfícies previamente contaminados (Guinto, 2002; Boyce, 2007). Salientando que profissionais da saúde são importantes carreadores, pois apresentam maior risco de colonização que a população em geral e esta colonização pode permanecer por vários anos (Robicsek, 2009).

O risco por infecção pelo MRSA deve ser considerado, uma vez que esses pacientes têm maior mortalidade, hospitalizações prolongadas e maiores custos associados ao tratamento que pacientes com infecções por *S. aureus* suscetíveis a meticilina (Cosgrove, 2003; Cosgrove, 2005). Da mesma forma, pacientes com infecção por MRSA também apresentam maiores taxas de falência renal, instabilidade hemodinâmica e dependência de ventilação mecânica que pacientes com infecções por *S. aureus* suscetíveis a meticilina (Blot, 2002).

Estudos de vigilância vem apresentando mudanças na epidemiologia das infecções por MRSA ao longo do tempo. Estudos nos Estados Unidos e na Comunidade Europeia já evidenciaram aumento do número de casos de infecções estafilocócicas – superior a 20% das infecções primárias de corrente

sanguínea (Voss, 1994; Wisplinghoff, 2004; Klevens, 2006). Um estudo europeu de prevalência e caracterização molecular do MRSA de infecções adquiridas na comunidade, evidenciou prevalência média de 15,1% de infecções relacionadas a este agente, podendo ser até 29% conforme a região avaliada (Bouchiat, 2017). Entretanto, os dados de vigilância na América Latina não apresentaram haver esta tendência de aumento de casos (Mejia, 2010).

Dados nacionais mostram que a frequência de IRAS por MRSA no Brasil é elevada, permanecendo em, aproximadamente, 20% das infecções primárias de corrente sanguínea (Martins, 2014). Em um amplo estudo multicêntrico Marra *et al.* (2011) evidenciaram o *S. aureus* como primeiro agente associado a bacteremias em pacientes com IRAS no Brasil. Neste mesmo estudo 43,5% dos *S. aureus* isolados foram resistentes a meticilina – dado que mostra a relevância deste patógeno em nosso meio (Marra, 2011). Contudo, existe carência de dados para a avaliação da epidemiologia nacional do MRSA considerando sua caracterização molecular, sendo a maioria dos dados disponíveis locais ou regionais.

Quando avaliados a epidemiologia pela caracterização molecular pelo tipo de SCCmec dos isolados de MRSA, alguns tipos se fazem mais prevalentes em determinados países. Considerando isso, um mapa com os tipos de SCCmec predominantes nas diversas regiões foi apresentado por Liu *et al.* 2016.

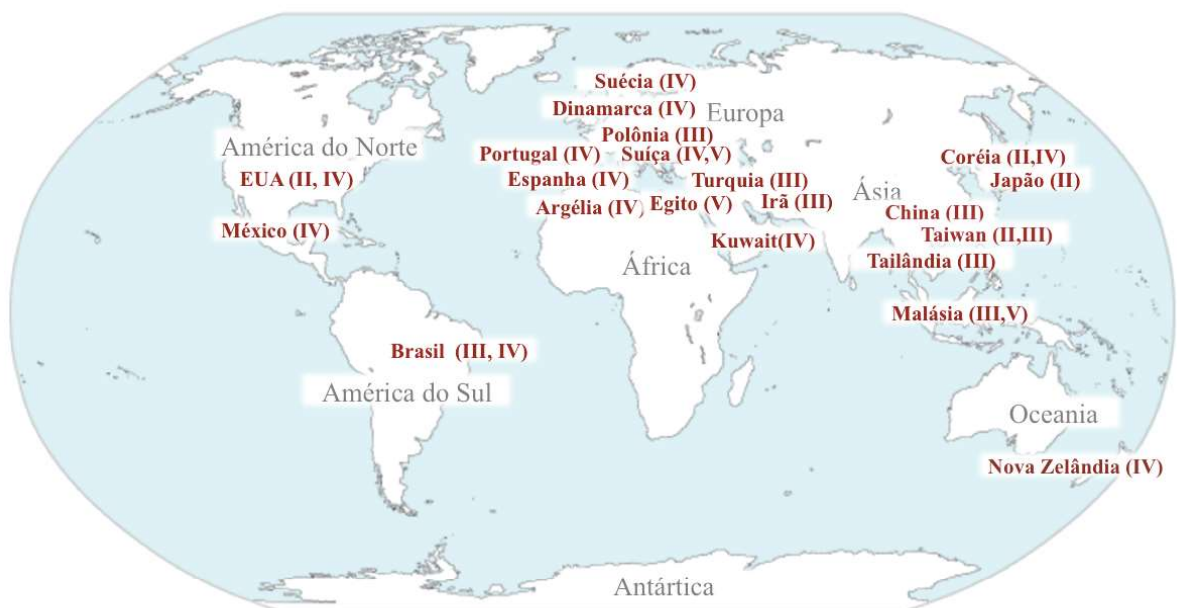


FIGURA (2) – Tipos de SCCmec mundialmente predominantes.

Adaptado de Liu *et al.* 2016.

O MRSA associado a IRAS e o associado as infecções comunitárias podem apresentar diferenças na clínica e na epidemiologia avaliada por tipagem molecular. Os MRSA com SCCmec do tipo I, II e III estariam associados a IRAS. Esses também apresentariam, com maior frequência, resistência a múltiplos antimicrobianos (Naimi, 2003; Liu, 2016). Um estudo de epidemiologia e caracterização molecular pela técnica da eletroforese em campo pulsado (do inglês: *Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) em isolados de IRAS Estados Unidos evidenciou 2 padrões clonais mais prevalentes: USA100 e USA200 (McDougal, 2003).

Alguns trabalhos de epidemiologia e caracterização dos isolados associados a infecções comunitárias, descrevem como sendo os SCCmec tipo IV, V e VI como mais prevalentes (Liu, 2016). Nestes isolados não foram evidenciados amplos perfis de resistência antimicrobianos não beta-lactâmicos. Apesar de não estar associado a um amplo perfil de resistência, os isolados do SCCmec de tipo IV estariam relacionados a cepas mais virulentas – com a presença da PVL (Baba, 2002; Naimi, 2003).

Dois estudos epidemiológicos com isolados de MRSA de pacientes atendidos em emergências nos Estados Unidos evidenciaram o padrão clonal USA300 como a linhagem mais prevalente (Moran, 2006; Albrecht, 2015). Moran *et al.* também identificaram maior prevalência do SCCmec IV e a presença da PVL em 98% nestes isolados de infecções comunitárias (Moran, 2006).

O estudo de Bouchiat *et al.* 2017, que realizou a caracterização molecular do MRSA circulante em vários países da comunidade europeia, evidenciou elevada diversidade de clones de *S. aureus* circulantes no continente – tanto de meticilina sensíveis como resistentes. Também importante ressaltar que neste estudo não se evidenciaram os padrões clonais mais presentes nos Estados Unidos (Bouchiat, 2017).

Dois estudos com isolados de Porto Alegre, evidenciaram a presença de diferentes clones internacionais entre seus isolados. Becker *et al.* evidenciaram o maior prevalência de isolados do SCCmec tipo III, assim como é a presença de clones internacionais entre os isolados *Cordobes/Chilean* e *Brazilian endemic clone* (BEC) (Becker, 2012). O estudo de Gelatti *et al.* com isolados de infecções comunitárias, evidenciou o SCCmec tipo IV como o mais prevalente e com a

presença dos clones USA300 e OSPC (Gelatti, 2013). Essas diferenças entre os achados poderiam estar relacionadas as diferenças nas origens dos isolados.

Alterações decorrentes de mutações podem ocorrer nos isolados ou cepas associadas a IRAS ou a infecções adquiridas comunidade (Yamamoto, 2012). Isolados mais prevalentes no cenário hospitalar podem circular transitoriamente na comunidade, bem como, o comunitário nos nosocômios. Essas alterações, nos seus mecanismos de virulência ou de resistência a antimicrobianos, poderiam ser incorporadas no genoma de outros isolados de MRSA. Como consequência, ocorreria a emergência de novas variantes, apresentando características distintas das linhagens previamente descritas – conforme representado na figura 3 (Figueiredo and Ferreira, 2014). Estes dados apresentam a condição dinâmica da epidemiologia das infecções pelo MRSA.

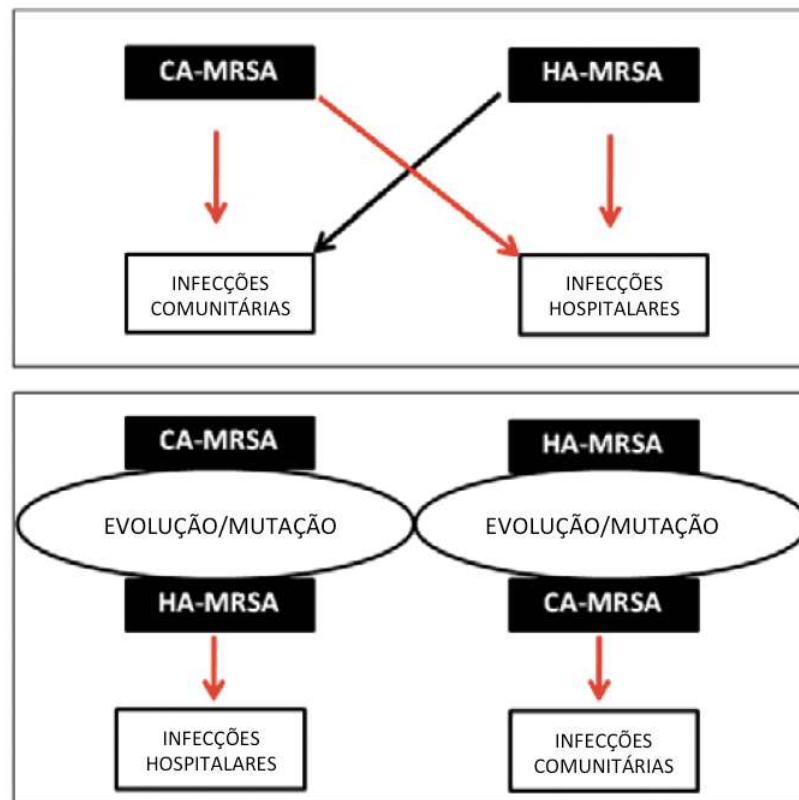


FIGURA (3) – Epidemiologia e cenários de circulação do MRSA. Adaptado de Figueiredo e Ferreira 2014.

## 1.5 Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo, tendo sido primeiramente isolado a partir do fungo *Streptomyces orientalis*. Os representantes dos glicopeptídeos são a vancomicina e, mais moderna, a teicoplanina. A vancomicina é um glicopeptídeo tricíclico com uma estrutura composta por 7 cadeias peptídicas ligadas a um dissacarídeo composto por vancosamina e glicose (Rubinstein and Keynan, 2014).

A vancomicina apresenta ampla ação sobre bactérias Gram positivas, sendo ativa contra cocos, bacilos aeróbios (apresentando ação bactericida para a maioria destes agentes) e Gram positivos anaeróbios da microbiota oral. É ativa, com ação bactericida, contra MRSA e *Staphylococcus epidermidis* resistente a oxacilina e bacteriostática contra *Enterococcus sp.* (Rubinstein and Keynan, 2014).

Após a introdução da meticilina, devido a toxicidade e efeito bactericida mais lento (quando comparada a beta-lactâmicos), a vancomicina deixou de ser considerada droga de primeira linha para infecções estafilocócicas. Contudo, a vancomicina tem sido a droga de escolha para o tratamento de infecções causados pelo MRSA por mais de 50 anos; incluindo bacteremia, endocardite infecciosa, pneumonia, celulite e outras síndromes infecciosas (Kalil, 2014). Assim como é a droga de primeira linha para infecções por *Staphylococcus* coagulase negativos e *Enterococcus* resistentes a ampicilina, e seu uso também é recomendado para pacientes com infecções graves por Gram positivos, que apresentem alergia a penicilinas semissintéticas ou cefalosporinas (Liu, 2011).

O mecanismo de ação da vancomicina é através da inibição da síntese da parede celular bacteriana. O alvo da droga são os monômeros de murina, que são precursores do peptidoglicano. A vancomicina se liga na fração D-ala-D-ala dos monômeros do peptidoglicano, este composto leva a inibição da incorporação da murina ao peptidoglicano em formação, com consequente interrupção da síntese da parede celular (Lowy, 2003; Rubinstein and Keynan, 2014).

A emergência de resistência a vancomicina ocorreu na década de 1980, em bactérias do gênero *Enterococcus*. Posteriormente ocorreu o aparecimento de isolados de *S. aureus* com susceptibilidade intermediária a vancomicina (VISA) e resistentes a vancomicina (VRSA) (Lowy, 2003).

Em 2008 o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) definiu a redução do limite da suscetibilidade (*breakpoint*) para vancomicina em *S. aureus*. Esses novos parâmetros definiram a concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina menor ou igual 2 mg/L sendo sensível, como intermediário 4-8 mg/L e resistente quando é maior ou igual a 16 mg/L. Essa nova definição ocorreu porque em pacientes com infecções por isolados de *S. aureus* com CIM de 4mg/L para vancomicina as falhas terapêuticas chegavam a 60% dos casos (Vandecasteele, 2013).

O mecanismo de resistência a vancomicina em isolados VISA está relacionado ao espessamento da parede celular, através da produção aumentada de peptidoglicano. Esse espessamento da parede provoca a redução da disponibilidade de vancomicina no seu alvo intracelular, conforme representado na figura 4 (Lowy, 2003).

