



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ana Paula Paes da Costa

**Avaliação comparativa do Phoenix[®], VITEK[®] 2, Etest[®] e Teste de
Microdiluição em Caldo, para determinação do perfil de sensibilidade à
vancomicina em *Staphylococcus aureus* isolado de infecção da corrente
sanguínea**

Rio de Janeiro

2021

Ana Paula Paes da Costa

Avaliação comparativa do Phoenix[®], VITEK[®] 2, Etest[®] e Teste de Microdiluição em Caldo, para determinação do perfil de sensibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus* isolado de infecção da corrente sanguínea

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. José Firmino Nogueira Neto

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C837 Costa, Ana Paula Paes da
Avaliação comparativa do Phoenix®, VITEK® 2, Etest® e Teste de Microdiluição em Caldo, para determinação do perfil de sensibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus* isolado de infecção da corrente sanguínea / Ana Paula Paes da Costa - 2021.

34f.

Orientador: Prof. Dr. José Firmino Nogueira Neto

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. *Staphylococcus aureus* – Teses. 2. *Estafilococos aureos* – Teses. 3. Vancomicina - Teses. 4. Circulação sanguínea – Infecção – Teses. I. Nogueira Neto, José Firmino. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.8.06

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ana Paula Paes da Costa

Avaliação comparativa do Phoenix[®], VITEK[®]2 , Etest[®] e Teste de Microdiluição em Caldo, para determinação do perfil de sensibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus* isolado de infecção da corrente sanguínea

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de maio de 2021.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Firmino Nogueira Neto (Orientador)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dra. Mila Muraro de Almeida

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Cláudia Resende Vieira de Mendonça Souza

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para seguir acreditando no meu sonho. Por ouvir minhas orações, por acalmar e clarear a minha mente em momentos de incerteza e dificuldades.

Agradeço à minha mãe Tania (in memória), a minha filha Beatriz, e ao meu padrasto Agripino, por todo apoio e pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida, pelo suporte em dias difíceis, por vibrarem pelas minhas vitórias e torcer ao meu lado pelas conquistas. Obrigada por voarem junto comigo em dias de sol e por ser meu porto seguro em dias nublados. Nossa união torna esse sonho realidade.

Agradeço aos meus Patrões (Wellington, Allan e Wilton) por acreditarem em mim todo o tempo, aconselhando e me motivando a seguir em frente. Suas palavras sempre me ajudaram a manter o foco, mesmo sabendo que seria necessária muita força e fé para seguir em frente.

Agradeço também ao Dr. Professor Firmino, por toda compreensão ao longo desses anos, e pacientemente me aconselhar sobre os desafios que estavam por vir e por torcer, incansavelmente, pela realização do meu sonho.

Agradeço ao Professor Dr. Robson Leão, que permitiu que tudo acontecesse, por ter acreditado em mim e por ter feito do meu sonho, seu também, foi a luz do meu caminho.

Agradeço a todos os professores, em especial a Simone, a Lia e aos colegas que entraram junto comigo e aos amigos que ganhei ao longo da jornada, como Luciano Carius.

Agradeço ao Professor Dr. Mario Bernardo Filho, a Dra. Danubia de Sá Caputo, Laisa Paineiras, Cintia e toda equipe do LAVIMPI, porque lá eu vi a responsabilidade e o comprometimento que todo pesquisador deve ter para fazer a diferença na vida das pessoas.

Para finalizar agradeço aos meus amigos do coração, Camila Oliveira, Cristiano Cruz, Douglas Guedes, e Jéssica Lagarto, pela amizade, mais principalmente por ter segurado a minha mão e ter andando junto comigo em momentos que achei que não seria possível. Agradeço pelos conselhos e pelo carinho, que foram determinantes pra mim nessa jornada.

O líder, diante de um problema, não perde tempo buscando culpados e, sim, busca soluções.

Moabe Teles

RESUMO

COSTA, Ana Paula Paes da. **Avaliação comparativa do Phoenix[®], VITEK[®] 2, Etest[®] e Teste de Microdiluição em Caldo, para determinação do perfil de sensibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus* isolado de infecção da corrente sanguínea 2021.** 34f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Insituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Bacteremia por *Staphylococcus aureus* causa morbidade e mortalidade significativas, principalmente causadas por *S.aureus* resistente à meticilina (MRSA). Atualmente, a vancomicina é uma das principais drogas de escolha para o tratamento das infecções por MRSA. A microdiluição em caldo (MDC) continua sendo a metodologia considerada padrão-ouro para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para a vancomicina. A maioria dos laboratórios clínicos empregam métodos mais práticos nas rotinas, porém esses métodos podem não determinar os valores de CIM para a vancomicina com precisão. Este estudo teve como objetivo avaliar a acurácia dos valores de CIM obtidos através dos sistemas automatizados Vitek System[®] 2 e BD Phoenix 100[®], bem como do teste de fita gradiente Etest[®], frente aos valores obtidos por MDC. Um total de 78 amostras (n=27 de *S. aureus* sensível à meticilina e n=51 de MRSA) foram isoladas de infecções da corrente sanguínea de pacientes internados em um Hospital Universitário, na cidade do Rio de Janeiro. A CIM para a vancomicina foi determinada seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e dos fabricantes dos sistemas comerciais analisados. Também realizamos a tipagem *SCCmec* a fim de estabelecer uma possível correlação dos tipos encontrados com os valores de CIMs verificados na análise. A maioria dos isolados apresentou valores de CIM de 1µg/mL por MDC e através do BD Phoenix100[®]. Etest[®] e VITEK System[®]2 determinaram para a maior parte dos isolados CIM de 1,5 e 0,5 µg/mL para a vancomicina, respectivamente. Assim, Etest[®] e VITEK System[®]2 tenderam a superestimar e subestimar, respectivamente, os valores de CIM. Três isolados MRSA, sensíveis à vancomicina pela MDC, eram intermediários à vancomicina pelo Etest[®]. Os tipos *SCCmec* II (39%) e IV (51%) foram os mais frequentes, não havendo relação entre o tipo de *SCCmec* e os valores de CIM. Os resultados mostraram que as CIMs para a vancomicina variam de acordo com o método utilizado. É essencial que os médicos considerem que os valores das CIMs podem ser diferentes, dependendo do método utilizado, uma vez que o valor da CIM é geralmente um dos parâmetros laboratoriais mais empregados pelos médicos para selecionar a terapia mais apropriada.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Vancomicina. Infecção da corrente sanguínea.

