

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

SUSCETIBILIDADE DE Staphylococcus epidermidis À
VANCOMICINA, RIFAMPICINA, AZITROMICINA E
ERITROMICINA

JULIANA THEISEN

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

SUSCETIBILIDADE DE Staphylococcus epidermidis À
VANCOMICINA, RIFAMPICINA, AZITROMICINA E
ERITROMICINA

Trabalho de Conclusão

da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

ORIENTADORA: Prof^a Dra. Ana Lúcia Peixoto de Freitas

CO-ORIENTADORA: Msc. Ana Lúcia Souza Antunes

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2010

RESUMO

Staphylococcus epidermidis é o mais frequente agente responsável por infecções relacionadas a implantes de dispositivos médicos e infecções de corrente sanguínea. Infecções associadas ao *S. epidermidis* caracterizam-se por sua capacidade em colonizar o polímero de superfície, formando o biofilme. Biofilme é um processo complexo e multifatorial, constituído por células bacterianas aderidas entre si e a uma superfície, envoltas por uma matriz polimérica altamente hidratada, que confere proteção contra a ação do sistema imunológico e dos antimicrobianos dificultando o tratamento da doença. O uso prolongado de antimicrobiano, especialmente na presença de cateter venoso central (CVC), tem gerado um problema de resistência. Assim, este estudo teve como principal objetivo avaliar a resistência em *S. epidermidis* isolados de amostras clínicas de CVC, frente à vancomicina, à rifampicina, à azitromicina e à eritromicina, através dos métodos de disco difusão (DD) e concentração inibitória mínima (CIM). Entre os agentes mais comumente utilizados para tratar infecções por *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) estão a vancomicina, a rifampicina, a eritromicina e a azitromicina. Para escolha do antimicrobiano adequado é importante determinar sua suscetibilidade, o que pode ser feito através de diferentes testes laboratoriais. Os testes “in vitro” buscam determinar a suscetibilidade da bactéria a doses usuais através do método de disco difusão, ou determinar a CIM. Estudos têm relatado um aumento sutil da resistência a vancomicina, que não estava sendo percebido pelo uso do teste de disco difusão o que também pode estar acontecendo com outros antimicrobianos. Nossos resultados mostraram que a disco difusão não determina exatamente o nível de resistência, uma vez que as CIMs da maioria das amostras estudadas foram muito elevadas. Embora tenha ocorrido na maioria dos isolados uma correlação entre os resultados de DD e CIM, os níveis de resistência não são mensurados com clareza, quando se utiliza apenas a DD. A preocupação com multiresistência torna importante saber qual o nível de resistência de nossas amostras clínicas. A solução para o problema mundial da resistência antimicrobiana vai além da necessidade de desenvolvimento de novos agentes. Outros fatores também são importantes, tais como o uso prudente dos fármacos existentes, o uso adequado de combinações de antibióticos, o controle e a prevenção da disseminação de organismos

resistentes aos antimicrobianos e, principalmente, o monitoramento atento do aumento destas resistências.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis*, vancomicina, eritromicina, azitromicina, rifampicina, resistência.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3 OBJETIVO.....	15
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	16
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1.1 Ensaios de Disco Difusão.....	16
4.1.2 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	16
5 RESULTADOS.....	18
6 DISCUSSÃO.....	19
7 CONCLUSÃO.....	23
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

O cateter venoso central (CVC) vem sendo utilizado desde 1945 com o objetivo de facilitar o diagnóstico ou o tratamento do paciente hospitalizado, para administrar medicamentos, soluções hidroeletrólíticas, sangue, alimentos e, também, para a monitoração de parâmetros fisiológicos. Apesar de sua grande utilidade, ele representa uma fonte potencial de complicações infecciosas (DIENNER *et al.*, 1996).

Várias condições têm sido apontadas como fatores de risco para o desenvolvimento das infecções associadas ao CVC. A duração do cateterismo, a colonização cutânea no local de introdução do cateter, a manipulação frequente da linha venosa e a gravidade do estado clínico são considerados os fatores mais importantes (DIENNER *et al.*, 1996).

A utilização de procedimentos invasivos e o uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro trouxeram benefícios aos pacientes, mas por outro lado, ocasionaram um aumento na incidência de infecções por microrganismos multirresistentes (SOUZA & FIGUEIREDO, 2008). As fontes associadas a esse tipo de infecção incluem as bactérias da microbiota da pele dos pacientes e da equipe médica, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, que estão comumente presentes nestes processos (ANWAR *et al.*, 1990).