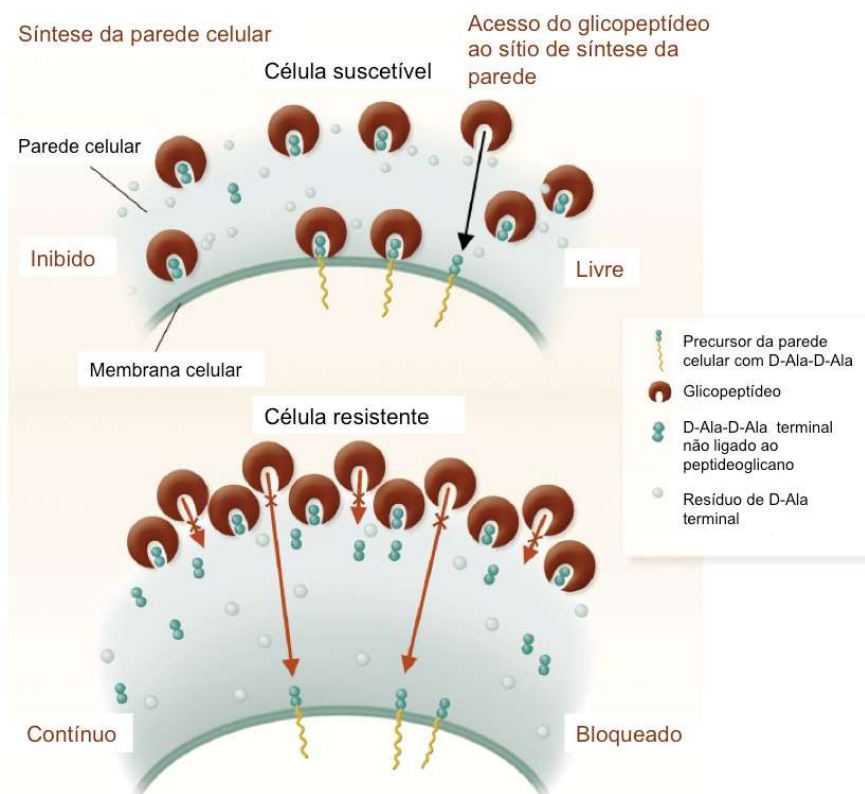


FIGURA (4) – Mecanismo de resistência do *S. aureus* a vancomicina - VISA. Adaptado de Lowy *et al.* 2003.

A resistência expressada nos isolados de VRSA está relacionada ao gene *van* – estes isolados apresentam CIM muito elevadas para vancomicina (Tenover,

2004). Este mecanismo está associado a alteração da parede celular bacteriana – com uma alteração do peptídeo terminal D-ala-Dala para D-ala-D-lac. Esta nova terminação apresenta baixa afinidade a vancomicina e permite a síntese do peptidoglicano, sendo um mecanismo muito mais eficiente do que os VISA. (Lowy, 2003). Vide a figura 5.

A resistência a vancomicina em MRSA de isolados clínicos foi recentemente descrita no Brasil (Rossi, 2014). Este caso ficou relacionado com a aquisição do gene plasmidial *vanA* a partir de um *Enterococcus faecalis* (Rossi, 2014). Apesar da resistência a vancomicina em *S. aureus* ainda ser infrequente, este e outros relatos de VRSA descritos geram grande preocupação (Zhu, 2010).

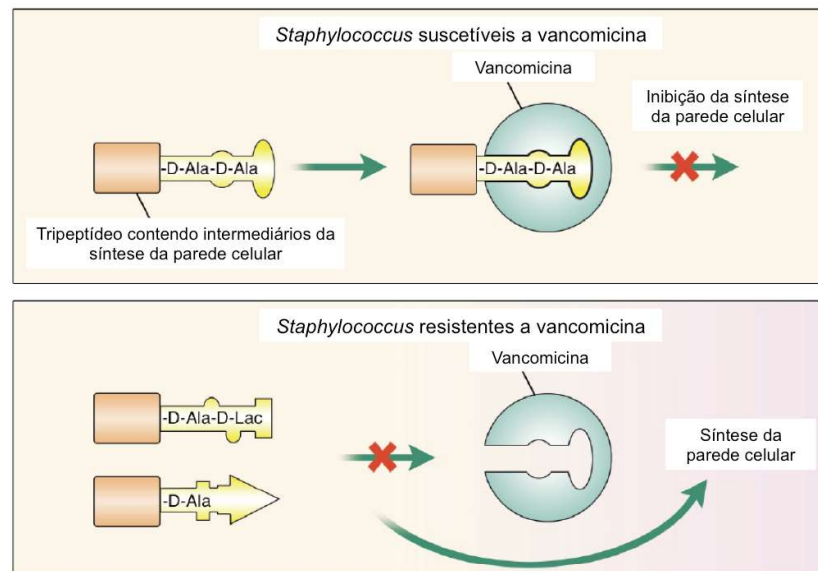


FIGURA (5) – Mecanismo de resistência do *S. aureus* a vancomicina - VRSA. Adaptado de Lowy *et al.* 2003.

Mesmo em infecções por MRSA suscetíveis a vancomicina a falha terapêutica não é incomum e ainda existe aumento deste risco de falha em pacientes com infecções por isolados com CIM para vancomicina maior que 1 mg/L (Dhand and Sakoulas, 2012). Apesar de suscetíveis, isso se deve muito a dificuldade de se atingir a nível sérico ou tissular adequado para ação deste antimicrobiano (Moise, 2007).

Um fenômeno classificado como "vancomycin MIC creep" foi descrito nos últimos anos como a elevação das CIM para vancomicina em isolados de *S. aureus*, mas que se mantenham dentro dos limiares da suscetibilidade (Sakoulas

and Moellering, 2008). Esta elevação progressiva da CIM para vancomicina tem sido descrita em diversos centros médicos no mundo (Zhuo, 2013). Diferente desses achados, em alguns centros este fenômeno parece não ocorrer, ou não foi possível sua comprovação (Reynolds, 2012; Chen, 2015).

Apesar de ser uma difícil comprovação, estudos tentaram relacionar o fenômeno de “*MIC creep*” com o consumo de antimicrobianos anti-MRSA, principalmente a vancomicina, mas não conseguiram estabelecer esta correlação (Grau, 2015). Mesmo sem haver estabelecido esta associação, o aumento no consumo de antimicrobianos para tratamento de infecções associadas ao MRSA tem sido relatado (Meyer, 2011). Neste sentido, novas evidências sugerem que este fenômeno pode não estar associado a pressão seletiva exercida por antibióticos, mas, possivelmente, relacionado a disseminação clonal de isolados (Hsieh, 2016). Contudo, é importante enfatizar que as investigações sobre este tema não são ainda definitivas.

## **1.6 Determinação da suscetibilidade à vancomicina**

A resistência a antimicrobianos pode ser identificada através de testes fenotípicos ou genotípicos. Apesar dos métodos de identificação já serem padronizados e usados no mundo todo, muitos estudos destacam as dificuldades e as limitações da identificação laboratorial de MRSA (Harbarth, 2006). Enfatizaremos aqui os testes de determinação da suscetibilidade à vancomicina abordados nesta dissertação.

O método preconizado para determinação da suscetibilidade de *S. aureus* à vancomicina, segundo o CLSI, é o teste da CIM por microdiluição em caldo (MDC) (CLSI, 2015). O teste de disco-difusão falha na detecção de resistência a vancomicina e não deve ser realizado, como já definido pelo CLSI. (van Hal, 2011; CLSI, 2015). Em uma metanálise, Jacob e DiazGranados sugerem que pacientes com infecções por isolados com CIM para vancomicina >1 mg/L apresentam pior desfecho clínico, contudo estes dados foram avaliados de estudos com fitas de Etest (Jacob and DiazGranados, 2013).

A determinação da CIM com a utilização de fitas de Etest é um método mais fácil de ser executado e está sendo amplamente utilizado. Contudo, apesar de

sua padronização, já foi descrita a superestimação da CIM determinada pelo método do Etest em relação à MDC – o que costuma ocorrer em diferenças de uma diluição (Kruzel, 2011). Embora o estudo de Khatib *et al.* indique que as diferenças entre os dois métodos sejam aceitáveis, é importante considerar o potencial de superestimação das CIM à vancomicina determinadas por Etest (Khatib, 2013).

### 1.7 Cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*)

Como já foi discutido, o SCC*mec* é um elemento genético móvel que contém o gene *mec* e genes que controlam a sua expressão. Existem três elementos básicos na composição do SCC*mec*: o complexo gene *mec*, o complexo gene *ccr* (*ccrAB* e *ccrC*) e a “*joining region*” (região J) (Hiramatsu, 2013; Liu, 2016).

O complexo gene *mec* é classificado em 5 classes, conforme a composição de *mecA* ou *mecC*, e seus genes reguladores. As classes A, B, C e D são compostas pelo gene *mecA* e a classe E pelo gene *mecC* (Liu, 2016).

De acordo com os diferentes tipos de *ccrAB* e *ccrC* e seus genes regulatórios associados, o complexo gene *ccr* foi classificado em 8 alotipos: tipo 1 os genes *ccrA1* e *ccrB1*, tipo 2 os genes *ccrA2* e *ccrB2*, tipo 3 os genes *ccrA3* e *ccrB3*, tipo 4 os genes *ccrA4* e *ccrB4*, tipo 5 o gene *ccrC1*, tipo 6 os genes *ccrA5* e *ccrB3*, tipo 7 os genes *ccrA1* e *ccrB6* e o tipo 8 os genes *ccrA1* e *ccrB3*. No complexo gene *ccr* genes de resistência a antimicrobianos não beta-lactâmicos e metais pesados podem ser inseridos, facilitando a troca de informação genética entre os MRSA (IWG-SCC, 2009; Liu, 2016).

Os elementos SCC*mec* são classificados nos tipos I ao XI, baseado na natureza dos complexos *mec* e gene *ccr* nele contidos (Hiramatsu, 2013). O modelo das estruturas de 11 tipos de SCC*mec* identificados estão caracterizados na figura 6.

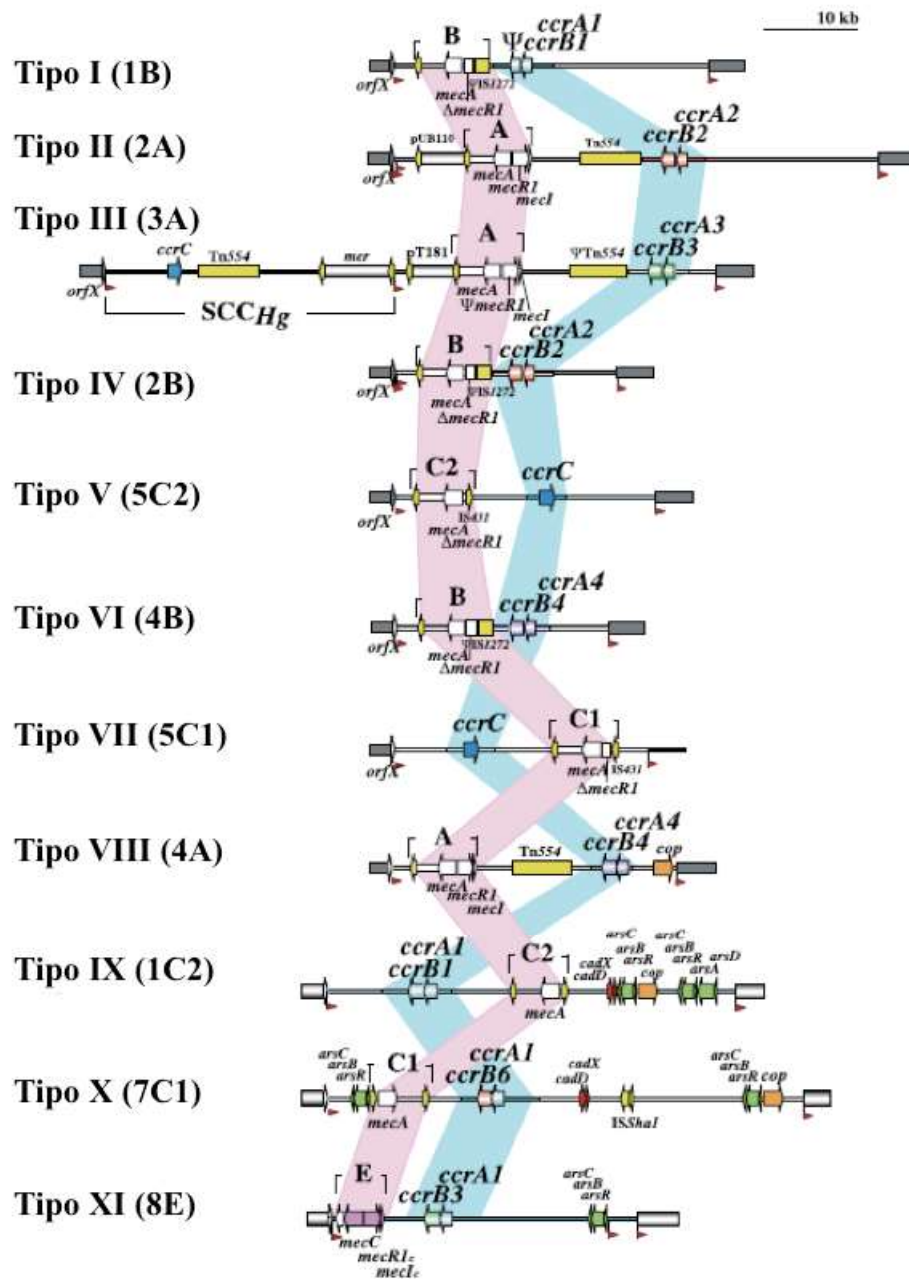


FIGURA (6) – Esquema da estrutura genética dos elementos SCC*mec*. A localização do complexo *mec* está destacada na cor rosa e a localização do gene *ccr* está destacada na cor azul. Adaptado de Hiramatsu *et al.* 2013.

Além destes 11 tipos de SCC*mec* apresentados, mais recentemente foi descrito o SCC*mec* tipo XII, composto pelo *mec* classe C2 e o *ccr* do tipo 9 (Lawung, 2014; Wu, 2015). A detecção de elementos divergentes compondo o complexo SCC*mec* também tem sido descritos, levantando hipóteses de que estas variações podem ter origem em mutações ou em outras espécies (Shore, 2011).

## 1.8 Tipagem Molecular do MRSA

Investigações epidemiológicas buscam estabelecer relações entre pacientes, lugares, tempo e condições. Na investigação de doenças infecciosas essas características devem ser suplementadas com técnicas microbiológicas, para que essa caracterização seja apropriada. Técnicas de tipagem molecular estão entre as mais estabelecidas para realização desta caracterização (Goering, 2013). Esses métodos são ferramentas úteis para o estudo da origem de isolados, relação clonais e epidemiologia de surtos (Shopsin, 1999). É importante que a técnica utilizada para tipagem de MRSA apresente poder discriminatório elevado, devido a possibilidade dos isolados derivarem de um número pequeno de clones (Sader, 1995).

