



Artigo/Article

Avaliação de métodos comumente usados em laboratórios para a determinação da suscetibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* sp, isoladas de um hospital de Vitória, Estado do Espírito Santo

Evaluation of methods commonly used in laboratories to determine the susceptibility to oxacillin among *Staphylococcus* sp samples isolated from a hospital in Vitória, State of Espírito Santo

Thais Dias Lemos Kaiser¹, Flavia Casseli Pacheco¹, Alessandra Avelino de Lima¹, Eliezer Menezes Pereira², Katia Regina Netto dos Santos² e Ana Paula Ferreira Nunes¹

RESUMO

Introdução: O gênero *Staphylococcus* é de grande importância devido a sua alta prevalência em infecções hospitalares e por apresentar taxas elevadas de resistência a oxacilina e a outros antimicrobianos. Assim, a avaliação da acurácia dos métodos fenotípicos usados para determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos é essencial para garantir a escolha da terapia mais adequada. **Métodos:** Foram usadas 114 amostras de *Staphylococcus* sp (53 *S. aureus* e 61 SCN) na avaliação da acurácia dos métodos de difusão de disco, microdiluição em agar, ágar triagem oxacilina e sistema automatizado em comparação com a PCR para verificação da resistência a oxacilina. **Resultados:** O gene *mecA* foi detectado em 48 (42,1%) amostras e 27 (23,7%) amostras apresentaram discrepância de resultados em pelo menos um dos métodos (74,1% SCN, 25,9% *S. aureus*). Para *S. aureus*, com exceção do Microscan Walkaway, todos os métodos apresentaram 100% de especificidade e sensibilidade. Já para os SCN, o sistema automatizado e o disco de cefoxitina apresentaram menor acurácia. **Conclusões:** O uso de dois métodos deve ser a melhor opção para a melhora da acurácia, principalmente quando o laboratório de diagnóstico utiliza somente sistema automatizado ou teste de difusão do disco de oxacilina. A associação destes métodos com outros apresentaram praticamente 100% de sensibilidade e especificidade em nosso estudo.

Palavras-chaves: *Staphylococcus aureus*. Oxacilina. Cefoxitina. *Staphylococcus* coagulase-negativos.

ABSTRACT

Introduction: The genus *Staphylococcus* is of great importance because of its high prevalence in hospital infections and because it presents high rates of resistance to oxacillin and other antimicrobials. Thus, evaluation of the accuracy of the phenotypic methods that are used to determine the profile of antimicrobial resistance is essential to ensure that the most appropriate therapy is chosen. **Methods:** One hundred and fourteen strains of *Staphylococcus* sp (53 *S. aureus* and 61 CNS) were used to evaluate the accuracy of the methods of disk diffusion, agar microdilution, oxacillin screening agar and automated systems, in comparison with PCR for investigating resistance to oxacillin. **Results:** The *mecA* gene was detected in 48 strains (42.1%), and 27 strains (23.7%) showed discrepant results in at least one of the methods (74.1% of CNS, 25.9% of *S. aureus*). For *S. aureus*, with the exception of the Microscan Walkaway, all the methods showed 100% specificity and sensitivity. In relation to CNS, the automated system and cefoxitin disk had lower accuracy. **Conclusions:** Use of two methods should be the best option for improved accuracy, especially when the diagnostic laboratory only uses an automated system or oxacillin disk diffusion test. Combination of these methods with others presented almost 100% sensitivity and specificity in our study.

Key-words: *Staphylococcus aureus*. Oxacillin. Cefoxitin. Coagulase-negative *Staphylococcus*.