Infecções associadas a *S. epidermidis* caracterizam-se por sua capacidade de colonizar o polímero de superfície, formando biofilme. A formação do biofilme é um processo em duas etapas: primeiro, a bactéria se adere rapidamente ao material do polímero; após, as bactérias se proliferam para formar “clusters” de várias camadas de células (EIFF *et al.*, 2002). As propriedades físico-químicas da superfície do CVC podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais têm mais afinidade pelas superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que pelas hidrofílicas (vidro ou metais). Já foi demonstrado que a adesão microbiana é favorecida pelo aumento da hidrofobicidade (DONLAN & COSTERTON, 2002). Assim, materiais como polietileno e polivinil, muitas vezes usados como principal

constituente dos CVC's, favorecem a aderência de microrganismos (ROSS, 2006).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno relacionado à existência de genes que codificam diferentes mecanismos que impedem a ação dos antimicrobianos. A resistência pode ser natural, quando os genes de resistência fazem parte do código genético do microorganismo, ou adquirida, quando os genes de resistência não estão normalmente presentes no código genético do microorganismo, sendo a ele incorporado (TAVARES, 2001).

Entre os agentes mais comumente utilizados para tratar infecções por *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) estão a vancomicina, a rifampicina, a eritromicina e a azitromicina. Para escolha do antimicrobiano adequado é importante determinar sua suscetibilidade, o que pode ser feito através de diferentes testes laboratoriais. Os testes "in vitro" buscam determinar a suscetibilidade da bactéria a doses usuais através do método de disco difusão, ou determinar a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano (concentração inibitória mínima - CIM). A técnica de disco difusão é amplamente utilizada devido à facilidade de procedimentos e à boa correlação com a resposta terapêutica. No entanto, a determinação da CIM possibilita analisar a evolução da resistência através da observação do aumento das doses necessárias para inibir a bactéria. Também cabe ressaltar que a adequação do método da difusão tem sido questionada para algumas combinações bactéria e antimicrobiano (SADER *et al.*, 2009).

Assim, este estudo teve como principal objetivo avaliar a resistência em *S. epidermidis* isolados de amostras clínicas de CVC frente à vancomicina, à rifampicina, à azitromicina e à eritromicina, através dos métodos de disco difusão e concentração inibitória mínima.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os estafilococos são bactérias comuns, que colonizam a pele e as membranas mucosas dos seres humanos e outros mamíferos. *Staphylococcus epidermidis* é a espécie mais frequentemente isolada do epitélio humano, sendo encontrado principalmente nas axilas e narinas (OTTO, 2009).

Todos os anos, hospitais e clínicas compram mais de 150 milhões de materiais implantáveis para a administração de líquidos, medicamentos, componentes sanguíneos e nutrição parenteral, para monitorar a hemodinâmica do paciente e para a realização de hemodiálise. Vários são os tipos de cateteres existentes e os fatores de risco para infecções relacionadas a cateteres variam de acordo com o tipo dos mesmos, o tamanho do hospital, unidade ou serviço, a localização do sítio de inserção e o tempo de permanência do cateter (MERMEL, 2000).

O crescente uso de próteses, cateteres e outras tecnologias invasivas em pacientes imunossuprimidos, trouxe *S. epidermidis* para o primeiro plano de patógenos nosocomiais, resultando em considerável morbidade e excesso de despesas médicas. Ao longo do tempo, esta bactéria se tornou cada vez mais resistente aos antibióticos, e a ameaça mais recente é o surgimento de isolados com níveis intermediários de resistência à vancomicina (HUEBNER & GOLDMANN, 1999).

Alguns dados extraídos do “National Nosocomial Infections Surveillance System” de janeiro de 1990 até maio de 1999, relataram que *Staphylococcus coagulase negativos* (SCoN) é o patógeno mais comumente isolado da corrente sanguínea de pacientes com infecções hospitalares, internados na Unidade de Terapia Intensiva, com prevalência de 37,3% comparado com 12,6% para *S. aureus* (EIFF *et al.*, 2002).

Staphylococcus epidermidis tem sido considerado como uma bactéria comensal inócua da pele humana. Hoje em dia tem sido reconhecido como um importante patógeno humano relacionado com infecções associadas à colonização de dispositivos médicos, como cateter venoso central (CVC). Ao

contrário de *S. aureus*, os fatores de virulência presentes no *S. epidermidis* não estão claramente estabelecidos. Sabe-se que eles têm um número limitado de exotoxinas e exoenzimas de degradação e que não causam danos aos tecidos. Portanto, as infecções por *S. epidermidis* podem ser subagudas ou crônicas. O sucesso do *S. epidermidis* como patógeno deve-se, provavelmente, ao fato de se aderir a superfícies, formando o biofilme (VUONG *et al.*, 2003).