Vários métodos são utilizados para tipagem do *Staphylococcus aureus*, porém, não agrupam as amostras da mesma maneira, variando de acordo com seu poder discriminatório (Enright, 2000). As técnicas mais utilizadas para a tipagem molecular de isolados de MRSA incluem a tipagem por *SCCmec*, eletroforese em campo pulsado, "*spa typing*" e "*Multi Locus Sequence Typing*" (MLST) – essas técnicas têm sido utilizadas para estudar a epidemiologia do MRSA em hospitais, nacional e internacionalmente (Grau, 2014).

Juntamente com as demais técnicas de caracterização molecular, a tipagem do elemento *SCCmec* apresenta grande relevância na avaliação da epidemiologia do MRSA. Esta técnica de PCR tem sido amplamente empregada (com variações desenvolvidas por vários pesquisadores) e costuma ser utilizada em conjunto com outros métodos de tipagem molecular que apresentem maior poder discriminatório. É um método amplamente utilizado e é capaz de distinguir entre os diferentes tipos e subtipos (Kondo, 2007; Lawung, 2014; Liu, 2016).

A técnica da PFGE se baseia na ação de enzimas de restrição sobre o DNA genômico bacteriano, clivando em fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. A enzima *SmaI* é comumente usada para a restrição do DNA de MRSA. Esses fragmentos de DNA são então submetidos a uma eletroforese de campo pulsado em gel de agarose. Os fragmentos de DNA apresentam-se separados por peso molecular e os padrões de bandas resultantes são analisados em *software* específico (Tenover, 1995; Bosch, 2010).

A PFGE é uma técnica padronizada que apresenta elevado poder discriminatório para *S. aureus*, sendo por isso um dos métodos mais aplicados para a investigação de surtos relacionados a este agente (Deurenberg, 2007). Uma grande vantagem desta técnica deve-se ao fato da análise não se restringir a um segmento do genoma ou de determinados genes, mas analisá-lo como um todo – diferente de outros métodos de tipagem molecular (Tenover, 1995). Esta metodologia tem sido aplicada há mais de 20 anos e mais recentemente tem sido utilizada em conjunto com outros métodos de tipagem molecular, principalmente técnicas com sequenciamento de DNA, podendo ser consideradas complementares na caracterização de isolados de MRSA (O'Sullivan, 2012).

A técnica da PFGE apresenta suas limitações, entre as principais é possível relatar a necessidade de crescimento em meio de cultura – o que impede que *S. aureus* identificados por meio de técnicas de biologia molecular sejam diretamente avaliados na PFGE. Esta técnica, em geral, é considerada lenta, tem custos elevados e também pode apresentar dificuldades de interpretação para comparação com isolados internacionais ou de diferentes centros (Weller, 2000; Cookson, 2007; Crnich, 2014). Apesar disso, o poder discriminatório da PFGE é uma ótima ferramenta para caracterização de surtos de curta duração, além de ser também válida para pesquisas de vigilância epidemiológica de longo prazo (Hallin, 2007; Stefani, 2012).

A caracterização genotípica através da análise de VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), que são sequências curtas de DNA geralmente não codificante que se repetem em quantidade variável de forma contígua dentro de um *locus* gênico, vem sendo utilizada para analisar a diversidade (Elberse, 2011). O *spa typing* envolve o sequenciamento de apenas um único gene, assim torna-se uma técnica mais barata, menos trabalhosa e mais rápida – apesar de apresentar menor poder discriminatório, se comparado com o PFGE (Schouls, 2009; Crnich, 2014). O elemento *spa* se refere ao gene produtor da proteína A estafilocócica – proteína de adesão encontrada em *S. aureus* – com um número de 24bp repetidas e está localizado na parede celular bacteriana (Shopsin, 1999).

A genotipagem por MLST é um método bem estabelecido, baseado na variação de sequências de 7 genes conservados. O conjunto das sequências obtida pelos 7 genes gera uma sequência tipo (ST), para que um isolado seja considerado como pertencente ao mesmo complexo clonal, este deve ter o

mesmo perfil alélico para 5 dos 7 *loci* analisados (Enright, 2000). Este método apresenta alto poder discriminatório, por não analisar somente um único *locus*, e elevada reprodutibilidade. Apresenta também a vantagem de fácil comparação de dados interlaboratoriais, tendo se mostrado adequado para estudos epidemiológicos de longo prazo (Perez-Roth, 2004). Contudo, esta é uma técnica de custos elevados, o que a torna pouco viável para a rotina de laboratórios clínicos (Du, 2014).

A elevada prevalência de infecções relacionadas a MRSA relatadas, tanto IRAS quanto comunitárias, e a morbimortalidade associada a estas infecções fazem deste agente um patógeno de grande relevância clínica. As evidências da emergência de resistência aos glicopeptídeos (principalmente nas elevações progressivas da CIM para vancomicina previamente relatadas) e as novas terapias antimicrobianas, causam preocupação quanto as possibilidades terapêuticas na prática clínica. O risco de falha terapêutica e a possibilidade de disseminação de clones de MRSA resistentes no cenário hospitalar expõem a necessidade da vigilância epidemiológica e da compreensão dos fatores de resistência do MRSA.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albrecht VS, Limbago BM, Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, McDougal LK, et al. *Staphylococcus aureus* Colonization and Strain Type at Various Body Sites among Patients with a Closed Abscess and Uninfected Controls at U.S. Emergency Departments. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(11):3478-84.
2. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002;359(9320):1819-27.
3. Becker AP, Santos O, Castrucci FM, Dias C, D'Azevedo PA. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil. *Epidemiology and infection*. 2012;140(8):1372-5.
4. Becker K, von Eiff C. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci\**. *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition: American Society of Microbiology*; 2011.
5. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med*. 2002;162(19):2229-35.
6. Bosch T, de Neeling AJ, Schouls LM, van der Zwaluw KW, Kluytmans JA, Grundmann H, et al. PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. *BMC microbiology*. 2010;10:40.
7. Bouchiat C, Curtis S, Spiliopoulou I, Bes M, Cocuzza C, Codita I, et al. MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(2):372-5.
8. Boyce JM, Havill NL, Otter JA, Adams NM. Widespread environmental contamination associated with patients with diarrhea and methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus* colonization of the gastrointestinal tract. Infection control and hospital epidemiology. 2007;28(10):1142-7.

9. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4):781-91.

10. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis. 2001;7(2):178-82.

11. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nature reviews Microbiology. 2009;7(9):629-41.

12. Chen CP, Liu MF, Lin CF, Lin SP, Shi ZY. The association of molecular typing, vancomycin MIC, and clinical outcome for patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi. 2015.

13. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M100-S25. Wayne, PA2015.

14. Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. Journal of clinical microbiology. 2007;45(6):1830-7.

15. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2003;36(1):53-9.

16. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infection control and hospital epidemiology*. 2005;26(2):166-74.
17. Crnich CJ, Duster M, Warrack S, Maki D, Safdar N. Comparison of pulsed-gel electrophoresis and a commercial repetitive-element PCR method for assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clustering in different health care facilities. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(6):2027-32.
18. de Jonge BL, Tomasz A. Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillin-binding protein 2A in cell wall synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993;37(2):342-6.
19. de Lencastre H, de Jonge BL, Matthews PR, Tomasz A. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1994;33(1):7-24.
20. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007;13(3):222-35.
21. Dhand A, Sakoulas G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. *F1000 medicine reports*. 2012;4:4.
22. Du XF, Xiao M, Liang HY, Sun Z, Jiang YH, Chen GY, et al. An improved MLVF method and its comparison with traditional MLVF, spa typing, MLST/SCCmec and PFGE for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(1):725-42.

23. Elberse KE, Nunes S, Sa-Leao R, van der Heide HG, Schouls LM. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. PloS one. 2011;6(5):e19668.
24. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of clinical microbiology. 2000;38(3):1008-15.
25. Figueiredo AM, Ferreira FA. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2014;109(3):265-78.
26. Gelatti LC, Bonamigo RR, Inoue FM, Carmo MS, Becker AP, Castrucci FM, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV in southern Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2013;46(1):34-8.
27. Goering RV, Kock R, Grundmann H, Werner G, Friedrich AW. From theory to practice: molecular strain typing for the clinical and public health setting. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2013;18(4):20383.
28. Gomez J, Garcia-Vazquez E, Banos R, Canteras M, Ruiz J, Banos V, et al. Predictors of mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia: the role of empiric antibiotic therapy. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2007;26(4):239-45.
29. Grau S, Fondevilla E, Freixas N, Mojal S, Sopena N, Bella F, et al. Relationship between consumption of MRSA-active antibiotics and burden of MRSA in acute care hospitals in Catalonia, Spain. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014.

30. Grau S, Fondevilla E, Freixas N, Mojal S, Sopena N, Bella F, et al. Relationship between consumption of MRSA-active antibiotics and burden of MRSA in acute care hospitals in Catalonia, Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(4):1193-7.
31. Guinto CH, Bottone EJ, Raffalli JT, Montecalvo MA, Wormser GP. Evaluation of dedicated stethoscopes as a potential source of nosocomial pathogens. *American journal of infection control*. 2002;30(8):499-502.
32. Hagstrand Aldman M, Skovby A, L IP. Penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: susceptibility testing, resistance rates and outcome of infection. *Infectious diseases (London, England)*. 2017:1-7.
33. Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonca R, De Ryck R, Struelens MJ. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(1):127-33.
34. Harbarth S, Masuet-Aumatell C, Schrenzel J, Francois P, Akakpo C, Renzi G, et al. Evaluation of rapid screening and pre-emptive contact isolation for detecting and controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care: an interventional cohort study. *Critical care (London, England)*. 2006;10(1):R25.
35. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection & chemotherapy*. 2013;45(2):117-36.
36. Hsieh YC, Lin YC, Huang YC. Vancomycin, teicoplanin, daptomycin, and linezolid MIC creep in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with clonality. *Medicine*. 2016;95(41):e5060.

37. IWG-SCC IWGotCoSCCE. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(12):4961-7.
38. Jacob JT, DiazGranados CA. High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2013;17(2):e93-e100.
39. Jarlov JO, Busch-Sorensen C, Espersen F, Mortensen I, Hougaard DM, Rosdahl VT. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1997;40(2):241-9.
40. Kalil AC, Van Schooneveld TC, Fey PD, Rupp ME. Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2014;312(15):1552-64.
41. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(6):1549-55.
42. Khatib R, Riederer K, Shemes S, Musta AC, Szpunar S. Correlation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin minimal inhibitory concentration results by Etest and broth microdilution methods with population analysis profile: lack of Etest overestimation of the MIC. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2013;32(6):803-6.

43. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;42(3):389-91.
44. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(1):264-74.
45. Kruzel MC, Lewis CT, Welsh KJ, Lewis EM, Dundas NE, Mohr JF, et al. Determination of vancomycin and daptomycin MICs by different testing methods for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(6):2272-3.
46. Lawung R, Chuong LV, Cherdtrakulkiat R, Srisarin A, Prachayasittikul V. Revelation of staphylococcal cassette chromosome *mec* types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Thailand and Vietnam. *Journal of microbiological methods*. 2014;107:8-12.
47. Li J, Echevarria KL, Traugott KA. beta-Lactam Therapy for Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Comparative Review of Cefazolin versus Antistaphylococcal Penicillins. *Pharmacotherapy*. 2016.
48. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(3):e18-55.
49. Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*. 2016;101:56-67.

50. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of clinical investigation. 2003;111(9):1265-73.
51. Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. Journal of clinical microbiology. 2011;49(5):1866-71.
52. Martins A, Riboli DF, Pereira VC, Cunha Mde L. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2014;18(3):331-5.
53. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. Journal of clinical microbiology. 2003;41(11):5113-20.
54. Mejia C, Zurita J, Guzman-Blanco M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2010;14 Suppl 2:S79-86.
55. Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P. Increasing consumption of MRSA-active drugs without increasing MRSA in German ICUs. Intensive care medicine. 2011;37(10):1628-32.
56. Moise PA, Sakoulas G, Forrest A, Schentag JJ. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(7):2582-6.

57. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *The New England journal of medicine*. 2006;355(7):666-74.
58. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama*. 2003;290(22):2976-84.
59. O'Sullivan MV, Zhou F, Sintchenko V, Gilbert GL. Prospective genotyping of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates by use of a novel, highly discriminatory binary typing system. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(11):3513-9.
60. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet Infectious diseases*. 2010;10(4):227-39.
61. Otto M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert review of dermatology*. 2010;5(2):183-95.
62. Perez-Roth E, Lorenzo-Diaz F, Batista N, Moreno A, Mendez-Alvarez S. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(10):4649-56.
63. Popovich KJ, Hota B, Aroutcheva A, Kurien L, Patel J, Lyles-Banks R, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization burden in HIV-infected patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(8):1067-74.
64. Purrello SM, Garau J, Giamarellos E, Mazzei T, Pea F, Soriano A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently

available treatment options. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2016;7:178-86.

65. Reynolds R, Hope R, Warner M, MacGowan AP, Livermore DM, Ellington MJ. Lack of upward creep of glycopeptide MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated in the UK and Ireland 2001-07. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(12):2912-8.

66. Robicsek A, Beaumont JL, Peterson LR. Duration of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;48(7):910-3.

67. Ross S, Rodriguez W, Controni G, Khan W. Staphylococcal susceptibility to penicillin G. The changing pattern among community strains. *Jama*. 1974;229(8):1075-7.

68. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *The New England journal of medicine*. 2014;370(16):1524-31.

69. Rubinstein E, Keynan Y. Vancomycin revisited - 60 years later. *Frontiers in public health*. 2014;2:217.

70. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, et al. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(5):798-806.

71. Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clinics in laboratory medicine*. 1995;15(2):407-31.

