

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Angelita Bottega**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA  
A CLINDAMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus  
aureus* DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO**

**Santa Maria, RS  
2016**

**Angelita Bottega**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA A  
CLINDAMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* DE UM  
HOSPITAL TERCIÁRIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Rosmari Hörner

**Santa Maria, RS  
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BOTTEGA, ANGELITA  
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA  
A CLINDAMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus*  
*aureus* DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO / ANGELITA BOTTEGA. -  
2016.

52 p.; 30 cm

Orientador: ROSMARI HORNER  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina  
(MRSA) 2. *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina  
(MSSA) 3. Clindamicina 4. Resistência Bacteriana I.  
HORNER, ROSMARI II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos reservados a Angelita Bottega. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.  
Email: angelitabottega@yahoo.com.br

Angelita Bottega

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA  
RESISTÊNCIA A CLINDAMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*Staphylococcus aureus* DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Aprovado em 11 de Agosto de 2016:**



---

**Rosmari Hörner, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Luciana Maria Fontanari Krause, PhD. (UNIFRA)**



---

**Fábio Lopes Pedro, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016



*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por sempre me guiar e aos meus pais, Nilton e Neusa, por todo amor, apoio e incentivo a mim dedicados em todos os momentos de minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e pelas oportunidades a mim confiadas até o presente momento, e por aquelas que ainda estão por vir.

Aos meus pais, Nilton e Neusa de Fátima, pelo amor, incentivo, compreensão e auxílio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu Irmão Joselino, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos desta jornada.

Ao meu namorado, Tiago, pelo carinho, incentivo e compreensão.

A todos os meus familiares, que de uma forma ou de outra, me apoiaram e incentivaram a prosseguir no meu objetivo.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Rosmari Horner, agradeço pela oportunidade a mim confiada, pelos ensinamentos, dedicação e apoio para a realização desta pesquisa.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia pelo convívio, disponibilidade e ajuda.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que você nasceu sem nada, e que tudo que conseguiu foi através de esforços e os esforços nunca se perdem, dignificam as pessoas.”

(Charles Chaplin)

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA A CLINDAMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO

AUTORA: Angelita Bottega  
ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Rosmari Horner

Os *Staphylococcus aureus* demonstraram ao longo do tempo, capacidade de desenvolver resistência a maioria dos antimicrobianos. O mecanismo de resistência aos macrolídeos em *S. aureus* atinge também as lincosamidas e as estreptograminas B, caracterizando a denominada resistência MLS<sub>B</sub>, cuja expressão pode ser constitutiva (cMLS<sub>B</sub>) ou induzível (iMLS<sub>B</sub>) e é codificada principalmente pela presença dos genes *erm* (*ermA*, *ermB* e *ermC*) e *msrA*. A resistência cMLS<sub>B</sub> é facilmente detectada pelos testes de susceptibilidade utilizados na rotina laboratorial, mas a identificação da resistência iMLS<sub>B</sub> só é possível, mediante a utilização de um agente indutor. Dessa forma, a terapia com clindamicina nos casos de infecção por isolados com resistência iMLS<sub>B</sub> pode falhar. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar o perfil fenotípico (cMLS<sub>B</sub> e iMLS<sub>B</sub>) e molecular (presença dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrA*) de 140 isolados clínicos de *S. aureus* sensíveis (MSSA) e resistentes à meticilina (MRSA), provenientes de pacientes admitidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) no período compreendido entre abril a dezembro de 2011. Como critérios de inclusão foram considerados todos os isolados identificados como *S. aureus* através de metodologias fenotípicas manuais (coloração de Gram, prova da catalase, coagulase, etc.) e automatizada (MicroScan® - Siemens), sendo excluídas do estudo amostras repetidas do mesmo paciente. O fenótipo MLS<sub>B</sub> foi detectado através do teste de indução por disco aproximação (D-teste), sendo que das 140 cepas, 25 apresentaram fenótipo cMLS<sub>B</sub> e 11 o fenótipo iMLS<sub>B</sub>. Dos isolados constitutivos, 20 eram MRSA e 5 MSSA, enquanto nos isolados induzíveis, 8 (5,8%) eram MSSA e 3 (2,1%) MRSA. A partir desses resultados, foi realizada a caracterização molecular através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de todos os isolados que expressaram no teste fenotípico a resistência MLS<sub>B</sub>. Entre estes, os genes *ermA* e *ermC* foram os prevalentes, sendo identificados em 11 e 15 dos isolados respectivamente. O gene *ermB* amplificou em 4 das 36 cepas, enquanto o *msrA* em 13, sendo que destas, 8 apresentavam associação com os genes *erm* pesquisados. Apesar do fenótipo iMLS<sub>B</sub> ter sido menos frequente que o cMLS<sub>B</sub>, a realização do D-teste é importante para detecção destes fenótipos, pois pode orientar condutas terapêuticas, contribuindo para melhora na saúde do paciente, reduzindo o tempo de internação e consequentemente, o ônus para o sistema de saúde. Além disso, o teste é de baixo custo e fácil de ser executado, quando comparado a técnica da PCR, que apesar da alta sensibilidade e especificidade, não é empregada na rotina de todos os laboratórios clínicos, devido aos elevados custos.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA). Clindamicina. Resistência Bacteriana.



