

# Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus* coagulase - positivos isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos

## SENSIBILITY TO OXACILLIN, VANCOMYCIN AND TEICOPLANIN OF COAGULASE - POSITIVE *STAPHYLOCOCCUS* ISOLATED FROM HOSPITALIZED PATIENTS OF SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Renata de Cássia Bernardes  
Antonio Olavo Cardoso Jorge  
Mariella Vieira Pereira Leão  
Instituto de Biociências da Universidade de Taubaté

### RESUMO

*Staphylococcus* coagulase-positivo é um importante patógeno encontrado na pele e mucosa dos seres humanos e de outros animais. O aumento das infecções causadas por cepas resistentes à oxacilina, principalmente em hospitais, tem requerido tratamento intravenoso com glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina. O presente trabalho teve como objetivo verificar a sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de cepas de estafilococos coagulase-positivas provenientes de três diferentes Hospitais do Município de São José dos Campos. Foram isoladas 104 cepas de amostras clínicas diferentes, e a sensibilidade aos antibióticos foi verificada utilizando-se a metodologia de difusão em ágar. Das 104 cepas estudadas 66 (63,46%) apresentaram resistência à oxacilina e todas as amostras mostraram sensibilidade à vancomicina e à teicoplanina. Os resultados confirmaram a alta ocorrência de estafilococos coagulase-positivos resistentes à oxacilina, demonstrando a importância da execução do teste de sensibilidade aos antimicrobianos antes da prescrição destes para pacientes hospitalizados.

### PALAVRAS-CHAVE

*Staphylococcus* coagulase-positivo. Oxacilina. Vancomicina. Teicoplanina.

### INTRODUÇÃO

Estafilococos são membros da família *Micrococcaceae* caracterizados como cocos Gram-positivos, que geralmente se dispõem em cachos irregulares (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). São microrganismos ubíquos, podendo ser encontrados na

microbiota normal da pele e das mucosas dos seres humanos (MURRAY et al, 2000). O gênero *Staphylococcus* é constituído de várias espécies, sendo algumas produtoras da enzima coagulase e a maioria coagulase-negativa (KONEMAN, 2001).

Até a década de 80, *S. aureus* era considerada a única espécie coagulase-positiva, sendo o resultado deste teste definitivo para identificação dessa espécie. Ultimamente têm sido isoladas de infecções humanas e animais, as espécies *S. schleiferi* (HERNANDEZ et al., 2001), *S. hyicus* (WEGENER et al., 1994) e *S. intermedius* (PETERSEN et al., 2003), também coagulase-positivas. A diferenciação destes estafilococos baseia-se em propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas (CAPURRO; NILSSON; OSTENSSON, 1999).

*S. aureus* é, sem dúvida, o patógeno humano mais importante do gênero *Staphylococcus*. As manifestações clínicas das doenças causadas por *S. aureus* variam desde intoxicações alimentares ou infecções cutâneas de pouca importância até infecções hospitalares graves, principalmente da corrente sanguínea (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). Este microrganismo pode fazer parte de microbiota normal sendo a nasofaringe o principal local colonizado. Cerca de 15% dos adultos sadios são portadores nasofaríngeos de *S. aureus*, com maior incidência em pacientes hospitalizados, equipe médica e neonatos (MURRAY et al., 2000; SILVA et al., 2003).

*S. aureus* sempre esteve presente na história da infecção nosocomial e foi capaz de desenvolver rapidamente resistência aos antibióticos. Nos anos 40, logo depois do surgimento das penicilinas, já apareceram estafilococos capazes de produzir penicilinase (FILE,

2000). Na década de 60, *S. aureus* tornaram-se rapidamente resistentes à metilicina e à oxacilina, antibióticos semi-sintéticos resistentes à penicilinase (FILE, 2000).

