Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl.,2009;30(1):115-118
ISSN 1808-4532

Determinação da resistência de *Staphylococcus aureus*: um desafio?

Colli, V.C.[1]; Pizzolitto, A.C.[1]; Raddi, M.S.G.[1]*

[1]*Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.*

Recebido 04/12/2008 / Aceito 16/06/2009

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus*, com diferentes padrões de eletroforese em campo pulsado (PFGE), em relação à resistência induzida à clindamicina e caracterizar cepas resistentes à oxacilina por testes fenotípicos. Do total de 18 cepas diferenciadas por PFGE, isoladas dos sítios nasais ou linguais de portadores adultos saudáveis, sem doença de base, sem histórico de uso de antibióticos e internações hospitalares, quatro (22,2%) apresentaram sensibilidade à clindamicina no antibiograma convencional, mas demonstraram resistência no D-teste; uma cepa (5,6%) foi caracterizada como BORSA (*borderline*) em relação à resistência a oxacilina e outra (5,6%) CA MRSA (*S.aureus* meticilina/oxacilina resistente associado à comunidade), ambas sensíveis à cefoxitina pelo teste de disco difusão. A caracterização molecular pela reação em cadeia para polimerase (PCR) da cepa identificada fenotipicamente como CA MRSA não revelou a presença do gene *mec*A, indicando tratar-se de cepa BORSA. Estes resultados apontam a importância do emprego rotineiro do D-teste como ferramenta para a determinação da resistência do tipo induzida à clindamicina, bem como para a importância da inclusão do teste de resistência à cefoxitina entre os métodos fenotípicos para caracterização de MRSA.

Palavras-chave: Staphylococcus aureus. Caracterização fenotípica. D-teste. MRSA.

Autor correspondente: Maria Stella Gonçalves Raddi - Departamento de Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista - UNESP - Expedicionários do Brasil, 1621 - CEP.14801-902 – Araraquara - SP - Brasil - Telefone:(16) 3301-6557 Fax: (16)3301-6559 - e-mail:raddims@fcfar.unesp.br

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é reconhecido como um patógeno hospitalar, entretanto várias publicações confirmam que infecções por cepas MRSA adquiridas na comunidade (CA MRSA: *community-associated methicillin resistant S. aureus*) estão aumentando, tanto nas áreas urbanas como em zonas rurais (Huijsdens et al., 2006). CA MRSA pode ser transmitido durante contato direto entre pessoas que compartilham intimamente o mesmo espaço como, por exemplo, acampamentos, internatos, creches, hotéis de bebê e outros (Gwen et al., 2005).

Relatos recentes associaram CA MRSA a abscessos, erupção na pele e pneumonia severa, visto que essas cepas exibem, com alta prevalência, genes que codificam a produção de uma leucocidina, no seu cassete cromossômico mec do tipo IV, denominada de Panton-Valentine, uma exotoxina associada a infecções graves. Nesses casos, o tratamento empírico com agentes de ß-lactâmicos é ineficaz, sendo a cultura indicada para identificação de CA MRSA e adequação terapêutica (Rotas et al., 2007).

A resistência constitutiva à oxacilina no *S. aureus* é determinada pela presença de um gene localizado no cromossomo, o gene *mec*A. Cepas de *S. aureus* com menor susceptibilidade à oxacilina, em decorrência da alta produção de β-lactamases, são designadas BORSA (*borderline oxacillin-resistant S. aureus*) (Nadarajah et al., 2006). CA-MRSA caracteristicamente tende a ser menos multirresistente que MRSA de origem hospitalar mantendo, em geral, sensibilidade à clindamicina, porém resistência a esse antibiótico pode ser do tipo induzida (Lamplante et al., 2007). Esse mecanismo de resistência não é detectado através do teste de sensibilidade rotineiramente empregado em laboratórios, sendo recomendado o teste de indução, denominado de D-teste (O'Sullivan et al., 2006; Otsuka et al., 2007).

Diversos métodos têm sido utilizados para a detecção da resistência em *S. aureus*. Métodos fenotípicos auxiliam na identificação de CA MRSA, pois essas cepas apresentam resistência à oxacilina, com concentração

inibitória mínima (CIM) entre 4 e 32 µg/mL (Boyce, 2003; Ribeiro et al., 2005). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar resistência induzida à clindamicina e detectar resistência à oxacilina em cepas de *S. aureus* através de métodos fenotípicos utilizados para o diagnóstico laboratorial.

