

# Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

IRENE MONTOYA C.<sup>1</sup>, MAGDALENA MIRA O.<sup>1</sup>, ISABEL ÁLVAREZ A.<sup>2</sup>, JOSÉ COFRÉ G.<sup>3</sup>,  
JACOB COHEN V., GLORIA DONOSO W.<sup>2</sup>, JUAN PABLO TORRES T.<sup>1</sup>

1. Pediatría. Unidad de Investigación, Hospital Luis Calvo Mackenna.

2. Laboratorio de Microbiología, Hospital Luis Calvo Mackenna.

3. Unidad de Infectología, Hospital Luis Calvo Mackenna.

## ABSTRACT

### Clindamycin inducible resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

**Background:** The increase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections has limited the use of effective available antibiotics. Clindamycin, an alternative against MRSA, might have inducible resistance that is not detected by common antibiograms. The disk diffusion method (D-test) detects the inducible resistance. **Objective:** To establish the frequency of inducible resistance in MRSA from blood and secretion samples obtained from hospitalized patients. **Methods:** Prospective and descriptive research, including MRSA positive blood and secretion samples from patients of Hospital Luis Calvo Mackenna, between July 2005-July 2006. A D-test was performed to the samples. **Results:** 220 MRSA samples were obtained and D-test was performed on 155 of them. 80% of the samples came from tracheobronchial secretion and 90% had used antibiotics. From all analyzed MRSA isolates, 32 (20.6%) were Clindamycin susceptible and 14 (43.8%) had Clindamycin inducible resistance (D-test+). **Conclusions:** A high percentage of MRSA Clindamycin resistant was found. From MRSA Clindamycin susceptible, 43.8% had Clindamycin inducible resistance (D test+). D-test was implemented in the Microbiology Laboratory at Hospital Luis Calvo Mackenna, allowing the identification of MRSA isolates susceptible to Clindamycin treatment.

(Key words: Clindamycin, antibiotic resistance, antibiotics, *Staphylococcus aureus*).

Rev Chil Pediatr 2009; 80 (1): 48-53

## RESUMEN

El aumento de infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) ha disminuido las alternativas de antimicrobianos efectivos. Clindamicina, una alternativa contra SAMR, puede presentar resistencia inducible no detectable con antibiogramas habituales. El test de difusión en disco (D test) detecta esta resistencia inducible. **Objetivo:** Determinar la frecuencia de resistencia inducible a clindamicina en muestras de sangre y/o secreciones positivas para SAMR de pacientes del hospital. **Materiales y**

Trabajo recibido el 22 de agosto de 2008, devuelto para corregir el 8 de octubre de 2008, segunda versión el 5 de noviembre de 2008, aceptado para publicación el 12 de enero de 2009.

Estudio financiado por "Concurso proyectos de investigación" Sociedad Chilena de Pediatría.

Correspondencia a:

Irene Montoya Claramunt

E-mail: pilmonclar@hotmail.com

**Métodos:** Estudio prospectivo descriptivo, incluyó muestras de sangre y secreciones positivas para SAMR de pacientes del Hospital Luis Calvo Mackenna, recolectadas entre Julio 2005 y Julio 2006. A cada muestra se le realizó el D-test estandarizado según pautas CLSI. **Resultados:** Se recolectaron 220 cepas de SAMR, se realizó D test a 155. El 80% de las muestras era secreción traqueo-bronquial. El 90% tenía antecedente de uso de antimicrobianos. Del total de cepas estudiadas, 32 (20,6%) resultó sensible a clindamicina y 14 (43,8%) presentaron resistencia inducible a clindamicina (D-test +). **Discusión:** Se encontró alto porcentaje de SAMR resistentes a clindamicina en nuestro medio hospitalario. Aquellos SAMR informados como sensibles a clindamicina, 43,8% presenta resistencia inducible a clindamicina (D-Test +). Se implementó en el Laboratorio de Microbiología la técnica de D test, permitiendo identificar cepas de SAMR susceptibles de tratar con clindamicina.

(Palabras clave: Clindamicina, resistencia, antibiótico, *Staphylococcus aureus*).

Rev Chil Pediatr 2009; 80 (1): 48-53

## Introducción

El número de infecciones estafilocócicas, tanto a nivel comunitario como nosocomial, ha aumentado en los últimos 20 años, así como también, han aumentado en forma significativa a nivel mundial las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR)<sup>1-4</sup>.