## ABSTRACT

### CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA A CLINDAMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO

AUTHOR: Angelita Bottega  
ADVISER: Dr<sup>a</sup>. Rosmari Hörner

*Staphylococcus aureus* demonstrated over the time, the ability to develop resistance to the most antimicrobials. The mechanism of resistance to macrolides in *S. aureus* also reaches lincosamides and streptogramins B, featuring the designate MLS<sub>B</sub> resistance, whose expression can be constitutive (cMLS<sub>B</sub>) or inducible (iMLS<sub>B</sub>) and it is encoded mainly by the presence of *erm* genes (*ermA*, *ermB* and *ermC*) and *msrA*. The cMLS<sub>B</sub> resistance is easily detected by susceptibility testing used in routine laboratory, but iMLS<sub>B</sub> resistance identification is only possible by using an inducing agent. Thus, clindamycin therapy in cases of infection by isolated with iMLS<sub>B</sub> resistance can fail. Thus, this study aimed to characterize the phenotypic profile (cMLS<sub>B</sub> e iMLS<sub>B</sub>) and molecular (presence of *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* genes) of 140 clinical isolates of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA), from patients admitted at University Hospital of Santa Maria (HUSM) in the period from April to December 2011. The inclusion criteria were all isolates identified as *S. aureus* by manual phenotypic methods (Gram stain, catalase test, coagulase, etc.) and automated (MicroScan® - Siemens), and excluded of the study repeated samples from the same patient. The MLS<sub>B</sub> phenotype was detected by approaching disk induction test (D-test), and from 140 strains, 25 had cMLS<sub>B</sub> phenotype and 11 the iMLS<sub>B</sub> phenotype. Of constitutive isolates, 20 were MRSA and 5 MSSA, while the inducible isolates 8 (5.8%) were MSSA and 3 (2.1%) MRSA. From these results, we performed the molecular characterization by Reaction technique Polymerase Chain (PCR) of all isolates that expressed the MLS<sub>B</sub> resistance in phenotypic test. Among these, *ermA* and *ermC* genes were prevalent, identified at 11 and 15 of the isolates, respectively. The gene *ermB* amplified in 4 of 36 strains, while *msrA* in 13, and of these, 8 had an association with the *erm* genes surveyed. Despite the iMLS<sub>B</sub> phenotype have been less frequent than cMLS<sub>B</sub>, the realization of the D-test is important to detect these phenotypes, it may guide therapeutic procedures, helping to improve in the health of the patient, reducing the length of hospitalization and thus the burden on the health system. Moreover, the test is inexpensive and easy to run compared to the PCR technique, which despite its high sensitivity and specificity is not used in routine of all clinical laboratories due to high costs.

**Keywords:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). Clindamycin. Bacterial Resistance.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

### Introdução

#### Figuras

- Figura 1 – Prevalência do HA-MSRA no mundo .....21  
Figura 2 – Fenótipos  $MLS_B$  encontrados no teste de indução por disco aproximação (D-teste) .....24

#### Material e Métodos Adicionais

#### Quadro

- Quadro 1 – Concentrações dos reagentes utilizados na PCR .....31

#### Resultados e Discussões Adicionais

#### Figura

- Figura 3 – Genes *erm* e *msrA* e seus respectivos pares de base .....34

## LISTA DE TABELAS

### Material e Métodos Adicionais

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados na execução da PCR .....	32
---	----