ABSTRACT

COSTA, Ana Paula Paes da. **Evaluation of the Phoenix[®], VITEK[®] 2, Etest[®] and broth microdilution test for susceptibility determination of *Staphylococcus aureus* to vancomycin in bloodstream infections.** 2021. 34f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Staphylococcus aureus bacteremia causes significant morbidity and mortality, mainly by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Currently, vancomycin is the main choice for treatment of MRSA infections. Broth microdilution (BMD) remains the gold standard test for measuring vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC). However, most clinical laboratories use practical methods in the routines, but these methods may not determine vancomycin MIC values accurately. The aim of this study was to evaluate the accuracy of VITEK[®]2, Phoenix[®], Etest[®] methods to determine MIC values against BMD. A total of 78 strains (27 methicillin-sensitive *S. aureus* and 51 MRSA) were isolated from bloodstream infections on patients admitted to an University Hospital in Rio de Janeiro city, Brazil. The vancomycin MIC was determined following *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) and the manufacturers' recommendations. Also was performed SCC*mec* typing, in order to identify a possible correlation between the types found with vancomycin MIC values verified in this analysis. Most of all isolates showed values of MIC = 1 µg/mL by BMD and Phoenix[®], while Etest[®] and VITEK[®] 2 determined the majority with MIC = 1.5 and 0.5 µg/mL, respectively. Thus, Etest[®] and VITEK[®] 2 tended to overestimate and underestimate, respectively, the MIC values. Three MRSA isolates that were vancomycin susceptible by BMD were considered vancomycin-intermediate by Etest[®]. The SCC*mec* II (39%) and IV (51%) types were the most frequent, and there was no correlation between the type of SCC*mec* and the MIC values. The results showed that vancomycin MICs vary according to the test method. It is essential that attending physicians consider the differences in MIC results determined by different methods, since the MIC value is generally one of the laboratorial parameters used to select the appropriate therapy.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Vancomycin. Bloodstream infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio agar-sangue.....	13
Figura 2 –	Técnicas utilizadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima, para vancomicina.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição dos valores de CIMs frente a vancomicina, entre as amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , de acordo com o método.....	18
Tabela 2 –	Estatísticas descritivas de todos os valores de CIMs determinados por cada método.....	20
Tabela 3 –	Concordância categórica entre os sistemas BD Phoenix100 [®] , VITEK System [®] 2 e Etest [®] em comparação com o método de microdiluição em caldo.....	21
Tabela 4 –	Diferenças estatísticas entre os três métodos em comparação com o método de microdiluição em caldo usando o teste de comparação múltipla de Dunn.....	22

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	OBJETIVOS	12
1.1	Geral	12
1.2	Específicos	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1	Isolados bacterianos	14
2.2	Determinação de Concentração Inibitória Mínima para a Vancomicina	14
2.2.1	<u>Microdiluição em Caldo</u>	14
2.2.2	<u>Determinação da CIM por Sistemas Comerciais</u>	15
2.3	Tipagem molecular (SCC<i>mec</i>)	16
2.4	Análise estatística	17
2.5	Comitê de Ética	17
3	RESULTADOS	18
4	DISCUSSÃO	23
	CONCLUSÕES	27
	REFERÊNCIAS	28
	APÊNDICE – <i>Comparative evaluation of the BD Phoenix100[®], VITEK System[®]2 and Etest[®] and microdilution test for vancomycin susceptibility testing in Staphylococcus aureus isolated from bloodstream infection (Manuscrito submetido à revista Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences, BJHBS)</i>	33
	ANEXO - Comprovante de submissão do artigo.....	31

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma das principais causas de bacteremia, com mortalidade estimada em 20% da população mundial^{1,2}. A bacteremia causada por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) está associada a piores desfechos clínicos, apresentando taxas mais altas de morbidade e mortalidade do que a bacteremia por *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA)³.

A resistência à meticilina é mediada pela aquisição do gene *mecA*, que está localizado dentro do elemento genético móvel *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*). Atualmente, 13 tipos de SCC*mec* foram descritos, entre eles, os tipos I – V de SCC*mec* são mais relatados^{4,5}.

Os antimicrobianos recomendados para o tratamento da bacteremia causada por MSSA incluem penicilinas resistentes à β -lactamase, como a oxacilina. A vancomicina é o tratamento de primeira linha para bacteremia por MRSA⁶.

Embora as cepas não suscetíveis à vancomicina permaneçam raras, uma proporção crescente de isolados de MRSA com Concentração Inibitória Mínimas (CIMs), elevados foi observada dentro da faixa de suscetibilidade em todo o mundo, incluindo o Brasil (MIC *creep* para a vancomicina)^{7,8}. No entanto, a interpretação da literatura sobre o “MIC *creep*” para a vancomicina é complicada devido a inconsistências dos métodos de teste de suscetibilidade⁹. Foi sugerido que há um risco aumentado de falha do tratamento na bacteremia por MRSA causada por cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina¹⁰⁻¹², embora resultados conflitantes tenham sido publicados¹³⁻¹⁴. As diferenças entre esses achados podem ser explicadas pela metodologia realizada para determinação da CIM, pois diferenças na metodologia são bem conhecidas por afetarem o valor da CIM, simultaneamente podem ter consequências significativas para os pacientes^{9,15}.

Diferentes metodologias estão disponíveis para a verificação dos valores de CIMs frente aos antimicrobianos, incluindo a vancomicina. Em 2019, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), a microdiluição em caldo (MDC) é considerada o padrão ouro para medir a CIM para a vancomicina. No entanto, a MDC é comumente considerada um método trabalhoso e caro, raramente realizado em diagnósticos de rotina¹⁶. Portanto, a maioria dos laboratórios clínicos utilizam métodos como os testes epsilométricos e os sistemas automatizados para determinação da CIM para a vancomicina. No entanto, essas metodologias alternativas ao

método de referência de microdiluição em caldo podem não ser suficientemente precisas, comprometendo o resultado clínico do paciente, uma vez que a determinação da CIM para a vancomicina é utilizada para adequar o tratamento de infecção por MRSA, podendo influenciar no desfecho clínico do paciente.^{17,18}

A determinação do valor de CIM geralmente é um dos parâmetros laboratoriais utilizados pelos médicos em associação a condição clínica, hemodinâmica e metabólica do paciente, para selecionar a terapia apropriada, o que enfatiza ainda mais a sua importância.

Assim, uma avaliação mais robusta das metodologias alternativas para a MDC é necessária, uma vez que os resultados obtidos influenciam diretamente na evolução clínica dos pacientes¹⁹. Além disso, características específicas do microrganismo *S. aureus*, como por exemplo, tipos de *SCCmec*, do tipo I ao V são os mais relatados e estão associados à CIM elevada de vancomicina^{20,21}. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia de vários métodos na determinação da CIM para a vancomicina entre isolados clínicos de MRSA / MSSA da corrente sanguínea em comparação com o método padrão ouro de MDC. Também realizamos a tipagem *SCCmec* e a correlação entre os valores de CIM frente a vancomicina, entre os diferentes tipos observados.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar a acurácia de vários métodos na determinação da CIM para a vancomicina entre isolados clínicos de MRSA / MSSA, da corrente sanguínea em comparação com o método considerado padrão ouro, microdiluição em caldo (MDC).