INTRODUÇÃO

Um dos patógenos de maior prevalência em infecções hospitalares é o *Staphylococcus aureus*¹. Entretanto, *Staphylococcus* sp coagulase negativo (SCN) também têm sido causa comum de infecções, principalmente nas bacteriemias relacionadas a cateter². Além disso, grande parte dessas infecções é causada por amostras resistentes a oxacilina. Resultados de um estudo conduzido pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) envolvendo 75 hospitais brasileiros (julho/2006 até junho/2008) mostraram *Staphylococcus* como os microorganismos mais frequentes (47%), entre 5.406 amostras bacterianas isoladas de infecções primárias, da corrente sanguínea, com SCN responsáveis por 29% e *S. aureus* por 18% destas infecções. Além disso, apenas 39% das amostras de *S. aureus* foram classificadas como sensíveis a oxacilina³. Taxas elevadas de isolamento de estafilococos resistentes a oxacilina fazem com que ocorra o uso em grande escala de antimicrobianos mais caros ou tóxicos como a vancomicina. Entretanto, em 1996 no Japão foi relatado o primeiro caso de resistência intermediária a vancomicina em amostras hospitalares de *S. aureus* resistente a oxacilina (cepas ORSA do inglês *oxacillin-resistant S. aureus*) e nos Estados Unidos, em 2002, foi relatado o primeiro caso de resistência plena a vancomicina, tornando mais evidente a hipótese de que estes fenômenos estão associados ao frequente uso desta droga^{4,5}.

A resistência à oxacilina é codificada pelo gene *mecA*, responsável pela produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional de 76kDa (PBP 2a), que possui uma baixa afinidade pelos agentes β -lactâmicos. A PBP2a atua como uma transpeptidase retomando as funções da síntese de parede celular quando as outras PBPs estão inibidas, garantindo a integridade da célula bacteriana na presença de agentes β -lactâmicos. O gene *mecA* é carregado por um cassete cromossômico de

1. Laboratório de Resistência Bacteriana, Departamento Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES. 2. Laboratório de Infecções Hospitalares, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Endereço para correspondência: Dr^a Ana Paula Ferreira Nunes. Laboratório de Resistência Bacteriana/ Dept^o de Patologia/CCS/UFES. Av. Marechal Campos s/n, Maruípe, 29043-900 Vitória, ES.

Tel: 55 27 3335-7258.

e-mail: anastron@gmail.com

Recebido para publicação em 09/11/2009

Aceito em 26/04/2010

estafilococo (*Staphylococcus cassette chromosome mec* - SCC*mec*), o qual apresenta dois complexos gênicos: o complexo *mec* e o complexo *ccr*, que codificam recombinases, além da presença de sequências de inserção relacionadas com a entrada de genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos. Características genéticas como essas, explicam os fenótipos de multirresistência a outras classes de antimicrobianos apresentados por amostras de estafilococos resistentes a oxacilina⁶⁻⁹.

O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) indica o teste de difusão do disco (TDD), entre outros métodos para a determinação da susceptibilidade à oxacilina. Recomenda também o método de diluição em ágar para medir quantitativamente a atividade *in vitro* desse agente antimicrobiano, com resultados expressos em concentração mínima inibitória (CMI). Além disso, o CLSI indica a realização de testes adicionais confirmatórios como o método de ágar triagem, contendo 6µg/mL de oxacilina (ATOx) para *S. aureus*, que tem mostrado maior concordância com a detecção direta do gene *mecA* pelo método da reação da polimerase em cadeia (PCR - do inglês *polimerase chain reaction*), considerado padrão-ouro^{7,10-12}. Apesar deste método não ser indicado para SCN, alguns trabalhos demonstraram que a utilização do ATOx com 4µg/mL de oxacilina apresentou alta sensibilidade e especificidade na detecção da resistência a oxacilina em amostras de SCN, quando o método foi comparado à técnica de PCR^{13,14}. Desde 2004, o CLSI indica a utilização do disco de cefoxitina (30µg) para determinação da susceptibilidade a oxacilina em amostras de *Staphylococcus*, pelo fato deste antimicrobiano ter apresentado uma capacidade de indução da expressão da PBP2a maior do que a oxacilina¹⁵. Vários estudos mostraram excelente sensibilidade e especificidade deste método para *S. aureus*¹⁵⁻¹⁷. Entretanto, para os SCN tem sido relatada uma redução significativa na acurácia quando comparado com o método de detecção do gene *mecA* pela técnica da PCR^{16,18}.

