ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

Comparação de duas metodologias para a detecção do mecanismo de resistência indutível à clindamicina em estirpes de *Staphylococcus* spp.

Comparison of Two Methodologies for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococcus spp.

/ J. Teixeira[1] / H. Ramos[2]

[1] Técnico Análises Clínicas, Serviço de Microbiologia, Centro Hospitalar do Porto, HSA
[2] Directora do Serviço de Microbiologia, Centro Hospitalar do Porto, HSA

Correspondência:
Júlio Manuel Pereira Teixeira
Rua Afonso Henriques, 2573, 6ª hab 5
4425-057 Águas Santas – Maia
Portugal
Telemóvel: 91 4151800
e-mail: juliompt37@gmail.com

/ Resumo

Os microrganismos em estudo pertencem ao género *Staphylococcus*, são reconhecidos como uma das principais causas de infecções adquiridas na comunidade e de infecções nosocomiais. Os mecanismos de resistências desenvolvidos por estes agentes, nomeadamente o mecanismo de resistência induzida, têm dificultado o tratamento de infecções. Os resultados dos métodos automáticos de susceptibilidade aos antimicrobianos num Laboratório de Microbiologia podem suscitar frequentemente dúvidas, e não se mostrarem eficazes. Este estudo teve como objectivo estudar a detecção do mecanismo de resistência induzida à clindamicina comparando os resultados obtidos no sistema VITEK® 2 da bioMérieux usando a carta AST-P580 com o método de indução, método reconhecido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute's (CLSI). Verificou-se que a espécie predominante era *Staphylococcus aureus* e que grande parte do género possuía fenótipo de resistência susceptível (43%), no que se refere à resistência induzida verificou-se 30% no global. Como resposta ao objectivo do estudo, ficou concluído que o resultado da indução à clindamicina usando a carta AST-P580 evidencia uma total concordância de resultados com o método de indução.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, Resistência, Clindamicina.

/ Abstract

The studied microorganisms belong to Staphylococcus genus; they are recognized as one of the main causes of community-acquired and nosocomial infections. The resistance mechanisms developed by these agents, namely the induced resistance mechanism, have made it difficult for the treatment of the infections. The results of automatic methods for antimicrobial susceptibility in a Microbiology Laboratory can cast numerous doubts, and not reveal effectiveness. The present research was performed to study the detection of inducible clindamycin resistance mechanism, comparing the results obtained with VITEK® System using card AST-580 (BioMérieux) and with Induction method, recognized method for the Clinical and Laboratory Standards Institute's (CLSI). The results showed that

Staphylococcus aureus was the predominant species and that a high percentage of the genus exhibited susceptible resistance phenotype (43%); overall, 30% demonstrated induced resistance. This study indicated that there is a total concordance in the results given by the two methods (the usage of card AST-580 and the induction method).

Key-words: *Staphylococcus, Resistance, Clindamycin.*

/ Introdução

Os *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa são reconhecidos como uma das principais causas de infecções adquiridas na comunidade e de infecção nosocomial a nível mundial[1]. Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos desenvolvidos por estes agentes têm sido motivo de preocupação para a classe médica. O grupo de antibióticos actualmente usado no tratamento das infecções estafilocócicas como alternativa aos *ß*-lactâmicos é o grupo (MLS_B): macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) e estreptograminas B[2]. Estes antibióticos pertencem a classes diferentes, mas têm essencialmente o mesmo mecanismo de acção, inibem a síntese das proteínas ligando-se às subunidades ribossomais 50S da parede celular bacteriana. Tal como nas penicilinas, tem-se verificado um aumento das resistências associadas a estes antibióticos. A resistência por mecanismo de efluxo e a resistência devido à metilação ribossomal do alvo de acção são os dois mecanismos de resistência mais frequentes. O mecanismo de efluxo confere resistência somente aos macrólidos e estreptograminas B e é conhecido como fenótipo de resistência MS_B. A resistência devido à metilação ribossomal confere resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B e é conhecido como fenótipo de resistência MLS_B[3, 4, 5]. Esta última pode apresentar-se como constitutiva (fenótipo $^cMLS_B$) ou induzida (fenótipo $^iMLS_B$). Está demonstrado que a resistência constitutiva à clindamicina pode ser detectada pelos métodos de susceptibilidade tradicionais de rotina. No que refere à resistência induzida isso já não se verifica. Conhecer o fenótipo de resistência é importante, pois permite prescrever o antimicrobiano correcto ao paciente. Estudos efectuados demonstraram insucesso clínico em pacientes infectados com estirpes com fenótipo de resistência induzida $^iMLS_B$ quando medicados com clindamicina[6]. Os métodos automáticos utilizados na maioria dos Laboratórios de Microbiologia não se mostram eficazes na detecção deste mecanismo de resistência. O objectivo deste projecto foi comparar o teste de indução utilizado no Serviço de Microbiologia com a nova carta AST-P580 do sistema VITEK® 2 (BioMérieux, Marcy, L'Etoile, France), de modo a verificar o seu desempenho para possível utilização na rotina laboratorial.