1.2 Específicos

Os objetivos específicos são:

- a) determinar a CIM para vancomicina, através do teste MDC;
- b) determinar a CIM para a vancomicina, através do teste de gradiente de concentração Etest[®];
- c) determinar a CIM para a vancomicina em dois sistemas automatizados, VITEK System[®]2 e BD Phoenix100[®];
- d) determinar a CIM para inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados (CIM⁵⁰ e CIM⁹⁰);
- e) realizar a tipagem SCCmec nas amostras de MRSA e avaliar a ocorrência de correlação entre os diferentes tipos SCCmec e os valores de CIMs;
- f) avaliar a correlação das diferentes metodologias frente à técnica padrão-ouro, para determinação da CIM da vancomicina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolados bacterianos

Um total de 78 amostras de *S. aureus*, incluindo 51 MRSA e 27 MSSA, isolados da corrente sanguínea foram analisadas, sendo que apenas um isolado por paciente foi incluído. Todos os isolados foram obtidos durante a rotina laboratorial do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), no período de 2012 a 2015. As amostras foram estocadas em tubos de 1 mL contendo uma solução a base de leite desnatado a 10% (*Skim Milk*, DifcoLabs, Michigan, USA) e glicerol a 10%, sendo conservadas em freezer a -20 °C, na coleção de bactérias do laboratório 2 do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DMIP/FCM/UERJ).

Os isolados foram identificados pelo VITEK System[®]2 (GP ID card, BioMérieux, França) como *S. aureus* e confirmados pela metodologia clássica, a saber, análise morfológica pela técnica de coloração de Gram, teste da catalase, fermentação do manitol, e prova da coagulase²². A resistência à metilicina foi verificada e confirmada com cefoxitina 30ug (Becton, Dickinson and Company, Sparks, EUA), através do método de difusão em agar (CLSI 2019).

Figura 1 – Colônias de *Staphylococcus aureus* em agar-sangue



Fonte: Santos et al.²³

2.2 Determinação de Concentração Inibitória Mínima para a Vancomicina

2.2.1 Microdiluição em Caldo

O teste de sensibilidade à vancomicina foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, com diluições seriadas de vancomicina, considerado o padrão ouro (CLSI 2019, BrCast/EUCAST, 2019).

O meio utilizado para a realização deste teste foi o caldo *Mueller-Hinton* (Difco, Le Pont-de-Claix, França) ajustado no momento do uso com os cátions cálcio e magnésio - CAMHB (*cation-adjusted Mueller-Hinton broth*).

Para confecção da solução de uso, foram utilizados 4992 μL do caldo CAMHB e 8 μL da solução estoque do agente antimicrobiano, totalizando um volume final de 5 mL. Para cada amostra foram utilizados 12 poços de uma microplaca com 96 poços com fundo em forma de “U”, onde foram adicionados 200 μL da solução de uso no primeiro poço, e nos demais 11 poços, apenas 100 μL de CAMHB. Posteriormente, foi executado o método de diluição seriada, retirando do primeiro poço 100 μL da solução de uso e transferidos para o poço posterior, seguido de homogeneização. Este processo foi executado até o décimo primeiro poço, e os 100 μL restantes, provenientes do método de diluição seriada, foram descartados, obtendo as seguintes diluições de antimicrobiano em cada poço: 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 e 0.0156 $\mu\text{g/mL}$. O último poço permaneceu somente com o CAMHB, a fim de ser usado como controle de crescimento bacteriano.

A partir de uma cultura crescida, foi feita a suspensão bacteriana para o preparo do inóculo, adicionando-se as colônias bacterianas em um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada, gerando uma turbidez que foi ajustada ao equivalente a 0,5 de *McFarland* (1×10^8 UFC/mL) através da comparação visual com um tubo de ensaio com a turbidez padronizada. Tal suspensão foi diluída 1:10 com solução salina estéril, e 100 μL da suspensão bacteriana padronizada (1×10^8 UFC/mL), resultando em uma suspensão bacteriana com concentração de 10^7 UFC/mL. Desta suspensão, foram adicionados 5 μL em todos os 12 poços, obtendo em cada poço uma concentração bacteriana em torno de 5×10^4 a 10^5 UFC/mL, e a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, procedendo a partir daí, a leitura, a qual considera o primeiro poço

límpido como a CIM a ser reportada.

As seguintes cepas foram usadas como controles: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, com faixa aceitável entre 1 – 4 µg/mL; e *S. aureus* ATCC 29213, com faixa aceitável entre 0,5 e 2 µg/mL

2.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima por Sistemas Comerciais

A CIM também foi avaliada por sistemas comerciais automatizados e manuais. Foram utilizados os sistemas automatizados BD Phoenix100[®] (BD Diagnostics, Reino Unido) versão V6.21A, com o tipo de painel PMIC/ID-89 com intervalo de concentração de vancomicina de 0,5 a 16 µg / mL e o sistema VITEK System[®]2 (BioMérieux, França) versão 06.01, o tipo de cartão AST-P585 com as diluições de concentração de vancomicina variam de 1, 2, 4, 8 e 16 µg/mL.

O sistema Vitek System[®]2, apesar de apresentar intervalo de concentração iniciando em 1, realiza a liberação de resultados de 0,5 através de algoritmo de CIM calculada.

A preparação dos painéis do BD Phoenix100[®] e dos cartões do VITEK System[®]2 foram feitas de acordo com as orientações presentes nas instruções de uso dos kits dos fabricantes.

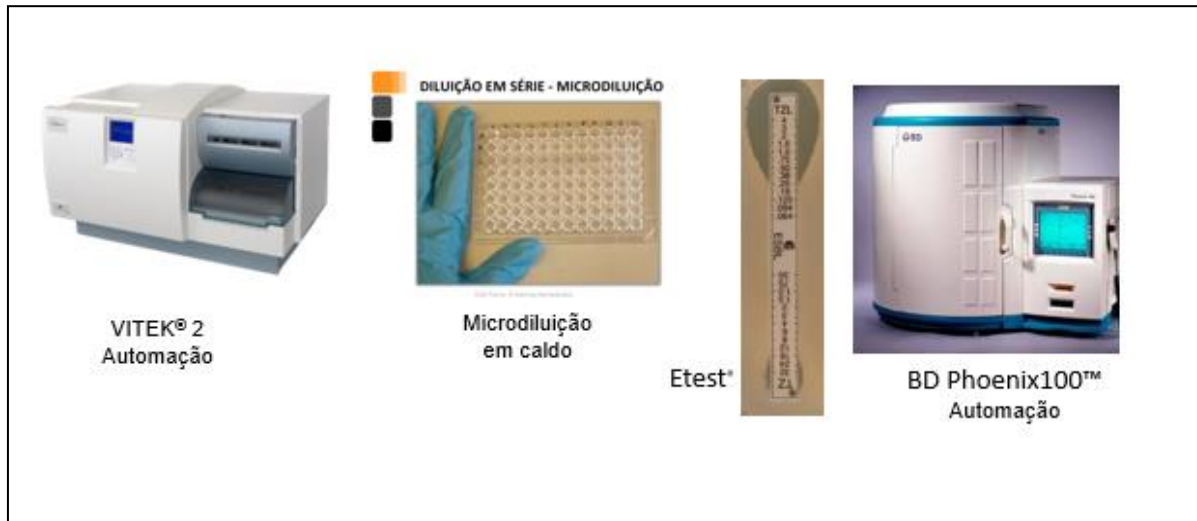
Como teste comercial manual, utilizou-se o teste epsilométrico Etest[®] (BioMérieux, França), apresentando tiras de gradiente com concentrações para a vancomicina variando de 0,016 a 256 µg/mL. A partir da suspensão bacteriana padronizada (1×10^8 UFC/mL), com o auxílio de um swab estéril, foi realizada a semeadura em placa de petri contendo *Ágar Mueller-Hinton* em todas as direções da placa, de forma a obter um crescimento confluyente. Com o auxílio de uma pinça estéril, foi colocada a tira de Etest[®] no centro da placa, e a mesma foi incubada em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h e após isso, realizada a leitura para aferição visual da CIM, através da leitura da zona de inibição em elipse, formada após a incubação.