Biofilme é um conjunto de células microbianas que formam uma fina camada (matriz) extracelular polissacarídica (EPS), a qual facilita a sua adesão a superfícies biológicas e interfaces sintéticas. Eles podem se formar em uma grande variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos, sistemas de canalização de água potável ou industrial, ou sistemas aquáticos naturais. As células bacterianas permanecem unidas umas às outras, às interfaces ou até mesmo aos substratos que circulam dentro da matriz (DONLAN & COSTERTON, 2002; DONLAN, 2002).

O biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e entrada dos antimicrobianos, dificultando assim, a difusão do fármaco nos tecidos. A resistência aos antimicrobianos em biofilme pode ser 100 a 1000 vezes maior do que em células planctônicas (DONLAN & COSTERTON, 2002). Os antibióticos administrados aos pacientes, em muitos casos não atingem as células do interior do biofilme protegidas pela matriz EPS, preservando a fonte de re-infecção do microrganismo (COSTERTON *et al.*, 1999). Genes específicos de resistência aos antibióticos estão amplamente distribuídos no biofilme do *S. epidermidis*.

O interesse em estudar SCoN tem aumentado juntamente com o aumento das infecções e da multirresistência observada entre os isolados hospitalares, incluindo a resistência a diversos antimicrobianos, tais como eritromicina, clindamicina, tetraciclina, β -lactâmicos e aminoglicosídeos (SANTOS *et al.*, 1997). Estudo com isolados hospitalares de SCoN na Espanha, mostrou um aumento global da resistência à maioria dos antimicrobianos; por exemplo, em 1986 a resistência à eritromicina era de 41,1%, mas em 2002 esse percentual foi para 63% (CUEVAS *et al.*, 2004).

Historicamente, o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* tem sido rápido, sendo que a resistência à penicilina nestes microrganismos foi observada apenas um ano após a sua introdução, em 1941. No início de 1950, apenas cinco anos após a disponibilidade deste antibiótico para o tratamento de infecções em populações civis, três quartos dos isolados de *S. aureus* em hospitais em muitos países tornaram-se penicilina-resistentes (SAKOULAS & MOELLERING, 2008).

Para combater estes estafilococos, foram desenvolvidas as penicilinas antiestafilocócicas, como a meticilina e a oxacilina e seus derivados. Contudo, logo surgiram bactérias resistentes a elas. Nestes estafilococos, chamados de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), a resistência é resultado de genes cromossômicos que codificam modificações no receptor dos β -lactâmicos, as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), havendo a produção de novas PBPs com pequena afinidade pelos β -lactâmicos (TAVARES, 2001). Atualmente, aproximadamente 60% dos isolados de *S. aureus* clínicos de todo o mundo são MRSA (SHORR, 2007).

Para cada classe de antimicrobiano, são observados mecanismos de resistência específicos, com envolvimento de genes plasmidiais ou transposons, que codificam elementos inativadores do antimicrobiano ou diminuem a sua afinidade de ligação, modificando o sítio alvo (JONES, 2001).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico que, da mesma maneira que os antibióticos penicilínicos, afeta a formação da parede celular das bactérias. Sua atuação ocorre pela ligação à porção terminal D-Ala-D-Ala de unidades precursoras da parede celular (SILVEIRA *et al.*, 2006). A vancomicina é muito utilizada para tratamento de infecções bacterianas por gram-positivos em pacientes alérgicos a penicilina ou bactérias resistentes aos β -lactâmicos, como o MRSA e a alguns enterococos, sendo assim, o antibiótico de escolha para o tratamento de pacientes hospitalizados com infecções por MRSA (SAKOULAS & MOELLERING, 2008).

Porém, o aparecimento de isolados de estafilococos com resistência plena ou intermediária (VISA) à vancomicina é preocupante, mesmo que estes microrganismos ainda sejam extremamente raros (SADER *et al.*, 2009). O

primeiro relato de uma cepa VISA (CIM= 8 µg/mL) surgiu no Japão, em 1997. Mais tarde, ocorreram 13 casos confirmados de VISA nos Estados Unidos da América (Centers for Disease Control and Prevention) (TENOVER, 2006). O mecanismo exato pelo qual esses organismos tornam-se resistentes ainda não está esclarecido, mas provavelmente envolve o espessamento da parede celular do organismo, que pode fazer com que a vancomicina fique presa nas camadas mais externas da parede celular (RICE, 2006). A vancomicina foi introduzida em 1958, mas o primeiro *S. aureus* totalmente resistente à vancomicina (VRSA) foi isolado em 2002. Até agora, quatro VRSA de isolados clínicos foram notificados, todos nos E.U.A. (SCHITO, 2006). Além disso, a eficácia da vancomicina para o tratamento de infecções por *S. aureus* pode ser prejudicada devido a sua baixa penetração nos tecidos e fraca atividade antibacteriana (RICE, 2006).