72. Sakai H, Procop GW, Kobayashi N, Togawa D, Wilson DA, Borden L, et al. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(12):5739-44.
73. Sakoulas G, Moellering RC, Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46 Suppl 5:S360-7.
74. Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006;12 Suppl 1:3-8.
75. Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, Huijsdens XW, Pluister GN, van Santen-Verheuevel MG, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing. *PloS one*. 2009;4(4):e5082.
76. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(11):3556-63.
77. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(8):3765-73.

78. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45 Suppl 3:S171-6.
79. Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science progress*. 2002;85(Pt 1):57-72.
80. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39(4):273-82.
81. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(9):2233-9.
82. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(1):275-80.
83. van Hal SJ, Barbogiannakos T, Jones M, Wehrhahn MC, Mercer J, Chen D, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility testing: methodology correlations, temporal trends and clonal patterns. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(10):2284-7.
84. Vandecasteele SJ, De Vriese AS, Tacconelli E. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of vancomycin in clinical practice: evidence and uncertainties. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(4):743-8.
85. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *European journal of clinical microbiology*

& infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 1994;13(1):50-5.

86. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, et al. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? The Journal of infectious diseases. 2006;194(12):1761-70.

87. Weller TM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? The Journal of hospital infection. 2000;44(3):160-72.

88. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2004;39(3):309-17.

89. Wu Z, Li F, Liu D, Xue H, Zhao X. Novel Type XII Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Harboring a New Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC2*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015;59(12):7597-601.

90. Yamamoto T, Takano T, Higuchi W, Iwao Y, Singur O, Reva I, et al. Comparative genomics and drug resistance of a geographic variant of ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged in Russia. PloS one. 2012;7(1):e29187.

91. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. Science (New York, NY). 2001;291(5510):1962-5.

92. Zhu W, Murray PR, Huskins WC, Jernigan JA, McDonald LC, Clark NC, et al. Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like *vanA* plasmid associated with

vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(10):4314-20.

93. Zhuo C, Xu YC, Xiao SN, Zhang GY, Zhong NS. Glycopeptide minimum inhibitory concentration creep among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from 2006-2011 in China. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;41(6):578-81.

### 3. JUSTIFICATIVA

A descrição dos dados locais do Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC) quanto as bacteremias por MRSA e a pesquisa pelo fenômeno de “*MIC creep*” para vancomicina são prioridades para o reconhecimento do risco de falha da terapia antimicrobiana para estes pacientes. Isso se faz importante pois mudanças nos perfis de suscetibilidade a antimicrobianos tem sido evidenciadas.

A avaliação do consumo de vancomicina, a existência do fenômeno “*MIC creep*” em âmbito local (ainda não relatada) e uma possível correlação tem sido observada em grandes centros médicos do mundo. Da mesma forma, a caracterização molecular dos isolados de MRSA e o estudo da sua epidemiologia tem se mostrado relevantes, por conta das alterações dos complexos clonais previamente descritos.

O entendimento da epidemiologia do MRSA e dos fatores associados a sua resistência a antimicrobianos devem avançar em paralelo. A avaliação do efeito da pressão seletiva exercida pelo consumo de antimicrobianos e a caracterização dos isolados presentes neste cenário apresentam-se como as ferramentas necessárias para o entendimento da evolução no MRSA no âmbito hospitalar.

## 4. OBJETIVO

### 4.1 Objetivo Geral

Caracterizar os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina provenientes de hemoculturas de pacientes internados no Hospital Nossa Senhora da Conceição, determinar a existência de “MIC creep” para vancomicina no período estudado e avaliar a existência de correlação com o consumo deste antimicrobiano.

### 4.2 Objetivos Específicos

Identificar e realizar a caracterização molecular dos isolados de MRSA do HNSC;

Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados;

Determinar a distribuição, ao longo do tempo (junho de 2012 a fevereiro de 2016), da CIM para vancomicina dos isolados;

Determinar o consumo de vancomicina (em DDD) por 100 pacientes-dia ao longo do período analisado;

Determinar se existe correlação entre o consumo de vancomicina (em DDD) e a CIM para vancomicina dos isolados de MRSA no período estudado;

Verificar, através de caracterização molecular, se houve disseminação clonal de MRSA no HNSC.

## 5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

### 5.1 Manuscrito I

Aceito para publicação na revista: Infection Control and Hospital Epidemiology

RICHE CVW, CASSOL R, FERREIRA JAS, DIAS CAG, FALCI DR (2017). Absence of Correlation between Vancomycin Consumption and Minimum Inhibitory Concentration of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Infect Control Hosp Epidemiol.

Fator de Impacto: 3.669

# Your ICHE Submission (ms 36962)

em@editorialmanager.com

ter 24/01/2017 19:06

Para:Cezar Vinícius Würdig Riche <cezar\_riche@hotmail.com>;

CC: iche.managingeditor@cambridge.org

Ref.: Ms. No. 36962

Absence of Correlation between Vancomycin Consumption and Minimum Inhibitory Concentration of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates

Dear Dr. Riche,

I am pleased to inform you that your manuscript, "Absence of Correlation between Vancomycin Consumption and Minimum Inhibitory Concentration of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates," has been accepted for publication in Infection Control & Hospital Epidemiology.

The corresponding author must sign a copyright transfer form and email it to Cambridge University Press, the publisher of the journal at iche.managingeditor@cambridge.org. You can download the copyright form directly from this link:

<https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/information/transfer-copyright>

We cannot publish your article until we have this signed form in hand. Please fill out and sign both sections A and B (you can sign on behalf of your co-authors).

Before publication, you will receive page proofs, along with a form to order reprints, from Cambridge University Press, who is the publisher of the journal. Your manuscript will be edited for consistency, clarity, and style; the manuscript editor may contact you by e-mail with questions. You will be notified by e-mail when the proofs are ready for you to check, approximately four weeks after we receive your copyright form.

We look forward to working with you during the remainder of the publication process. Thank you for your interest in Infection Control & Hospital Epidemiology.

Sincerely,  
Suzanne F. Bradley, MD  
Editor-in-Chief

4. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:237–251.
5. Indicateurs de qualité et de sécurité des soins. Thème Infections Associées Aux Soins (IAS) Fiche descriptive de l'indicateur de consommation de solutions hydro-alcooliques ICSHA 2. Haute Autorité de Santé website. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-04/2016\\_has\\_fiche\\_descriptive\\_icssha\\_2.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-04/2016_has_fiche_descriptive_icssha_2.pdf). Published 2016. Accessed February 8, 2017.
6. Halcomb EJ, Griffiths R, Fernandez R. Role of MRSA reservoirs in the acute care setting. *Int J Evid Based Healthcare* 2008;6:50–77.
7. Heinrich N, Mueller A, Bartmann P, Simon A, Bierbaum G, Engelhart S. Successful management of an MRSA outbreak in a neonatal intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:909–913.
8. Scheithauer S, Trepels-Kottek S, Häfner H, et al. Healthcare worker-related MRSA cluster in a German neonatology level III ICU: a true European story. *Int J Hyg Environ Health* 2014;217:307–311.
9. Sollid JUE, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Genet Evol* 2014;21:531–541.
10. Abad CL, Pulia MS, Safdar N. Does the nose know? An update on MRSA decolonization strategies. *Curr Infect Dis Rep* 2013;15:455–464.
11. Lepelletier D, Corvec S, Caillon J, Reynaud A, Rozé J-C, Gras-Leguen C. Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit: which measures for which success? *Am J Infect Control* 2009;37:195–200.

## Absence of Correlation Between Vancomycin Consumption and Minimum Inhibitory Concentration of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important human pathogen; it is among the most common causes of healthcare-associated infection.<sup>1</sup> Despite the use of appropriate antimicrobial therapy, MRSA invasive infections carry a high mortality rate.<sup>2,3</sup> Vancomycin is a mainstay of therapy in MRSA infections, and although it has been used since 1950, resistance is uncommon.<sup>1</sup> Vancomycin minimal inhibitory concentration (MIC) “creep” is a phenomenon in which the vancomycin MIC in *S. aureus* isolates progressively reaches higher values (MIC  $\geq 1.5$  mg/L) within the susceptibility range.<sup>4</sup>

Monitoring antimicrobial usage remains a cornerstone of antimicrobial stewardship programs. There is limited evidence of a correlation between MRSA active antimicrobial agent consumption and the emergence of resistance.<sup>5</sup> In this study,

we aimed to assess the existence of vancomycin MIC creep among MRSA isolates obtained from blood cultures and to determine whether a correlation exists between vancomycin consumption and variations in the MIC over time.

This study was performed at the Hospital Nossa Senhora da Conceição, a tertiary-care public hospital located in Porto Alegre, Brazil. The study period extended from June 2012 to February 2016, and data for the period were obtained from computerized databases. Isolates from the same episode of bacteremia were counted only once. The isolates were identified using a Vitek-2 system (bioMérieux, Marcy-l’Étoile, France). The vancomycin MIC was determined either by broth microdilution (BMD), according to Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations, or by Etest strips (bioMérieux). Vancomycin utilization was expressed in defined daily doses (DDD) per 100 patient days, processed according to the Anatomical Therapeutic Chemical classification system, in which the DDD of vancomycin is 2 g.

The  $\chi^2$  test was used to compare proportions. Correlation between variables was tested using the Pearson correlation coefficient, and variation of MIC over time was calculated using analysis of variance (ANOVA). Two-tailed *t* tests were utilized, and a value of  $P \leq .05$  was considered significant. Statistical analyses were performed using the JMP 9 program (SAS Institute, Cary, NC).

A total of 186 isolates were included in the analysis. During the study period, the laboratory applied 2 different methodologies: for data from June 2012 to November 2013, BMD was used, and for data from December 2013 to February 2016, an Etest was performed. The MIC ranged from 0.25 to 2.0 mg/L in the first period (for which BMD was used), and the MIC varied from 0.5 to 2.0 mg/L in the second period (for which an Etest was used).

Vancomycin MIC geometrical mean increased significantly in the study period from 0.766 to 1.966 mg/L ( $P < .0001$ ) when the 2 different methodologies were combined. Analyzing the 2 periods separately, no significant variation was observed for the BMD period. However, for the second period (ie, the Etest period), a significant increase in MIC geometrical mean from 0.791 to 1.966 mg/L was observed ( $P = .0003$ ) (Figure 1). There was an increase in the modal MIC from 0.5 to 2.0 mg/L over the whole period ( $P < .0001$ ). Analyzing modal MIC only in the Etest period, there was an increase from 1.0 to 2.0 mg/L ( $P = .003$ ). The proportion of isolates with MIC  $> 1.0$  mg/L ranged from 6.5% to 100% ( $P = .001$ ) during the Etest period.

Both vancomycin utilization and its relation to the total number of hospitalized patients remained stable, varying between 4,488 and 6,449 DDD per 100 patient days ( $P = .223$ ). No correlation was observed between vancomycin utilization and the MIC geometric mean, nor with modal MIC, even when the 2 different methodology periods were analyzed separately. A separate correlation coefficient between MIC geometrical mean and vancomycin utilization for the Etest period alone was poor ( $r = 0.524$ ;  $P = .148$ ).

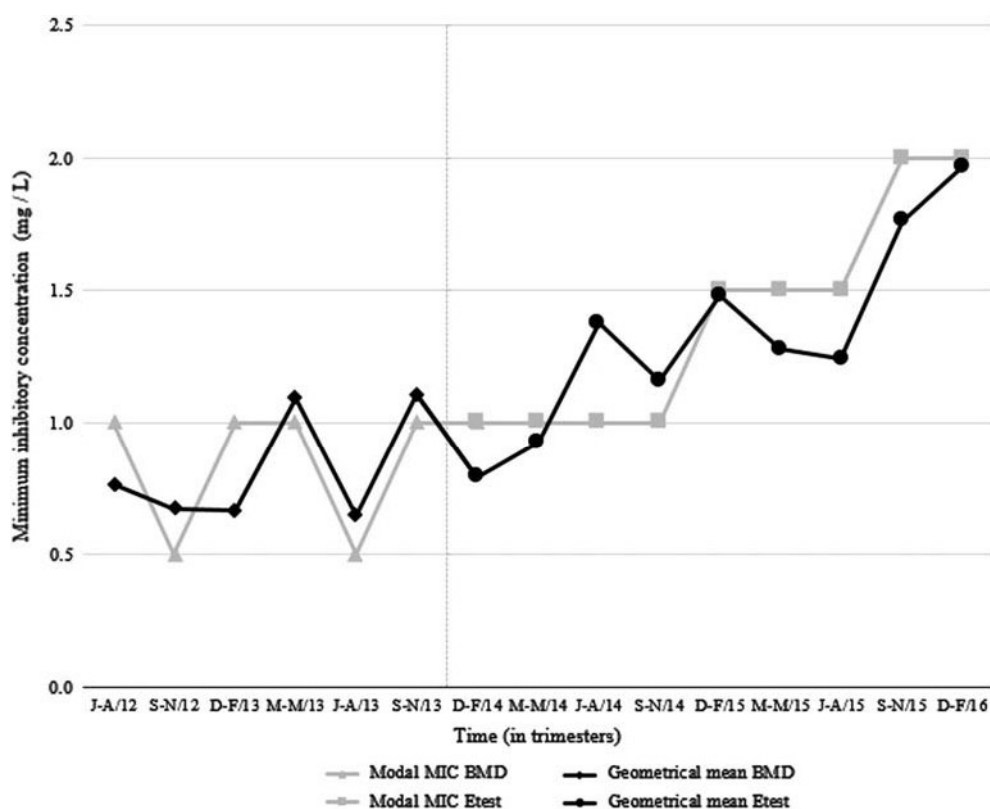


FIGURE 1. Evolution of vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) geometric mean and modal MIC through the time, considering both methodologies. For the data from the first period, June 2012 to November 2013, broth microdilution (BMD) was used; for the data from the second period, December 2013 to February 2016, Etest was performed.

We observed an increase in the vancomycin MIC geometric mean throughout the study period. Moreover, when the Etest period was considered separately, the same phenomenon was detected. Although there is probably an overestimation of MIC by the Etest method, when compared to BMD,<sup>6</sup> another study found that the MIC can be identical or may have just one discordant dilution.<sup>7</sup> Regardless of the change in methodology, our study revealed an increase in MIC that can be considered "MIC creep."