Em 2018, foi estabelecido através dos comitês de padronização (CLSI e EUCAST/BrCast), que o ponto de corte para *S. aureus* sensível a meticilina é de ≤ 2 µg/mL; sendo que para valores > 2 µg/mL, a amostra é considerada resistente à meticilina (MRSA).

As cepas padrão de *S. aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

foram utilizadas como controle de qualidade.

Figura 2 - Técnicas utilizadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima, para vancomicina



Nota: Microdiluição em caldo e Etest® são técnicas manuais para a identificação da CIM e VITEK® 2 e BD Phoenix100® são técnicas automatizadas.

Fonte: Biomerieux²⁴, BD Phoenix²⁵, Clickfarma²⁶

2.3 Tipagem molecular (SCC_{mec})

A determinação dos tipos de SCC_{mec} foi realizada utilizando a técnica de PCR Multiplex, conforme o protocolo desenvolvido por Boye et al. (2007), com algumas modificações. Foram utilizados quatro pares de *primers*, tornando possível a determinação de cinco tipos de SCC_{mec} (I, II, III, IV e V).

Para a PCR, foram utilizadas as seguintes condições para a reação: 1X PCR buffer, 0,5 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP's), 3 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada *primer*, 1 U/μL da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e 3 μL de DNA bacteriano extraído. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 μL, assim, foram utilizados os seguintes volumes dos reagentes para cada amostra: 16 μL de água deionizada do tipo Milli-Q esterilizada; 2,5 μL de PCR buffer; 0,5 μL de dNTP's; 1,5 μL de MgCl₂; 0,2 μL dos *primers* β e α3; 0,25 μL dos *primers* ccrCF e ccrCR; 0,1 μL dos *primers* 1272F1 e 1272R1; 0,1 μL dos *primers* 5R_{mecA} e 5R431; 0,2 μL da enzima Taq DNA polymerase; e 3 μL do DNA bacteriano previamente extraído. As amplificações foram

realizadas utilizando o termociclador GeneAmp[®] PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) programado para um ciclo de 94°C durante 4 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C durante 90 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.²¹.

Como controle da PCR, foi utilizado como controle branco um microtubo com os reagentes sem DNA, e como controles positivos foram utilizadas duas amostras já tipificadas como sendo SCC*mec* IV e SCC*mec* V.

2.4 Análise estatística

As comparações entre os grupos foram feitas com estatística descritiva, com base na média, desvio padrão e coeficiente de variação. Antes do teste estatístico, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar as variáveis para distribuição normal. Como as amostras não apresentaram distribuição normal, a análise estatística foi realizada com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn para comparações entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Além disso, a concentração necessária para inibir 50% (CIM50) e 90% (CIM90) dos isolados foi calculada para cada método. Em comparação com a MDC, a concordância categórica entre os métodos de teste foi avaliada de acordo com o ponto de corte estabelecido pelos comitês CLSI e EUCAST/BrCast, que é de $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ e o ponto de corte sugerido pelos estudos clínicos, de $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, para a sensibilidade reduzida.^{28,29}

2.5 Comitê de Ética

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética sob o número: CCAE 41957920.300005259.

3 RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os valores de CIM para a vancomicina obtidos através dos quatro métodos, em relação ao grupo total e aos subgrupos de isolados MSSA e MRSA. No geral, pela MDC, todos, exceto um isolado (CIM = 2 µg / mL), tiveram CIMs ≤1 µg / mL. Da mesma forma, todos os isolados tiveram CIMs ≤1 µg / mL por VITEK System®2. Por outro lado, BD Phoenix100® e Etest® tiveram valores de CIM > 1 µg / mL, com uma frequência de 9% e 63% em todos os isolados testados, respectivamente. No grupo MSSA, apenas Etest® determinou valores CIM > 1 µg / mL. Notavelmente, todos os isolados determinados com CIM > 1 µg / mL por MDC e BD Phoenix100® pertenciam ao grupo MRSA. No geral, MDC e BD Phoenix100® tenderam a determinar valores de CIM = 1 µg / mL, enquanto VITEK System®2 e Etest® determinaram a maioria com CIM = 0,5 µg / mL e 1,5 µg / mL, respectivamente. Três isolados de MRSA que eram sensíveis à vancomicina pelo método de MDC eram intermediários à vancomicina pelo Etest® (CIM > 2 µg / mL). Todos os isolados apresentaram CIM50 e CIM90 de ≤1 µg / mL para MDC, BD Phoenix100® e VITEK System®2, exceto o grupo MRSA para BDPhoenix100®, que apresentou CIM90 de 2 µg / mL. Por outro lado, o Etest® foi o único método que apresentou valores de CIM50 e CIM90 > 1 µg / mL.

Tabela 1 – Distribuição dos valores de CIMs frente a vancomicina, entre as amostras de *Staphylococcus aureus*, de acordo com o método

Método	Nº. de isolados (%) valor de CIM							
	≤ 0.5	1	1.5*	2	3*	4	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Total de amostras (n= 78)								
MDC	12 (15.4)	65 (83.3)	-	1 (1.3)	-	-	1	1
Phoenix®	3 (3.8)	68 (87.2)	-	7 (9)	-	-	1	1
VITEK® 2	65 (83)	13 (17)	-	-	-	-	0.5	1

Etest [®]	5 (6)	24 (31)	32 (41)	14 (18)	1 (1)	2 (3)	1	1.5
MSSA (n= 27)								
MDC	11 (41)	16 (59)	-	-	-	-	1	1
Phoenix [®]	3 (11)	24 (89)	-	-	-	-	1	1
VITEK [®] 2	23 (85)	4 (15)	-	-	-	-	0.5	1
Etest [®]	4 (15)	10 (37)	11 (41) ⁸	2 (7)*	-	-	1	1.5
MRSA (n= 51)								
MDC	1 (2)	49 (96)	-	1 (2)	-	-	1	1
Phoenix [®]	-	44 (86.3)	-	7(13.7)	-	-	1	2
VITEK [®] 2	42 (82)	9 (18)	-	-	-	-	0.5	1
Etest [®]	1 (2)	14 (27)	21(41)*	12 (24)	1 (2)*	2(4)8*	1.5	2

Legenda: MDC: Microdiluição em Caldo; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; MSSA: *S. Aureus* susceptível à metilicina; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM⁵⁰: concentração que inibiu o crescimento de 50% dos isolados; CIM⁹⁰: concentração que inibiu o crescimento de 90% dos isolados; *concentração presente apenas no Etest[®].