/ Material e Métodos

Foram estudadas um total de 297 estirpes de *Staphylococcus spp* (ver *Gráfico 1*), isoladas de amostras com interesse clínico no Serviço de Microbiologia do HGSA, entre Abril e Junho de 2009. Destes 221 *Staphylococcus aureus,* 45% (135) eram *Staphylococcus aureus meticilino-resistentes* (STAUMR), 29% (86) *Staphylococcus aureus meticilino-sensíveis* (STAUMS) e 26% (76) *Staphylococcus coagulase negativa (SCN).*

As estirpes foram identificadas com recurso ao sistema semi-automático Vitek® 2, de acordo com o protocolo do fabricante (BioMérieux, Marcy, L'Etoile, France). O estudo da susceptibilidade antimicrobiana foi executado pelo método semi-automático Vitek® 2, recorrendo à carta AST-P580, de acordo com o protocolo do fabricante (BioMérieux, Marcy, L'Etoile, France). No controlo de pureza da detecção da susceptibilidade,

efectuou-se o teste de indução, método prático para detecção da resistência induzida à clindamicina, que consiste em colocar um disco de eritromicina (15µg) a 15 mm de distância de um disco de clindamicina (2µg) sobre a placa, confluente para o crescimento, (CLSI 2003) [7]. Após incubação de 16 a 24h a 35ºC, as zonas de inibição foram examinadas para detectar qualquer achatamento da forma do halo da clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (zona D), que indica resistência induzida. O crescimento até ao disco de clindamicina indica resistência constitutiva. O organismo que não apresentar halo de inibição da clindamicina será considerado sensível.

/ Resultados

A comparação entre os resultados dos testes de indução e da carta de susceptibilidade AST-P580 do Vitek® 2 evidencia uma total concordância de resultados, 100% (*Quadro I*).

No que se refere à detecção da resistência induzida da clindamicina: das 297 estirpes, 43% obtiveram o fenótipo sensível à clindamicina, 30% o fenótipo de resistência induzida e 16% resistência constitutiva. 11% das estirpes apresentaram resistência apenas à eritromicina, fenótipo MS_B (*Quadro II*).

A resistência induzida predomina sobre a resistência constitutiva e o fenótipo sensível (46%, 30% e 21% respectivamente) entre os isolados de STAUMR. O fenótipo sensível predomina em larga maioria (84%) entre os isolados de STAUMS. Entre os isolados de SCN verificou-se que predomina (31%) a resistência induzida, sobre a sensível e a resistência constitutiva, 25% e 17%, respectivamente (*Quadro I*).

/ Discussão e Conclusão

A crescente frequência de infecções provocadas por estirpes de *Staphylococcus* e a mudança no padrão de resistência, conduziram ao interesse renovado no uso da terapia pela clindamicina para tratar tais infecções. A clindamicina é uma boa alternativa para o tratamento de infecções provocadas por *Staphylococcus* resistentes e sensíveis à meticilina[8]. Desde 2004 o CLSI recomenda o uso do teste de indução e sugere que as estirpes com o fenótipo de resistência induzida sejam relatadas como clindamicina resistente[9]. Neste estudo os resultados indicam que o STAUMR é a espécie mais predominante no período em análise. Verificou-se uma incidência elevada (30%) do fenótipo induzido, tal como noutros estudos[10]. Conferiu-se também que grandes partes das estirpes (43%) eram susceptíveis à eritromicina e à clindamicina, as quais poderão constituir uma opção terapêutica com estas drogas. No que se refere à comparação dos dois métodos, foi demonstrado que a resistência induzida pode ser facilmente detectada quer pelo teste de indução quer no Vitek® 2 pela carta AST-P580, avaliação em que se obteve 100% de

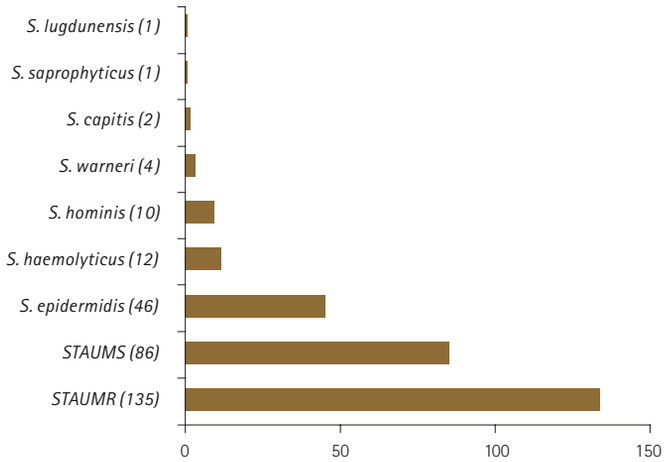


Gráfico 1 — Espécies e frequência das estirpes de *Staphylococcus* estudadas.