A determinação correta da suscetibilidade a oxacilina em amostras de estafilococos é fundamental, pois a falha na detecção desta resistência pode resultar em uma terapêutica ineficaz, levando ao uso desnecessário e indiscriminado da vancomicina em hospitais. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a susceptibilidade das amostras de estafilococos a oxacilina, comparando os resultados dos métodos de ATOx, TDD com disco de oxacilina e cefoxitina, diluição em ágar e sistema automatizado, com a detecção do gene *mecA* através da técnica de PCR.

MÉTODOS

Amostras bacterianas

Foram analisadas 114 (53 *S. aureus* e 61 SCN) amostras isoladas de pacientes internados no Hospital Santa Rita de Cássia (HSRC), Vitória, ES. As amostras foram obtidas a partir de diferentes sítios de infecção ou colonização, sendo os principais sangue e secreção (Tabela 1). A identificação em nível de espécie e a susceptibilidade à oxacilina foram determinadas pelo sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade Behring Inc, West Sacramento, CA, USA). Para controle dos testes, foram utilizadas as seguintes amostras padrão: *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 29213, sensíveis à oxacilina, e ATCC 33591, resistente à oxacilina. As amostras de estafilococos foram semeadas em ágar nutriente, incubadas por 48h a 35°C para verificação da pureza e estocadas a -20°C em caldo TSB com 20% de glicerol.

TABELA 1 - Distribuição das espécies e sítios de isolamento das 114 amostras de estafilococos.

Espécies	Amostras n°(%)	Sítios de isolamento (n° de amostras)
SCN	61 (53,5 %)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	37	Sangue (18) Ponta de cateter (6) Secreção (11) Urina (2)
<i>S. haemolyticus</i>	6	Sangue (3) Ponta de cateter (1) Secreção (2)
<i>S. hominis</i>	7	Sangue (6) Ponta de cateter (1)
<i>S. xylosum</i>	2	Sangue
<i>Staphylococcus spp</i>	3	Sangue (2) Secreção
<i>S. auricularis</i>	1	Secreção
<i>S. sciuri</i>	1	Secreção
<i>S. saprophyticus</i>	1	Urina
<i>S. cohnii</i>	1	Sangue
<i>S. warneri</i>	1	Sangue
<i>S. capitis</i>	1	Sangue
<i>Staphylococcus aureus</i>	53 (46,5 %)	Sangue (17) Ponta de cateter (4) Secreção (29) Urina (3)
Total	114	Sangue (51) Ponta de cateter (12) Secreção (45) Urina (6)

Avaliação da susceptibilidade à oxacilina

Teste de difusão do disco: o TDD foi realizado de acordo com o manual do CLSI (2007) com os discos (Cefar Diagnóstica, LTDA-SP) de oxacilina (1µg) e cefoxitina (30µg). A leitura do diâmetro do halo de inibição do crescimento foi realizada com 24h de incubação a 35°C. Para as amostras de *S. aureus* e SCN que apresentaram halos de sensibilidade ≥ 13 mm e ≥ 18 mm para o disco de oxacilina e ≥ 20 mm e ≥ 25 mm para o disco de cefoxitina foram classificadas como sensíveis, respectivamente. As amostras foram classificadas como resistentes quando apresentaram halos de sensibilidade menores^{11,12}.

Ágar triagem oxacilina: as amostras foram submetidas a subcultivo em ágar Mueller-Hinton contendo 6µg/mL¹¹ e 4µg/mL de oxacilina (Sigma - Aldrich/Alemanha)¹³ e suplementado com 4% de NaCl. O inóculo foi preparado com o padrão de turvação de acordo com a escala 0,5 de McFarland e foi semeado com um swab em ¼ da placa. A resistência a oxacilina foi confirmada pela visualização de crescimento de pelo menos uma colônia após 24h e 48h de incubação a 35°C.