Fonte: A autora, 2021.

No grupo MRSA, a média de CIM de vancomicina para o BD Phoenix100[®] foi 1,14 µg / mL, valor mais próximo da MDC (1,01 µg / mL). As CIMs determinadas pelo VITEK System[®] 2 foram frequentemente menores, apresentando valores médios menores. O Etest[®] teve maior discordância com as médias das CIMs pela MDC nos três grupos (todas as cepas, MSSA e MRSA). Já o sistema BD Phoenix100[®] apresentou valores mais próximos do coeficiente de variação da MDC. O Etest[®] apresentou valores maiores para o coeficiente de variação, mostrando que houve alta variabilidade dos valores da CIM em relação ao método de referência (Tabela 2).

Tabela 2 - Estatísticas descritivas de todos os valores de CIMs determinados por cada método

Método	Significância ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão	Coefficiente de variação
Total de amostras (n= 78)			
MDC	0.94	0.22	23.5
Phoenix [®]	1.1	0.31	28.9
VITEK [®] 2	0.59	0.19	32.9
Etest [®]	1.46	0.62	42.3
MSSA (n= 27)			
MDC	0.80	0.25	31.44
Phoenix [®]	0.94	0.16	16.95
VITEK [®] 2	0.57	0.18	31.53
Etest [®]	1.20	0.42	35.05
MRSA (n= 51)			
MDC	1.01	0.16	15.62
Phoenix [®]	1.14	0.35	30.56
VITEK [®] 2	0.60	0.20	33.78
Etest [®]	1.59	0.67	41.89

Legenda: MDC: Microdiluição em Caldo; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MSSA: *S. aureus* susceptível à meticilina; CIM: concentração inibitória mínima.

Fonte: A autora, 2021.

As concordâncias categóricas para os três métodos, em comparação com a MDC, são mostradas na Tabela 3. VITEK System[®] 2 e BD Phoenix100[®] mostraram um alto nível de concordância entre os pontos de corte com CIMs do ensaio de MDC, considerado padrão ouro. Etest[®] teve uma boa concordância apenas no ponto de interrupção $\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Tabela 3 - Concordância categórica entre BD Phoenix100[®], VITEK System2[®] e Etest[®] em comparação com o método de microdiluição em caldo

Ponto de corte ($\mu\text{g/mL}$)	(%) Total de amostras	(%) MSSA	(%) MRSA
Phoenix [®]			
≤ 2	100	100	100
≤ 1	91	100	86.3
VITEK [®] 2			
≤ 2	100	100	100
≤ 1	98.7	100	98
Etest [®]			
≤ 2	96.1	92.6	94.1
≤ 1	33.3	51.9	31.4

Legenda: MSSA: *Staphylococcus aureus* susceptível à meticilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Fonte: A autora, 2021.

Diferenças significativas (teste de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$) foram detectadas entre os quatro métodos, nos três grupos de isolados (todas as cepas, MSSA e MRSA). A comparação par a par não paramétrica de Dunn, testando após um Kruskal-Wallis significativo, foi calculada usando MDC como o método de referência. Assim, em todos os grupos (todas as cepas, MSSA e MRSA), foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a MDC e VITEK System[®]2, e entre a MDC e o Etest[®]. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o MDC e o BD Phoenix100[®] ($P > 0,05$) (Tabela 4).

Entre os 51 isolados de MRSA, 2 (4%) abrigavam o SCCmec I, 20 (39%) o SCCmec II, 1 (2%) o SCCmec III, 26 (51%) o SCCmec IV e 1 (2%) o SCCmec V. Não foi possível determinar o tipo de SCCmec de um isolado (MRSA) (2%). Não houve correlação entre a classificação SCCmec e as CIMs em nosso estudo, uma vez que 99% das CIMs por MDC apresentaram valores $\leq 1 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 4 - Diferenças estatísticas entre os três métodos em comparação com o método de microdiluição em caldo usando o teste de comparação múltipla de Dunn

Método	Total de amostras	P-valor
Phoenix®		0.1883
VITEK® 2		<0.0001
Etest®		<0.0001
Método	MSSA	P-valor
Phoenix®		0.2044
VITEK® 2		0.0187
Etest®		0.0007
Método	MRSA	P-valor
Phoenix®		0.7435
VITEK® 2		<0.0001
Etest®		<0.0001

Legenda: MSSA: *Staphylococcus aureus* susceptível à meticilina;

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Fonte: A autora, 2021.

4 DISCUSSÃO

O método de determinação do perfil de suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos em laboratórios de microbiologia clínica precisa ser de fácil execução, confiável e precisa, pois influenciam a tomada de decisão terapêutica. De acordo com o CLSI e o EUCAST/BrCast, a microdiluição em caldo (MDC) é considerada o padrão ouro para determinar a suscetibilidade do *S.aureus* à vancomicina, porém esse procedimento é trabalhoso e não é usado rotineiramente em laboratórios clínicos. A maioria dos laboratórios clínicos utilizam testes epsolométricos como o Etest[®] e sistemas automatizados de baseados na MDC para medir a CIM de vancomicina¹⁶. No entanto, existe uma variabilidade sutil nos valores de CIM para a vancomicina obtidos com diferentes metodologias, o que é um problema, visto que o valor de CIM é um dos parâmetros para a escolha da terapia²⁸. Assim, métodos confiáveis e de maior facilidade de implementação na rotina laboratorial para verificar o perfil de suscetibilidade de *S.aureus* à vancomicina, são necessários para prever a resposta clínica apropriada.

Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina (CIM ≤ 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$) por MDC, BD Phoenix100[®] e VITEK System^{®2}; exceto para Etest[®], que determinou três isolados com CIM > 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Neste estudo, em todas as cepas (n = 78), as CIMs de vancomicina obtidas por Etest[®] foram consistentemente maiores (média de 1,46 $\mu\text{g} / \text{mL}$), enquanto VITEK System^{®2} apresentou valores de CIM menores (média de 0,59 $\mu\text{g} / \text{mL}$), quando comparadas com MDC (média de 0,94 $\mu\text{g} / \text{mL}$), demonstrando que o Etest[®] e o VITEK Sytem^{®2} tendem a superestimar e subestimar o valor da CIM, respectivamente. Os valores de CIM para a vancomicina obtidos pelo BD Phoenix100[®] (média 1,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$) correlacionaram-se melhor com o método de MDC.

