

Sensibilidade à vancomicina em cepas de *Staphylococcus aureus* tolerantes à oxacilina

Cícero Carlos de Freitas*

Cyro Samel*

Jupira Miron Caballido**

Maria da Graça Antunes de Cerqueira Saback Sampaio**

Mayre Aparecida Borges da Costa***

Resumo

Vinte cepas de *Staphylococcus aureus*, tolerantes à oxacilina e identificadas entre 80 isolados clínicos de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), tiveram as suas sensibilidades à vancomicina testadas através das determinações das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) e bactericidas (CMBs), pela técnica da diluição à metade. Nenhuma cepa exibiu tolerância (CMB/CMI ≥ 16) ou resistência à vancomicina. A análise dos valores das CMIs e das CMBs para a oxacilina mostrou que, apesar da tolerância a esta penicilina, apenas 5 cepas (6,25%) não poderiam ser tratadas com este beta-lactâmico, porque apresentaram CMBs $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ (CMIs entre 0,39 e $6,25 \mu\text{g/ml}$). Os valores das CMBs para a vancomicina variaram entre 0,39 e $12,50 \mu\text{g/ml}$, o que permite o uso deste glicopeptídeo no combate àquelas cepas tolerantes à oxacilina com CMBs \leq à concentração sistêmica máxima alcançada pela vancomicina.

Introdução

Embora as cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* dos dias atuais sejam, usualmente, sensíveis aos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems e monobactams) e a outros tipos de antibióticos (em geral, minociclina, gentamicina, clindamicina, ácido fusídico e vancomicina), as infecções provocadas por estes microorga-

nismos continuam sendo, não apenas comuns, mas uma ameaça à vida dos pacientes, no mundo inteiro⁽¹⁾. Isto se deve, principalmente, à competência genético-bioquímica destas bactérias de desenvolverem mecanismos de resistência e de tolerância aos antibióticos⁽²⁻⁷⁾.

Uma bactéria é, geralmente, considerada resistente a um determinado antibiótico, quando sobrevive, *in vitro*, a concentrações superiores àquelas alcançadas pela droga nos líquidos orgânicos, particularmente, sangue, líquido céfalo-raquidiano, bile e urina⁽⁸⁾. Além da resistência, as bactérias desenvolvem tolerância aos antibióticos^(3,4,7).

Uma cepa tolerante difere, essencialmente, de uma resistente, porque é capaz de desenvolver defesas, apenas, contra o efeito bactericida do antibiótico, de modo que a concentração mínima bactericida (CMB) deste é, pelo menos, 16 vezes a sua concentração mínima inibitória (CMI), ou seja: CMB/CMI ≥ 16 ⁽⁷⁾. Numa bactéria resistente, por outro lado, esses parâmetros estão aumentados (em relação aos da cepa sensível), mas CMB = CMI. Enquanto alguns mecanismos, através dos quais as bactérias desenvolvem resistência, são bem conhecidos^(3,4,9,10,11), o mecanismo da tolerância ainda é desconhecido, embora, de acordo com Handwerger e Tomasz⁽¹²⁾, o grau da tolerância pareça estar relacionado às atividades das mureína-hidrolases, enzimas envolvidas nos estágios finais da biossíntese da mureína⁽¹³⁾. À semelhança do que se verifica com a resistência, a tolerância aos antibióticos representa, também, uma dificuldade à antibioticoterapia^(4,14), principalmente, entre os *S. aureus*⁽¹⁵⁾.

A oxacilina tem sido um dos beta-lactâmicos de mais largo uso no combate às cepas de *S. aureus*, em especial, àquelas beta-lactamase positivas⁽¹⁶⁾. Recentes investigações, entretanto, têm mostrado a existência de cepas de *S. aureus* resistentes^(1,6,16) e tolerantes^(7,17) a esta penicilina. Por outro lado, a vancomicina vem sendo uma opção terapêutica contra as cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina, principalmente em pacientes alérgicos às penicilinas⁽¹⁸⁾. Neste trabalho, determinamos a sensibilidade à vancomicina em 20 cepas de *S. aureus* tolerantes a oxa-

*Professor-Adjunto 4, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ

**Professora-Adjunta 2, Serviço de Patologia Clínica-HUAP, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ

***Acadêmica de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal Fluminense (UFF) e Bolsista de Iniciação Científica do CNPq, Niterói, RJ

Por interesse dos Editores este trabalho será publicado em *Femina*

cilina, identificadas entre 80 isolados de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP).