Atualmente, os clínicos recomendam que o tratamento não seja realizado como monoterapia. A combinação de dois ou mais antibióticos pode ser necessária por diversas razões: 1) tratamento de infecções mistas, nas quais nem todos os microrganismos são sensíveis ao mesmo antibiótico; 2) prevenção ou adiamento de desenvolvimento de resistência bacteriana a um antibiótico; 3) possibilidade de utilizar quantidades não tóxicas de dois antibióticos quando o uso de apenas um deles exigiria doses tóxicas, ou 4) quando o tratamento combinado pode ser mais eficaz frente a um microrganismo do que o uso de um único agente antimicrobiano (KONEMAN *et al.*, 2001).

Há relatos de um aumento sutil na CIM de vancomicina, o chamado “creep” de vancomicina. Porém, esse aumento não estava sendo percebido devido ao uso do método de disco difusão (SADER *et al.*, 2009; MUSTA *et al.*, 2009). Estas mudanças podem prever o futuro desenvolvimento da resistência deste antibiótico e ajudar a explicar a falha terapêutica a ele relacionada (STEINKRAUS *et al.*, 2007). Além disso, este aumento reforça a ideia de que são necessários novos agentes antimicrobianos com propriedades farmacocinéticas contra patógenos gram-positivos (MENICHETTI, 2005).

Em vista disso, o método de disco difusão vem perdendo espaço nos testes de detecção laboratorial da resistência à vancomicina. Tornou-se claro que o resultado “susceptível” não é suficiente para orientar uma terapia adequada, então, o laboratório deve fornecer CIMs precisas e confiáveis (SADER *et al.*, 2009). Assim, desde 2005 o CLSI vem alterando suas recomendações e preconizando que qualquer estafilococo com CIM elevada para vancomicina ($CIM \geq 4 \mu\text{g/mL}$) deve ser enviado a um laboratório de referência, já que o método de disco difusão não é capaz de diferenciar as cepas susceptíveis à vancomicina na faixa de CIM entre 0,5 - 2 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2005).

Estudos relatando isolados de MRSA com valores de CIM $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ e com resposta clínica diminuída à vancomicina levaram a redução do ponto de corte de susceptibilidade do *S. aureus* frente à vancomicina de 4 $\mu\text{g/mL}$ para 2 $\mu\text{g/mL}$. Contudo, o CLSI manteve o ponto de corte de susceptibilidade $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ para os SCoN (MACLAYTON *et al.*, 2006). A partir de 2009 foi estabelecido que deve ser realizado o ensaio de determinação da CIM através da microdiluição em caldo para todos os isolados de estafilococos e que a disco difusão com vancomicina não deve mais ser realizada (CLSI, 2009).

A rifampicina é um antibiótico bactericida pertencente ao grupo das rifamicinas. É um macrolídeo complexo, de amplo espectro, que inibe o crescimento da maioria das bactérias gram-positivas e muitas gram-negativas. Age inibindo a RNA-polimerase DNA-dependente através da formação de um complexo farmacoenzimático estável, levando à supressão da iniciação da formação da cadeia na síntese de RNA (GOODMAN & GILMAN, 2006).

A rifampicina é muito ativa contra os estafilococos, porém, o rápido desenvolvimento de resistência durante o tratamento limita a sua utilidade. Ela deve ser usada apenas em combinação com outros agentes antimicrobianos, e apenas em situações onde não há outro antibiótico como alternativa de tratamento (HUEBNER & GOLDMANN, 1999; CLSI, 2009). Nos testes de disco difusão, isolados com halos $\geq 20 \text{ mm}$ são considerados susceptíveis ao antibiótico, e para CIM, amostras com ponto de corte $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2009). Estudos sugerem que o surgimento de resistência à rifampicina deve-se a uma

mutação no gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase. Aproximadamente 95% de todos os organismos resistentes encontrados tinham mutações nesse gene, e quase todas as mutações ocorriam no mesmo operon (GILLESPIE, 2001).

Assim como outros antibióticos macrolídeos, a eritromicina é bacteriostática, podendo tornar-se bactericida em concentrações elevadas ou em contato com microrganismos muito sensíveis. Sua ação ocorre por inibição da síntese das proteínas, ao ligar-se à fração 50S do ribossoma, impedindo a fixação do RNA transportador ao ribossoma e bloqueando o aporte dos aminoácidos componentes das proteínas. O espectro de ação da eritromicina sobre bactérias gram-positivas, cocos gram-negativos e treponemas a torna um substituto natural da penicilina G, sendo empregada, com frequência, como droga de segunda escolha frente a tais agentes infecciosos (TAVARES, 2001).

Desenvolvimento de resistência adquirida à eritromicina vem sendo observado em *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, especialmente em ambiente hospitalar, onde a resistência do estafilococo já atinge 50% das amostras isoladas em alguns centros (TAVARES, 2001).