Um estudo nos EUA fez uma análise comparativa entre metodologias comerciais, incluindo BD Phoenix100[®], Etest[®] e VITEK System^{®2}, com a metodologia padrão de MDC para medir a CIM frente a vancomicina de 200 amostras MRSA isoladas de sangue, mais 10 cepas controle²⁹. Em seu estudo, os resultados mostraram que 60% dos isolados submetidos ao Etest[®] apresentaram CIMs com 1 diluição a mais do que os CIMs determinados pela MDC; enquanto o VITEK System^{® 2} e os sistemas BD Phoenix[®] foram mais propensos a subestimar a CIM em 1 diluição em 32,3% e 26,7% dos isolados, respectivamente. Semelhante ao estudo atual, VITEK System^{® 2} e Etest[®] também tenderam a subestimar e superestimar os valores de CIM em 74% (58/78) e 68% (58/78) dos isolados,

respectivamente; entretanto, o sistema BD Phoenix100[®] tendeu a superestimar a CIM em 20% (18/78) dos isolados. Da mesma forma, Rybak et al., em seu estudo também relataram que BD Phoenix100[®] (66,2%) foi o método com maior concordância com os valores de CIM pelo método de referência²⁹.

No estudo atual, mostramos que as CIMs determinadas por VITEK System[®] 2 tendem a apresentar valores de 0,5 µg/mL (65/78, 83%), enquanto o Etest[®] tende a resultar em valores > 1 µg/mL (49/78, 63%), discordando da metodologia padrão ouro, que tendeu a relatar valores iguais a 1 µg/mL (65/78, 83,3%). Similarmente ao MDC, o sistema BD Phoenix 100[®] tendeu a ter CIM igual a 1 µg/mL (68/78, 87,2%). Um estudo realizado no Texas, com 161 amostras de *S. aureus* obtidas a partir de hemoculturas, mostrou que 59% das amostras submetidas ao Etest[®] apresentaram CIM para vancomicina de 1,5 µg/mL e aproximadamente 20% das amostras foram determinadas com CIM de 2 µg/mL, enquanto o VITEK System[®] 2 apresentou aproximadamente 90% das amostras com CIM de 0,5 µg/mL, concordando com a MDC. Neste mesmo estudo, o sistema BD Phoenix100[®] tendeu a determinar CIM de 0,5 µg/mL, discordando dos dados encontrados em nosso estudo^{30, 31}.

O único isolado (MRSA) com CIM = 2 µg/mL por MDC foi determinado com CIM de 1 µg / mL por VITEKSystem[®] 2 e BD Phoenix100[®], mesmo este último tendendo a aumentar a CIM, na única amostra com CIM de 2 µg/mL, ele não detectou, e quando testado com Etest[®], o isolado teve CIM de 3 µg/mL. Um estudo anterior, que determinou a suscetibilidade à vancomicina de 129 isolados de *S. aureus* da coleção do CDC (Centros de Controle e Prevenção de Doenças), mostrou que o Etest[®] e o sistema BD Phoenix100[®] tendiam a categorizar cepas de VSSA (*S.aureus* suscetível à vancomicina) como VISA (vancomicina-intermediário *S. aureus*), enquanto VITEK System[®] 2 tendeu a categorizar cepas VISA como VSSA³². Discrepâncias nos valores da CIM para a vancomicina, mesmo que pequenas, podem ter consequências relevantes para o paciente, devido à janela terapêutica estreita da vancomicina ou à categorização incorreta da CIM, como determinar VSSA uma cepa que é VISA⁸.

Nossos resultados mostram o risco do sistema automatizado VITEK System[®] 2 em subestimar os valores de CIM, principalmente quando há subpopulações VISA (hVISA - *S. aureus* intermediário de vancomicina heterorresistente). Subestimar os valores de CIM pode levar a resultados terapêuticos graves ou risco de falha, uma vez que os médicos normalmente não alteram a terapia para isolados com CIMs ≤ 1 µg / mL de vancomicina²⁵. A CIM da vancomicina em cepas MRSA com valores entre 1-2 µg/mL tem maior probabilidade de resultar em falha no tratamento com vancomicina, devido à possível presença de

subpopulações VISA, sendo consideradas terapias alternativas em pacientes com infecções persistentes, como bacteremia. Uma vez que hVISA é associado a resultados insatisfatórios, é de grande importância que uma metodologia tenha a capacidade de distinguir os valores de CIM entre 1 e 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de vancomicina³³⁻³⁵.

Os resultados encontrados para o ponto de corte para susceptibilidade à vancomicina em *S. aureus* ajustado para $\leq 1 \mu\text{g} / \text{mL}$, que é o ponto de corte sugerido pelos estudos para melhores resultados clínicos²², mostraram que apenas 37% dos isolados (29 / 78) seriam categorizados como VSSA por Etest[®]. Ao contrário, 98,7% e 100% dos isolados submetidos ao BD Phoenix100[®] e VITEK System[®] 2, respectivamente, seriam categorizados como VSSA. Assim, possivelmente, menos da metade dos pacientes teriam indicação para iniciar o tratamento com vancomicina ao usar o Etest[®] para determinar a CIM; em contraste, se forem utilizados os sistemas BDPhoenix100[®] e VITEK System[®]2, todos os pacientes terão uma grande chance de iniciar o tratamento com vancomicina. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo anterior, em 359 isolados (MRSA e MSSA), que assumindo CIM $\leq 1 \mu\text{g} / \text{mL}$, 96% e 16% dos pacientes receberiam tratamento com vancomicina ao usar VITEK System[®]2 e Etest[®], respectivamente, para determinar o CIM de vancomicina³⁶.

Os CIMs de vancomicina gerados por Etest[®] foram consistentemente maiores no estudo atual. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que mostram que os CIMs de Etest[®] tendem a ser maiores do que os CIMs de MDC^{16,37,38}. O CIM falsamente elevado da vancomicina pode influenciar os médicos a usar outro antimicrobiano para substituir a vancomicina e, em outro cenário, com o valor CIM preciso, a vancomicina seria a primeira escolha para o tratamento³⁹. Embora novos antimicrobianos anti-estafilocócicos tenham sido desenvolvidos recentemente, como a linezolida, a vancomicina ainda continua sendo a principal escolha terapêutica, principalmente devido ao baixo custo e ao grande número de ensaios clínicos quando comparados aos novos medicamentos⁴⁰.

Apenas 23,1% (18/78) e 26,9% (21/78) dos isolados foram concordantes com os valores obtidos pelo método de referência de MDC quando os isolados foram testados com o VITEK System[®]2 e o Etest[®], respectivamente. Porém, quando testado com BDPhoenix100[®], 78,2% dos isolados foram concordantes com os valores obtidos pela MDC. Não existe um método totalmente confiável para determinar a CIM para a vancomicina, mas a MDC continua sendo o método aparentemente mais confiável; entretanto, a MDC não é usada rotineiramente em laboratórios clínicos. Entretanto, este método consiste em diluições seriadas em log de 2 dos antimicrobianos, o que pode impossibilitar a detecção de aumentos sutis nos valores de CIM para a vancomicina⁴¹. Neste estudo, BD Phoenix100[®] é o melhor

método para determinação de CIMs de vancomicina em comparação com VITEK System[®]2 e Etest[®]. No entanto, os valores de CIM de vancomicina consistentemente mais altos por Etest[®] parecem ser mais confiáveis na previsão da resposta ao tratamento com vancomicina^{42,43}. Etest[®] é baseado em um gradiente contínuo com valores de meia diluição (ou seja, 1,5 µg / mL). Sugere-se medir isolados com CIM elevado de vancomicina (dentro da faixa suscetível) com um segundo método alternativo, como Etest[®]; auxiliando assim as recomendações para terapia antibiótica⁴¹⁻⁴⁴.