### Resultado e Discussões Adicionais

Tabela 2 – Genes de resistência dos 36 isolados de <i>S. aureus</i> com fenótipo $MLS_B$ .....	35
--	----

### Artigo

Tabela 1 – The erythromycin and clindamycin susceptibility profiles of clinical samples of <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
Tabela 2 – Isolation of <i>Staphylococcus aureus</i> in clinical samples .....	28

## LISTA DE ABREVIações

°C	Graus Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de origem comunitária
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CL	Clindamicina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cMLSB	Resistência MLSB constitutiva
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
D-teste	Teste de Indução por Disco Aproximação
ER	Eritromicina
<i>erm</i>	<i>erythromycin ribosomal methylase</i>
HA- MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de origem hospitalar
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
I	Intermediária
iMLS <sub>B</sub>	Resistência MLS <sub>B</sub> induzível
MLS <sub>B</sub>	Resistência aos macrolídeos, às lincosamidas e estreptograminas B
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina
pB	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
R	Resistente
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribossomal
s	Segundos
S	Sensível
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA: DESAFIO A SAÚDE PÚBLICA .....	14
1.2	O <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
1.3	FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>S. aureus</i> .....	17
1.4	<i>S. aureus</i> RESISTENTE À METICILINA (MRSA).....	18
1.5	RESISTÊNCIA DO <i>S. aureus</i> AO GRUPO DE MACROLÍDEOS, LICONSAMIDAS E ESTREPTOGRAMINAS B (MLS <sub>B</sub> ) .....	21
1.6	JUSTIFICATIVA.....	24
1.7	OBJETIVOS.....	25
1.7.1	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>25</b>
1.7.2	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>26</b>
2.1	ARTIGO .....	26
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS.....</b>	<b>30</b>
3.1	DETECÇÃO GENES <i>erm</i> E <i>msrA</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	30
3.1.1	<b>Seleção de isolados e extração do DNA bacteriano.....</b>	<b>30</b>
3.1.2	<b>Sequências de <i>primers</i> e condições de ciclagem dos genes.....</b>	<b>31</b>
3.1.3	<b>Análise dos produtos da PCR .....</b>	<b>33</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES ADICIONAIS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é responsável por uma variedade de doenças que vão desde infecções de pele e tecidos moles a quadros infecciosos invasivos e potencialmente fatais, como bacteremia, endocardite, pneumonia e sepse (DONG et al., 2013). Sua importância clínica vem crescendo, particularmente, devido à emergência de infecções graves causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (BRAGA et al., 2014; SKOV et al., 2012), os quais figuram entre as bactérias mais envolvidas em infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) (CORREAL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012).

Mudanças nos padrões de sensibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos levaram ao interesse no uso de antibióticos alternativos, destacando-se os macrolídeos, as lincosâmidas e as estreptograminas B (MLS<sub>B</sub>) (UZUN et al., 2014; VIVEK et al., 2011). Dentre esses antimicrobianos, a clindamicina, uma lincosamida, representa uma escolha frequente no tratamento de infecções por *S. aureus*, devido às suas excelentes propriedades farmacocinéticas, como a ótima penetração nos tecidos e acumulação em abscessos (MIMICA, 2012; MOCKTA et al., 2015). Além disso, o fármaco pode ser administrado por via oral, pois é bem tolerado e representa uma alternativa em casos de intolerância à penicilina ou à meticilina (ABBAS et al., 2015; CASTELLANO et al., 2015). No entanto, o uso indiscriminado dos MLS<sub>B</sub> vem aumentando o número de isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes a esses fármacos (BAIU; AL-ABDELLI, 2016).

Embora os MLS<sub>B</sub> não se relacionem estruturalmente, possuem similar modo de ação. Estes fármacos agem através da ligação ao receptor 23S do RNA que compõe a subunidade ribossomal 50S da bactéria e interferem na elongação da cadeia peptídica durante a translocação, bloqueando a biossíntese das proteínas bacterianas de organismos sensíveis (DURMAZ et al., 2014; MOTAMEDIFAR et al., 2014).

