

# Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*

Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*  
Resistencia inducible a clindamicina entre aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*

Débora Meira Ramos Amorim\*

Osmar Clayton Person\*\*

Paulo José do Amaral\*\*\*

Ioshie Ibara Tanaka\*\*\*\*

**RESUMO:** Falhas terapêuticas que ocorrem em tratamentos com clindamicina podem ser devido aos múltiplos mecanismos que conferem resistência aos antimicrobianos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina. Este estudo foi realizado para detectar a presença de resistência induzível à clindamicina em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, por meio do D-teste, usando o disco de eritromicina e clindamicina segundo preconizado pelo CLSI, e sua relação com a resistência a oxacilina. A resistência MLS<sub>c</sub> foi verificada em 79,06% dos MRSA e a resistência MLS<sub>i</sub> em 4,65%. Para os MSSA, o fenótipo MLS<sub>c</sub> foi de 2,88% e o fenótipo MLS<sub>i</sub> foi de 6,73%. A resistência ao grupo MLS e a expressão constitutiva foi mais comum entre os isolados MRSA, e a frequência de MLS<sub>i</sub> foi mais frequente em MSSA do que em MRSA. O fenótipo induzível pode comprometer a eficácia da clindamicina, portanto recomenda-se a realização do teste de indução e o monitoramento constante da susceptibilidade a droga dos isolados de *S. aureus*, considerando a necessidade de controle epidemiológico e terapêutico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resistência induzível à clindamicina. Fenótipo MLS<sub>i</sub>. *Staphylococcus aureus*.

**ABSTRACTS:** Clinical failure of clindamycin therapy has been reported due to multiple mechanisms that confer resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics. This study was undertaken to detect the presence of inducible clindamycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, by D-test, using erythromycin and clindamycin disks as per CLSI, and its relationship to oxacilin resistance. In this study, 79,06% of MRSA presented the phenotype MLS<sub>c</sub>, and 4,65% the phenotype MLS<sub>i</sub>, and 2,88% and 6,73% of MSSA, respectively. The resistance to MLS group and constitutive expression were more common among the MRSA isolates, and the MLS<sub>i</sub> frequency was higher in MSSA than MRSA. The inducible phenotype can compromise the clindamycin efficacy, therefore both the inducible test and the constant monitoring of susceptibility to this drug in the *S. aureus* isolates are recommended, considering the necessity of epidemiology control and therapy.

**KEYWORDS:** Inducible clindamycin resistance. MLS<sub>i</sub> phenotype. *Staphylococcus aureus*.

**RESUMEN:** Fallas terapéuticas ocurridas en tratamientos con clindamicina pueden ser causadas por los múltiples mecanismos que confieren resistencia a los antimicrobianos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas. Este estudio fue ejecutado para detectar la presencia de resistencia inducible a clindamicina en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* de promedio la prueba D, utilizando el disco de eritromicina y clindamicina que recomienda el CLSI, y su relación con la resistencia a oxacilina. La resistencia MLS<sub>c</sub> fue verificada en el 79.06% de los MRSA y la resistencia MLS<sub>i</sub> en el 4.65%. En cuanto a los MSSA, el fenotipo MLS<sub>c</sub> alcanzó el 2.88% y el fenotipo MLS<sub>i</sub> el 6.73%. La resistencia al grupo MLS y la expresión constitutiva fueran mas comunes entre el los aislados MRSA, y la frecuencia de MLS<sub>i</sub> fue mas grande en MSSA que en MRSA. El fenotipo inducible puede comprometer la eficacia de la clindamicina, se recomendando por lo tanto la realización de pruebas de inducción y la monitoración constante de la susceptibilidad a drogas de los aislados de *S. aureus*, en vista de la necesidad del control epidemiológico y terapéutico.

**PALABRAS LLAVE:** Resistencia inducible a clindamicina. Fenotipo MLS<sub>i</sub>. *Staphylococcus aureus*.

\*Acadêmica de Medicina da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA).

\*\* Coordenador Adjunto do Curso de Medicina do Centro Universitário São Camilo.

\*\*\* Laboratorista do Serviço de Microbiologia da FAMEMA.