Modal vancomycin MIC increased significantly for the entire study period and also for the Etest period independently. The proportion of isolates with vancomycin MIC > 1 mg/L increased as well. These findings bring concerns about the high proportion of MRSA isolates with a high vancomycin MIC. Even though the mortality risk associated with this finding is the subject of ongoing debate,<sup>1,8</sup> the risk of failure with vancomycin therapy is an important problem. These data suggest the need to evaluate the suitability of vancomycin as the drug of choice, and they may also indicate a need to assess the antimicrobial susceptibility profile of other anti-MRSA antibiotics at this center (which are not routinely performed).

The absence of correlation between vancomycin consumption and MIC variation suggests that other factors are related to MIC increases. The correlation between consumption and antimicrobial resistance is difficult to demonstrate in studies

that do not involve a large number of isolates or a prolonged period of evaluation.<sup>5,9</sup> The MIC creep phenomenon may not be associated with the emergence of de novo resistance caused by antimicrobial consumption, but it may be associated with clonal selection and the spread of isolates with higher vancomycin MICs.<sup>6,10</sup>

This study has some limitations, such as not evaluating the consumption of other anti-MRSA drugs. Another limitation, the change in the MIC determination methodology, might have interfered with MIC variation during the study due to possible overestimation by the Etest, but this possibility was circumvented by separating the analyses of the 2 different methodology periods.

Knowledge about the effect of selective pressure exerted by antimicrobial consumption is crucial. This study describes findings in accordance with the literature regarding the possible existence of vancomycin MIC creep among MRSA isolates,<sup>3</sup> and the results have revealed an absence of correlation with vancomycin consumption,<sup>10</sup> which suggests clonal dissemination. Genotyping of isolates are needed to confirm this hypothesis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

*Financial support:* No financial support was provided relevant to this article.

*Potential conflicts of interest:* D.R.F. has received research support from Merck, Sharp, and Dohme and from Pfizer; he has also received travel grants

from and has given lectures for Pfizer. All other authors report no conflicts of interest relevant to this article.

**Cezar Vinícius Würdig Riche, MD;<sup>1,2</sup>**  
**Renato Cassol Ferreira da Silva, MD;<sup>3</sup>**  
**Jorge Alberto Santiago Ferreira, PharmD;<sup>3</sup>**  
**Cícero Armídio Gomes Dias, PharmD, PhD;<sup>1</sup>**  
**Diego Rodrigues Falci, MD, PhD<sup>4,5</sup>**

Affiliations: 1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; 2. Hospital Ernesto Dornelles, Porto Alegre, RS, Brazil; 3. Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil; 4. Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; 5. Centro Universitário La Salle Canoas, Canoas, RS, Brazil.

Address correspondence to Cezar V. W. Riche, MD, Rua Sarmiento Leite #245, Room 204, Porto Alegre, RS, Brazil (cezar@ufcspa.edu.br).

Received December 16, 2016; accepted January 24, 2017; electronically published March 16, 2017

*Infect Control Hosp Epidemiol* 2017;38:751–753

© 2017 by The Society for Healthcare Epidemiology of America. All rights reserved. 0899-823X/2017/3806-0022. DOI: 10.1017/ice.2017.39

## REFERENCES

1. Kalil AC, Van Schooneveld TC, Fey PD, Rupp ME. Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2014; 312:1552–1564.
2. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003;36:53–59.
3. Dhand A, Sakoulas G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. *F1000 medicine reports* 2012;4:4.
4. Edwards B, Milne K, Lawes T, Cook I, Robb A, Gould IM. Is vancomycin MIC "creep" method dependent? Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility trends in blood isolates from North East Scotland from 2006 to 2010. *J Clin Microbiol* 2012;50:318–325.
5. Grau S, Fondevilla E, Freixas N, et al. Relationship between consumption of MRSA-active antibiotics and burden of MRSA in acute care hospitals in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1193–1197.
6. van Hal SJ, Barbogiannakos T, Jones M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility testing: methodology correlations, temporal trends and clonal patterns. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2284–2287.
7. Khatib R, Riederer K, Shemes S, Musta AC, Szpunar S. Correlation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin minimal inhibitory concentration results by Etest and broth microdilution methods with population analysis profile: lack of Etest overestimation of the MIC. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:803–806.
8. van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012;54:755–771.
9. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis* 2014;14:13.
10. Hsieh YC, Lin YC, Huang YC. Vancomycin, teicoplanin, daptomycin, and linezolid MIC creep in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with clonality. *Medicine* 2016;95:e5060.

## 5.2 Manuscrito II

Este manuscrito será submetido a revista: The Brazilian Journal of Infectious Diseases

As normas para publicação estão apresentadas como anexo neste documento.

RICHE CVW, MOTT MP, PEREIRA RI, CUNHA GR, DIAS CAG. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a southern Brazil public hospital

Fator de Impacto: 1.412

Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a southern  
Brazil public hospital

Brief communication

Authors:

Cezar Vinícius Würdig Riche, MD;<sup>1,2</sup> Mariana Preussler Mott, MSc;<sup>1,3</sup> Rebeca Inhoque  
Pereira, MSc;<sup>1</sup> Gabriela Rosa da Cunha, MSc;<sup>1</sup> Cícero Armídio Gomes Dias, PhD;<sup>1</sup>

Affiliation:

<sup>1</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Hospital Ernesto Dornelles, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>3</sup>Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Adress correspondence to Cezar V. W. Riche, MD.

Rua Sarmento Leite #245, room 204, Porto Alegre, RS, Brazil

CEP 90050-170

+55(51)3303-8738 / +55(51)99646-8181

cezar@ufcspa.edu.br

## **Abstract**

The aim of this study was to describe the vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream isolates and evaluate if there was a clonal dissemination among these isolates. Were included twenty-seven isolates from bloodstream infections of patients from a tertiary public hospital in Porto Alegre, Southern Brazil. The study period was from January until December 2015. Most of isolates (51.8%) were multidrug resistant. No resistance to vancomycin, linezolid and ceftaroline were evidenced. Even though isolates with vancomycin MIC  $\geq$  1.5 mg/L were detected in high proportion. The SCC*mec* typing by multiplex PCR evidenced SCC*mec* IV as most frequent (77.7%) and subtypes IVa and IVc were detected. The Panton-Valentine Leucocidin was positive in 62.9% of the isolates, a finding that might be according to the most prevalent SCC*mec* type. Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis evidence the presence of five clonal clusters and the Brazilian endemic clone was not evidenced in this study. These findings suggest that, as part of a dynamic process, changes in MRSA continuous and must be better understood.

**Keywords:** MRSA, vancomycin, bloodstream infection, PFGE

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major human pathogen and highly prevalent in health-care associated infections.<sup>1</sup> An increasing in prevalence of MRSA infections in US and Europe was noticed. Although differences in epidemiology, concerning the predominant MRSA clone, have been described.<sup>2</sup> Surveillance studies have not evidenced this tendency in Latin America.<sup>3</sup>

MRSA strains have been reported to be concentrated into subset of clones and be involved in adapting to antibiotic selective pressure and dissemination worldwide.<sup>4</sup> For decades vancomycin still serve as the cornerstone for treatment of serious staphylococcal infections and resistance is not common among MRSA.<sup>5</sup> However recent reports have documented an increasing in MRSA minimum inhibitory concentration (MIC) for vancomycin, but within the susceptibility range – this phenomenon has been referred as vancomycin “MIC creep”.<sup>6</sup> This is a worldwide phenomenon and it is suggested to be associated with a clonal dissemination of specific strains.<sup>4</sup>

A changing in MRSA molecular epidemiology in Brazilian hospitals was recently described, with substitution of the previously predominant Brazilian endemic clone (BEC).<sup>7</sup> The presence of international clones is recent and has also been evidenced in others centers in Brazil.<sup>8</sup> These finds suggests that the epidemiology of MRSA is not a stationary process. The objective of this study was to describe the vancomycin MIC profile of MRSA bloodstream isolates and evaluate if there was a clonal spread among these isolates.

This cohort study was performed in a tertiary public hospital located in Porto Alegre, Southern Brazil. All MRSA bloodstream isolates were prospectively collected - isolates from the same episode of bacteremia were counted only once. The study period was from January to December 2015.

The isolates were identified by Vitek-2 system (bioMérieux, Marcy-I'Etoile / France)

and antimicrobial susceptibility test was performed by disk-diffusion tests, according to the protocols of the Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI.<sup>9</sup> The included antimicrobials were erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), ciprofloxacin (5 µg), linezolid (30 µg) and trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg). Ceftaroline susceptibility test was performed with Etest strips (bioMérieux) according to the manufacture's instructions. Vancomycin MIC was determined either by broth microdilution (BMD, according to CLSI recommendations) or Etest strips (bioMérieux). For BMD tests intermediary dilution concentrations (0.75 mg/L and 1.5 mg/L) were included in the protocol. *S. aureus* ATCC 29213 was used as control strain with every set of tests.

Methicillin resistance was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) protocol for amplification of *mecA* gene as previously described.<sup>10</sup> Detection of *lukS-lukF* genes, responsible for Panton-Valentine Leucocidin (PVL) codification was performed as described by Ribeiro *et al.* 2005.<sup>11</sup> *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) typing of the isolates was performed by multiplex PCR assay that includes types 1 to 5, according to Kondo *et al.* 2007.<sup>10</sup> The control strains were NTCT10442 (I), N315 (II), 85/2082 (III), CA05 (IVa), 8/6-3P (IVb), MR108 (IVc), JCSC4469 (IVd) and WIS (V).

The analysis of chromosomal DNA similarity of the isolates was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) – patterns by adapted protocol from Pinto *et al.* 2013 using 20 µg/ml of lysostaphin in the lysis step and running conditions as described by McDougal.<sup>12, 13</sup> Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs, Whitby / United Kingdom) was used as a molecular weight marker. The patterns were interpreted by unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) with optimization 0.5% and tolerance 1% using Bionumerics software 7.1 (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem / Belgium). Strain relatedness was displayed as dendrogram and similarity coefficient of 80%

was used to distinguish clones.<sup>13</sup>

During the study period, a total of 52 bacteremias related to MRSA were identified, and 31 samples were possible to be retrieved, according to the study criteria. Four isolates were later excluded due to failure to characterize methicillin resistance – in both cefoxitin disk-diffusion test and *mecA* PCR. Therefore, 27 isolates were included in the analysis.

A total of 14/27 (51.8%) MRSA isolates presents with resistance for more than 1 antimicrobial. Resistance to erythromycin was observed in 14/27 (51.8%), clindamycin 8/27 (29.6%), ciprofloxacin 6/27 (22.2%), and trimethoprim-sulfamethoxazole 2/27 (7.4%). Only two isolates were intermediary resistant to ceftaroline. All isolates were susceptible to linezolid and vancomycin. The resistance profile is showed in table 1.

The vancomycin MIC ranged from 0.5 mg/L to 2.0 mg/L if determined by Etest method and varied from 1.0 mg/L to 2.0 mg/L if determined by BMD. According to the methodology employed, 25/27 (92.5%) isolates had vancomycin MIC > 1.0 mg/L if determined by Etest – four isolates with MIC of 1.5 mg/L and 21 with MIC 2.0 mg/L. Using BMD methodology, 10/27 (37.0%) isolates presented with MIC  $\geq$  1.5 mg/L.

The PCR for detection of PVL was positive in 17/27 (62.9%) of the isolates. The SCC*mec* most frequent type was IVa 11/27 (40.7%), followed by IVc 10/27 (37.0%) and V 2/27 (7.5%). The SCC*mec* types I, II and III were identified in 1/27 (3.7%) each and one isolate was non-typeable (table 1).

In the molecular characterization by PFGE it was possible to observe five different clonal clusters, and other nine isolates had its own PFGE patterns. The most prevalent patterns presented were clonal grup A with 6 isolates (22.2%), followed by B 4 (14.8%) and C 3 (11.1%). The clonal grups D and E were represented with 2 (7.4%) isolates each. The PFGE patterns are presented in the figure 1 and table 1.

All 31 isolates were previously identified as MRSA, only 27 were confirmed by the presence of *mecA* gene. Such discrepancies between phenotypic and genotype methods can be observed, especially when automated systems are used.<sup>14</sup> Besides this, there is the possibility of the presence of *mecC* gene, however, this hypothesis was not tested. The *mecC* is a homologous gene to *mecA* and also promote methicillin resistance.<sup>15</sup> This gene is related to SCC*mec* types VII, IX and X and was not tested in our protocol.<sup>16</sup> This SCC*mec* types are not common in this region and the cefoxitin disk-diffusion test is a high sensitive test to predict methicillin resistance, so this is a minor possibility.<sup>9</sup>

In our study we found a high prevalence of PVL (62.9%). This is probably associated with the most prevalent SCC*mec* type that was present among our isolates. The SCC*mec* IV has been associated to PVL in previous studies and both were originally associated with community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA).<sup>17</sup> The presence of PVL confers enhanced virulence in these strains.<sup>18</sup> Unfortunately this correlation could not be evaluated once we did not have access to the medical background of these patients.

The majority of isolates presented with resistance to erythromycin, and 51.8% with resistance to multiple drugs. Once these isolates are from bloodstream infections, many of these antimicrobials are not considerable as treatment options, but they predict the presence of resistance mechanisms.<sup>5</sup>

An important finding was that no resistance to vancomycin, linezolid and ceftaroline was detected. Also, the full susceptibility of these isolates to linezolid, and 92.5% susceptibility to ceftaroline suggest these medications as good therapeutical options, even for empiric therapy, for MRSA infections in this center.<sup>5</sup>

Considering the high proportion of isolates with vancomycin MIC  $\geq$  1.5 mg/L evidenced in our study is a concerning situation, considering the fact that higher chance of

treatment failure was described in patients with MRSA bloodstream infections with elevated MIC.<sup>5,6</sup> Even with the discrepancy evidence between methods – a much higher proportion considering Etest methodology than BMD (92.5% vs 37.0%), because this difference was expected – an overestimation of 1 dilution in MIC, considering Etest and BMD has been well described.<sup>19</sup>

MRSA epidemiological studies from Brazil used to describe the presence of *SCCmec* type III.<sup>8,20,21</sup> Our findings evidenced a new pattern, with most prevalence of typed IVa and IVc. This new data and the absence of BEC lineages among these isolates might represent a change in MRSA epidemiology. In previous studies in our region BEC was a present clone.<sup>8</sup> In Brazil, this finding was described in two studies from different regions: the substitution of BEC, which was a well-established clone, by other lineages and the high prevalence of *SCCmec* type IV.<sup>7,22</sup>

The study has limitations; one of them is the small sample size. Also, and most relevant is the short period evaluated – considering that maybe in a longer period the presence of the BEC or the previous most prevalent *SCCmec* type III might be noted. Even though, the majority of bloodstream infections isolates, from this period, were included – fact that would minimize this possibility.