Um total de 37 cepas de *S. aureus* isoladas dos sítios nasais ou linguais de pacientes portadores adultos voluntários, saudáveis e sem histórico de internação hospitalar prévia ou uso de antibióticos, atendidos na Clinica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-SP, Brasil, foram inicialmente submetidos à tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE), no Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Escola Paulista de Medicina. A digestão enzimática do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição *SmaI* (CCC GGG) (PHARMACIA, UNITED KINDON) e a eletroforese em campo pulsado no equipamento CHEF DRI *System* (BIO-RAD, USA) com intervalos de tempo de pulso de 1 a 30 segundos por 24 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm (Pfaler, 1993). Os resultados selecionaram 18 cepas, com distintos perfis eletroforéticos, isto é, não relacionadas epidemiologicamente. O padrão de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado através do método de disco difusão (NCCLS, 2004) em Agar Mueller Hinton (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com 4% de NaCl com os discos de (CECON-SP, Brazil): penicilina G (10U), amoxacilina/ácido clavulínico (20/10 µg), eritromicina (25 µg), clindamicina (2 µg) e oxacilina (1 µg). *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle. A resistência induzida a clindamicina foi avaliada através do D-teste, empregando-se discos de eritromicina (15 µg) e clindamicina (2 µg) colocados lateralmente a uma distância entre 15 e 23 mm e incubado por 16-18 h a 35-37º C. Considerou-se o D-teste positivo quando da presença de qualquer achatamento no halo da clindamicina na zona de confluência dos dois antibióticos (NCCLS, 2004). A resistência à oxacilina foi verificada empregando-se Agar Mueller-Hinton contendo 4% NaCl e 6 µg/mL oxacilina (MRSA *Screen Agar*) (NCCLS, 2004) e a concentração inibitória mínima (CIM) determinada pelo método de diluição em caldo Mueller Hinton (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com 2% de NaCl contendo diluições sucessivas (0,1 a 100 µg/mL) do antimicrobiano (SIGMA, St. Louis, MO-USA). Cepas com CIM > 2 µg/mL sem crescimento em MRSA *Screen Agar* foram submetidas ao teste de detecção de β-lactamases através de disco de nitrocefina (SIGMA, St. Louis, MO-USA). O estudo obteve a aprovação de Comitê de Ética em Pesquisa Faculdade de Odontologia de Araçatuba-SP, Brasil (protocolo 01112/04).

Do total de 18 cepas de *S. aureus* com diferentes padrões de PFGE, quatro (22,2%) demonstraram sensibilidade a clindamicina no teste de disco difusão,

Tabela 1 - Caracterização fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus*

		Antimicrobianos						
Strains	SA(1)	PEN(2)	AMXCL(3)	ERI(4)	CLI(5)	OXA(6)	CF0(7)	CIM(8)
24N	Não	S	S	S	S	S	S	≤ 0.1
37N	Não	R	S	S	S	S	S	≤ 0.1
LCN	Não	R	S	S	S	S	S	≤ 0.1
CNN	Não	R	S	S	S	S	S	≤ 0.1
36T	Não	R	S	S	S	S	S	≤ 0.1
38T	Não	R	S	S	S	S	S	≤ 0.1
1N	Não	R	S	R	S	S	S	0.2
7N	Não	R	S	R	S	S	S	0.2
21N	Não	R	S	R	S	S	S	0.2
40T	Não	R	S	R	S	S	S	0.2
5N	Sim	R	S	R	S	R	S	8.0**
LGT	Não	R	S	R	S*	S	S	0.2
32N	Não	R	S	R	S*	S	S	≤ 0.1
4N	Não	R	S	R	S	S	S	≤ 0.1
4A	Não	R	S	R	S	S	S	0.2
4AT	Não	R	S	R	S	I	S	2.0**
8N	Não	R	S	R	S*	S	S	0.2
19N	Não	R	S	R	S*	S	S	≤ 0.1

(1)Screen Agar; (2)penicilina; (3)amoxacilina/acido clavulânico; (4)eritromicina; (5) clindamicina; (6)oxacilina; (7)cefoxitina; (8)concentração inibitória mínima para oxacilina (µg/mL); * D-teste positivo; ** produção de β-lactamases; R, resistente; S, sensível; I, intermediário

no entanto apresentaram resistência induzida quando analisadas pelo D-teste. Através do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados, 16 (88,8%) cepas foram consideradas *S. aureus* meticilina sensível (MSSA), uma (5,6%) BORSA (CIM para oxacilina de 2,0 µg/mL) e uma (5,6%) CA MRSA (resistente à oxacilina pelo teste de difusão em agar, CIM para oxacilina de 8.0 µg/mL, crescimento em *Screen Agar*) (Tabela 1). A cepa identificada fenotipicamente como CA MRSA foi submetida à técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) para detecção do gene *mec*A de resistência à meticilina, considerado padrão-ouro, no Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ (*primers: Forward*: MECA P 5' TCCAGATTACAACTTCACCAGG-3'; *Reverse*: MECA P7 5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'), entretanto sua presença não foi revelada.

A vigilância dos padrões de sensibilidade aos antimicrobianos de *S. aureus* é de grande importância para a compreensão das tendências emergentes de resistência. Este estudo demonstrou resistência induzida à clindamicina em 22,2% das cepas, evidenciando a necessidade da utilização rotineira do D-teste na avaliação laboratorial para, conseqüentemente, evitar falhas terapêuticas nas infecções causadas por essas cepas.