Determinação da CMI para oxacilina pelo teste de diluição em ágar: a CMI foi determinada para oxacilina pelo método de diluição em ágar segundo o CLSI (2007). As amostras foram inoculadas em placas de Mueller-Hinton suplementado com 2% de NaCl contendo oxacilina em concentrações variando de 0,0625 a 1.024µg/mL. Foram consideradas resistentes à oxacilina as amostras de *S. aureus* e SCN que apresentaram CMI ≥ 4 µg/mL e $\geq 0,5$ µg/mL¹², respectivamente.

Detecção do gene *mec* por PCR

Cinco a seis colônias bacterianas foram suspensas em 100µL de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,8) e aquecidas a 100°C por 10 min. Em seguida, foram centrifugadas (20,000xg/30s) e o sobrenadante coletado para a reação da PCR¹⁹. A amplificação foi realizada em um termociclador Programmable Thermal Controller (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg, Germany) utilizando-se de um volume total de 25µL composto por: 3µL de lisado de células bacterianas, 100µM de cada desoxinucleotídeos trifosfato (Life Technologies), 1,0 U de polimerase *Taq* DNA (Biotools, Madrid, Spain), tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4, KCl 50mM e MgCl₂ 2mM, Biotools), 1µM de cada oligonucleotídeos iniciadores MRS₁ (5' - TAG AAA TGA CTG AAC GTC CG - 3') e MRS₂ (5' - TTG CGA TCA ATG TTA CCG TAG - 3') usados para detectar um segmento de 154pb do gene *mecA* (codificador da resistência a oxacilina)²⁰. As condições de amplificação foram: desnaturação por 3 min a 92°C, seguido por 30 ciclos de 92°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 3 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com brometo de etídio e visualizados com o auxílio de um transiluminador UV.

RESULTADOS

O gene *mecA* foi detectado em 48 (42,1%) amostras (13 *S. aureus* e 35 SCN). Oitenta e sete (76,3%) amostras apresentaram concordância nos resultados dos métodos avaliados, em relação ao método padrão-ouro, enquanto as demais 27 amostras apresentaram discrepância de resultados em pelo menos um dos métodos; 20 (74,1%) SCN e 7 (25,9%) *S. aureus* (Tabela 2).

Considerando que a sensibilidade e a especificidade de um método estão relacionadas com resultados verdadeiramente positivos e negativos, respectivamente, quando comparados a um método padrão, nossos resultados mostraram 100% de sensibilidade e especificidade em todos os métodos para as amostras de *S. aureus* avaliadas, exceto para o sistema automatizado Microscan WalkAway, que mostrou 92,9% de sensibilidade e 85% de especificidade (Tabela 3). Valores de sensibilidade e especificidade mais baixos (77,1% e 84,6%, respectivamente) também foram obtidos com o sistema automatizado para os SCN. Os demais métodos apresentaram maior variação nos valores de sensibilidade e especificidade para os SCN do que observados com as amostras de *S. aureus*, devido à presença de um a oito amostras com resultados discrepantes (Tabela 4).

TABELA 2 - Resultados das 27 amostras de estafilococos que apresentaram discrepâncias em um ou mais métodos fenotípicos em relação ao método da PCR (padrão-ouro).