A maioria dos isolados de MRSA carregavam *SCCmec* tipo II (n = 20; 39%) ou tipo IV (n = 26; 51%). Da mesma forma, um estudo realizado em um hospital universitário brasileiro, que tipificou 31 isolados de pacientes com bacteremia por MRSA, mostrou que 48% e 52% dos isolados foram classificados como *SCCmec* II e IV, respectivamente⁴⁵. Não houve associação com uma CIM elevada de vancomicina e o tipo de *SCCmec*, uma vez que 99% das CIMs por MDC apresentaram valores ≤ 1 µg / mL. No entanto, 36 isolados de MRSA (36/51) tinham CIM > 1 µg / mL por Etest[®], desses isolados, 44% (16/36) eram portadores de *SCCmec* tipo II. Um estudo utilizando Etest[®], MDC e PCR em tempo real, com 188 pacientes com bacteremia por MRSA, descobriu que isolados com suscetibilidade reduzida à vancomicina (CIM por Etest[®] > 1 µg / mL) foram significativamente associados com *SCCmec* II em comparação com isolados sem suscetibilidade reduzida à vancomicina¹⁹. Pelo contrário, outro estudo não encontrou associações entre *SCCmec* com CIM elevado de vancomicina e aumento da mortalidade em pacientes com bacteremia por MRSA¹².

CONCLUSÕES

Em resumo, os resultados do estudo atual demonstram que os CIMs de vancomicina variam de acordo com a metodologia do teste. VITEKSystem[®]2 e Etest[®] tendem a subestimar ou superestimar, respectivamente, o valor da CIM, sendo significativamente diferente da MDC ($P < 0,05$). O sistema BD Phoenix100[®] apresentou valores de CIM mais próximos da MDC, não sendo encontradas diferenças significativas entre essas metodologias ($p > 0,05$). Essas metodologias não são equivalentes à MDC, portanto, não substituem com precisão a metodologia padrão ouro.

É essencial que os médicos levem em consideração as diferenças nos resultados da CIM determinadas por diferentes metodologias utilizadas alternativamente à MDC e que o conhecimento do tipo de metodologia usada no laboratório clínico seja relevante antes de considerar a terapia antimicrobiana para infecções graves por MRSA. A variabilidade das metodologias na determinação da CIM para a vancomicina e o valor da CIM elevada para a vancomicina, mesmo dentro da faixa de suscetibilidade ($\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$), ainda são motivo de preocupação.

Um estudo prospectivo amplo é necessário para esclarecer melhor o prognóstico clínico de diferentes esquemas de tratamento com base em vários métodos de medição de CIM. Assim, uma melhor prática seria rever os perfis dos pacientes em conjunto com a referência aos níveis de CIM. Em pacientes com função renal prejudicada, por exemplo, antibióticos com toxicidade renal, como a vancomicina, não devem ser considerados como a droga de escolha.

REFERÊNCIAS

1. Guimaraes AO, Cao Y, Hong K, Mayba O, Peck M, Gutierrez J, et al. A prognostic model of persistent bacteremia and mortality in complicated *S. aureus* bloodstream infection. *Clin Infect Dis*. 2018;68(9):1502-11.
2. Adani S, Bhowmick T, Weinstein MP, Narayanan N. Impact of Vancomycin MIC on Clinical Outcomes of Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia Treated with Vancomycin at an Institution with Suppressed MIC Reporting. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(4):e02512-17.
3. Balakuntla J, Prabhakara S, Arakere G. Novel rearrangements in the staphylococcal cassette chromosome mec type V elements of Indian ST772 and ST672 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *PLoS One*. 2014;9(4):e94293.
4. Kaya H, Hasman H, Larsen J, Stegger M, Johannesen TB, Allesøe RL, et al. SCCmecFinder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. *mSphere*. 2018;3(1):e00612-17.
5. Kalimuddin S, Chan YFZ, Phillips R, Ong SP, Archuleta S, Lye DC, et al. A randomized phase 2B trial of vancomycin versus daptomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia due to isolates with high vancomycin minimum inhibitory concentrations – results of a prematurely terminated study. *Trials*. 2018;19(1):305.
6. Zuma AVP, Lima DF, Assef APDAC, Marques EA, Leão RS. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Rio de Janeiro displaying susceptibility profiles to non- β -lactam antibiotics. *Brazilian J Microbiol*. 2017;48(2):237-41.
7. Diaz R, Ramalheira E, Afreixo V, Gago B. Evaluation of vancomycin MIC creep in *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;10:281–4.
8. 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(2):318–25.
9. 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(6):755–71.
10. San-Juan R, Fernández-Ruiz M, Gasch O, Camoez M, López-Medrano F, Domínguez MÁ, et al. High vancomycin MICs predict the development of infective endocarditis in patients with catheter-related bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(7):2102–9.

11. De Sanctis JT, Swami A, Sawarynski K, Gerasymchuk L, Powell K, Robinson-Dunn B, et al. Is there a clinical association of vancomycin MIC creep, agr group II locus, and treatment failure in MRSA bacteremia? *Diagn Mol Pathol*. 2011;20(3):184–8.
12. Park S-Y, Oh I-H, Lee H-J, Ihm C-G, Son JS, Lee MS, et al. Impact of Reduced Vancomycin MIC on Clinical Outcomes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5536–42.
13. Hos NJ, Jazmati N, Stefanik D, Hellmich M, AlSael H, Kern W V., et al. Determining vancomycin Etest MICs in patients with MRSA bloodstream infection does not support switching antimicrobials. *J Infect*. 2017;74(3):248–59.
14. CLSI (2019) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-seventh informational supplement. CLSI, M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
15. Rossatto FCP, Proenca LA, Becker AP, Silveira AC de O, Caierao J, D’Azevedo PA. Evaluation of methods in detecting vancomycin MIC among MRSA isolates and the changes in accuracy related to different MIC values. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(6):469–72.
16. Agrawal DC. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: Inconsistencies in Vancomycin Susceptibility Testing Methods, Limitations and Advantages of each Method. *J Clin DIAGNOSTIC Res*. 2015; 9(10):DC01-4.
17. Phillips C, Wells N, Martinello M, Smith S, Woodman R, Gordon D. Optimizing the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with elevated vancomycin minimum inhibitory concentrations within the susceptible range. *Infect Drug Resist*. 2016;9:87-92.
18. Bhatt M, Burgess DR, Wallace KL, Gregory E, Myint T. 1804. Impact of Susceptibility Testing Method on Antibiotic Selection for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Bacteremia. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(1):511–2.
19. Han JH, Edelstein PH, Lautenbach E. Reduced vancomycin susceptibility and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type distribution in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(10):2346–9.
20. Menzies RE. Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heat-stable nuclease tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol*. 1977;30(7):606–8.
21. Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Møller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCC *mec* types I-V. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(7):725-7.
22. Álvarez R, López Cortés LE, Molina J, Cisneros JM, Pachón J. Optimizing the Clinical Use of Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):2601–9.