\*\*\*\* Professora Livre-Docente e Chefe da Disciplina e Serviço de Microbiologia da FAMEMA. E-mail: ibara@famema.br

## Introdução

Embora encontrado com relativa frequência como membro da microbiota normal humana, o *Staphylococcus aureus* atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde algumas localizadas, geralmente superficiais, até outras disseminadas, com elevada gravidade. Sua importância clínica varia ao longo dos anos, tendo crescido particularmente em função do aumento na ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por amostras resistentes<sup>1</sup>.

Macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>) são drogas quimicamente distintas, entretanto, apresentam mecanismo de ação similar na inibição da síntese proteica, pela ligação ao receptor 23s do rRNA, que faz parte da subunidade 50s do ribossomo bacteriano. Apresentam espectro de atividade dirigida contra cocos Gram positivos, cocos Gram negativos e bactérias intracelulares como clamídias e riquetsias. A resistência do *S. aureus* ao grupo MLS<sub>B</sub> é conhecida desde 1956, logo após a introdução da eritromicina na prática terapêutica. A resistência aos antibióticos ocorre devido a três mecanismos: modificações no alvo de ligação no ribossomo; efluxo ativo; ou inativação enzimática da droga<sup>2,3</sup>.

A modificação no alvo de ligação se deve a metilação do resíduo A2058, localizado no domínio conservado V de 23s do rRNA levando a resistência cruzada, resultando na formação do fenótipo de resistência conhecido como MLS<sub>B</sub>. Este fenótipo é codificado pelo gene *erm* (*erythromycin methionine methylase*) que tem sido reportado em uma grande variedade de microrganismos<sup>4,5</sup>.

A Clindamicina é usada no tratamento de infecções de pele e tecidos moles, causadas por espécies de estafilococos, além de ser uma

alternativa para pacientes alérgicos a penicilina<sup>6</sup>.

A expressão do fenótipo MLS<sub>B</sub> pode ser constitutiva (MLS<sub>Bc</sub>) ou induzível (MLS<sub>Bi</sub>). A resistência induzível é observada quando o mRNA inativo é transcrito e, na presença de um indutor, torna-se ativo produzindo metilases. Por outro lado, nas amostras com resistência constitutiva o mRNA relativo à metilase é ativo, sendo desnecessária a presença de um agente indutor<sup>2</sup>. As amostras que carregam o gene *erm* induzível são resistentes ao indutor e permanecem susceptíveis aos macrolídeos não indutores e lincosamidas. A eritromicina em baixos níveis é indutora do fenótipo MLS<sub>Bi</sub>, que é a base do D-teste<sup>7,8</sup>.

Tratamentos de infecções utilizando clindamicina e macrolídeos não indutores, causadas por amostras que carregam o gene *erm* podem levar a falha terapêutica<sup>9,10,11</sup>. Mutantes constitutivos podem ser selecionados *in vitro* na presença de clindamicina ou qualquer outro macrolídeo não indutor entre as amostras metilino resistentes<sup>2</sup>.

A meticilina ou oxacilina é um antibiótico derivado semi-sintético da penicilina, resistente à β-lactamase. Foi introduzida na Europa em 1959 e um ano depois detectou-se a primeira cepa de *S. aureus* metilino resistente (MRSA). Mais tarde, em 1963, foi reportado o primeiro surto nosocomial causado por MRSA e, desde então, têm sido notificadas cepas de MRSA em todo o mundo, representando um importante problema de saúde pública<sup>12</sup>.

A resistência à oxacilina (MRSA) é devida à presença do gene *mecA*, que faz parte de um elemento genético móvel encontrado em todos os isolados com este tipo de resistência, denominado cassete estafilocócico do cromossomo *mec* - SCC *mec* (*Staphylococ-*

*cal Cassette Chromosomal*). O gene *mecA* codifica proteínas ligadoras de penicilina (PBP) modificadas e não tem relação com a produção de β-lactamases. MRSA caracteriza a resistência a todos os antibióticos β-lactâmicos<sup>13,14</sup>.