A resistência à eritromicina resulta de pelo menos três alterações mediadas por plasmídeos: (1) uma redução da permeabilidade à droga através do envoltório celular, como se observa no *S. epidermidis*; (2) uma modificação dos sítios-alvo sobre o ribossomo, que ocorre em microrganismos gram-positivos e gram-negativos; e (3) hidrólise da eritromicina por uma esterase produzida por Enterobacteriaceae (GOODMAN & GILMAN, 2006). O CLSI preconiza, para disco difusão com eritromicina, um halo de inibição ≥ 23 mm para suscetibilidade, enquanto a CIM deve ser $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2009). Um estudo realizado em 2002 pelo Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program (ZAAPS), com 7971 amostras, sendo 870 SCoN, apresentou uma resistência de 67,8% para a eritromicina (ROSS *et al.*, 2005).

A azitromicina tem ação bacteriostática, sendo ativa contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Pertence à classe dos macrolídeos, e diferencia-se da eritromicina por ter um espectro de ação mais amplo, sendo

capaz de agir contra microorganismos gram-negativos, e por sua farmacocinética mais favorável e de melhor tolerância (TAVARES, 2001). Seu mecanismo de ação é muito semelhante ao da eritromicina. Ela atua inibindo a síntese de proteínas por ligar-se à fração 50S do ribossoma, e com isso impede a fixação do RNA transportador, bloqueando o aporte de aminoácidos componentes das proteínas. No caso da azitromicina, para os testes de disco difusão, a bactéria é suscetível se o antibiograma apresentar um halo ≥ 18 mm, e a CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2009).

3. OBJETIVOS

Avaliar a resistência de *Staphylococcus epidermidis* isolado de CVC, através dos testes de disco difusão (DD) e concentração inibitória mínima (CIM).

Comparar os resultados de suscetibilidade dos testes de disco difusão (DD) e concentração inibitória mínima (CIM) frente à azitromicina, à rifampicina, à vancomicina e à eritromicina.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados isolados de *S. epidermidis* resistente à meticilina (MRSE) e *S. epidermidis* sensível à meticilina (MSSE), provenientes de CVC de diferentes pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, um hospital terciário, no período de janeiro de 2010 a fevereiro de 2010.

As amostras estudadas foram coletadas para um estudo envolvendo outras metodologias, tendo sido aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pela Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP0/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921), em 31.10.2007 (Projeto: 07- 485). O projeto de origem destas amostras também foi submetido e aprovado pela ComPesq/Far em 25 de agosto de 2008, sob o parecer nº 18/08.

4.1.1 Ensaios de disco difusão

O teste de disco difusão foi realizado de acordo com as orientações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2009). De cada isolado foi preparada uma suspensão bacteriana com turvação ajustada ao tubo 0,5 de McFarland por comparação visual. Após, cada um foi semeado sobre a superfície de Agar Müeller-Hinton (Oxoid, UK) de maneira uniforme e colocados os discos com os antibióticos (vancomicina, eritromicina, azitromicina ou rifampicina; todos Oxoid, UK). As placas foram incubadas em estufa, durante 24 horas, a temperatura de 35°C. O tamanho dos halos foi medido em mm e categorizado como: sensível, intermediário ou resistente, conforme padronizado pelo CLSI.

4.1.2 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Ainda conforme as recomendações do CLSI (2009) foram realizados os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em microplacas de poliestireno

de 96 poços de fundo chato (Costar no 3596; Cornig, NY, USA). Para o teste a suspensão bacteriana ajustada a 0,5 de McFarland foi diluída em caldo Müeller-Hinton (MH - Oxoid, UK). A cada poço foi adicionado caldo e solução do antibiótico para obter as concentrações desejadas, além de 20 µL da suspensão bacteriana para uma concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL, conforme a figura 1. A presença de turbidez após incubação de 24 h em estufa bacteriológica foi considerada indicativa de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano na qual não houve crescimento (ISENBERG, 1992; HINDLER & JORGENSEN, 2007; CLSI, 2009

Figura 1. Modo de preparo das microplacas para testes de CIM.