Espécie	TDD		Microscan WalkAway	Diluição em ágar		Ágar triagem oxacilina				PCR <i>mecA</i>
	CFO	OXA		24h	48h	4µg		6µg		
						24h	48h	24h	48h	
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R (> 2)	0,5	1	-	-	-	-	N
<i>S. aureus</i>	S	S	R (> 2)	0,25	0,5	-	-	-	-	N
<i>S. aureus</i>	S	S	R (> 2)	0,5	0,5	-	-	-	-	N
<i>S. aureus</i>	S	S	R (> 2)	0,5	0,5	-	-	-	-	N
<i>S. aureus</i>	S	S	R	0,5	1	-	-	-	-	N
<i>S. aureus</i>	R	R	S (0,5)	128	128	+	+	+	+	P
<i>S. aureus</i>	S	S	R (> 2)	0,5	0,5	-	-	-	-	N
<i>S. epidermidis</i>	S	S	R (> 2)	<0,0625	0,125	-	-	-	-	N
<i>S. epidermidis</i>	S	S	R (> 2)	0,25	0,25	-	-	-	-	N
<i>S. epidermidis</i>	S	R	R (> 2)	8	32	+	+	+	+	P
<i>S. epidermidis</i>	S	R	S	1	2	+	+	+	+	P
<i>S. epidermidis</i>	S	R	R (> 2)	1	2	+	+	+	+	P
<i>S. epidermidis</i>	S	R	R (> 2)	8	8	+	+	+	+	P
<i>S. epidermidis</i>	S	R	R (> 2)	32	32	+	+	+	+	P
<i>S. epidermidis</i>	S	S	R (> 2)	0,125	0,5	+	+	+	+	P
<i>S. hominis</i>	R	R	S (≤0,25)	32	64	-	+	-	+	P
<i>S. hominis sub hominis</i>	S	S	R	1	1	-	-	-	-	N
<i>S. hominis sub hominis</i>	S	S	R (> 2)	<0,0625	0,125	-	-	-	-	N
<i>S. hominis sub hominis</i>	R	R	S (< 1)	8	8	+	+	+	+	P
<i>S. xylosum</i>	S	S	R (> 2)	0,25	0,25	-	-	-	-	N
<i>S. xylosum</i>	S	S	R (> 2)	<0,0625	<0,0625	-	-	-	-	N
<i>S. sciuri</i>	S	S	S (≤ 0,25)	1	2	+	+	-	+	N
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	S (≤0,25)	1.024	1.024	+	+	+	+	P
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	S (≤ 0,25)	512	1.024	+	+	+	+	P
<i>S. auricularis</i>	R	R	S (≤ 0,25)	64	128	+	+	+	+	P
SCN	S	R	R (> 2)	1	2	+	+	+	+	P
SCN	S	R	R (> 2)	2	2	+	+	+	+	P

CFO: cefoxitina, OXA: oxacilina, TDD: Teste de difusão do disco, R: resistente, S: sensível, +: crescimento de uma ou mais colônias, -: ausência de crescimento, P: gene *mecA* positivo, N: gene *mecA* negativo, SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo. Limites de resistência para oxacilina: *S. aureus* CMI ≥4µg/mL e SCN CMI ≥ 0,5µg/mL (CLSI, 2007).

TABELA 3 - Resultados da suscetibilidade a oxacilina entre as 53 amostras de *S. aureus* e cálculo de sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos em comparação com a detecção do gene *mecA* pelo método de PCR.

Método	Nº de amostras				Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
	<i>mecA</i> positivo (nº = 13)		<i>mecA</i> negativo (nº = 40)			
	resistente	falso-resistente	sensível	falso-sensível		
TDD oxacilina	13	-	40	-	100,0	100,0
TDD cefoxitina	13	-	40	-	100,0	100,0
Diluição em ágar	13	-	40	-	100,0	100,0
Microscan WalkAway	12	6	34	1	92,9	85,0
ATOx 4µg/mL (24h)	13	-	40	-	100,0	100,0
ATOx 4µg/mL (48h)	13	-	40	-	100,0	100,0
ATOx 6µg/mL (24h)	13	-	40	-	100,0	100,0
ATOx 6µg/mL (48h)	13	-	40	-	100,0	100,0

TDD: teste de difusão do disco, ATOx: ágar triagem oxacilina, sensibilidade: percentual de amostras *mecA*-positivas classificada corretamente, especificidade: percentual de amostras *mecA*-negativas classificadas corretamente.

TABELA 4 - Resultados da suscetibilidade a oxacilina entre as 61 amostras de SCN e cálculo de sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos em comparação com a detecção do gene *mecA* pelo método de PCR.