23. Santos AL, Santos DO, de Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2007;43(6):413-23.
24. Biomeriux. Etest® para a detecção da resistência. Portal Biomeriux. [Internet]. [Acesso em: 10 jan 2021] Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/produto/etestr-para-deteccao-da-resistencia-antimicrobiana-ard>
25. BD Phoenix. Automação para identificação bacteriana e teste de sensibilidade a antimicrobianos. Portal BD Phoenix. 2021. [Internet]. [Acesso em: 10 jan 2021]. Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/identification-and-susceptibility-testing/phoenix->
26. ClickFarma. Doseamento microbiológico. Portal ClickFarma. 2021. [Internet]. [Acesso em: 10 jan 2021]. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/clickfarma/doseamento-microbiologico>.
27. Toyokawa M, Francisco M, Nishi I, Sunada A, Ueda A, Sakata T, et al. Accuracy of Commercial Susceptibility Testing Method for Measuring Vancomycin MIC Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Lab Med. 2011; 42(8):473–7.
28. Holmes NE, Johnson PDR, Howden BP. Relationship between Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-Intermediate *S. aureus*, High Vancomycin MIC, and Outcome in Serious *S. aureus* Infections. J Clin Microbiol. 2012;50(8):2548–52.
29. Rybak MJ, Vidailac C, Sader HS, Rhomberg PR, Salimnia H, Briski LE, et al. Evaluation of vancomycin susceptibility testing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Etest and three automated testing methods. J Clin Microbiol. 2013;51(7):2077–81.
30. Kruzal 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*. J Clin Microbiol. 2011;49(6):2272–3.
31. Marx A, Daniels L, Miller MB, Weber DJ. Vancomycin minimum inhibitory concentration is not a substitute for clinical judgment: Response to healthcare-associated ventriculitis and meningitis. Clin. Infect. Dis. 2017; 65(8):1428–1429.
32. Swenson JM, Anderson KF, Lonsway DR, Thompson A, McAllister SK, Limbago BM, et al. Accuracy of Commercial and Reference Susceptibility Testing Methods for Detecting Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2009;47(7):2013–7.
33. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. Clin Infect Dis. 2011;52(3):e18–55.

34. Van Hal SJ, Paterson DL. Systematic Review and Meta-Analysis of the Significance of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(1):405–10.
35. Devi Y, Punithavathy PM, Thomas S, Veeraraghavan B. Challenges in the Laboratory Diagnosis and Clinical Management of Heteroresistant Vancomycin *Staphylococcus aureus* (hVISA). *Clin. Microbiol*, 2015;4(4):405–10.
36. Tomczak H, Szalek E, Błażejewska W, Myczko K, Horla A, Grześkowiak E. The need to assay the real MIC when making the decision to eradicate *Staphylococcus aureus* with vancomycin. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013;67:921–5.
37. Sousa AGP, Da Costa TM, Cavalcante FS, Chamon RC, Ferreira DC, Nouér SA, et al. Vancomycin minimum inhibitory concentrations using different susceptibility methods in *Staphylococcus aureus* isolates. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(04):558–60.
38. Manfredini C, Picoli SU, Becker AP. Comparação de métodos na determinação de sensibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. *J Bras Patol e Med Lab*. 2011;47(2):141–5.
39. Goldman JL, Harrison CJ, Myers AL, Jackson MA, Selvarangan R. No Evidence of Vancomycin Minimal Inhibitory Concentration Creep or Heteroresistance Identified in Pediatric *Staphylococcus aureus* Blood Isolates. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(2):216–8.
40. Ma X, Gao P, Lv X, Lu H, Chen F, Chang W. Vancomycin MIC creep in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from 2006 to 2010 in a hospital in China. *Indian J Med Microbiol*. 2015;33(2):262.
41. Wilcox M, Al-Obeid S, Gales A, Kozlov R, Martínez-Orozco JA, Rossi F, et al. Reporting elevated vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: consensus by an International Working Group. *Future Microbiol*. 2019;14(4):345–52.
42. Hsu DI, Hidayat LK, Quist R, Hindler J, Karlsson A, Yusof A, et al. Comparison of method-specific vancomycin minimum inhibitory concentration values and their predictability for treatment outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(5):378–85.
43. Sader HS, Rhomberg PR, Jones RN. Nine-Hospital Study Comparing Broth Microdilution and Etest Method Results for Vancomycin and Daptomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(7):3162–5.
44. Nadarajah R, Post LR, Liu C, Miller AS, Sahm DF, Brooks GF. et al. Detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* with the updated Trek-Sensititre System and the MicroScan System. Comparison with results from the conventional Etest and CLSI standardized MIC methods. *American Journal of Clinical Patholog*. 2010;133(6):844–8.
45. Da Costa TM, Morgado PGM, Cavalcante FS, Damasco AP, Nouér SA, dos Santos KRN. Clinical and Microbiological Characteristics of Heteroresistant and Vancomycin-

Intermediate *Staphylococcus aureus* from Bloodstream Infections in a Brazilian Teaching Hospital. PLoS One. 2016;11(8):e0160506.

APÊNDICE – Evaluation of the Phoenix[®], VITEK[®] 2 and Etest[®] methods to test the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin: a comparison with the broth microdilution reference method (Manuscrito submetido a revista Brazilian Journal BJHBS of Health and Biomedical Sciences)

Title: Comparative evaluation of the Phoenix[®], VITEK[®] 2, E-test[®] and microdilution test for vancomycin susceptibility testing in *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infection

Short title: Comparative vancomycin susceptibility testing in *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infection

Daiana C. S. Rodrigues^{a*}, Ana Paula P. Costa^{b*}, Elizabeth A. Marques^a, José F. N.Netto^{b,c}, Robson S. Leão^{a,**}

^a Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

^b Programa de Pós-Graduação Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

^c Departamento de Patologia e Laboratórios, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

*DCSR and APPC contributed equally to this work.

**Corresponding author.

Robson S. Leão. E-mail address: robson.leao@uerj.br

ANEXO – Comprovante de submissão do artigo

Prezado Robson,

Temos satisfação em informar que o artigo foi aceito para publicação na versão atual. Planejamos publicá-lo na edição 1/2021, prevista para junho/2021.

Att.,

Mario.

--

Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences - BJHBS
(Antiga Revista HUPE // Formerly entitled Revista HUPE)

bjhbs.hupe.uerj.br

Boulevard 28 de Setembro, 77, térreo, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. | CEP: 20551-030

Telefone: 55 21 2868 8506 | Telefax: 55 21 2868 8108 | bjhbs.uerj@gmail.com