We highlight that our study brings new and relevant data, once there are few descriptions about the molecular epidemiology of MRSA bloodstream isolates in Brazil. This possible change in epidemiological profile and predominance of *SCCmec* IV must be followed in further studies. We consider that larger studies with molecular characterization techniques would be necessary in order to confirm this hypothesis.

#### **Acknowledgments:**

The authors thank Dr. Diego R. Falci for the guidance in this research and writing assistance.

Financial support: none reported.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39(4):273-82.
2. Bouchiat C, Curtis S, Spiliopoulou I, Bes M, Cocuzza C, Codita I, et al. MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(2):372-5.
3. Mejia C, Zurita J, Guzman-Blanco M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2010;14 Suppl 2:S79-86.
4. Hsieh YC, Lin YC, Huang YC. Vancomycin, teicoplanin, daptomycin, and linezolid MIC creep in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with clonality. *Medicine*. 2016;95(41):e5060.
5. Choo EJ, Chambers HF. Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infection & chemotherapy*. 2016;48(4):267-73.
6. Dhand A, Sakoulas G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. *F1000 medicine reports*. 2012;4:4.
7. Chamon RC, Ribeiro SD, da Costa TM, Nouer SA, Dos Santos KR. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian journal of*

infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2016.

8. Becker AP, Santos O, Castrucci FM, Dias C, D'Azevedo PA. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil. *Epidemiology and infection*. 2012;140(8):1372-5.
9. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M100-S25. Wayne, PA2015.
10. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(1):264-74.
11. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquo L, Ferreira FA, Santos RN, et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(4):1985-8.
12. Pinto TC, Souza AR, de Pina SE, Costa NS, Borges Neto AA, Neves FP, et al. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the ATPC gene. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(10):3242-9.
13. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(11):5113-20.

14. Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'Hara CM, Tenover FC. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(10):3785-8.
15. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(9):1265-73.
16. Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*. 2016;101:56-67.
17. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama*. 2003;290(22):2976-84.
18. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, et al. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(12):1761-70.
19. van Hal SJ, Barbaggiannakos T, Jones M, Wehrhahn MC, Mercer J, Chen D, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility testing: methodology correlations, temporal trends and clonal patterns. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(10):2284-7.
20. Martins A, Riboli DF, Pereira VC, Cunha Mde L. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2014;18(3):331-5.

21. Silveira AC, Cunha GR, Caierao J, Cordova CM, d'Azevedo PA. Molecular epidemiology of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Brazil. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2015;19(5):466-72.
22. Scribel LV, Silva-Carvalho MC, Souza RR, Superti SV, Kvitko CH, Figueiredo AM, et al. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC*mecIV* in a university hospital in Porto Alegre, Brazil. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009;65(4):457-61.

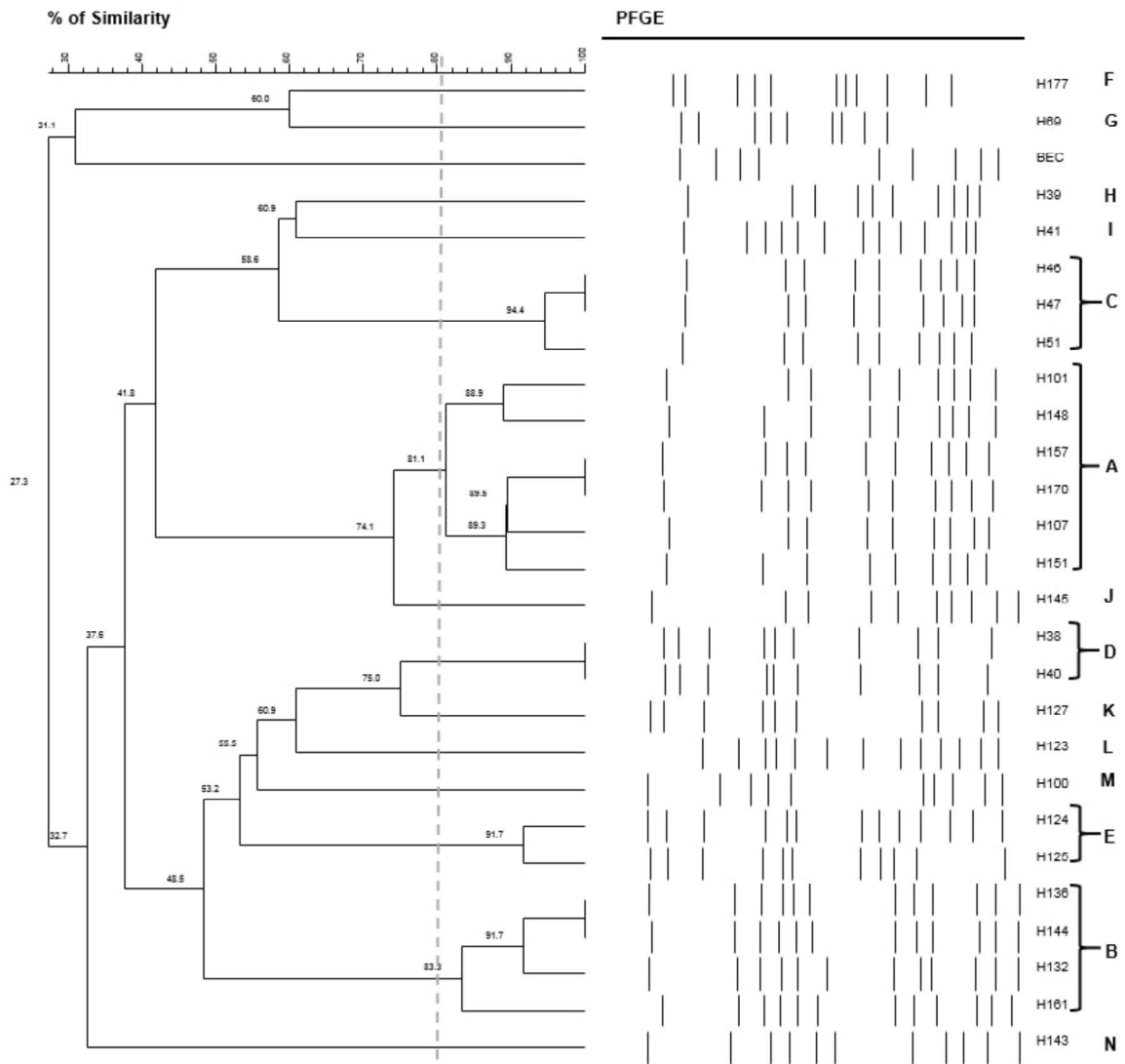
**TABLE 1. SCC<sub>mec</sub> typing and antimicrobial resistance according to PFGE patterns.**

Pattern, pulsed-field gel electrophoresis patterns; SCC<sub>mec</sub>, Staphylococcal cassette chromosome *mec*; PVL, Pantone-Valentine Leucocidin; Vanco, vancomycin; MIC, minimum inhibitory concentration; BMD, broth microdilution; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin, CIP, ciprofloxacin; CFT, ceftaroline; LZD, linezolid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; S, susceptible; I, intermediary; R, resistant.

Isolate	Pattern	SCC <sub>mec</sub>	PVL	Vanco E-test	Vanco BMD	ERY	CLI	CIP	CFT	LZD	SXT
H101	A	IVc	+	2	1	R	R	S	S	S	S
H148	A	IVc	+	2	1	I	S	S	S	S	S
H157	A	II	+	2	1	R	S	S	S	S	S
H170	A	Ivc	+	2	1	R	S	S	S	S	S
H107	A	IVc	+	2	1	R	R	S	S	S	S
H151	A	IVc	+	2	1.5	I	S	S	S	S	S
H136	B	IVa	+	2	2	I	S	R	S	S	S
H144	B	IVa	+	2	2	I	S	R	S	S	S
H132	B	IVa	+	2	1	R	S	S	S	S	S
H161	B	IVa	+	2	1	I	S	R	S	S	S
H46	C	IVc	+	1	1.5	S	S	S	S	S	S
H47	C	IVc	+	2	2	I	S	S	S	S	S
H51	C	IVc	+	2	1	R	R	S	S	S	S
H38	D	IVa	-	1.5	1	R	S	S	I	S	S
H40	D	IVa	-	2	1	R	S	S	S	S	S
H124	E	IVa	-	1.5	1	I	S	S	S	S	S
H125	E	IVa	-	1.5	1	S	S	S	S	S	S
H177	F	IVc	+	2	1	I	S	S	S	S	S
H69	G	I	-	2	2	R	R	R	S	S	S
H39	H	IVa	+	2	2	I	I	S	I	S	S
H41	I	IVa	+	2	1	I	I	R	S	S	S
H145	J	IVc	+	2	1	R	R	S	S	S	S
H127	K	V	-	2	2	R	S	S	S	S	S
H123	L	nt	-	2	1	R	R	I	S	S	S
H100	M	III	-	1.5	2	R	R	R	S	S	R
H143	N	IVa	-	2	2	R	R	I	S	S	R
H128	-	V	-	0.5	1	I	S	S	S	S	S

**FIGURE 1. Dendrogram generated of PFGE profiles of MRSA isolates.**

Note. Optimization 0.5% and Tolerance 1.0%. Similarity coefficient of 80% was selected to distinguish between clusters.



## 6. CONCLUSÕES

- Através da caracterização molecular pode-se observar a presença do gene *mecA* em todos os isolados analisados. O complexo *SCCmec* mais frequente foi o do tipo IV (77,7%), sendo presentes os subtipos IVa e IVc. Foram encontrados, também, conforme a frequência, os *SCCmec* do tipo V, seguido dos tipos I, II e III. A presença do gene *lukS-lukF*, para detecção de PVL, foi elevada entre isolados (62,9%).

- A maioria dos isolados apresentou perfil de resistência a mais de um antimicrobiano (51,8%). Perfis de resistência foram observados para eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprima. Não foram observados perfis de resistência para linezolida, ceftarolina e vancomicina – apesar de muitos isolados apresentarem CIM  $\geq 1,5$  mg/L para vancomicina.

- Houve aumento estatisticamente significativo da moda ( $p=0,003$ ) e da média geométrica ( $p=0,0003$ ) da CIM para vancomicina nos isolados, durante o período do estudo. Também foi evidenciado o aumento da proporção de isolados de MRSA com CIM para vancomicina  $> 1$  mg/L. ( $p=0,001$ ). Estes dados sugerem a existência do fenômeno de “*MIC creep*” para vancomicina nestes isolados.

- Foi possível evidenciar que tanto o consumo de vancomicina, quanto o seu uso ajustado pela ocupação hospitalar do HNSC se mantiveram estáveis durante todo o período do estudo, variando entre 4,488 e 6,449 DDD de vancomicina por 100 pacientes-dia internados, sem apresentar variação significativa ( $p=0,223$ ).

- Não foi evidenciada correlação entre o consumo ajustado de vancomicina nem com a moda, nem com a média geométrica da CIM dos isolados de MRSA, independente da metodologia para determinação da CIM utilizada, ( $r=0,524$ ;  $p=0,128$ ). Esta ausência de correlação sugere que outros fatores, que não a indução de resistência *de novo* pelo consumo de

antimicrobianos, devem estar associados ao "*vancomycin MIC creep*" aqui evidenciado.

- Este estudo pode evidenciar a presença de cinco complexos clonais entre os isolados bacterianos. Também pode-se avaliar a ausência do *Brazilian endemic clone* (BEC), uma linhagem antes circulante, mas não mais evidenciada. Estes achados não podem confirmar a existência de disseminação clonal de MRSA no HNSC e uma possível associação com o "*MIC creep*" para vancomicina, mas sugerem a existência de novas linhagens de MRSA que as previamente descritas em Porto Alegre.

## **7. ANEXOS**

### **7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** RELAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE VANCOMICINA E A CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE ISOLADOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES A METICILINA

**Pesquisador:** Renato Cassol Ferreira da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 39682414.0.3001.5345

**Instituição Proponente:** HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEICAO SA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.820.747

**Apresentação do Projeto:**

Dissertação de Mestrado, com apresentação de recurso por saída de pesquisador e adequação de pendências.

O Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram positiva e está entre os principais causadores de infecção de pele e corrente sanguínea. No Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC) o S. aureus é o quarto microrganismo causador de infecção primária de corrente sanguínea e também de pneumonia. O S. aureus resistente à meticilina (MRSA) se tornou um patógeno hospitalar endêmico e as infecções por esse germe estão relacionadas ao aumento da morbidade e mortalidade. O antimicrobiano de escolha para tratamento dessas infecções é a vancomicina. O aumento da concentração inibitória mínima (MIC) para vancomicina em isolados de MRSA é um fenômeno recente conhecido como "MIC Creep" e pode trazer complicadores para o tratamento com esse antimicrobiano.

# Hipótese:

- A existência de correlação entre o consumo de vancomicina e a MIC para vancomicina dos isolados de MRSA no período ocasionando aumento progressivo da MIC e consequente fenômeno de MIC creep.

**Endereço:** Rua Sarmento Leite ,245

**Bairro:** Sarmento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.820.747

**Objetivo da Pesquisa:**

**# Objetivo Primario:**

- Identificar, traçar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e caracterizar alguns fatores de virulencia em cepas de Staphylococcus aureus resistente a meticilina isolados a partir de hemoculturas de pacientes internados no Hospital Nossa Senhora da Conceicao.