Concentração desejada (µg/mL)	CIM
0,25	25 µl da solução de 2 µg/mL 155 µl de caldo MH
0,50	50 µl da solução de 2 µg/mL 130 µl de caldo MH
1,0	100 µl da solução de 2 µg/mL 80 µl de caldo MH
2,0	100 µl da solução de 4 µg/mL 80 µl de caldo MH
4,0	100 µl da solução de 8 µg/mL 80 µl de caldo MH
8,0	100 µl da solução de 16 µg/mL 80 µl de caldo MH
16,0	100 µl da solução de 32 µg/mL 80 µl de caldo MH
32,0	100 µl da solução de 64 µg/mL 80 µl de caldo MH
64,0	100 µl da solução de 128 µg/mL 80 µl de caldo MH
124,0	100 µl da solução de 256 µg/mL 80 µl de caldo MH
256,0	100 µl da solução de 512 µg/mL 80 µl de caldo MH
512,0	100 µl da solução de 1024 µg/mL 80 µl de caldo MH
1024,0	100 µl da solução de 2048 µg/mL 80 µl de caldo MH
2048,0	100 µl da solução de 4096 µg/mL

	80 µl de caldo MH
--	-------------------

5. RESULTADOS

Foram estudados 30 isolados de *S. epidermidis* formadores de biofilme, sendo 25 MRSE e 5 MSSE, provenientes de cateter venoso central de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Das trinta amostras de *S. epidermidis*, apenas seis (13,3%) foram suscetíveis à eritromicina pelo teste de DD, sendo que em cinco houve discrepância com os valores de CIM considerados para suscetibilidade ($\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$). Entre os isolados resistentes, CIM = 1024 $\mu\text{g/mL}$ foi observada em dezesseis (53,3%) casos (Tabela 1).

A azitromicina mostrou um perfil muito semelhante quanto à prevalência: seis (20%) amostras foram suscetíveis, e as vinte e quatro (80%) restantes mostraram-se resistentes ao antimicrobiano, sendo que dezesseis (53,3%) delas tiveram CIM ≥ 2048 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados de ambos os métodos classificaram as bactérias na mesma categoria (Tabela 2).

Nos testes com rifampicina, os resultados mostraram que vinte e quatro (80%) amostras foram susceptíveis ao antibiótico por ambos os métodos; apenas seis amostras tiveram CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

Todas as amostras avaliadas foram suscetíveis à vancomicina, independentemente do teste avaliado (Tabela 4).

Tabela 1. Resultados obtidos frente à eritromicina por Disco difusão (DD) e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Nº isolados	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	DD
1	0,5	S
2	1	S
1	2	S
2	8	S
1	16	R
3	64	R
3	128	R
16	1024	R
1	≥ 2048	R

R = resistente; S = suscetível

Tabela 2. Resultados obtidos frente à azitromicina por Disco difusão (DD) e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Nº isolados	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	DD
3	1	S
3	2	S
1	32	R
1	64	R
2	128	R
4	256	R
16	≥ 2048	R

R = resistente; S = suscetível

Tabela 3. Resultados obtidos frente à rifampicina por Disco difusão (DD) e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Nº isolados	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	DD
11	0,25	S
1	0,5	S
12	1	S
6	≥ 64	R

R = resistente; S = suscetível

Tabela 4. Resultados obtidos frente à vancomicina por Disco difusão (DD) e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Nº isolados	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	DD
9	1	S
21	2	S

R = resistente; S = suscetível

6. DISCUSSÃO

Staphylococcus epidermidis são parte da microbiota normal da pele em humanos, e foram considerados de baixa virulência e sem grande importância clínica até algumas décadas atrás. Porém, com o aumento do uso de materiais implantáveis, esses microrganismos assumiram um papel importante nos processos infecciosos, principalmente hospitalares.

A multirresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre estes isolados hospitalares e têm incluído resistência a eritromicina, clindamicina, aminoglicosídeos, β -lactâmicos e eventualmente quinolonas (SANTOS *et al.*, 1997). Para cada classe de antimicrobiano, são observados mecanismos de resistência específicos, com envolvimento de genes plasmidiais, ou transposons que codificam elementos inativadores do antibiótico ou diminuem a afinidade de ligação, modificando o sítio alvo. A capacidade dos SCoN em albergar vários marcadores de resistência demonstra sua importância como reservatório de genes de resistência, que podem ser transmitidos para outras espécies e outros gêneros de microrganismos.

O interesse em estudar a suscetibilidade aos antimicrobianos nesta espécie também tem aumentado juntamente com o aparecimento de resistência. Diversos relatos têm revelado um aumento sutil da resistência a vancomicina, que não estava sendo percebido devido ao uso de disco difusão. Desde 2009 o CLSI retirou o teste de disco difusão e recomendou a realização de CIM para vancomicina (SADER *et al.*, 2009; MUSTA *et al.*, 2009). Não encontramos relato de estudos de vancomicina e SCoN, mas acreditamos que esta tendência também pode ocorrer neste grupo de bactérias. Além do mais também não estamos monitorando o aumento da resistência frente a outros antimicrobianos de uso terapêutico. Isso é relevante porque, no momento em que a vancomicina mostra níveis de resistência mais elevados é preciso lançar mão de outras opções terapêuticas para tratar pacientes com MRSA e VISA.