Materiais e Métodos

Bactérias e condições de crescimento

As cepas usadas neste trabalho foram isoladas de pacientes admitidos no HUAP e identificadas como *S. aureus* pelos métodos bioquímicos convencionais. Uma amostra de *S. aureus* ATCC 29213 foi empregada como referência. As bactérias foram crescidas, a 37°C, no seguinte meio (g/100ml): bacto-peptona (Difco) — 1,0g, extrato de levedo (Difco) — 1,0g, cloreto de sódio (Merck) — 0,5g e água destilada, q.s.p. 100ml. O meio foi esterilizado por autoclavagem: 30 minutos sob a pressão de 1 atmosfera e 120°C. As culturas-estoques foram mantidas, no meio sólido (ágar inclinado), em congelador (–18°C). As culturas para as experiências foram preparadas a partir da transferência de algumas colônias da cultura estoque para 2ml do meio. Esta cultura foi mantida a 37°C, durante 5 horas, antes de ser usada nas experiências.

Determinações das concentrações mínimas inibitórias (CMI) e bactericidas (CMBs)

Uma cultura de 5 horas, crescendo a 37°C, com, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ ufc/ml (ufc - unidades formadoras de colônias), foi diluída no meio, para a obtenção de um inóculo da ordem de $1,0 \times 10^5$ ufc/ml. Desta cultura, 0,5ml foram adicionados a cada um de uma série de 18 tubos de 100 x 13mm, contendo 0,5ml do meio com oxacilina ou vancomicina. As concentrações variaram de 0,01 a 1.600 µg/ml. Um tubo com 0,5ml do meio (sem antibiótico) e outro com 1,0ml (sem bactérias) foram usados como controles. As leituras das CMIs foram feitas após 24 horas de incubação a 37°C. As determinações das CMBs foram realizadas mediante repicagem de 10 µl da cultura de cada tubo (após leitura das CMIs) e semeadura em placa de Petri. As placas foram incubadas a 37°C, durante 24 horas; as colônias foram contadas e os resultados expressos em ufc/ml. A CMI foi definida como a menor concentração do antibiótico que inibiu o crescimento visível do inóculo. A CMB foi estabelecida como a menor concentração da droga que matou, pelo menos, 99,9% das bactérias viáveis inoculadas. No caso das cepas tolerantes (CMB/CMI ≥ 16), as determinações foram repetidas por 2 outros do Grupo. Nestas condições, os resultados coincidiram em 95% e, nos resultados não coincidentes, as diferenças não foram além de 2 tubos. Cada valor é a média de duas experiências.

Antibióticos

Os dois seguintes antibióticos foram empregados neste trabalho: Staficillin-N (oxacilina sódica) - Bristol e Vancomicina (cloridrato de vancomicina) - Lilly. As soluções foram preparadas no próprio meio de cultura, mantidas a 4°C e usadas durante 1 semana.

Resultados

A tabela 1 mostra as variações dos valores da relação CMB/CMI para oxacilina e vancomicina, em 80 cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes admitidos no HUAP. Esta tabela apresenta, também, o número de cepas tolerantes, com a respectiva percentagem (%), para os dois antibióticos. As cepas foram consideradas tolerantes quando exi-

Tabela 1 — Níveis de tolerância em 80 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes do HUAP

Antibiótico	Variação da CMB/CMI	Cepas tolerantes (%)
Oxacilina (ox.)	1 — 64	20 (25%)
Vancomicina (vanc.)	1 — 8	0 (0%)

$$S. aureus ATCC 29213: (CMB/CMI)_{ox.} = 1 \text{ e } (CMB/CMI)_{vanc.} = 2$$

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) e bactericidas (CMBs) foram determinadas pela técnica da diluição à metade, com inóculo de $1,0 \times 10^5$ ufc/ml e incubação (24 horas) a 37°C. Cepa tolerante: CMB/CMI ≥ 16 .

biram uma relação CMB/CMI ≥ 16 .