O fenótipo de resistência aos MLS<sub>B</sub> pode ser constitutivo (cMLS<sub>B</sub>) ou induzível (iMLS<sub>B</sub>). No fenótipo constitutivo, os genes *erm* (*erythromycin ribosomal methylase*) estão expressos e a RNA metilase é produzida na ausência de um agente indutor. Os microrganismos com este fenótipo, podem mostrar resistência *in vitro* frente à eritromicina, clindamicina e demais fármacos MLS<sub>B</sub>, sendo facilmente detectadas no antibiograma. Entretanto, no fenótipo de resistência induzível, a bactéria produz

RNA<sub>m</sub> inativo, que é incapaz de codificar metilases. Este RNA<sub>m</sub> torna-se ativo, apenas na presença de um agente indutor como um macrolídeo, pois este leva a rearranjos do RNA<sub>m</sub>, permitindo que os ribossomas traduzam a sequência codificadora de metilases, expressando assim, o verdadeiro mecanismo de resistência apresentado pelo microrganismo (ALEKSANDRA et al., 2014; CHAUDHARY et al., 2015; JUYAL et al., 2013).

De acordo com Coutinho e colaboradores (2010), os testes de sensibilidade aos antimicrobianos baseados em métodos de diluição em caldo ou ágar, bem como, método de difusão dos discos de eritromicina/azitromicina (não adjacentes à clindamicina) não reconhecem o fenótipo iMLS<sub>B</sub>. A expressão *in vivo* da resistência induzível à clindamicina pode diminuir a eficácia deste antimicrobiano, aumentando as chances de ocorrerem falhas terapêuticas (LYALL et al., 2013). Por esse motivo, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), recomenda a realização do teste de disco aproximação (D-teste), um método fenotípico para triagem deste tipo de resistência (CLSI, 2014).

A detecção genotípica através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite investigar a presença do gene *erm*, responsável por inibir a produção de proteínas pela bactéria, é uma técnica bastante aplicada em laboratórios de pesquisa, devido a sua alta sensibilidade e especificidade na identificação da ocorrência dos fenótipos constitutivo e induzível (COUTINHO et al., 2010; MOOSAVIAN et al., 2014).

Assim, torna-se importante caracterizar o perfil fenotípico (ocorrência dos fenótipos cMLS<sub>B</sub> e iMLS<sub>B</sub>) e molecular (ocorrência dos genes *erm* e *msrA*) da resistência MLS<sub>B</sub>, dos isolados clínicos de *S. aureus* sensíveis e resistentes a meticilina. Essa investigação permitirá obter dados locais a respeito do perfil de resistência, podendo direcionar condutas terapêuticas mais adequadas.

## 1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA: DESAFIO A SAÚDE PÚBLICA

A descoberta dos antibióticos na terapêutica clínica permitiu a cura de doenças, que no passado apresentavam altos índices de mortalidade (GOOL; FARIA, 2014). Entretanto, o uso indiscriminado e irracional destes fármacos, contribuiu para o surgimento da resistência bacteriana que representa um sério problema de saúde pública mundial, já que as opções terapêuticas para tratar

doenças infecciosas têm se tornado cada vez mais restritas (FRANCO et al., 2015; PERUGINI et al., 2015; VIANA et al., 2011).

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenômeno que ocorre como resposta da bactéria ao uso abusivo de antimicrobianos no meio ambiente que se tornou um problema de grandes proporções, devido aos elevados índices de morbidade e mortalidade associados. Antes do século XXI, este fenômeno ocorria predominantemente em ambientes hospitalares, mas atualmente, as infecções por bactérias resistentes ocorrem em diversos ambientes podendo atingir, inclusive, indivíduos hígidos (BAIU; AL-ABDELLI, 2016; GOOL; FARIA, 2014; PAIM; LORENZINI, 2014).

De acordo com Guimarães e colaboradores (2010), o conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância para compreender a forma como a bactéria desenvolve resistência. Apesar desses mecanismos serem distintos de microrganismo para microrganismo, a resistência está relacionada a alguns fatores básicos como a mutação genética (alteração do sítio de ligação do fármaco); aquisição de genes de resistência (mediada por plasmídeos e transposons) e bombas de efluxo que expõem o fármaco da célula bacteriana (FRANCO et al., 2015).

A diminuição da eficácia de medicamentos para o tratamento de algumas patologias tem prolongado o tempo de internação do paciente e elevado os custos do tratamento para o sistema de saúde. Além disso, as pesquisas com novos compostos ainda não evoluíram de acordo com a demanda, sendo necessárias medidas alternativas para o controle das doenças infecciosas (CARVALHO; FONTES, 2014; GRILLO et al., 2014).