El SAMR fue aislado por primera vez en un cultivo en 1961, 2 años después de la introducción de la meticilina como tratamiento en la práctica clínica<sup>5</sup>. Esto inicialmente ocurría en hospitales del nivel terciario, pero el SAMR se encuentra cada vez con más frecuencia en la comunidad<sup>6-10</sup>. La primera infección de la comunidad por SAMR, fue reportada en 1980 en Estados Unidos, existiendo ciudades de ese país en que más del 50% de las infecciones estafilocócicas de la comunidad son producidas por SAMR<sup>11,12</sup>.

El *Staphylococcus aureus* es un patógeno humano versátil que se adapta a los antimicrobianos, siendo capaz de generar mecanismos de resistencia eficientes<sup>4</sup>. En este microorganismo se han descrito múltiples mecanismos de resistencia. Entre estos, existen 3 mecanismos de resistencia para los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS): Modificación del sitio de acción (codificado por el gen *erm*), Bomba de eflujo (codificado por el gen *msr A*) e Inactivación (codificado por el gen *mph*)<sup>13</sup>.

La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus aureus* que son resistentes a la eritromicina lo son también a las Lincosamidas. Esto

es codificado por el gen *erm* que induce la metilación de la subunidad 23S ribosomal lo que conlleva a la modificación del sitio de unión de estos antibióticos. Estas cepas se han dividido en dos clases fenotípicas mayores: a) Cepas con resistencia constitutiva, las cuales pueden crecer en presencia de altas concentraciones de antimicrobianos MLS sin requerir inducción previa (MLSc) y b) Cepas con resistencia inducible, cuya resistencia a los antimicrobianos MLS puede ser inducida por concentraciones subinhibitorias (0,01 a 0,1 ug/ml) de eritromicina (MLSi)<sup>14</sup>.

La resistencia inducible para macrólidos, lincosamidas y streptograminas no se detecta usando los test de susceptibilidad antimicrobianos estándar. La no identificación de esta resistencia inducible puede conducir a falla del tratamiento con clindamicina, como se ha reportado desde el año 1969 por Mc Gehee y colaboradores<sup>15-17</sup>. Esto ha llevado a los clínicos a desestimar su uso. Por otra parte, si se considera como clindamicina resistente a todos los *Staphylococcus aureus* eritromicina resistentes, se rechazaría la posibilidad de tratar con clindamicina infecciones por *Staphylococcus aureus* que son susceptibles<sup>16</sup>.

Para identificar *in vitro* las cepas de *Staphylococcus aureus* que poseen una resistencia inducible a la clindamicina, existe un método de laboratorio conocido como test de difusión de doble disco (D test)<sup>18</sup>. Este método consiste en colocar en un cultivo de *Staphylococcus aureus*, un disco de clindamicina y uno de eritromicina a una distancia de 15 mm (según

guías CLSI 2004). Aquellos *Staphylococcus aureus* con resistencia inducible a clindamicina forman una letra D en la zona circular de inhibición alrededor del disco de clindamicina hacia el lado que enfrenta al disco de eritromicina (figura 1). D test es un método que ha demostrado una sensibilidad y especificidad cercana al 100% al ser comparado con el estudio de genotipificación, el cual constituye el *gold standard* para la identificación de las cepas que presentan resistencia inducible a clindamicina<sup>19</sup>.

La prevalencia de este tipo de resistencia es variable según área geográfica. Los reportes mundiales van desde un 2,2% en Houston, Texas<sup>20,21</sup>, 12,3% en Philadelphia<sup>22</sup>, a un 96,3% en Australia<sup>19</sup>.

El aumento de la frecuencia de las infecciones por SAMR en niños y los cambios en patrones de resistencia antimicrobiana ha renovado el interés en el uso de nuevos antibióticos<sup>15</sup>. Clindamicina surge como una alternativa atractiva dado que es un tratamiento efectivo en infecciones habituales como musculoesqueléticas, piel, tejidos blandos y neumonía con empiema. Además su uso puede ser endovenoso y oral con una biodisponibilidad del 90%, más económico que otras alternativas antibióticas y podría ser beneficioso en inhibir la producción de ciertas toxinas y factores de virulencia del *Staphylococcus aureus*<sup>17</sup>.



Figura 1. Imagen de D test (+) en muestra de SAMR.