Método	Amostras				Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
	<i>mecA</i> positivo (nº = 35)		<i>mecA</i> negativo (nº = 26)			
	resistente	falso-resistente	sensível	falso-sensível		
TDD oxacilina	34	0	26	1	97,1	100,0
TDD cefoxitina	27	0	26	8	77,1	100,0
Diluição em ágar	34	2	24	1	97,1	92,3
Microscan WalkAway	27	4	22	8	77,1	84,6
ATOx 4µg/mL (24h)	34	1	25	1	97,1	96,1
ATOx 4µg/mL (48h)	35	1	25	-	100,0	96,1
ATOx 6µg/mL (24h)	34	-	26	1	97,1	100,0
ATOx 6µg/mL (48h)	35	1	25	-	100,0	96,1

TDD: teste de difusão do disco, ATOx: ágar triagem oxacilina, sensibilidade: percentual de amostras *mecA*-positivas classificada corretamente, especificidade: percentual de amostras *mecA*-negativas classificadas corretamente.

DISCUSSÃO

O gênero *Staphylococcus* é considerado de grande importância devido a sua alta prevalência nas infecções hospitalares, além de apresentar taxas elevadas de resistência a oxacilina e a outros antimicrobianos complicando o tratamento dos pacientes. Atualmente, um dos principais objetivos para o controle de infecções hospitalares é o uso racional dos antimicrobianos, o que torna a avaliação da acurácia dos métodos fenotípicos usados para determinação do perfil de suscetibilidade essencial para garantir a escolha mais adequada dos antimicrobianos terapêuticos^{21,22}. Entretanto, algumas amostras de estafilococos (principalmente SCN) resistentes a oxacilina apresentam expressão heterogênea de resistência, isto é, uma unidade formadora de colônia (UFC) entre 10⁴ a 10⁸ UFCs expressa resistência fenotípica²³. Estas poucas

células resistentes podem levar a resultados falso-negativos em métodos convencionais para determinação da suscetibilidade e podem ser selecionadas em pacientes que recebem tratamento com β-lactâmicos, levando então a falha terapêutica¹². Neste trabalho, comparamos 5 métodos fenotípicos diferentes com a detecção do gene *mecA* por PCR, com destaque para o sistema automatizado e TDD por os serem os métodos mais utilizados pelos laboratórios de diagnóstico microbiológico no Brasil.

Para *S. aureus*, praticamente todos os métodos apresentaram boa correlação com o método de PCR, mostrando 100% de sensibilidade e especificidade após 24h de incubação, exceto para o sistema automatizado Microscan WalkAway. Alguns pesquisadores mostraram alto nível de acurácia destes métodos para esta espécie^{10,14} onde a expressão heterogênea de resistência não chegou a influenciar significativamente nas condições experimentais como 24h de

incubação a 35°C, ausência de NaCl no TDD e inóculo reduzido usado no método de diluição em ágar ($\sim 10^{3-4}$ UFC/mL). Entretanto, nossos resultados também mostraram que 6 amostras de *S. aureus mecA*-negativas apresentaram resultados de falsa resistência e uma amostra *mecA*-positiva foi considerada sensível a oxacilina pelo método automatizado Microscan WalkAway (92,9% sensibilidade e 85% especificidade). Estes resultados podem estar relacionados com uma alta expressão de β -lactamases nas amostras *mecA*-negativas ou, no caso da amostra *mecA*-positiva, a uma expressão heterogênea da resistência à oxacilina.