O objetivo deste estudo foi detectar a presença de resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *S. aureus*, verificar a resistência à oxacilina e a relação entre estas formas de resistência.

## Material e métodos

Foram analisadas 147 cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes materiais clínicos (pele, abscessos, nasofaringe, secreção nasal, urina, sangue, entre outros) de pacientes atendidos nos hospitais da Faculdade de Medicina de Marília-SP nos anos de 2007 e 2008. Os isolados foram identificados por métodos convencionais<sup>15</sup>. Os discos de eritromicina (30 µg), clindamicina (2 µg), oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), entre outros, utilizados no antibiograma foram da marca Oxoid. Os isolados foram testados pelo método de Kirby-Bauer<sup>16</sup>. *S. aureus* ATCC 25923 foi usado para o controle de qualidade (CQ) dos discos de clindamicina e eritromicina, de acordo com os procedimentos de CQ padronizados no teste de disco difusão.

Os isolados resistentes a eritromicina e sensíveis à clindamicina foram submetidos ao D-teste para detectar resistência induzível a clindamicina<sup>6,17</sup>. Estes foram semeados em agar Mueller Hinton e um disco de eritromicina foi colocado a uma distância de 20 mm (borda a borda) do disco de clindamicina, e incubados a 35°C ± 2 por 24 horas. A eritromicina presente no disco difunde-se pelo meio de cultura e induz a resistência à clindamicina, resultando em um achatamento do halo de inibição, adjacente ao dis-

co de eritromicina, com a forma da letra D (efeito D), como ilustrado na Figura 1.

Os isolados positivos no D-teste foram reportados como resistentes a clindamicina, acrescidos de uma nota informativa, conforme sugere a NCCLS 2004 (atual CLSI): “este isolado é presuntivamente resistente a clindamicina baseado na prova de detecção de resistência induzida”.

Os isolados resistentes à oxacilina no teste de disco difusão foram triados para resistência à oxacilina em agar Muller Hinton, acrescido de 4% de NaCl e de 6 µg/mL de oxacilina (agar *screening* para oxacilina).

## Resultados

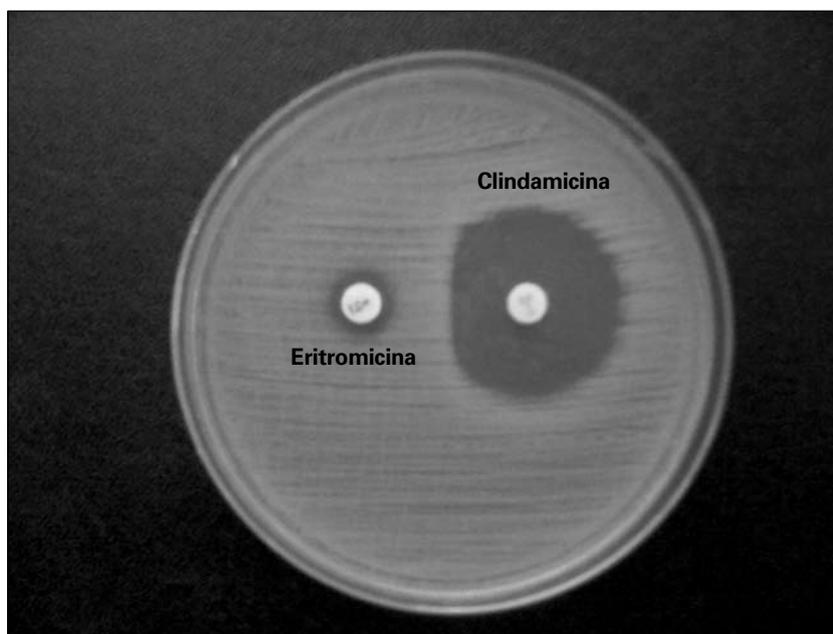
A Tabela 1 resume os resultados obtidos neste trabalho. Todos os 147 isolados estudados foram sensíveis à vancomicina, 29,25% (43) foram confirmados como MRSA e 70,75% (104) como MSSA. A resistência  $MLS_{B,c}$  foi verificada em 79,06% (34) dos MRSA e a resistência  $MLS_{B,i}$  em 4,65% (2). Para os MSSA, o fenótipo  $MLSB_{B,i}$  foi de 2,88% (3) e o fenótipo  $MLSB_{B,c}$  foi de 6,73% (7). A resistência somente a eritromicina entre os MRSA foi de 9,30% (4), e entre os MSSA de 7,69% (8). A sensibilidade aos antimicrobianos do grupo  $MLS_{B}$  foi de 6,97% (3) e 81,73% (85) entre os MRSA e MSSA, respectivamente. Uma cepa (0,96%) MSSA foi resistente somente a clindamicina.