O número de cepas isoladas de *S. aureus* metilicina-oxacilina resistente (MRSA/ORSA) vem aumentando e hoje este microrganismo é um dos principais causadores de infecções hospitalares, tornando-se um problema mundial (CHAMBERS, 1988). Septicemias por MRSA estão associadas com significantes morbidades e mortalidades, requerendo métodos rápidos de identificação e sensibilidade aos antibióticos (TAN et al, 2001). Melzer et al., (2003), num estudo comparativo de pacientes com infecção nosocomial e bacteremia, observaram que a proporção de mortes por MRSA era significativamente maior que aquelas causadas por estafilococos sensíveis à metilicina. A transmissão interpessoal é muito importante, particularmente quando as cepas envolvidas forem multirresistentes aos antibióticos (LOCKSLEY et al., 1982).

Atualmente, cerca de 80% das infecções estafilocócicas vêm sendo tratadas com glicopeptídeos como a vancomicina e a teicoplanina (CHAMBERS, 1988; PHILIPS; GOLLEDGE, 1992). Hoje esta é, ainda, a classe antimicrobiana de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA, embora cepas com reduzida sensibilidade a vancomicina já tenham sido isoladas (WEBER et al., 2000).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a sensibilidade de cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivas isoladas de pacientes hospitalizados à oxacilina, vancomicina e teicoplanina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras estudadas

Foram estudadas 104 cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivas isoladas de amostras de pacientes internados em três hospitais de São José dos Campos. As amostras foram colhidas de secreções purulentas de diversas regiões: ponta de cateter, urina, escara, escarro, ponta de *intracth*, secreção de abscesso, hemocultura, fragmento, secreção ferida, secreção traqueal, fistula, secreção de ouvido, fragmento do pé, secreção de pus, líquido ascítico, secreção orofaríngea, secreção da parede abdominal, secreção ocular e secreção do ombro.

### Semeadura

Os materiais clínicos foram coletadas de acordo com o local da infecção, colocados em tubos contendo meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, Difco) e incubadas por 24 horas, a 37°C. A seguir as amostras foram semeadas por esgotamento em placas de Petri contendo Ágar Sangue de carneiro 5% (Ágar base: Columbia/ Merck) e *Mannitol Salt Ágar* (Difco) e foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Em ágar sangue as colônias de *Staphylococcus*, principalmente de *Staphylococcus aureus* apareceram com coloração creme/camurça circundadas por zona de hemólise completa. O ágar salgado selecionou o crescimento de estafilococos e permitiu a observação da fermentação do *Mannitol* através da mudança na coloração do meio (MAZA et al., 1999).

### Identificação de *Staphylococcus* coagulase-positivo

Primeiramente, foi executada a prova da catalase para confirmação da característica do gênero. Este teste foi realizado pela adição de peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% a colônia do microrganismo sobre uma lâmina de vidro. O aparecimento de bolhas indicou uma reação positiva, significando que a catalase hidrolisou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em oxigênio e água. Os estafilococos são catalase positivos (MAZA et al., 1999).

Posteriormente, foi feita a prova da coagulase, que avalia a habilidade do microrganismo de coagular o plasma pela produção desta enzima. Em um tubo de ensaio colocou-se 500µL de plasma humano e 250µL de suspensão do microrganismo em salina (NaCl a 0,85%) correspondente à escala 0,5 de Mac Farland, e incubou-se a 37°C por 24 horas. As cepas que foram capazes de formar coágulo foram consideradas coagulase-positivas e, portanto, selecionadas.

### Antibiograma

O método utilizado para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi o método de difusão em ágar. Três a cinco colônias com morfologia similar foram selecionadas a partir de uma cultura recente em *Mannitol Salt Ágar* e foram suspensas em solução de NaCl 0,85%, obtendo-se turbidez de 0,5 na escala de Mc Farland, correspondendo a aproximadamente 1,5 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC). A partir desta suspensão, realizou-se semeadura com *swab* em placa de Petri contendo meio Ágar Mueller-