A determinação de resistência à oxacilina em *S. aureus* é essencial sob o ponto de vista clínico, pois as infecções por BORSA podem ter como opção terapêutica oxacilina ou um β-lactâmico associado a um inibidor de β-lactamases, porém nas infecções por MRSA essas indicações são inadequadas. Agar Mueller-Hinton contendo 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina (MRSA *Screen Agar*) é recomendado como um dos teste fenotípico para verificação de resistência à oxacilina em *S. aureus* (NCCLS, 2004), entretanto alguns estudos revelam discrepâncias entre cepas que demonstram menor susceptibilidade à oxacilina por apresentarem mecanismo de resistência não relacionada à presença do gene *mec*A, mas pela produção de grande quantidade de β-lactamases. A cepa classificada fenotipicamente como CA MRSA não demonstrou a presença do gene *mec*A, sendo considerada BORSA.

Estudos mais recentes demonstram a eficácia do teste de disco-difusão para cefoxitina como marcador substituto da detecção da resistência à meticilina pelo gene *mec*A (Swenson et al., 2007; Anand et al., 2009). Assim, as cepas foram submetidas ao teste de sensibilidade à cefoxitina (30 µg) e relatadas como sensíveis por apresentarem o diâmetro da zona de inibição ≥ 20 mm, demonstrando a concordância do teste com a PCR para a discriminação do MRSA.

Para o sucesso terapêutico de infecções causadas por *S. aureus* a realização de um diagnóstico laboratorial confiável é condição essencial, no entanto a proximidade dos valores de CIM para oxacilina de BORSA e MRSA pode dificultar a caracterização qualitativa da resistência (Rojas et al., 2007). Apesar da acurácia dos testes fenotípicos para o diagnóstico da resistência à oxacilina em estafilococos ser relatada, um índice não desprezível de erro (5,6%) foi demonstrado empregando os métodos de rotina. O teste de disco-difusão utilizando cefoxitina parece, atualmente, ser uma alternativa fidedigna para detecção de MRSA.

A comparação contínua dos testes laboratoriais recomendados com testes confirmatórios para a detecção de resistência à oxacilina deve ser realizada com freqüência até que métodos moleculares para a caracterização de MRSA sejam tecnicamente disponíveis e a baixo custo.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Profa. Dra. Agnes M. S. Figueiredo do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, pela análise de PCR.

ABSTRACT

Identification of drug resistance in Staphylococcus aureus: a challenge?

The aim of this study was to identify the resistance profile of *Staphylococcus aureus* strains, in relation to induced clindamycin resistance, and to detect oxacillin resistance by the routine phenotypic methods. The strains were isolated from nasal or lingual swabs taken from healthy adult carriers with no medical history of hospitalization or antibiotic treatment. Eighteen strains were distinguished by the different patterns generated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Four (22.2%) of these showed sensitivity to clindamycin by the conventional antibacterial susceptibility test, but demonstrated inducible resistance to it by the D-test. One strain (5.6%) was characterized as *borderline oxacillin-resistant S. aureus* (BORSA), and another (5.6%) as CA MRSA (community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Both of these strains were shown to be cefoxitin susceptible by the disk diffusion test. The polymerase chain reaction (PCR) failed to detect the *mec*A gene in this last strain and it was thus classified as BORSA. These results show the importance of incorporating the D-test into the routine lab tests for *S. aureus* inducible clindamycin resistance and also of including the cefoxitin resistance test among the phenotypic methods for MRSA characterization.

Keywords: Staphylococcus aureus. Phenotypic identification. Clindamycin. MRSA.

REFERÊNCIAS

Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin *Screen Agar*, and PCR for *mec*A gene for detection of MRSA. Indian J Med Microbiol. 2009; 27:27-9.

Boyce JM. Update on resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clin Upd Infec Dis. 2003; 6(2):1-4.

Gwen B, Jeffrey P, Barry CS. Community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA MRSA). Guidelines for clinical management and control of transmission, Wisconsin Division of Public Health University; 2005.

Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuvel MG, Heck ME, Pluister GN, Voss A, Wannet WJ, de Neeling AJ. Community-acquired MRSA and pigfarming. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006; 10:5-26.

Lamplante KL, Rybak MJ, Amjad M, Kaatz GW. Antimicrobial susceptibility and staphylococcal chromosomal cassette mec type in community- and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pharmacotherapy 2007; 27:3-10.

Nadarajah J, Lee MJS, Louie L, Jacob L, Simor AE, Louie M, McGavin MJ Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with *borderline* oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. J Med Microbiol. 2006; 55:1675-83.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standarts. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Baltimore; 2004.

Nicola F, Bantar C, Canigia LF, Relloso S, Bianchini H, Smayevsky J. Comparison of several methods to determine methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* with focus on *borderline* strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000; 36:91-3.

O'Sullivan MV, Cai Y, Kong F, Zeng X, Gilbert GL. Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in Staphylococcus spp. J Clin Microbiol. 2006; 44:4072-6.

Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S, Higuchi W, Yamamoto T. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(3):325-7.

Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquo L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol. 2005; 43:1985-8.

Rojas M, Calla S, Liu C, Minkoff H, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Necrotizing Pneumonia Arising From an Infected Episiotomy Site, Obstet Gynecol. 2007; 109:533-6.

Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Patel JB. Detection of *mec*A-mediated resistance using cefoxitin disk diffusion (DD) in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing *borderline* oxacillin MICs. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 58:33-9.