Na tabela 2, são apresentados os valores das CMIs, das CMBs e das (CMB/CMI)s, para os dois antibióticos, nas 20 cepas de *S. aureus* tolerantes à oxacilina.

Discussão e conclusões

Os resultados da tabela 1 mostram as "CMB/CMI"s máximas de 8 e 64, para vancomicina e oxacilina, respectivamente. Isto caracteriza a identificação de cepas de *S. aureus* tolerantes (CMB/CMI ≥ 16) apenas para o beta-lactâmico. Vinte (25%) das cepas testadas apresentaram tolerância à oxacilina, conforme pode ser visto na tabela 2. Desta tabela, podemos inferir que, apesar de 20 cepas terem exibido tolerância à oxacilina, do ponto de vista da antibióticoterapia, apenas 5 delas oferecem perspectivas de sucesso terapêutico com esta penicilina, porque apresentam valores de CMB ≥ 25 µg/ml. Esta interpretação se deve ao fato de que a administração, por via oral, de 1 grama deste antibiótico, com o paciente em jejum, permite níveis sanguíneos de, no máximo, 9 µg/ml em 1 hora, embora esta concentração baixe para menos de 1 µg/ml em 4 horas⁽¹⁹⁾. No caso daquelas cepas, tivemos: $0,39 \leq CMI \leq 6,25$ µg/ml, para a oxacilina — valores possíveis de serem alcançados na circulação sistêmica do paciente e de inibirem completamente o crescimento daquelas cepas. Este efeito inibitório é suficiente para o êxito terapêutico, desde que o paciente não seja um imunossuprimido, situação em que a morte, e não a simples inibição do patógeno, é essencial ao sucesso da quimioterapia⁽²⁰⁾. Da tabela 2, concluímos, também, quanto à inexistência de cepas resistentes à vancomicina (maior CMI = 3,12 µg/ml), entre as 20 tolerantes à oxacilina.

Os dados das tabelas 1 e 2 permitem que tiremos, entre outras, as conclusões que se seguem. Embora cepas tolerantes (CMB/CMI ≥ 16) à oxacilina tenham sido identificadas entre os 80 isolados de *S. aureus* testados, esta penicilina continua sendo uma opção terapêutica de alta eficiência contra estes isolados, tendo em vista que apenas 5 (6,25%) das cepas tolerantes àquele beta-lactâmico apresentaram CMBs acima do valor sistêmico máximo alcançado pelo antibiótico⁽¹⁹⁾. Apesar desta tolerância à oxacilina, considerando o seu efeito inibitório, nenhuma cepa resistente a esta penicilina foi encontrada entre as 20 tolerantes, para as quais a maior CMI determinada foi de 6,25 µg/ml. A resistência (6,25%) apareceu, apenas, no nível de seu efeito bactericida, com CMBs ≥ 25 µg/ml. Os nossos resultados enfatizam a conveniência de os laboratórios de Microbiologia Clínica fornecerem aos clínicos

Tabela 2 — CMIs, CMBs e (CMB/CMI)s, para oxacilina e vancomicina, em 20 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes admitidos no HUAP

Cepas/HUAP	Oxacilina			Vancomicina		
	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)	CMB/CMI	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)	CMB/CMI
1	1,56	50,00	32	0,78	0,78	1
2	0,39	6,25	16	0,78	1,56	2
3	0,78	25,00	32	1,56	1,56	1
4	0,09	1,56	16	1,56	3,12	2
5	6,25	100,00	16	1,56	1,56	1
6	0,19	3,12	16	1,56	1,56	1
7	3,12	50,00	16	3,12	3,12	1
8	0,09	3,12	32	1,56	1,56	1
9	0,02	0,39	16	0,78	0,78	1
10	0,04	0,78	16	1,56	1,56	1
11	0,09	3,12	32	3,12	12,50	4
12	0,09	6,25	64	3,12	6,25	2
13	0,04	1,56	32	1,56	1,56	1
14	0,04	1,56	32	1,56	1,56	1
15	0,04	1,56	32	1,56	1,56	1
16	0,09	3,12	32	1,56	1,56	1
17	0,39	25,00	64	0,78	3,12	4
18	0,09	1,56	16	0,39	3,12	8
19	0,04	3,12	64	0,39	3,12	8
20	0,39	6,25	16	3,12	3,12	1
ATCC 29213	1,56	1,56	1	0,39	0,78	2