La importancia radica en que clindamicina podría constituir una alternativa antibiótica para aquellos SAMR tanto de la comunidad como del Hospital. La técnica del D test, para detectar la resistencia inducible, no se realiza de rutina. Considerando que es un examen sencillo de realizar, de bajo costo, con alta sensibilidad y especificidad, y que la información que entrega es importante para la decisión terapéutica que debe adoptar el clínico, esta técnica se podría implementar en los laboratorios de microbiología para su uso de rutina. Por lo anterior los objetivos principales de nuestro trabajo son: implementar la técnica de test de difusión de doble disco (D test) en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Luis Calvo Mackenna y determinar la frecuencia de resistencia inducible a clindamicina en muestras de sangre y/o secreciones positivas para SAMR de pacientes del Hospital Luis Calvo Mackenna.

## Materiales y Métodos

Estudio descriptivo prospectivo, que incluyó todas las muestras de sangre y/o secreciones positivas para SAMR obtenidas de pacientes de los distintos servicios del Hospital Luis Calvo Mackenna, en el período comprendido entre julio 2005 y julio 2006.

El Comité de Ética del Hospital, determinó que por las características de este trabajo no correspondía solicitar consentimiento informado.

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Luis Calvo Mackenna. Se les realizó estudio de sensibilidad a oxacilina, vancomicina, cotrimoxazol, rifampicina, amikacina y clindamicina.

A las cepas seleccionadas se les realizó el test de difusión de doble disco (D test) estandarizado según pautas CLSI (*Clinical and Laboratory standards Institute*)<sup>18</sup>. Se almacenó la muestra en crioviales a -20 °C. Se cultivaron en agar sangre y se incubaron a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente, se preparó una suspensión de cada una de las cepas de SAMR a una concentración de 0,5 MacFarland, para luego inocularlas en agar Mueller-Hinton no suplementado. En este agar se instaló un

disco estándar de eritromicina de 15ug y un disco de clindamicina de 2 ug, separados por una distancia de 15 mm. Cada cepa se incubó por 24 horas a 35 °C. Despues del cual se observó la presencia de halo de inhibición alrededor de cada uno de los discos y se medió su diámetro.

Se recolectó las fichas clínicas de aquellos pacientes con cepas con D test positivo y se obtuvo los siguientes datos: sexo, edad, diagnóstico de ingreso y uso de antimicrobianos en los 14 días previos.

### Definiciones

1. *Resistencia inducible a clindamicina*: corresponde a aquellas cepas de SAMR que en antibiograma son sensibles a clindamicina pero en las que posteriormente se identifica un D test (+).

2. *D test (+)*: será positivo cuando tengamos distorsión del halo de inhibición alrededor del disco de clindamicina en la cara que enfrenta al disco de Eritromicina (figura 1).

*Análisis estadístico*: El presente trabajo es considerado un estudio piloto, de manera que no es posible calcular el tamaño muestral. Los datos se incorporaron en una base de datos Excel, que posteriormente fueron analizados.

### Resultados

Durante el período en estudio se recolectaron 220 cepas de SAMR de muestras de sangre y secreciones, a 155 de ellas se les realizó D test. Previamente a las cepas se les había realizado estudio de sensibilidad para vancomicina, cotrimoxazol, rifampicina y amikacina.

De las 155 cepas estudiadas, 32 (20,5%) fueron informadas como sensibles a clindamicina con el antibiograma estándar. De estas 32 cepas, 14 (43,8%) resultaron tener D test positivo (figura 2).

La caracterización de la sensibilidad a estos antimicrobianos para las cepas que resultaron D test positivo, se analizan en la tabla 1.

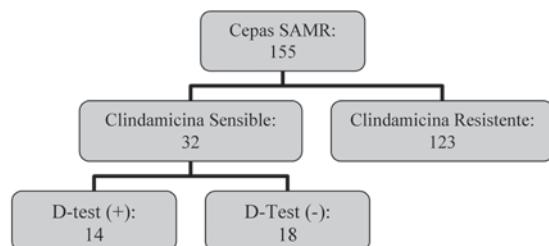
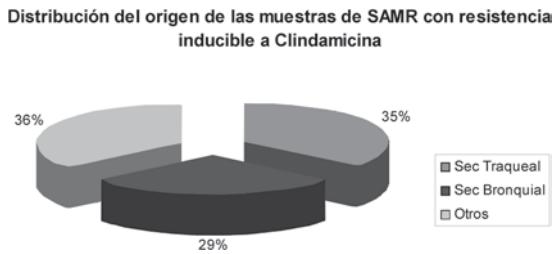


Figura 2. Resultados de estudio de resistencia inducible en cepas de SAMR.