## Discussão e conclusões

Este estudo teve como objetivo verificar qual o tipo de resistência - indutiva ou constitutiva - apresentada pelo *S. aureus* aos antibióticos do grupo  $MLS_{B}$ , assim como a relação desse com a resistência ou sensibilidade à oxacilina.

A frequência de sensibilidade e resistência a oxacilina foi de

**Figura 1.** Apresentação do D-teste. Observa-se o efeito da eritromicina reduzindo o halo de sensibilidade à clindamicina, resultando em um halo com forma de letra D



**Tabela 1.** Fenótipos de resistência MLS em 147 amostras de *S. aureus* isoladas de diferentes materiais clínicos

Resistência a oxacilina	Nº (%)	Resistência a eritromicina	( $MLS_{B,i}$ ) <sup>a</sup>	( $MLS_{B,c}$ ) <sup>b</sup>
MRSA	43 (29,25)	4 (9,30)	2 (4,65)	34 (79,06)
MSSA	104 (70,75)	8 (7,69)	7 (6,73)	3 (2,88)
TOTAL	147 (100)	12 (8,16)	9 (6,12)	37 (25,17)

MRSA, *S. aureus* resistente a meticilina; MSSA, *S. aureus* sensível a meticilina; <sup>a</sup> $MLS_{B,i}$ , fenótipo  $MLS_{B}$  induzível; <sup>b</sup> $MLS_{B,c}$ , fenótipo  $MLS_{B}$  constitutivo.

70,75% e 29,25%, respectivamente. Essa frequência de resistência a oxacilina encontrada foi maior que a reportada por Ciraj et al<sup>18</sup> (17,33%), mas muito semelhante a encontrada por Kim et al (70%)<sup>19</sup>.

A frequência encontrada por este estudo pode ser justificada no enfoque das precauções de contato e no controle do uso de antimicrobianos pela equipe de saúde. Verificou-se que a resistência  $MLS_{B,i}$  foi encontrada em 4,65% dos MRSA e 6,73% dos MSSA. Estas cepas foram isoladas de material de pele e partes moles em MRSA e de cinco cepas de MSSA. Ciraj et al<sup>18</sup> relatam frequências muito maiores de

amostras com o fenótipo  $MLS_{B,i}$ , ou seja, de 12,9% em amostras MSSA e de 38,46% em amostras MRSA.

A clindamicina é uma opção para tratamento de infecções de pele e partes moles causadas por MRSA; entretanto, o fenótipo  $MLS_{B,i}$  pode limitar a efetividade dessa droga. Desde que este tipo de resistência não seja detectado nos testes de sensibilidade por disco difusão, a aplicação do D-teste na rotina laboratorial é útil para detectar a possibilidade de indução dessa resistência e, assim, auxiliar no uso efetivo da clindamicina nas infecções estafilocócicas mencionadas.

Outros estudos sugerem que uma porcentagem verdadeira de resistência a clindamicina pode ser subestimada se o teste de indução de resistência não for efetuado<sup>20,21</sup>. As amostras MRSA exibiram taxas de fenótipo MLS<sub>B</sub>C significativamente maiores quando comparadas com as amostras MSSA. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores que constataram que a resistência constitutiva foi mais frequente em isolados de MRSA<sup>20,22,23</sup>. Um estudo realizado na Grécia mostrou que isolados MRSA que expressam o fenótipo constitutivo possuem o gene *erm C*<sup>24</sup>, enquanto outro estudo mostrou que este gene foi mais frequente entre os

isolados MSSA resistentes a eritromicina<sup>23</sup>.