Para Pereira e colaboradores (2014), medidas preventivas devem ser instituídas principalmente em hospitais e devem ser implantadas através de um programa de racionalização, tendo como objetivos evitar a seleção de bactérias resistentes, reduzir os riscos de reações adversas e tornar menores os custos com a assistência à saúde. Além disso, Silveira et al. (2014), relatam que é importante orientar e treinar profissionais da saúde, para que possam prescrever antimicrobianos adequados para cada quadro de infecção e possam fornecer aos pacientes explicações claras e precisas quanto ao uso do fármaco prescrito.

A racionalidade do uso de antimicrobianos é importante. Esses medicamentos geralmente são utilizados com objetivos profiláticos



(antibioticoprofilaxia, quando se deseja prevenir a instalação de uma infecção por um agente conhecido ou fortemente suspeito, em um indivíduo em risco de vir a adquiri-la) e com propósitos curativos (antibioticoterapia, quando já existe uma doença causada por um microrganismo sensível ao antibiótico). A decisão de usar antibioticoterapia profilática, no entanto, deve ser baseada no peso da evidência de possível benefício em relação a possíveis eventos adversos, pois a prescrição errônea pode contribuir para o aumento no número de microrganismos resistentes (MOTA et al., 2010; PEREIRA et al., 2014).

Tendo em vista o grande número de antimicrobianos disponíveis e seus diferentes mecanismos de ação, assim como os diversos meios de resistência apresentados pelos microrganismos e a complexidade de determinados tipos de infecção, no Brasil, a fim de atenuar esta problemática, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 2010 a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 44/2010 que dispõe sobre o controle de medicamentos antimicrobianos. Em maio de 2011 esta resolução foi revogada e substituída pela RDC 20/2011 que trouxe algumas atualizações em relação à anterior. Esta (RDC/2011) determina que, os antibióticos vendidos nas farmácias e drogarias ou distribuídos em unidades de saúde do país só poderão ser entregues ao usuário mediante receita de controle especial (ANVISA, 2010; ANVISA, 2011; CARVALHO; FONTES, 2014).

Estas medidas buscam favorecer, principalmente, a prevenção do surgimento de microrganismos multirresistentes, reduzir os gastos com as internações e otimizar o tratamento dos pacientes (SALES; SILVA, 2012).

## 1.2 O *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é constituído por aproximadamente 40 espécies destacando-se entre estas o *S. aureus*, devido a sua importância clínica. Este microorganismo é um coco Gram-positivo, catalase e coagulase positivo, presente na microbiota transitória da pele e de outros sítios anatômicos dos seres humanos, sendo o vestíbulo nasal o seu principal reservatório (BROOKS et al., 2012, p. 185; OLIVEIRA et al., 2015).

Este microorganismo foi descrito pela primeira vez em 1880 por Alexander Ogston e 136 anos depois, ainda é um dos patógenos que mais afeta a população, sendo considerada a causa mais comum de infecções de origem hospitalar e

comunitária, demonstrando ampla capacidade de disseminação (MOHAMMADI, 2014).

A quebra da barreira cutânea ou a diminuição da imunidade representam a principal causa de mudança de comportamento deste microrganismo, que passa a ser o agente etiológico de diversas infecções (DONG et al., 2013). Estas variam desde cutâneas simples que incluem espinhas, furúnculos e celulites, a infecções sistêmicas graves com elevada morbidade e mortalidade associadas, tais como meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e sepse (PERES et al., 2014).

Esta espécie encontra-se amplamente distribuída no ambiente, tendo a capacidade de formar biofilmes sobre superfícies inanimadas e de resistir a ambientes inóspitos, como o calor e o frio intenso, permanecendo viável por longos períodos (MIRANI et al., 2013; SALES; SILVA, 2012). Seu potencial patogênico reside na combinação de alguns fatores como a virulência mediada por enzimas e toxinas; caráter invasivo (fácil multiplicação e disseminação nos tecidos); evasão do sistema imunológico e rapidez no desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (CORREAL et al., 2013; DONG et al., 2013).

### 1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA EM *S. aureus*

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* está relacionada com a expressão de diversos fatores de virulência. Estes fatores permitem a fixação, colonização, interação célula a célula e evasão da resposta imunológica do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2014).