Tabla 1. Características del Antibiotograma de las muestras de SAMR con resistencia inducible a clindamicina

| Procedencia          | Tipo Muestra   | Oxa | Ak | Rif | Va | Sxt |
|----------------------|----------------|-----|----|-----|----|-----|
| 2º Infancia          | Sec. Traqueal  | R   | S  | S   | S  | S   |
| Lactantes            | Sec. Traqueal  | R   | R  | S   | S  | S   |
| Poli. Broncopulmonar | Sec. Bronquial | R   | R  | R   | S  | S   |
| UTI                  | Sec. Piel      | R   | R  | S   | S  | S   |
| UTI                  | Sec. Traqueal  | R   | R  | S   | S  | S   |
| Lactantes            | Sec. Traqueal  | R   | I  | R   | S  | S   |
| UTI                  | Hemocultivo    | R   | R  | S   | S  | S   |
| UTI                  | Sec. Traqueal  | R   | S  | S   | S  | S   |
| Conin                | Sec. Piel      | R   | S  | S   | S  | S   |
| UTI                  | LCR            | R   | R  | R   | S  | S   |
| 2º Infancia          | Sec. Bronquial | R   | R  | S   | S  | R   |
| Cirugía              | CVC            | R   | S  | S   | S  | S   |
| Poli. Broncopulmonar | Sec. Bronquial | R   | R  | R   | S  | S   |
| 2º Infancia          | Sec. Bronquial | R   | R  | S   | S  | R   |

SAMR: *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente; Oxa: Oxacilina; Ak: Amikacina; Rif: Rifampicina; Va: Vancomicina; Sxt: Cotrimoxazol. S: Sensible; R: Resistente.



**Figura 3.** Resultados de estudio de resistencia inducible en cepas de SAMR. \*Otros: hemocultivos, secreción perirectal, secreción perigastrostomía.

Al analizar los pacientes de los cuales se obtuvieron las cepas de SAMR con D test positivo, 11 pacientes eran hombres y 3 mujeres. El rango de edad de los pacientes de estas muestras fue de 3 meses a 11 años con un promedio de 2,5 años.

Los diagnósticos de los pacientes en un 60% correspondió a traqueobronquitis, 20% infección endobronquial y otros diagnósticos en un 20%. El origen de las muestras se describe en la figura 3.

Al analizar el uso de antimicrobianos en los 14 días previos a la toma de la muestra en los pacientes en los que se obtuvo D test positivo, se encontró que 9 pacientes (90%) hizo uso de ellos.

## Discusión

Considerando el aumento en la prevalencia de SAMR tanto a nivel hospitalario como en la comunidad surge la necesidad de encontrar nuevas herramientas terapéuticas que sean accesibles, sobre en aquellas infecciones localizadas donde se podría realizar tratamiento ambulatorio.

Se estandarizó la técnica de D test en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Luis Calvo Mackenna, siendo esta una técnica sencilla de realizar y de interpretar, reproducible y de bajo costo. Constituye además una técnica sensible y específica, como se mostró en el estudio de O'Sullivan y colaboradores en el año 2006. Es por esto que el D test es un método atractivo para determinar la presencia de la

resistencia inducible a clindamicina en cepas de SAMR, a diferencia de la genotipificación, que si bien constituye el *gold standard*, es un método de alto costo y no disponible en nuestro medio.

El D test no es realizado de rutina en los laboratorios de Microbiología, por eso se implementó la técnica en el Hospital Luis Calvo Mackenna, de manera de ser una herramienta para el clínico en la decisión de iniciar tratamiento antimicrobiano en cuadros producidos por SAMR, donde muchas veces la alternativa terapéutica se limita a tratamientos costosos, de uso endovenoso como la vancomicina. En este sentido, clindamicina aparece nuevamente como una atractiva alternativa de tratamiento, especialmente en infecciones cutáneas y osteoarticulares, donde logra buenas concentraciones. Las ventajas de clindamicina son tener forma de presentación oral y endovenosa, buena tolerancia y biodisponibilidad.