Em relação às amostras de SCN, observamos um maior número de resultados discrepantes quando comparados às amostras de *S. aureus*. Tanto o ATOx quanto o TDD oxacilina apresentaram os melhores resultados de sensibilidade e especificidade em relação a PCR (Tabela 2). Apesar de uma amostra de *S. sciuri mecA*-negativa ter sido capaz de crescer no ATOx em 48h em ambas concentrações (resultado falso-positivo para resistência), a incubação por mais 24h reverteu o resultado falso-negativo observado para uma amostra de *S. hominis mecA*-positiva. Alguns trabalhos indicaram o método ATOx com 4 μ g/mL de oxacilina como a melhor escolha para confirmação da resistência a oxacilina em SCN^{13,14}. A concentração mais baixa e o período de incubação estendido (48h) evitariam resultados falso-negativos devido à característica de heterorresistência freqüente em SCN principalmente na espécie *S. epidermidis*^{13,14,24}. Em relação ao TDD oxacilina, somente uma amostra de *S. epidermidis mecA*-positiva foi classificada como sensível o que resultou num valor de sensibilidade de 97,1% e 100% de especificidade. Apesar de ter apresentado 100% de especificidade, a sensibilidade do disco de cefoxitina foi mais baixa do que para o disco de oxacilina (77,1%). Este resultado pode ser um indicativo de que o disco de cefoxitina não deve ser usado sozinho para prever resistência a oxacilina mediada pela PBP2a em amostras de SCN. Nossos resultados corroboram com outros trabalhos que mostraram equivalência ou inferioridade nos valores de sensibilidade ou especificidade do disco de oxacilina em comparação com o de cefoxitina, indicando que a performance do TDD cefoxitina não é tão boa quanto para *S. aureus*^{23,25,26}. Porém, em nosso estudo a combinação dos resultados dos dois discos gerou um valor de sensibilidade igual ao do disco de oxacilina sozinho (97%) devido a uma amostra de *S. epidermidis mecA*-positiva ter sido sensível para ambos os antimicrobianos. O mesmo foi observado por Perazzi e cols²⁶ que verificaram um aumento significativo nos valores de sensibilidade (90%) e especificidade (100%) na associação dos dois discos.

Resultados discrepantes ocorreram em 23,7% das amostras, sendo SCN a maioria (77,8%) destas. Este fato reflete a dificuldade na determinação da suscetibilidade à oxacilina para algumas amostras de SCN devido, principalmente, a uma expressão heterogênea da resistência o que contribui para os resultados de falsa-suscetibilidade. Esta característica deve ser considerada na escolha dos métodos a serem usados na rotina laboratorial. Por exemplo, o inóculo do método de agar diluição (10^4 UFC/mL) é significativamente menor do que o do ATOx (10^7 UFC/mL). Além disso, o tempo de incubação de 24h, para o TDD e determinação da CMI, pode ser insuficiente para o crescimento das cepas heterorresistentes que estão em menor número (1 a cada 10^6 UFC/mL).

O método automatizado Microscan WalkAway é frequentemente usado na rotina de laboratórios de diagnóstico microbiológico de grande porte e mostrou a menor acurácia, quando comparado aos

outros métodos, com o maior número de amostras discrepantes (18 das 27 amostras). Este método mostrou resultados de falsa resistência para 12 (44,4%) amostras e falsa sensibilidade para 6 (22,2%) amostras. Uma desvantagem deste sistema é o uso de um baixo número de concentrações de oxacilina, geralmente, limitado às concentrações definidas como *breakpoints* estabelecidos no CLSI (concentrações variando de 0,25 a 2 μ g/mL). A associação do sistema automatizado, com outro método deveria ser adotada pelos laboratórios de diagnóstico microbiológico para garantir o aumento da acurácia na determinação da resistência a oxacilina.

Apesar da rotina dos laboratórios de diagnóstico microbiológico ser *uma corrida contra o tempo* é importante realizar a avaliação da acurácia dos métodos de detecção de resistência à oxacilina em estafilococos. O uso de dois métodos deve ser a melhor opção para a melhora da acurácia. Ex: a associação dos métodos automatizados com o TDD; TDD com cefoxitina e oxacilina ou TDD com ATOx. Estas associações apresentaram praticamente 100% de sensibilidade e especificidade em nosso estudo e são de baixo custo. Desta maneira, a segurança e a qualidade dos resultados estarão garantidas e consequentemente evitarão o uso desnecessário de vancomicina ou falha terapêutica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a direção e ao Dr. Jose Américo de Carvalho, chefe da CCIH, do Hospital Santa Rita de Cássia pelo acesso as informações necessárias ao desenvolvimento deste trabalho e ao Dr Henrique Tommasi, presidente do Grupo Tommasi, pelo fornecimento das amostras bacterianas.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