Hinton (Difco), procurando assegurar distribuição homogênea do inóculo (MAZA *et al.*, 1999). Depois disso, discos de papel contendo oxacilina 1 mcg, vancomicina 30 mcg e teicoplanina 30 mcg (Cecon), foram depositados sobre a superfície do ágar e pressionados para melhor aderência ao meio. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura da sensibilidade à oxacilina, à vancomicina e à teicoplanina foi feita medindo-se a zona de inibição de crescimento em mm. Os resultados foram interpretados segundo as Normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), que considera *Staphylococcus* coagulase-positivo sensível à oxacilina quando o diâmetro do halo for  $\geq 13$ mm e resistente quando  $< 12$ mm. Sensível à vancomicina quando o diâmetro for  $\geq 12$  mm e resistente quando  $< 12$ . Para teicoplanina considera-se sensível quando o diâmetro do halo for  $\geq 14$  e resistente quando  $< 14$ .

A confirmação da resistência à oxacilina foi realizada segundo as normas preconizadas pelo NCCLS, semeando-se *Staphylococcus* coagulase-positiva em meio Mueller Hinton acrescido de 4% de NaCl com 6  $\mu$ g/ml de oxacilina e meio MRSA(Probac). O crescimento de microrganismos nestes meios confirma o resultado de resistência a este antimicrobiano.

## RESULTADOS

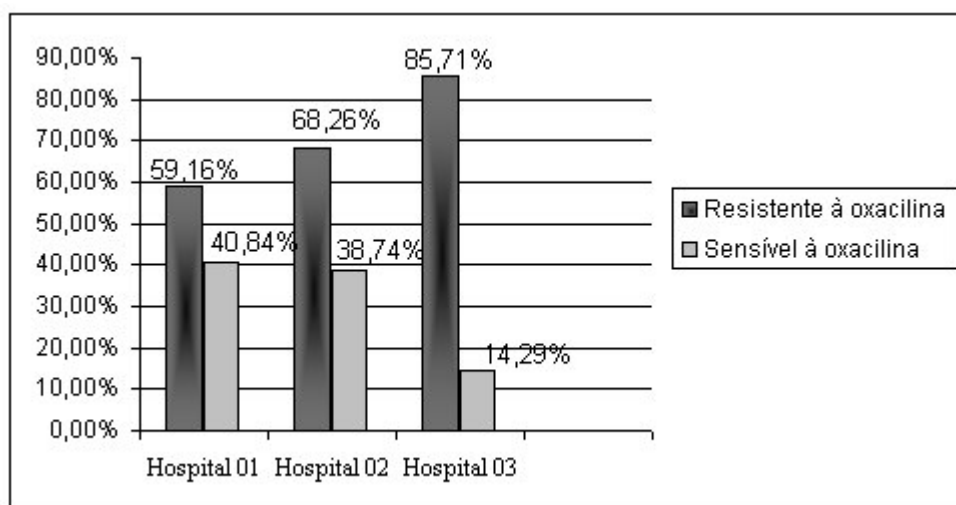
Foram obtidas 104 cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivo. Das 71 cepas provenientes do Hospital 1, 29 apresentaram-se sensíveis à oxacilina e 42 resistentes. Das 19 amostras provenientes do Hospital 2, 7 apresentaram-se sensíveis à oxacilina e 12 resistentes. Das 14 amostras provenientes do Hospital 3, 2 apresentaram-se sensíveis à oxacilina e 12 resistentes. As amostras dos 03 Hospitais apresentaram sensibilidade à vancomicina e à teicoplanina (tabela 01).

**Tabela 1** Freqüência de sensibilidade de *Staphylococcus* coagulase-positivo em diferentes Hospitais de São José dos Campos.

HOSPITAL	n	OXACILINA		VANCOMICINA		TEICOPLANINA	
		Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível
1	71	42	29	0	71	0	71
2	19	12	07	0	19	0	19
3	14	12	02	0	14	0	14

A freqüência do isolamento de *Staphylococcus* coagulase-positivo resistente à oxacilina no Hospital 1 foi de 59,16%, das amostras provenientes do Hospital 2 apresentaram 63,16%; no Hospital 3 apresentaram 85,71% (Figura 01). Em relação à

vancomicina e à teicoplanina não ocorreu resistência em todos os hospitais. As 104 cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivo estudadas, 66 foram resistentes à oxacilina evidenciando um índice de resistência de 63,46%.