Neste estudo, o fenótipo MLS<sub>B</sub>I foi comparável entre os isolados MRSA e MSSA, e a sensibilidade aos antimicrobianos do grupo MLS<sub>B</sub> foi maior em MSSA (81,73%) do que em MRSA (6,97%). Um estudo realizado na Coréia do Sul investigou a presença de resistência MLS<sub>B</sub> em *S. aureus* e constatou que 97% dos MRSA foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos do grupo MLS<sub>B</sub>, mas todos foram sensíveis a quinupristin/dalfopristin<sup>19</sup>.

A resistência ao grupo MLS<sub>B</sub> e a expressão constitutiva foram mais comuns entre os isolados MRSA, e a frequência de MLS<sub>B</sub>I foi maior

em MSSA do que em MRSA. Como já foi mencionado anteriormente, o fenótipo induzível pode comprometer a eficácia da clindamicina, portanto recomenda-se a realização do teste de indução e o monitoramento constante da susceptibilidade à droga dos isolados de *S. aureus*, considerando a necessidade de controle epidemiológico e terapêutico.

Recomenda-se a elaboração de estratégias específicas direcionadas aos profissionais acerca do MRSA, para que possam ser implementadas nas instituições de saúde, com vistas a melhorar a adesão a medidas objetivando a diminuição dos índices de infecções hospitalares.

## REFERÊNCIAS

1. Trabulsi LR, Teixeira LM, Bueris V. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. Microbiologia. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 175-82.
2. Leclercq R. Mechanisms of resistance of macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis. 2002;34(4):482-92.
3. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005.
4. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(3):577-85.
5. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(12):2823-30.
6. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4740-4.
7. Weisblum B, Demohn V. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved. J Bacteriol. 1969;98(2):447-52.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility test: supplement M100-S14. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2004.
9. Watanakunakorn C. Clindamycin therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis: clinical relapse and development of resistance to clindamycin, lincomycin and erythromycin. Am J Med. 1976;60(3):419-25.
10. Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. J Antimicrob Chemother. 2001;48(2):315-6.
11. Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance *in vitro*. Clin Infect Dis. 2003;37(9):1257-60.
12. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilicilinoresistente. Salud Publica Mex. 2005;47(5):381-7.
13. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(11):7687-92.
14. Rohrer S, Maki H, Berger-Bächi B. What makes resistance to methicillin heterogeneous? J Med Microbiol. 2003;52(pt 8):605-7.

15. Kloss WE, Banerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington (DC): ASM Press; 1999. p. 264-82.
  16. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45(4):493-6.
  17. CDC Appendix (to Routine Disk Diffusion test). Clindamycin disk induction test for *Staphylococcus* spp. [cited 2009 Jul 15]. Available from: [http://www.managingmanagedcare.com/discus/messages/225/2\\_Hindler\\_D-Test-947.pdf](http://www.managingmanagedcare.com/discus/messages/225/2_Hindler_D-Test-947.pdf)
  18. Ciraj AM, Vinod P, Sreejith G, Rajani K. Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of staphylococci. Indian J Pathol Microbiol. 2009;52(1):49-51.
  19. Kim HB, Lee B, Jang HC, Kim SH, Kang CI, Choi YJ, et al. A high frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolated in South Korea. Microb Drug Resist. 2004;10(3):248-54.
  20. Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in clinical staphylococcal isolates. Int J Antimicrob Agents. 2008;31(4):364-8.
  21. Gul HC, Kilic A, Guclu AU, Bedir O, Orhon M, Basustaoglu AC. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistant phenotypes and genotypes for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. Pol J Microbiol. 2008;57(4):307-12.
  22. Reyes J. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. Int J Infect Dis. 2007;11(4):329-36.
  23. Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S, Higuchi W, et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. Clin Microbiol Infect. 2007;13(3):325-7.
  24. Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. erm(C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. J Antimicrob Chemother. 2004;53(5):814-7
- 

*Recebido em 30 de junho de 2009*  
*Aprovado em 4 de agosto de 2009*