A formação de biofilme, sem dúvida coloca em evidência a questão da resistência e provavelmente é co-responsável pelo aumento da mesma, uma

vez que bactérias em biofilme estão protegidas pelo EPS, e assim sobrevivem em condições restritivas de nutrientes, água e oxigênio.

Assim, comparamos dois métodos fenotípicos de detecção de resistência para avaliar a diminuição de suscetibilidade em isolados provenientes de CVC, material bastante propício para a formação de biofilme.

Nossos resultados reforçam que o método de disco difusão não determina exatamente o nível da resistência, uma vez que as CIMs encontradas na maioria das amostras estudadas foi muito elevada. Embora tenha ocorrido uma correlação dos resultados de DD e CIM, para azitromicina, vancomicina e rifampicina, isso não foi verdadeiro para eritromicina, já que 5 isolados com halos de inibição compatíveis com suscetibilidade apresentam CIM superiores a 0,5 µg/mL. Em tempos de multiresistência não basta só determinar se um isolado é ou não suscetível; epidemiologicamente é necessário conhecer o grau desta resistência.

Os níveis de resistência aos macrolídeos testados (eritromicina e azitromicina) foram muito elevados. Frente à eritromicina apenas um isolado apresentou resultado suscetível por ambos os testes. Por outro lado, foram observados dois casos com resultados de DD compatíveis com suscetibilidade, mas CIM associada a resistência (8µg/mL). Assim o paciente poderia fazer uso de um macrolídeo em seu tratamento, uma vez que o CLSI preconiza o uso do disco de eritromicina para prever a suscetibilidade aos demais macrolídeos. Quanto à azitromicina, foi observada suscetibilidade em apenas seis amostras. Assim, a resistência foi de 87% para eritromicina e 80% para azitromicina, mas a CIM permitiu avaliar que o grau de resistência frente à azitromicina foi maior, uma vez que maior número de isolados apresentou alto nível de resistência (CIM ≥ 2048 µg/mL).

A rifampicina apresentou valores de suscetibilidade que ainda podem ser considerados muito bons, uma vez que em apenas seis isolados foi observada resistência, o que representa uma suscetibilidade de 80%. Embora este fármaco seja ainda indicado especialmente como tuberculostático, seu uso terapêutico tem aumentado diante de isolados de *S. epidermidis* formadores de biofilme.

Todos os isolados de *S. epidermidis* apresentaram suscetibilidade à vancomicina. Os valores de CIM encontrados para vancomicina foram de 2 µg/mL (21 isolados) e 1 µg/mL (9 isolados). Considerando os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI, todos seriam considerados suscetíveis à vancomicina. Mas cabe ressaltar que estes valores de CIM estão muito próximos ao limite superior de suscetibilidade. Até poucos anos, se acreditava que os valores de CIM para vancomicina em isolados clínicos não ultrapassariam 0,5 µg/mL, mas esta realidade vem se modificando, e alguns estudos já demonstram valores de 2,5 a 3,0 µg/mL. É importante observar que tem sido relatada falha terapêutica em infecções por cepas com valores de CIM aumentados (SADER *et al.*, 2009; MUSTA *et al.*, 2009).

7. CONCLUSÃO

No contexto da resistência, vários aspectos devem ser considerados: (a) bactérias patogênicas estão se tornando cada vez mais resistentes a antimicrobianos; (b) comunidades bacterianas em biofilme são menos suscetíveis a tratamentos com antimicrobianos e mantêm um elevado nível de virulência para o hospedeiro; (c) a maioria das infecções e uma variedade de enfermidades envolvem biofilme bacteriano e mais especificamente; (d) a utilização de antimicrobianos ineficazes na presença de biofilme aumenta o tempo de internação, o que leva ao aumento da morbi-mortalidade, onera o sistema de saúde, e eleva as taxas de resistência aos antimicrobianos e disseminação de bactérias resistentes (RICE, 2006).

A solução para o problema mundial da resistência vai além da necessidade de desenvolvimento de novos agentes. Outros fatores também são importantes, tais como o uso prudente de agentes atuais, o uso adequado de combinações de antibióticos, o controle e a prevenção da disseminação de organismos resistentes aos antimicrobianos.

Parece inevitável que as bactérias continuem a desenvolver resistência aos antimicrobianos, através de mutações ou troca de informações genéticas. Em muitas unidades de saúde em todo o mundo, patógenos bacterianos que expressam múltiplos mecanismos de resistência estão se tornando cada vez mais frequentes. Assim o monitoramento constante da resistência parece importante para evitar a seleção de bactérias multiresistentes, orientando a utilização de fármacos adequados na dose certa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANWAR, H.; STRAP, J.L.; COSTERTON, J.W. Establishment of Aging Biofilms: Possible Mechanism of Bacterial Resistance to Antimicrobial Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.36, n.7, p.1347-1351, 1992.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GRENNBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CUEVAS, O., CERCENADO, E., VINDEL, A., GUINEA, J., SÁNCHEZ-CONDE, M., SÁNCHEZ-SOMOLINOS, M., BOUZA, E. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 4240-4245, 2004.