**Figura 1** Sensibilidade *Staphylococcus* coagulase-positivo em relação à Oxacilina em diferentes Hospitais de São José dos Campos.

## DISCUSSÃO

Os índices crescentes de resistência aos antibióticos de bactérias patogênicas têm resultado em maior morbidade e mortalidade nas infecções nosocomiais. As bactérias patogênicas mais problemáticas incluem bastonetes Gram-negativos, como *Pseudomonas* e enterobactérias, e Gram-positivos, com *Staphylococcus* coagulase-positivo (YATES, 2000).

Apesar da introdução da penicilina nos anos 40 ter oferecido um importante avanço terapêutico, e solucionado o problema das infecções estafilocócicas, a susceptibilidade à penicilina foi de vida curta, com o primeiro caso confirmado de resistência em 1944 (FERREIRA, 2001).

No final dos anos 50, aproximadamente 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* já eram resistentes à penicilina (CHAMBERS, 1988). Essas cepas estavam associadas a surtos de infecções hospitalares antes do desenvolvimento da metilina e oxacilina, em 1960. Cepas apresentando resistência à metilina (MRSA) começaram a ser isoladas na Grã-Bretanha em 1961 (BARBER, 1961). Vários centros médicos da Europa, na época, registraram simultaneamente a ocorrência desses microrganismos, sendo o primeiro grande surto de infecção hospitalar descrito por Steward e Holt, em 1963. No Brasil, infecções nosocomiais associadas a este microrganismo também têm sido relatadas (TRESOLDI et al, 1997; RAASCH R.H., 2000; SILVA et al., 2003).

Neste trabalho procuramos analisar a sensibilidade das cepas de estafilococos coagulase-positivas isoladas de pacientes hospitalizados em São José dos Campos à oxacilina. Também analisamos a sensibilidade destas cepas à vancomicina e à teicoplanina, devido à importância desses antimicrobianos no tratamento das infecções causadas por MRSA/ORSA. O estudo mostrou que das cepas isoladas 63,46% eram resistentes à oxacilina.

Este valor foi superior aos 43% encontrados por Silva et al., (2003) em isolados de neonatos de Hospital de ensino brasileiro. Esta diferença pode ter ocorrido devido ao fato de nem todas as cepas terem sido isoladas de infecções e, segundo Melzer et al., (2003), MRSA é mais virulento e está mais associado a infecções graves que estafilococos sensíveis à metilina.

Em 1997, Tresoldi et al., analisando a frequência relativa dos microrganismos isolados de infecções hospitalares no Hospital das Clínicas da Unicamp no

período de 1987 a 1994, observaram o aumento da frequência de MRSA. Segundo os autores, em 1990, 22,2% dos *S. aureus* isolados eram resistentes à metilina, em 1991, 42%, em 1992, 59,7%, em 1993, 53,2% e, em 1994, 53,2%. *S. aureus* foi o microrganismo mais frequente, presente nas infecções de ferida cirúrgica, da corrente sanguínea e nas artérias-venosas.

Os estafilococos também são as bactérias mais frequentes em infecções articulares e segundo Garvin, Hinrihs e Urban (1999), 46,7% das cepas associadas com infecções nestes sítios são resistentes à metilina.

Apesar da tendência dos estafilococos de desenvolverem resistência a antibióticos, quase todas as cepas são uniformemente sensíveis aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), sendo esta a classe antimicrobiana de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA/ORSA (CHAMBERS, 1988).

Analisando a sensibilidade das cepas isoladas frente à vancomicina e à teicoplanina, pudemos observar uma sensibilidade de 100% em relação a eles.

A elevada prevalência de cepas *Staphylococcus* coagulase-positivo e o conseqüente emprego de vancomicina nos hospitais brasileiros, somado à ausência de controle do uso de antimicrobiano e às condições precárias das instituições públicas de saúde, predispõem ao surgimento de cepas de sensibilidade intermediária, ou reduzida à vancomicina (VISA ou VRSA) (OLIVEIRA; MAMIZUKA, 2000).