SUPORTE FINANCEIRO

Fundação de Apoio à Ciência & Tecnologia do Espírito Santo (FAPES), Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (FACITEC) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Hasty MB, Klasner A, Kness S, Denmark TK, Ellis D, Herman L. Cutaneous community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among all skin and soft-tissue infections in two geographically distant pediatric emergency departments. *Acad Emerg Med* 2007; 14:35-40.
- Casey AL, Lambert PA, Elliott TSJ. *Staphylococci*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2007; 29: S23-S32.
- ANVISA. Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM, Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm> Acesso em: 10 out. 2009.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K. Methicillin-resistance *S. aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:135-136.
- Chang FY, Peacock JEJR, Musher DM, Triplett P, Macdonald BB, et al. *Staphylococcus aureus bacteremia: recurrence and the impact of antibiotic*

- treatment in a prospective multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82:333-339.
6. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2002; 292:67-74.
 7. Diekema DJ, Dodgson KJ, Sigurdardottir B, Pfaller M. Rapid Detection of Antimicrobial-Resistant Organism Carriage: an Unmet Clinical Need. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2879-2883.
 8. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001; 9:486-493.
 9. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111:1265-1273.
 10. Velasco D, Tomas MM, Cartelle M, Beceiro A, Perz A, Molina F, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:379-382.
 11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition, M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania; 2007.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition, M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania; 2008.
 13. Ferreira RBR, Iorio NLP, Malvar KL, Nunes APF, Fonseca LS, Bastos CCR, et al. Coagulase-Negative Staphylococci: Comparison of Phenotypic and Genotypic Oxacillin Susceptibility Tests and Evaluation of the Agar Screening Test by Using Different Concentrations of Oxacillin. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:3609-3614.
 14. Perez LRR, Antunes ALS, Barth AL. Variations of agar screen tests for detection of methicillin resistance in staphylococci: focus on cefoxitin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:267-270.
 15. Sharp SE, Warren JA, Thompson RB. Cefoxitin disk diffusion screen for confirmation of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and utility in the clinical laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 51:69-71.
 16. Frigatto EAM, Machado AMO, Pignatari ACC, Gales AC. Is the Cefoxitin Disk Test Reliable Enough to Detect Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci? *J Clin Microbiol* 2005; 43:2028-2029.
 17. Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting mec-A mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: Validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51:57-62.
 18. Skov R, Smyth R, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Kahlmeter G. Evaluation of cefoxitin 5 and 10mg discs for the detection of methicillin resistance in staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:157-161.
 19. Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NLP, Santos KRN. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52:431-435.
 20. Santos KRN, Teixeira LM, Leal GS, Fonseca LS, Gontijo-Filho PP. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. *J Med Microbiol* 1999; 48:17-23.
 21. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Contr Hosp Epidemiol* 2008; 29:996-1011.
 22. Henderson DK. Managing methicillin-resistant staphylococci: a paradigm for preventing nosocomial transmission of resistant organisms. *Discussion S64-73. Am J Infect Control* 2006; 34:46-54.
 23. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:781-791.
 24. Perazzi B, Fermepin MR, Malimovka A, Garcia SD, Orgambide M, Vay CA, et al. Accuracy of Cefoxitin Disk Testing for Characterization of Oxacillin Resistance Mediated by Penicillin-Binding Protein 2a in Coagulase-Negative Staphylococci. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3634-3639.
 25. Palazzo ICV, Darini ALC. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 257:299-305.
 26. Zhu LX, Zang ZW, Wang C, Yang HM, Zang Q, Cheng J. Evaluation of the CLSI cefoxitin 30- μ g disk-diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:1039-1042.