En los resultados obtenidos se encontró un alto porcentaje de SAMR resistente a clindamicina (79,4%). De aquellos informados como sensibles a clindamicina por el antibiograma estándar, un 43,8% presentó resistencia inducible a clindamicina. El porcentaje encontrado en nuestra serie de resistencia inducible corresponde a un valor intermedio a los rangos publicados en las series internacionales, que van desde 2,2% a 96,3%. Las infecciones del tracto respiratorio constituyen el diagnóstico más frecuente entre los pacientes estudiados. La estadía en UTI junto con el uso de antimicrobianos previos son hallazgos frecuentes en los pacientes de los cuales se obtuvo cepas con D test positivo, lo que coincide con los factores de riesgo descritos en la literatura.

La técnica de D test permite entonces identificar aquellas cepas de SAMR susceptibles de ser tratadas con clindamicina, disminuyendo la posibilidad de falla de tratamiento. Es por esto que se puede sugerir la realización del D test a todas las muestras de SAMR informadas como sensibles a clindamicina en el test de antibiograma estándar.

A futuro se pretende realizar estudio genómico de las cepas de SAMR con D test positivo y determinar sensibilidad y especificidad. Además dado en incremento de infecciones por

SAMR a nivel de la comunidad, realizar D test a muestras de SAMR de la comunidad.

## Referencias

- 1.- *Salyers A*: Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM press, second edition. 2002.
- 2.- *Lowy FD*: *Staphylococcus aureus* Infections. N Engl J Med 1998 ; 339: 520-32.
- 3.- *Chambers HF*: The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Em Infect Dis 2001; 7: 178-82.
- 4.- *Lowy FD*: Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 2003; 111: 1265-73.
- 5.- *Farr B*: Prevention and Control of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Curr Opin Infect Dis 2004; 17: 317-22.
- 6.- *Pan E, Diep B, Carleton H, et al*: Increasing Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in California Jails. Clin Infect Dis 2003; 37: 1384-8.
- 7.- *Herold B, Immergluck L, Maranan L*: Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children with no Identified Predisposing Risk. JAMA 1998; 279: 593-8.
- 8.- *Salgado C, Farr B, Calfee D*: Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors. Clin Infect Dis 2003; 36: 131-9.
- 9.- *Hussain F, Boyle-Vavra S, Bethel C, Daum R*: Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Healthy Children Attending an Outpatient Pediatric Clinic. Pediatr Infect Dis J 2001; 20: 763-76.
- 10.- *Adcock P, Pastor P, Medley F, Patterson J, Murphy T*: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Two Child Care Centers. J Infect Dis 1998; 178: 577-80.
- 11.- *Gorak E, Yamada E, Brown J*: Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitalized Adults and Children without Known Risk Factors. Clin Infect Dis 1999; 29: 797-800.
- 12.- *Hussain F, Boyle-Vavra S, Bethel C, Daum R*: Current Trends in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at Tertiary Care Pediatric Facility. Pediatr Infect Dis J 2000; 19: 1163-6.
- 13.- *Matsuoka M, Inoue M, Nakajima Y, Endo Y*: New erm Gene in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 211-5.
- 14.- *Matsuoka M, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y*: Characteristic Expression of Three genes, msr(A), mph(C) and erm(Y), that Confer Resistance to Macrolide Antibiotics on *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters 2003; 220: 287-93.
- 15.- *Siberry G, 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: 1257-60.
- 16.- *Fiebelkorn K, Crawford S, McElmeel M, Jorgensen J*: Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. J Clin Microbiol 2003; 41: 4740-4.
- 17.- *Kaplan S, Hulten K, González B, Hammerman W, Lamberth L, Versalovic J, Mason E*: Three-year Surveillance of Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Infections in Children. CID 2005, 40: 1785-91.
- 18.- NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing; fourteenth Informational Supplements, M100-S14. Jan. 2004. NCCLS, Wayne, PA.
- 19.- *O'Sullivan M, Cai Y, Kong F, Zeng X, Gilbert G*: 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; 4072-4076.
- 20.- *Frank A, Marcinak J, Mangat D, et al*: Clindamycin Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Children. Pediatr Infect Dis J 2002; 21: 530-534
- 21.- *Chávez-Bueno S, Bozdogan B, Katz K, et al*: Inducible Clindamycin Resistance and Molecular Epidemiologic Trends of Pediatric Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Dallas, Texas. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005; 2283-8.
- 22.- *Levin T, Suh B, Axelrod P, Truant A, Fekete T*: Potential Clindamycin Resistance in Clindamycin-Susceptible, Erythromycin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Report of a Clinical Failure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005; 1222-4.