Estas cepas têm sido estudadas no Japão, EUA, França e recentemente no Brasil. Todas as estirpes que apresentam esta característica são resistentes à oxacilina (ORSA) e os pacientes acometidos por esta bactéria fizeram uso de glicopeptídeos, principalmente vancomicina, por período prolongado. Portanto, até esse momento, o desenvolvimento de resistência à vancomicina parece estar relacionado com o contato direto e prolongado do microrganismo com o antimicrobiano (OLIVEIRA; MAMIZUKA, 2000).

Ike et al. (2001), estudando MRSA de 278 hospitais japoneses, não detectaram cepas resistentes à vancomicina. Já Oliveira et al.,(2001) observaram a existência de cepas de *S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina em Hospital brasileiro, sendo este o primeiro registro do isolamento de VRSA no Brasil. Isto alerta para a possibilidade de VRSA ser capaz de se propagar rapidamente uma vez que controles adequados à infecção nosocomial não são tomados.

Também tem sido relatado que o uso de cefalosporinas de terceira geração aumentam a possibilidade do aparecimento de enterococos resistente à vancomicina (VRE) e a resistência destes microrganismos é particularmente problemática, visto que ela é mediada por plasmídeos e pode ser transferida a outras bactérias (RAASCH R.H., 2000; MURRAY *et al.*, 2000).

É difícil prevenir e controlar as infecções que se desenvolvem em pacientes hospitalizados por muito tempo e que são tratados com antibióticos de amplo espectro. A implementação de práticas apropriadas de controle das infecções podem reduzir o risco de colonização por bactérias multirresistentes. Isto inclui vigilância contínua e aperfeiçoada, redução do uso desnecessário de antibióticos e aplicação de novas estratégias profiláticas em pacientes portadores de *Staphylococcus* para prevenção de infecções estafilócocicas mais graves por cepas multirresistentes. Estas medidas devem ser tomadas se queremos preservar o nosso arsenal antimicrobiano para a próxima década.

## CONCLUSÃO

A incidência de *Staphylococcus* coagulase-positivo resistente à oxacilina, nos três Hospitais de São José dos Campos foi alta e todas as cepas isoladas apresentaram sensibilidade à vancomicina e à teicoplanina. Os resultados demonstram a importância do uso adequado de antimicrobianos e do controle de microrganismos resistentes.

## ABSTRACT

The coagulase-positive *Staphylococcus* is an important pathogen found in skin and mucous of humans and other animals. The increase in infections caused by oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* has required intravenous treatment with glycopeptides like vancomycin and teicoplanin. The objective of this study was to verify the sensibility of coagulase-positive *Staphylococcus* to oxacillin, vancomycin and teicoplanin in clinic samples from three different hospitals of the city of São José dos Campos. The 104 samples studied, 63,46% presented resistance to oxacillin and all of them showed sensibility to vancomycin and teicoplanin (100%). The results

confirmed the high incidence of *Staphylococcus* resistant to oxacillin and the importance of antimicrobial sensibility test before their prescription to hospitalized patients.

## KEY-WORDS

Coagulase-positive *Staphylococcus aureus*. Oxacillin. Vancomycin. Teicoplanin.

## AGRADECIMENTOS

Ao Diretor Técnico Administrativo do Laboratório de Análises Clínicas (Valeclin) – Dr. José Plácido de Almeida Sgavioli, pela oportunidade de realização dos exames.