**# Objetivo Secundario:**

- Identificar o gene mecA nos isolados de MRSA;
- Determinar a presença do gene lukS-PV e lukF-PV nos isolados;
- Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de MRSA;
- Realizar a tipagem do elemento SCCmec nos isolados;
- Verificar se houve disseminacao clonal de MRSA;
- Determinar a distribuicao, ao longo do tempo (janeiro ate dezembro de 2015), da MIC para vancomicina de isolados de MRSA;
- Determinar o consumo de vancomicina (em DDD) por paciente-dia ao longo do periodo analisado;
- Determinar se existe correlacao entre o consumo de vancomicina (em DDD) e a MIC para vancomicina dos isolados de MRSA no periodo estudado.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**# Riscos:**

Nao existira acesso a prontuarios, tampouco quaisquer intervencoes ou riscos aos pacientes. Como se trata de revisao de dados do HSNC e sem acesso direto a informacoes de pacientes, consideramos inviavel e desnecessaria a aplicacao de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

**# Beneficios:**

A descricao dos dados locais do HNSC quanto as bacteremias por Staphylococcus aureus, principalmente MRSA, e a pesquisa pelo fenomeno de "MIC creep" para vancomicina sao prioridades para o reconhecimento do risco de falha da terapia antimicrobiana para estes pacientes. A avaliacao do consumo de vancomicina e relacionar a existencia do fenomeno "MIC creep" local ainda nao foi relatada. O efeito da pressao seletiva exercida pelo consumo de antimicrobianos tem sido estudado em grandes centros medicos do mundo, uma vez que as necessidades clinicas atuais requerem cada vez maior de antibioticoterapia.

**Endereço:** Rua Sarmiento Leite ,245

**Bairro:** Sarmiento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.820.747

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**# Critério de Inclusão:**

- Serão incluídos no estudo todos os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina provenientes de hemoculturas realizadas em pacientes internados no hospital.
- Os critérios para solicitação de cultura, os procedimentos operacionais para realização das culturas foram os definidos nas rotinas do HNSC. Da mesma forma, será contabilizado todo o consumo de vancomicina no período.

**# Critério de Exclusão:**

- Serão excluídos os isolados que não possam ser analisados por problemas técnicos e aqueles que não seja possível o resgate da informação sobre a MIC para vancomicina.

**# Metodologia Proposta:**

- Estudo transversal, observacional.
- Os isolados bacterianos que serão incluídos no estudo são provenientes de exames de hemocultura realizados em pacientes do HNSC.
- Estes exames foram solicitados pela equipe assistente, não tendo havido nenhuma intervenção da equipe de pesquisa para tal solicitação.
- Estes isolados são previamente identificados e armazenados pelo Laboratório de Microbiologia do HNSC, serviço rotineiramente executado. Então as amostras disponíveis após o início da coleta de dados serão encaminhadas e armazenadas no Laboratório de Microbiologia da UFCSPA.
- No Laboratório de Cocos Gram Positivos (LCGP) da UFCSPA será confirmada a identificação dos isolados de MRSA (pesquisa do Gene *mecA*) e serão pesquisados fatores de virulência – através de testes fenotípicos (resistência a antimicrobianos) e genotípicos (pesquisa do Gene *luk* e tipagem do *Scmec*) – assim como será pesquisada a existência de perfil clonal, através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE).
- Será efetuado baseado em informações do banco de dados do Controle de Infecção Hospitalar por sua vez originadas do Laboratório de Microbiologia e do Serviço de Farmácia do Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC).
- Serão mensurados o número de ampolas de vancomicina consumidas em cada mês desde janeiro até dezembro de 2015, pacientes-dia atendidos pelo HNSC no período e a MIC para vancomicina de todos os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina provenientes de hemoculturas realizadas em pacientes internados no HNSC.

**Endereço:** Rua Sarmiento Leite ,245

**Bairro:** Sarmiento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.820.747

- Os dados sobre a utilização da vancomicina serão expressos em dose diária definida (DDD) por 100 pacientes-dia, e serão processados de acordo com o sistema de classificação Anatomical Therapeutic Chemical da Organização Mundial da Saúde (ATC/WHO)(22). O DDD da vancomicina adotado será de 2 gramas.
- Todos os isolados incluídos estarão previamente identificados pelo Laboratório de Microbiologia, rotineiramente pelo sistema Vitek 2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile / France). A MIC para vancomicina registrado pelo estudo será aquele que foi realizado pelo Laboratório de Microbiologia no momento da realização do exame, seja ele microdiluição em caldo ou e-Test.
- Não haverá qualquer procedimento adicional no Laboratório de Microbiologia, considerando ainda que trata-se de estudo retrospectivo recuperando informações de procedimentos já realizados com os isolados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Todos os termos necessários foram apresentados, inclusive os novos, devidos às readequações necessárias, com a saída de pesquisador e às solicitações anteriores de correção do projeto.

**Recomendações:**

Aprovação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

- Não há pendência, uma vez que as anteriores que existiam foram supridas, conforme consta no relatório do recurso apresentado em anexo.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Emenda aprovada.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Recurso do Parecer	recurso.pdf	12/09/2016 16:19:11		Aceito
Solicitação Assinada pelo Coordenador do CEP	memo_troca_pesquisador12set2016.pdf	12/09/2016 14:35:47	Rogério Farias Bitencourt	Aceito
Notificação do CEP	memo_12set2016.pdf	12/09/2016 14:35:47	Rogério Farias Bitencourt	Aceito
Solicitação Assinada pelo	Pedido_alteracao_pesquisador.pdf	12/09/2016 10:56:11	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito

**Endereço:** Rua Sarmento Leite ,245

**Bairro:** Sarmento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 1.820.747

Pesquisador Responsável	Pedido_alteracao_pesquisador.pdf	12/09/2016 10:56:11	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Recurso do Parecer	recurso.pdf	08/09/2016 19:14:02		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Recurso_Set2016.pdf	08/09/2016 19:13:47	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	TermoanuenciaLACHNSC.pdf	08/09/2016 19:06:27	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	TermoanuenciaCIH_HNSC.pdf	08/09/2016 19:06:19	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	RelacaoIntegratesATUALIZADA_Set2016.pdf	08/09/2016 19:06:10	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proj_Mest_CezarRiche_CEP_Set2016.pdf	08/09/2016 19:05:52	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_736988E1.pdf	13/06/2016 15:35:18		Aceito
Outros	CARTAdEEMENDA.pdf	13/06/2016 15:27:13	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjATUALIZADORelacaoentreConsumodeVancomicinaeaeMICdeisoladosdeMRSA.pdf	13/06/2016 15:26:28	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	TermoanuenciaLabUFCSPA.pdf	13/06/2016 15:25:24	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	RelatoriodeentregaATUALIZADO.pdf	13/06/2016 15:24:22	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	RelacaointegrantesATUALIZADO.pdf	13/06/2016 15:24:02	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	LattesRenatoCassolFerreiradaSilva.pdf	13/06/2016 15:20:45	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	LattesCiceroArmidioGomesDias.pdf	13/06/2016 15:20:26	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	FolhaderostoORIGINAL.pdf	13/06/2016 15:17:45	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoATUALIZADA2016.pdf	13/06/2016 15:16:18	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	Termo de Anuencia.pdf	06/12/2014 20:04:39		Aceito
Outros	Currículo Lattes Diego Rodrigues Falci.pdf	06/12/2014 19:37:06		Aceito
Outros	Currículo Lattes Patrícia Reis Pereira.pdf	06/12/2014 19:36:42		Aceito
Outros	Currículo Lattes Cezar Vinícius Würdig Riche.pdf	06/12/2014 19:36:08		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Rua Sarmento Leite ,245

**Bairro:** Sarmento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.820.747

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 16 de Novembro de 2016

---

**Assinado por:**

**Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima  
(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Sarmiento Leite ,245

**Bairro:** Sarmiento

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3303-8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

## **7.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HNSC**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** RELAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE VANCOMICINA E A CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE ISOLADOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES A METICILINA

**Pesquisador:** Renato Cassol Ferreira da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 39682414.0.0000.5530

**Instituição Proponente:** HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEICAO SA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.751.167

**Apresentação do Projeto:**

Projeto de dissertação de mestrado do PPG de Ciências Médicas da UFCSPA intitulado "Relação entre o consumo de vancomicina e a concentração inibitória mínima de isolados de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina" do pesquisador Cezar Vinícius Würdig Riche (ex-residente HNSC).

O Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram positiva e está entre os principais causadores de infecção de pele e corrente sanguínea. No Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC) o S. aureus é o quarto microrganismo causador de infecção primária de corrente sanguínea e também de pneumonia. O S. aureus resistente a meticilina (MRSA) se tornou um patógeno hospitalar endêmico e as infecções por esse germe estão relacionadas a aumento da morbidade e mortalidade. O antimicrobiano de escolha para tratamento dessas infecções é a vancomicina O aumento da concentração inibitória mínima (MIC) para vancomicina em isolados de MRSA é um fenômeno recente conhecido como "MIC Creep" e pode trazer complicadores para o tratamento com esse antimicrobiano.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo deste trabalho é identificar, traçar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e caracterizar alguns fatores de virulência de isolados de MRSA de exames de hemocultura de pacientes do HNSC. Assim como determinar a distribuição das MIC para vancomicina de isolados

**Endereço:** Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11

**Bairro:** CRISTO REDENTOR

**CEP:** 91.350-200

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3357-2407

**Fax:** (51)3357-2407

**E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 1.751.167

de MRSA de pacientes internados no HNSC e também determinar se existe correlação entre o consumo geral de vancomicina no HNSC e a MIC para vancomicina dos isolados de MRSA.

### 3.1 Objetivo geral

Identificar, traçar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e caracterizar alguns fatores de virulência em cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina isolados a partir de hemoculturas de pacientes internados no Hospital Nossa Senhora da Conceição.

### 3.2 Objetivos específicos

Identificar o gene *mecA* nos isolados de MRSA;

Determinar a presença do gene *lukS-PV* e *lukF-PV* nos isolados;

Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de MRSA;

Realizar a tipagem do elemento SCCmec nos isolados;

Verificar se houve disseminação clonal de MRSA;

Determinar a distribuição, ao longo do tempo (janeiro até dezembro de 2015), da MIC para vancomicina de isolados de MRSA;

Determinar o consumo de vancomicina (em DDD) por paciente-dia ao longo do período analisado;

Determinar se existe correlação entre o consumo de vancomicina (em DDD) e a MIC para vancomicina dos isolados de MRSA no período estudado.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Conforme descrito no projeto;

Riscos:

Não existirá acesso a prontuários, tampouco quaisquer intervenções ou riscos aos pacientes. Como se trata de revisão de dados do HNSC e sem acesso direto a informações de pacientes, consideramos inviável e desnecessária a aplicação de Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

Benefícios:

A descrição dos dados locais do HNSC quanto as bacteremias por *Staphylococcus aureus*, principalmente MRSA, e a pesquisa pelo fenômeno de "MIC creep" para vancomicina são prioridades para o reconhecimento do risco de falha da terapia antimicrobiana para estes pacientes. A avaliação do consumo de vancomicina e relacionar à existência do fenômeno "MIC creep" local ainda não foi relatada. O efeito da pressão seletiva exercida

pelo consumo de antimicrobianos tem sido estudado em grandes centros médicos do mundo, uma vez que as necessidades clínicas atuais requerem cada vez maior de antibioticoterapia.

**Endereço:** Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11

**Bairro:** CRISTO REDENTOR

**CEP:** 91.350-200

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3357-2407

**Fax:** (51)3357-2407

**E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 1.751.167

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Métodos: Estudo transversal observacional. Será confirmada a identificação dos isolados de MRSA e serão pesquisados fatores de virulência – através de testes fenotípicos e genotípicos – assim como será pesquisada a existência de perfil clonal. Também será mensurada a MIC para vancomicina de todos os isolados de MRSA do HNSC no período de janeiro até dezembro 2015. Será mensurado o consumo mensal de vancomicina em DDD (dose diária definida) no período, corrigido pelo número de pacientes-dia atendidos pelo hospital. Serão procedidas medidas de tendência central das variáveis e testes de correlação entre as mesmas.

#### **5.1 Delineamento**

Estudo transversal, observacional.

#### **5.2 Origem das amostras**

##### **5.2.1 Critérios de inclusão**

Serão incluídos no estudo todos os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina provenientes de hemoculturas realizadas em pacientes internados no hospital. Os critérios para solicitação de cultura, os procedimentos operacionais para realização das culturas foram os definidos nas rotinas do HNSC.

Da mesma forma, será contabilizado todo o consumo de vancomicina no período.

##### **5.2.2 Critérios de exclusão**

Serão excluídos os isolados que não possam ser analisados por problemas técnicos e aqueles que não seja possível o resgate da informação sobre a MIC para vancomicina.

#### **5.3 Tamanho da amostra**

Parte-se de uma expectativa de casos baseada no histórico da instituição e da epidemiologia local previamente descrita. Um total entre 30 e 50 isolados é esperado, considerando o período de 12 meses.

#### **5.4 Microbiologia e biologia molecular**

##### **5.4.1 Amostra bacteriana**

Os isolados de MRSA que serão utilizados neste trabalho já foram previamente identificados, durante o ano de 2015, e estão disponíveis no Laboratório de Microbiologia do HNSC. Estes isolados serão encaminhados ao laboratório de Microbiologia da UFCSPA, onde permanecerão armazenados sob resfriamento em Freezer a – 80°C.

O transporte dos isolados será feito por empresa especializada, sendo enviadas juntamente a outros isolados bacterianos rotineiramente encaminhados pelo LAC GHC para o laboratório de Microbiologia da UFCSPA. Seguindo este fluxo já estabelecido não existirá custos adicionais,

**Endereço:** Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11  
**Bairro:** CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3357-2407 **Fax:** (51)3357-2407 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 1.751.167

tampouco alterações nas rotinas dos serviços envolvidos.

Critérios de inclusão: serão incluídos no estudo todos os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina provenientes de hemoculturas realizadas em pacientes internados no hospital. Os critérios para solicitação de cultura, os procedimentos operacionais para realização das culturas foram os definidos nas rotinas do HNSC. Da mesma forma, será contabilizado todo o consumo de vancomicina no período.