DIENER, J.R.C.; COUTINHO, M.S.S.A.; ZOCCOLI, C.M. Infecções relacionadas ao cateter venoso central em terapia intensiva. *Rev Ass Med Brasil*, v.42(4), p.205-14, 1996.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.9, p.881-889, 2002.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

ELMER W. KONEMAM. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido - 5ª edição, Editora Médica Científica Ltda - Rio de Janeiro, p.795-847.

EIFF C.V.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases*, v.2, p.677-685, 2002.

GILLESPIE, S. H. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *Journal of Antimicrobial Agents*, v.17, n.3, p.171-176, 2001.

GOODMAN & GILMAN: BRUNTON, L.L., LAZO, J.S., PARKER K.L. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11ªed. Rio de Janeiro: Editora McGrawHill, 2006.

HIDAYAT, L.K.; HSU, D.I.; QUIST R.; SHRINER, K.A.; WONG-BERINGER, A. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. *Archives of Internal Medicine*, v. 166, p. 2138-2144, 2006.

HINDLER, J.F.; JORGENSEN, J.H. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Textbook of Diagnostic Microbiology. 3. ed., St Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap. 13, p. 319-354.

HUEBNER, J. & GOLDMANN D. A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annual Review of Medicine* v.50, p.223-236, 1999.

ISENBERG, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: American Society for Microbiology, v. 1, 1992.

JONES, R.N. Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. Results from the 1997-1999 SENTRY Antimicrobial Program. *Clinical Infectious Disease*, v. 32, p. 81-156, 2001.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

MACLAYTON, D.O., SUDA, K.J., COVAL, K.A., YORK, C.B., GAREY, K.W. Case-control study of the relationship between MRSA bacteremia with a vancomycin MIC of 2 µg/ml and risk factors, costs, and outcomes in patients undergoing hemodialysis. *Clinical Therapeutics*, v. 28, p. 1208-1216, 2006.

MENICHETTI, F. Current and emerging serious Gram-positive infections. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 11, N. 3, p. 22–28, 2005.

MERMEL, L.A. Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med*, v. 132 (5), p. 391-402, 2000.

MUSTA, A.C., RIEDERER, K., SHEMES, S., CHASE, P., JOSE, J., JOHNSON, L.B., KHATIB, R. Vancomycin MIC plus Heteroresistance and outcome of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: Trends over 11 years. *J Clin Microbiol* 47, p.1640-1644, 2009.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nature Reviews*, v.7, p.555-567, 2009.

RICE, L.B. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *The American Journal of Medicine*, v.119 (6A), p.S11–S19, 2006.

ROSS, J.E.; ANDEREGG, T.R.; SADER, H.S.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N. Trends in linezolid susceptibility patterns in 2002: Report from the worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.52, p.53-58, 2005.

ROSS, C. Análise Microbiológica de Pontas de Cateteres Venosos Centrais de Pacientes do Hospital Universitário – Londrina – Paraná. Londrina. Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina, 2006.

SADER, H.S.; RHOMBERG, P.R.; JONES, R.N. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antim Clin Chemother*, v.53, p.3162-3165, 2009.

SANTOS, K.R.N., FONSECA, L. S., NETO, B. G. R., GONTIJO FILHO, P. P. Surgical site infection: rates, etiology and resistance patterns to antimicrobials among strains isolated at Rio de Janeiro University Hospital. *Infection*, v. 25, p. 217-220, 1997

SAKOULAS, G., MOELLERING, R.C. Increasing Antibiotic Resistance among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Clinical Infectious Diseases*, v.46, p.360-367, 2008.

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, v.12, n.1, p.3-8, 2006.

SILVEIRA, G.S., NOME, F., GESSER, J.C., SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, v.29, n.4, p.844-855, 2006.

SHORR, A.F. Epidemiology of Staphylococcal Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, v.45, p.171-176, 2007.

SOUZA, L.B.G.; FIGUEIREDO, B.B. Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), no Hospital Universitário Regional de Maringá. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.40, n.1, p. 31-34, 2008.

STEINKRAUS, G., WHITE, R., FRIEDRICH, L. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) blood isolates from 2001–05. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.60, p.788–794, 2007.

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos. 3ª edição, Editora Atheneu, São Paulo, 2001.

TENOVER, F.C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, v.119 (6A), p.S3–S10, 2006.

VUONG, D., GERKE, C., SOMERVILLE, G.A., FISCHER, E.R., OTTO, M. Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 188, p. 706-718, 2003