As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) e bactericidas (CMBs) foram determinadas pela técnica da diluição à metade, com inóculo de $\sim 1,0 \times 10^5$ ufc/ml e incubação (24 horas) a 37°C. Cepa tolerante: CMB/CMI ≥ 16 .

os valores das CMIs e das CMBs, pois, em alguns casos de tolerância, o insucesso terapêutico poderá ser revertido através de um simples aumento da dose do antibiótico, evitando-se, assim, a sua substituição, que poderá resultar na seleção de cepas resistentes^(22,23) ou tolerantes⁽⁴⁾. Finalmente, sempre que a vancomicina for indicada para substituir a oxacilina, no combate às cepas tolerantes a esta penicilina, convém não esquecer que a vancomicina apresenta maiores riscos de efeitos colaterais, principalmente ototóxicos e nefrotóxicos⁽²¹⁾, bem assim como a indução de resistência pelo uso deste glicopeptídeo⁽²⁴⁾.

Summary

Sensitivity to vancomycin of oxacillin tolerant clinical strains of *Staphylococcus aureus*

Twenty oxacillin tolerant strains of *Staphylococcus aureus*, identified among 80 clinical isolates from patients admitted to the Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), had their susceptibilities tested to vancomycin through minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) determined by the two-fold dilution technique. None of the strains exhibited either tolerance (MBC/MIC ≥ 16) or resistance to vancomycin. MICs and MBCs found for oxacillin showed that, in spite of the tolerance to this penicillin, only 5 strains

(6.25%) could not be treated with this beta-lactam, since those strains exhibited MBCs $\geq 25 \mu\text{g/ml}$, with MICs between 0.39 and 6.25 $\mu\text{g/ml}$. On the other hand, MBCs for vancomycin ranged from 0.39 to 12.50 $\mu\text{g/ml}$, and so, this glycopeptide can be used to fight those oxacillin tolerant strains with MBCs \leq to the maximum systemic concentration reached by vancomycin.

Referências

1. SHEAGREN JN — *Staphylococcus aureus*: the persistent pathogen. *N Engl J Med*, 310: 1.368-1.373, 1984.
2. JACOBY GA, ARCHER GL — New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med*, 324: 601-712, 1991.
3. FREITAS CC — Aspectos genético-bioquímicos da resistência bacteriana aos antibióticos. Em: U Zanon e J Neves - Infecções hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento. MEDSI, Rio, pp 207-249, 1987.
4. TUOMANEN E, DURACK DT, e TOMASZ A — Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 350: 521-527, 1969.
5. RUOFF KL, KURITZKES DR, WOLFSON JS, FERRARO MJ — Vancomycin-resistant Gram-positive bacteria isolated from human sources. *J Clin Microbiol*, 26: 2.064-2.068, 1988.
6. JONES RJ, BARRY AL, GARDNER RV, PACHER RR — The prevalence of staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillin. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 12: 385-394, 1989.
7. FREITAS CC, ESPÓSITO RC, CABALLIDO JM, ARAGÃO TVG, SAMEL C — Tolerância a antibióticos em cepas de *Echerichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP). *Ciênc Cult*, 41: 1.215-1.217, 1989.
8. ROSENBLAT JE — Laboratory tests used to guide antimicrobial chemotherapy. *Mayo Clin Proc*, 62: 799-805, 1987.
9. REYNOLDS PE — Resistance of the antibiotic target site. *Br Med*