Critérios de exclusão: serão excluídos os isolados que não possam ser analisados por problemas técnicos e aqueles que não seja possível o resgate da informação sobre a MIC para vancomicina.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram incluídos na Plataforma Brasil:

1. Projeto atualizado;
2. Lista participantes atualizada com currículos pesquisadores;
3. Referência do GHC;
4. Anuência chefia microbiologia e SCIH;
5. Cronograma atualizado.
6. Orçamento (no projeto).

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências e inadequações apontadas em parecer anterior (versão original do projeto, apresentado como TCR) foram atendidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Recurso do Parecer	recurso.pdf	12/09/2016 16:19:11		Aceito

**Endereço:** Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11  
**Bairro:** CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3357-2407 **Fax:** (51)3357-2407 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

**GRUPO HOSPITALAR  
CONCEIÇÃO/HOSPITAL  
NOSSA SENHORA DA**



Continuação do Parecer: 1.751.167

Solicitação Assinada pelo Coordenador do CEP	memo_troca_pesquisador12set2016.pdf	12/09/2016 14:35:47	Rogério Farias Bitencourt	Aceito
Notificação do CEP	memo_12set2016.pdf	12/09/2016 14:35:47	Rogério Farias Bitencourt	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Pedido_alteracao_pesquisador.pdf	12/09/2016 10:56:11	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Recurso do Parecer	recurso.pdf	08/09/2016 19:14:02		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Recurso_Set2016.pdf	08/09/2016 19:13:47	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	TermoanuenciaLACHNSC.pdf	08/09/2016 19:06:27	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	TermoanuenciaCIH_HNSC.pdf	08/09/2016 19:06:19	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	RelacaoIntegratesATUALIZADA_Set2016.pdf	08/09/2016 19:06:10	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proj_Mest_CezarRiche_CEP_Set2016.pdf	08/09/2016 19:05:52	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_736988E1.pdf	13/06/2016 15:35:18		Aceito
Outros	CARTAdedeEMENDA.pdf	13/06/2016 15:27:13	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjATUALIZADORelacaoentreConsumodeVancomicinaeaeMICdeisoladosdeMRSA.pdf	13/06/2016 15:26:28	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	TermoanuenciaLabUFCSPA.pdf	13/06/2016 15:25:24	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	RelatoriodeentregaATUALIZADO.pdf	13/06/2016 15:24:22	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	RelacaointegrantesATUALIZADO.pdf	13/06/2016 15:24:02	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	LattesRenatoCassolFerreiradaSilva.pdf	13/06/2016 15:20:45	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	LattesCiceroArmidioGomesDias.pdf	13/06/2016 15:20:26	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	FolhaderostoORIGINAL.pdf	13/06/2016 15:17:45	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoATUALIZADA2016.pdf	13/06/2016 15:16:18	Cezar Vinícius Würdig Riche	Aceito
Outros	Termo de Anuencia.pdf	06/12/2014 20:04:39		Aceito
Outros	Currículo Lattes Diego Rodrigues	06/12/2014		Aceito

**Endereço:** Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11  
**Bairro:** CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3357-2407 **Fax:** (51)3357-2407 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

GRUPO HOSPITALAR  
CONCEIÇÃO/HOSPITAL  
NOSSA SENHORA DA



Continuação do Parecer: 1.751.167

Outros	Falci.pdf	19:37:06		Aceito
Outros	Currículo Lattes Patrícia Reis Pereira.pdf	06/12/2014 19:36:42		Aceito
Outros	Currículo Lattes Cezar Vinícius Würdig Riche.pdf	06/12/2014 19:36:08		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 28 de Setembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Daniel Demétrio Faustino da Silva**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11  
**Bairro:** CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3357-2407 **Fax:** (51)3357-2407 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

### 7.3 Produção Científica Complementar

- XIX Congresso Brasileiro de Infectologia  
Fortaleza, CE

Resumo: Relação entre o consumo de vancomicina e a concentração inibitória mínima de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina no Hospital Nossa Senhora da Conceição.

RICHE, CVW; SILVA, RCF; PEREIRA, PR; FERREIRA, JAS; DIAS, CAG; FALCI, DR.

- I Mostra de trabalhos de Ensino Pesquisa e Extensão da UFCSPA  
Porto Alegre, RS

Resumo: Detecção de *mecA* e *lukS-lukF* em *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina de um hospital de grande porte na região sul do Brasil.

NOLL, G; URGELL, AF; SANDRIN, LA; NUNES, MR; CHRISTOPHE, BL; MOTT, MP; RICHE, CVW; CUNHA, GR; DIAS, CAG.

Resumo: Detecção do gene *mecA* e perfil de susceptibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina obtidos em hospital de grande porte de Porto Alegre.

SANDRIN, LA; NUNES, MR; URGELL, AF; NOLL, G; CHRISTOPHE, BL; RICHE, CVW; MOTT, MP; CUNHA, GR; DIAS, CAG.

- Antimicrobial stewardship: a practical and integrated approach  
IJmuiden, Holanda

Resumo: Pre-authorization of strategic antimicrobials.

RICHE, CVW; SILVA, RCF; FALCI, DR.

- IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada  
Porto Alegre, RS

Resumo: Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de hVISA.

RICHE, CVW; ROSSATO, AM; DIAS, CAG; D'AZEVEDO, PA.

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### Introduction

The BJID is an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases (SBI), published by monthly since 1996, from February to December and published by Elsevier Editora Ltda. Produced by the Editor-in-Chief, Dr. Carlos Brites, an editorial board and highly competent associate editors, the production staff and advertising board, the articles and communications published in the BJID aim to be relevant in the broadest sense to all aspects of microbiology, infectious diseases and immune response to infectious agents.

The BJID is one of the most influential publications in its field in Brazil and Latin America with a high impact factor, since its inception it has garnered a growing share of the publishing market.

In addition to six regular issues per year, the BJID published special supplements, conference and seminar, annals and reprints of individual articles, as well as advertising courses, competitions and seminars in all fields of medicine.

### Scope and policy

The aim of the Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID) is to be relevant in the broadest sense to all aspects of Infectious Diseases and its fields. The manuscripts submitted to BJID should develop new concepts or experimental approaches; they have to describe new principles or improvement of an existing method and their results; they have to bring new data about a subject which will be important to physicians; so they could not be a single presentation of known data.

### *Types of article*

Manuscripts may be submitted within designated categories of communication, including:

- Original basic or clinical investigation (original papers);
- Brief reports of new methods or observations (brief communications);
- State-of-the-art presentations or reviews (review or mini review papers);
- Case presentation and discussion (case reports);
- Clinical infectious diseases images;
- Letters to the editor concerning previous publications;
- Editor's corner, containing ideas, hypotheses and comments (Editorial).

### Original articles

It is the most important section of the Journal. Original articles present new data about researches, issues and matters in the field of infectious diseases. These articles should conform strictly to the rules of publication, containing the following sections: abstract, objective or hypothesis, experimental design and methods used (statistical data), essential features of any interventions, main outcome measures, main results of the study, discussion and conclusion. An Original Paper should contain:

- An abstract of no more than 300 words;
- No more than 7 keywords;
- The text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, References);
- No more than 50 references;
- Number of authors should not exceed 10;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be an original paper.

### Brief communications

A brief communication is focused in a single subject, which should be concise and a new point of view presentation of the subject. The scope of this section is intended to be wide and methods, results and discussion should be in the same text. A brief communication should contain:

- An abstract of no more than 200 words;
- No more than 4 keywords;
- Text should not exceed 12 double-spaced typed pages of 23 lines each;
- A maximum of 2 figures or tables (or one of each);
- No more than 20 references;
- The text should not be divided into separate sections;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a brief communication;

- Number of authors should not exceed 5.

### **Review article**

This section is for an updated presentation on a specific topic. This section should contain critical analysis and a new point of view of a relevant area and not a chronological description of the literature. This section aims to raise discussion among readers about controversial issues and the development of concepts in Infectious Diseases. A review article has to bring the new point of view of the focus of the subject. A minireview is focused on a restricted part of a subject. A minireview and review article should contain:

- An abstract of no more than 300 words;
- No more than 7 keywords;
- No more than 80 references;
- The text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles;
- Number of authors should not exceed 5;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a review or mini review article.

### **Case reports**

Reports of clinical cases must contain a brief introduction about the nature of the case diagnosis, whose focus is the importance of the subject. The case has to be described with data and reports of examinations, treatment and prognosis of the case, discussion about the importance of the findings and presentation of the case in relation to literature. A case report should have a special interest to the clinical research community or it has to be a rare case; or to present a new diagnostic method; or new or modified treatment. A case report article should contain:

- An abstract of no more than 150 words;
- No more than 4 keywords;
- No more than 20 references;
- The text may be divided into sections: brief introduction with a review of literature, case reports, and conclusion;
- Number of authors should not exceed 5;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a case report article.

### **Clinical infectious diseases images**

For submission to Clinical Infectious Diseases Images, which is not intended as a vehicle for case reports, all text should contain:

- A minimum of references (no more than 4);
- No abstract;
- The text should be uniform and contain no more than 300 words;
- Number of authors should not exceed 5.

### **Letters to the editor**

Letters may be written in response to previous content published in The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID) or on any topic of general interest or concern. In the first case, the letter must emphasize the main message of the author of the article, focusing the contribution of that scientific article in the medical practice, drawing attention to the reference and impact it had on the community. The Letter to the Editor should contain:

- Title and the text with no more than 23 line pages;
- No more than 5 references;
- Number of authors should not exceed 5.

### **Contact details for submission**

To submit an article to the journal: <http://ees.elsevier.com/bjid> If you have problems with sending or reviewing manuscripts, please contact us by email (ayuda-ees@elsevier.com) or by phone (+34 932 406 176) Monday through Friday, from 9:30 to 18:00 (GMT +1).

### **Page charges**

This journal has no page charges.

### **BEFORE YOU BEGIN**

### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

### **Human and animal rights**

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

### **Conflict of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Clinical trials registry**

Clinical trials must be registered according to WHO recommendation at <http://www.who.int/ictrp/en>. The definition of clinical trial include preliminary trials (phase I): any study with prospective recruiting of subjects to undergo any health-related intervention (drugs, surgical procedures, equipment, behavioral therapies, food regimen, changes in health care) to evaluate the effects on clinical outcomes (any biomedical or health-related parameter, including pharmacokinetics measurements and adverse reactions).

The Journal has the right not to publish trials not complying with these and other legal and ethical standards determined by international guidelines.

## **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

## **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

## **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

## **Role of the Funding Source**

Authors: please indicate any financial support in the cover letter.

## **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

## **Language**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these).

## **Informed consent and patient details**

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

## **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/bjid>.

## **Referees**

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **Additional information**

### *Additional information*

All papers must be submitted in English. Instructions for submission can be found on <http://www.bjid.org.br/instructions>.

## **PREPARATION**

### **Double-blind review**

This journal uses double-blind review, which means that both the reviewer and author name(s) are not allowed to be revealed to one another for a manuscript under review. The identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. For more information please refer to <http://www.elsevier.com/reviewers/peer-review>. To facilitate this, please include the following separately:

*Title page (with author details)*: This should include the title, authors' names and affiliations, and a complete address for the corresponding author including telephone and e-mail address.

*Blinded manuscript (no author details)*: The main body of the paper (including the references, figures, tables and any Acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

- This section should be subdivided by short underscore headings referring to methods used;
- This section cannot contain figures or tables;
- The material and methods used must be carefully described to allow the study repetition and to determine if the results were possible and correct;
- Papers with statistical testing should state the name of the test, the name for each analysis, the comparisons of interest, a justification of that test, the alpha level for all tests, whether the tests were over two-tailed, and the actual p-value for each test;
- Data sets should be summarized with descriptive statistics, which should include then for each data set, a clearly labeled measure of centre (such as the mean or median), and a clearly labeled measure of variability (such as the standard deviation or range).

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

The discussion presents the results comparing and evaluating them to literature and the existing knowledge. References to other studies should appear in the Discussion to compare the data obtained in the methods and results of the paper.

### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, references should be avoided. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide the keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Please consider the manuscript formats to verify the number of keywords.

### Abbreviations

- Do not abbreviate institutions;
- Abbreviations must follow the format of the National Library of Medicine (USA) as in Index Medicus.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

## Artwork

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

## Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

- The data presented in this section have to be oriented by universal units;
- Tables should be clear enough to the readers do not need the text to understand them;
- Tables should be presented on separate pages, portrait orientation, and upright on the page;
- Tables should present a short one-line title in bold;
- Tables have to be numbered consecutively with Arabic numerals in the text;
- Symbols and abbreviations are defined immediately below the table;
- More information about the table should be below the symbols and abbreviations;
- If the table is from another source, the authors must indicate the source and send the permission to the Journal.

### **References**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference style*

Please quote all the authors in works with until six authors; after six authors, quote the first three followed by the expression et al. Reference Manager or Endnote programs are strongly recommended for use adopting the "Vancouver" style.

Examples for reference citation are presented below. Authors should consult NLM's Citing Medicine for additional information on the reference formats.

### **Article**

Turner SW, Young S, Goldblatt J, Landau LI, Le Souëf PN. Child hood asthma and increased airway responsiveness a relationship that begins in infancy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:98-104.  
Chang ML, Yang CW, Chen JC, et al. Disproportional exaggerated arpartate transaminase is a useful prognostic parameter in late leptospirosis. *World J Gastroenterol.* 2005;11:5553-6.

### **Book chapter**

Taylor DM, Personnet J. Epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori* infection. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin J eds. *Infections of the gastrointestinal tract.* New York: Raven Press, 1994.

### **Book**

Polak JM, Van Noordan S. *An introduction to immunochemistry: current techniques and problems.* Oxford, UK: Oxford University Press, 1987.

## Abstract

Blatt SP, Butzin CA, Lucey DR, Melcher GP, Hendrix CR. Anergy status and CD4 CD29 memory T-cells predict progression to AIDS (abstract PoB 3480). In: Program and abstracts: VIII International Conference on AIDS (Amsterdam). Amsterdam: CONGREX Holland, 1992.

### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

## Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

## Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

## Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## AFTER ACCEPTANCE

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

### **AUTHOR INQUIRIES**

You can track your submitted article at [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/89/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/). You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>