São descritos como componentes estruturais: a cápsula de polissacarídeo que inibe a fagocitose dos organismos pelos leucócitos polimorfonucleares (PMN); o peptidoglicano que torna a parede celular da bactéria mais rígida e com atividade quimiostática e a proteína A inibidora de anticorpos e de fatores do complemento (CASTAÑÓN-SÁNCHEZ, 2012). O *S. aureus* possui ainda enzimas coagulase, catalase, lipases, nucleases e penicilinasas. Todos estes fatores garantem o sucesso na instalação, desenvolvimento e manutenção do microrganismo no tecido hospedeiro (BROOKS et al., 2012, p. 187).

A transmissão da infecção por *S. aureus* pode ocorrer através do contato direto ou indireto, sendo relatada principalmente no ambiente hospitalar, devido às facilidades de colonização e disseminação do microrganismo por meio de

equipamentos como cateteres, sondas e respiradores mecânicos, pelas mãos dos profissionais da área da saúde que ao prestar assistência a pacientes portadores persistentes podem transmitir o microrganismo a outros pacientes e pela facilidade de contágio de indivíduos imunologicamente debilitados (RIZECK et al., 2011).

Além dessas formas de contágio, Carvalho e Fontes (2014) e Prado et al. (2015), relatam que este microrganismo também está associado a quadros de intoxicação alimentar, por serem normalmente transmitidos aos alimentos armazenados e manipulados de forma inadequada, por colonizadores. A intoxicação ocorre através da produção de enterotoxinas que são liberadas durante sua multiplicação, sendo estes quadros, relatados com maior frequência nos alimentos de origem animal.

#### 1.4 *S. aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)

Eventos significativos na evolução dos *S. aureus* ocorreram nos últimos 70 anos, como o desenvolvimento de resistência às penicilinas e à meticilina, que representa um grave problema de saúde pública em muitos hospitais ao redor do mundo, além da emergência de cepas MRSA comunitárias (BOUCHER; COREY, 2008; CARVALHO; FONTES, 2014).

No início dos anos 1960, com o objetivo de solucionar a resistência dos *Staphylococcus* spp. à penicilina, foram desenvolvidas as penicilinas  $\beta$ -lactamases estáveis, resistentes à hidrólise das enzimas estafilocócicas representadas, pela meticilina e oxacilina (GUIMARÃES et al., 2010). Porém, um ano depois da implantação desses fármacos no mercado começaram a surgir relatos de cepas de *S. aureus* resistentes à estes antimicrobianos, denominadas respectivamente MRSA/ORSA, que se disseminaram rapidamente em vários países no mundo (ESCOBAR et al., 2012; MIMICA, 2012).

A resistência à oxacilina se deve basicamente a mecanismos como o BORSA e MOD-AS e à presença do gene *mecA*, que codifica a produção de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) adicionais e alteradas, denominadas PBP2a ou PBP2'. Elas possuem baixa afinidade por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e conseguem manter a síntese da parede celular bacteriana mesmo na presença de altas doses desses antimicrobianos (CALDERA et al., 2015; CATÃO et al., 2013).

O gene *mecA* é carreado em um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome - SCCmec*), e pode também conter estruturas como transposons que conferem resistência a antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos como os fármacos MLS<sub>B</sub>. Até o momento, são conhecidos 11 tipos de *SCCmec* (tipo I-XI) em MRSA (CORREAL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

As cepas de MRSA, basicamente eram responsáveis por causar infecções em pacientes com comprometimento imunológico e em ambiente hospitalar, sendo conhecidas como MRSA de origem hospitalar (HA-MRSA), que estão fortemente associadas aos *SCCmec* tipos I, II e III que lhes confere, geralmente, multirresistência a antimicrobianos. No entanto, a transmissão na comunidade entre indivíduos sem fatores de risco prévio tem sido reportada nos últimos anos e se deve a mudanças epidemiológicas, fenotípicas e genotípicas em MRSA. O primeiro caso relatado foi descrito na Austrália, em 1990, e algum tempo depois estas infecções começaram a se disseminar pelos Estados Unidos (EUA), Europa, Ásia e América do Sul (NAZARETH et al., 2011; ROCA, 2013).

Essas cepas ficaram conhecidas como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade (CA-MRSA), e apresentam características fenotípicas e genéticas distintas, quando comparadas às cepas típicas isoladas nos hospitais. Os CA-MRSA, carregam os *SCCmec* tipos IV ou V, que são elementos genéticos menores que os de origem hospitalar e, na grande maioria, conferem resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e aos macrolídeos-azalídeos (eritromicina, claritromicina, azitromicina). Além disso, uma importante característica observada nos isolados de origem comunitária é a presença de genes que codificam a leucocidina de Panton-Valentine (PVL), uma citotoxina capaz de causar necrose tecidual e destruição de leucócitos, através da formação de poros na membrana celular do hospedeiro (AGUDO et al., 2011; NAZARETH et al., 2011; ROCA, 2013; TAMARIZ et al., 2010).