## REFERÊNCIAS

- BABER, M. Methicillin-resistant Staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, v.14, p.385-393, 1961.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Microbiologia Médica. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 158.
- CAPURRO, A.; C.; NILSSON, L.; OSTENSSON K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet Scand*, v. 40, n.4, p. 315-321, 1999.
- CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin. Microbiol., Rev.*, v. 1, 1988, p. 173-186.
- FERREIRA, A. W., ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 147-159.
- FILE, T. M. Visão geral sobre resistência bacteriana nos anos 90. *Ple. Chest.*, v. 2, n. 1, p. 3-8, 2000.
- GARVIN, K. L.; HINRIHS, S. H.; URBAN, J. A. Emerging antibiotic-resistant bacteria: their treatment in total joint arthroplasty. *Clin. Orthop.*, v. 369, p. 110-23, 1999.
- HERNÁNDEZ, J. L. et al. Clinical and microbiological characteristics of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi*. *Eur. Clin. microbial. Infect. Dis.*, v. 20, n. 3, p. 153-158, 2001.

IKE, Y. et al. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese Hospitals. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 12, p. 4445-4451, 2001.

KONEMAM, E. W. et al. *Diagnóstico microbiológico*. Texto e Atlas Colorido. 5. ed. São Paulo: Medsi, 2001, p. 551-88.

LOCKSLEY, R. M. et al. Multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction, transmission and evolution of nosocomial infection. *Ann. Int. Med.*, v. 97, p.317-324, 1982.

MAZZA, L. M. et al. *Atlas de Diagnóstico em Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 1999, p.32.

MELZER, M. et al. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicillin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteremia. *Clin. Infect. Dis.*, v. 37, n. 11, p. 1453-1460, 2003.

MURRAY, P. et al. *Microbiologia médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000, p. 173-47-157.

OLIVEIRA, G. A.; MAMIZUKA, E. M. Como triar e identificar *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina. *Laes & Haes*. p. 110-120, 2000.

OLIVEIRA, G. A. et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infection Control. Hosp. Epidemiol.*, v. 22, n. 7, p. 443-448, 2001.

PETERSEN, A. D. et al. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *Am Anim Hosp Assoc.*, v. 38, n. 5, p. 407-413, 2002.

PHILIPS, G.; GOLLEDGE, C. L. . Vancomycin and Teicoplanin something old, something new. *Med. J. Aus.*, v. 156, n. 1., p. 53-57, 1992.

RAASCH, R. H.. Infecções na unidade de terapia intensiva o uso coreto de antibióticos. Patógenos emergentes nas Doenças Infecciosas. *Relatório Especial Hospital Practice*, p. 53-64, 2000.

SILVA, H. A. et al. Infection and colonization, by *Staphylococcus aureus* in a high risk nursery of a Brazilian teaching hospital. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 7, n. 6, p. 381-386, 2003.

STEWART, G. T. O; HOLT, R. J. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. *Br. Med. J.*, v.1, p. 308-311, 1963.

TAN, T. Y. et al. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR. *J. Clinical Microbiol.*, v. 39, n.12, p. 4529-4531, 2001.

TRESOLDI, A.T. et al. Relative frequency of nosocomial microorganisms at Unicamp University Hospital from 1987 to 1994. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 39, n. 6, p. 333-336, 1997.

WEBER, D. J. et al. Infecções nosocomiais na UTI: A importância crescente dos patógenos resistentes aos antibióticos. *Ple. Chest.*, v. 2, n. 1, p. 33-39, 2000.

WEGENER, H. C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermiyis in pigs. *Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 3, p. 793-795, 1994.

YATES, R. R. Novas estratégias de intervenção para redução da resistência aos antibióticos: surtos de resistência e opções terapêuticas. v. 2, n. 1, p. 24-27, 2000.

#### **Renata de Cássia Bernardes**

aluna de Especialização em Análises Clínicas e Doenças Infecciosas da UNITAU

#### **Antonio Olavo Cardoso Jorge**

Instituto Básico de Biociências - UNITAU  
Disciplina de Microbiologia e Imunologia

#### **Mariella Vieira Perreira Leão**

Instituto Básico de Biociências - UNITAU  
Disciplina de Microbiologia e Imunologia  
Av. Tiradentes, 500, Bom Conselho, Depto de Medicina  
CEP: 12030-180 - Taubaté - SP

### **TRAMITAÇÃO**

Artigo recebido em: 10/03/2004

Aceito para publicação em: 10/05/2004