Bull, 40: 3-10, 1984. **10.** HOOPER DC, WOLFSON JS — Bacterial resistance to the quinolone antimicrobial agents. *Am J Med*, 87 (Suppl 6C): 17S-23S, 1989. **11.** KIKAIIDO H — Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 33: 1.831-1.836, 1989. **12.** HANDWERGER S, TOMASZ A — Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Rev Infect Dis*, 7: 368-386, 1985. **13.** ELLERBROK H, HAKENBERCK R — Penicillin-degrading activities of peptides from pneumococcal penicillin-binding proteins. *Eur J Biochem*, 171: 219-224, 1989. **14.** MEESON J — Differential response to benzylpenicillin *in vivo* of tolerant and nontolerant variants of *Streptococcus sanguis* II. *J Antimicrob Chemother*, 25: 103-109, 1990. **15.** RAJASHEKARAI AH KR et al — Clinical significance of tolerant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with endocarditis. *Ann Intern Med*, 93: 796-800, 1990. **16.** WOODS GL, YAM P — Bacterial activity of oxacillin against beta-lactamase-hyperproduction *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 32: 1614-1618, 1988. **17.** MIMICA LMJ, DRAGONETTI AE — Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes, sensíveis e tolerantes à oxacilina: comparação da susceptibilidade à clindamicina e à lincomicina. *Rev Bras Clin Terap*, 16: 59-61, 1987. **18.** MASHELL JP, SEFTON AM, YOUNG J, CHI SJ, WILLIAMS JD — Comparative *in vitro* activity of erythromycin, vancomycin and pristinamycin. *Infection*, 16: 365-370, 1988. **19.** TAVARES W — Manual de

antibióticos para o estudante de Medicina. Livraria Atheneu, Rio-São Paulo, 1985. **20.** SANDE MA — Antimicrobial therapy of infections in patients with AIDS - An overview. *J Antimicrob Chemother*, 23: 63-65, 1989. **21.** BRUMMETT RE, FOX KE — Vancomycin and erythromycin-induced hearing loss in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 38: 791-796, 1988. **22.** MOLLER JK — Antimicrobial usage and microbial resistance in a university hospital during a seven year period. *J Antimicrob Chemother*, 24: 983-992, 1989. **23.** MARGARET BS, DRUSANO GL, STANDIFOR HC — Emergence of resistance to carbapenem antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 24 (Suppl A): 161-167, 1989. **24.** AL-OBEID S, COLLATZ E, GUTTMANN L — Mechanisms of resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366 and *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrob Agents Chemother*, 34: 252-256, 1990.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições: PROPP-UFF, FAPERJ (Proc. E-29/170.660/88) e CNPq (Proc. 406659/87-7). Os autores agradecem, também, a Ivan Miguel Mendes Martins, pela indispensável ajuda técnica, e a Eugenio Carlos da Rocha, pelo excelente trabalho de datilografia.

Como tornar-se Sócio da Sociedade Brasileira de Doenças Sexualmente Transmissíveis

Condições Básicas

- 1 — Ter dois anos ou mais de formado
- 2 — Preencher uma das exigências abaixo:
 - 2.1. Ser Professor Universitário (área médica);
 - 2.2. Exercer atividade de coordenação, chefia ou supervisão na área de D.S.T. em Serviço Público ou Sociedade Civil;
 - 2.3. Autor ou Co-autor de um ou mais artigos sobre D.S.T.;
 - 2.4. Ter participado de um ou mais evento internacional ou nacional sobre D.S.T.;
 - 2.5. Ter participado de dois ou mais eventos regionais ou locais sobre D.S.T.;
 - 2.6. Ter participado em um evento regional sobre D.S.T. e neste ter apresentado um trabalho científico, ter participado de uma mesa ou proferido palestra.

Observações:

- 1 — Exige-se comprovação dos títulos (enviar cópias)
- 2 — É necessário enviar *curriculum vitae* e preenchimento da proposta
- 3 — Reserva-se a diretoria ou comissão especial a análise de cada proposta. Só depois de um parecer o candidato poderá ser aprovado como Membro Associado da SBDST
- 4 — O Associado terá direito a receber gratuitamente um exemplar de cada número do Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis
- 5 — O Associado terá direito a desconto de 50% em todos os eventos da Sociedade, exceto em um evento (anualmente escolhido pela Diretoria) cuja inscrição será grátis
- 6 — Valor da Anuidade: 200 CH (coeficiente de honorário da Associação Médica Brasileira) vigentes no mês da inscrição. O valor total poderá ser dividido em duas parcelas iguais.
Valor da CH de fevereiro de 1991 = Cr\$ 38,50