QUADRO I – COMPARAÇÃO DE RESULTADOS DO MÉTODO DE INDUÇÃO COM A CARTA AST-P580 DO VITEK® 2

Estirpe	Fenótipo	N.º de amostras	% de resistências	N.º e % de amostras detectados pelo Teste D	N.º e % de amostras detectadas pelo Vitek
STAUMR (135)	$^{i}MLS_{B}$	62	46%	62 (100	62 (100)
	$^{c}MLS_{B}$	34	30%	34 (100)	34 (100)
	MS_{B}	5	3%	5 (100)	5 (100)
	S/ resistência	34	21%	34 (100)	34 (100)
STAUMS (86)	$^{i}MLS_{B}$	5	7%	5 (100)	5 (100)
	$^{c}MLS_{B}$	1	1%	1 (100)	1 (100)
	MS_{B}	6	8%	6 (100)	6 (100)
	S/ resistência	74	84%	74 (100)	74 (100)
SCN (76)	$^{i}MLS_{B}$	22	31%	22 (100)	22 (100)
	$^{c}MLS_{B}$	14	17%	14 (100)	14 (100)
	MS_{B}	21	27%	21 (100)	21 (100)
	S/ resistência	19	25%	19 (100)	19 (100)

STAUMR (Staphylococcus aureus meticilino resistente) STAUMS (Staphylococcus aureus meticilino sensível) SCN (Staphylococcus coagulase negativa) $^{i}MLS_{B}$ - fénotipo de resistência induzida; $^{c}MLS_{B}$ - fénotipo de resistência constitutiva; $^{c}MLS_{B}$ - fénotipo de resistência pelo mecanismo de efluxo.

concordância. Com este estudo pretendia-se avaliar o método utilizado na rotina deste laboratório, podendo concluir-se que o teste de indução realizado no Vitek® 2 usando a carta AST-P580 produz resultados que permitem descriminar correctamente entre resistência induzida e constitutivo, podendo assim ajudar a evitar falhas terapêuticas nos doentes administrados com clindamicina.

QUADRO II – CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À CLINDAMICINA

Fenótipo de resistência	Frequência (n=297)	Percentagem
Constitutivo	49	16%
Induzido	89	30%
Sensível	127	43%
Negativo	32	11%

/ Bibliografia

1. Fokas, S., Fokas, S., Tsironi, M., Kalkani, M. & Dionysopouloy, M. "Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide resistant *Staphylococcus* spp." *Clin. Microbiol. Infect.* 2005; *11:* 337-340.
2. Fiobelkorn, K. R., Crawford, S.A., McElmeel, M. L. & Jorgensen, J. H. "Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistence in Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci". *J. Clin. Microbiol.* 2003; *41:* 4740-4744.
3. Goldman, R. C. & Capobianco, J. O. "Role of an energy dependent efflux pump in plasmid $_{p}$NE24-mediated resistance to 14 and 15 memered macrolides in *Staphylococcus epidermidis". Antimicrob. Agents Chemother* 1990; *34:* 1973-1980.
4. Leclercq, R. & Courvalin, P. "Bacterial resistence to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification". *Antimicrob. Agents Chemother* 1991a; *35:* 1267-1272.
5. Leclercq, R. & Courvalin, P. "Intrinsic and unusual resistence to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria". *Antimicrob. Agents Chomether* 1991b; *35:* 1273-1272.
6. Jorgensen, J. H., S. A. Crawford, M. L. McElmeel, and K. R. Fiebelkorn. "Detection of inducible clindamycin resistance of staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing". *J. Clin. Microbiol.* 2004; *42:* 1800-1802.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards *(2003).* "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests approved standard M2-A8. Wayne, PA": National Committee for Clinical Laboratory Standards.
8. Frank, A. L., Marcinak, J. F., Mangat, P. D., Tjhio, J. T., Kelkar, S., Schreckenberger, P. C. & Quinn, J. P. "Clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. Pediatr." *Infect. Dis.* 2002; *21:* 530-534.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards *(2004).* "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, fourteenth informational supplement, document M100-S14. Wayne, PA": National Committee for Clinical Laboratory Standards.
10. Yilmaz, G., K. Aydin, S. Iskender, R. Caylan, I. Koksal. "Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci". *Journal of Medical Microbiol.* 2007; *56:* 342-345.