Os CA-MRSA são identificados na comunidade ou em até 48 horas após a admissão hospitalar, em indivíduos sem histórico prévio de assistência a saúde, tais como internação em unidade de tratamento intensivo, prolongada hospitalização, doença de base grave, procedimentos invasivos e exposição prolongada ou repetida aos antimicrobianos no último ano (OLIVEIRA et al., 2014).

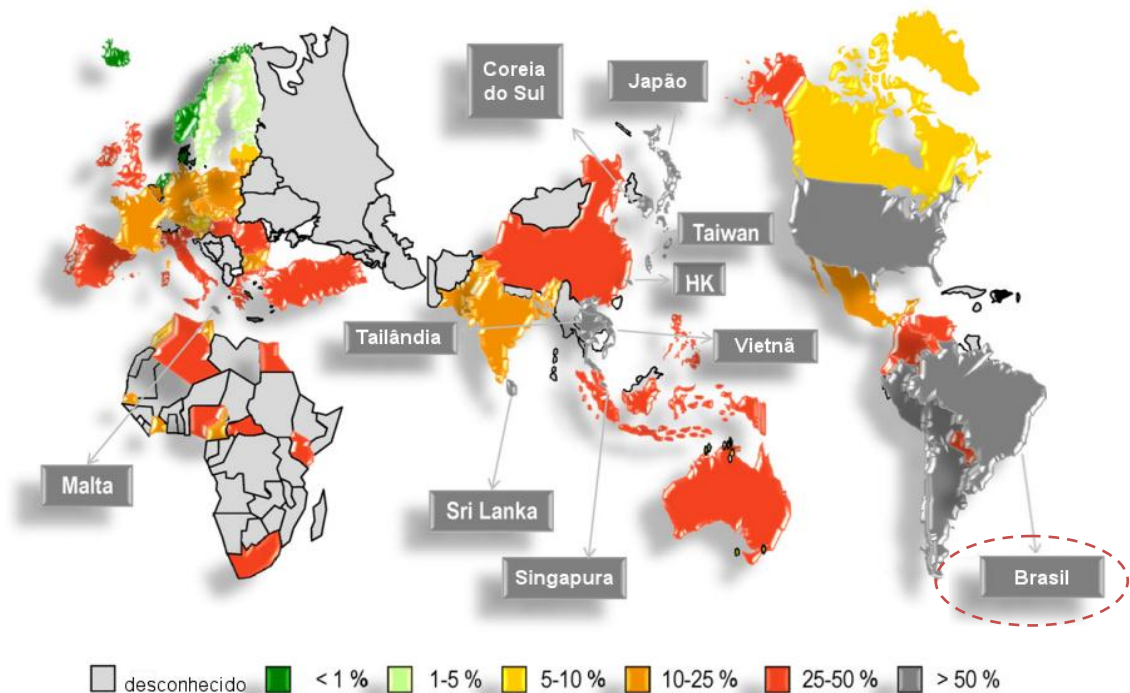
A população afetada, as infecções mais frequentes, o perfil de resistência aos antimicrobianos, os tipos de Cassete Cromossômico Estafilocócico (*SCCmec*) e a presença ou não da leucocidina de Panton-Valentine (PVL), podem ser utilizados como marcadores para fazer a distinção entre as duas estirpes (ESCOBAR et al., 2012; NAZARETH et al., 2011; OLIVEIRA; PAULA, 2012).

No relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), divulgado em 2014, há um alerta de que a resistência antimicrobiana está ameaçando a prevenção e o tratamento eficaz de um número cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. Segundo dados deste relatório, em alguns ambientes, até 90% das infecções por *S. aureus* são resistentes à meticilina, o que significa que o tratamento com antimicrobianos convencionais não estão mais funcionando adequadamente (WHO, 2014).

Em 2014 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde (Rede RM), investigou 18.233 casos de infecção primária da corrente sanguínea (IPCS) em 908 UTIs do Sistema Único de Saúde (SUS) e observou que do total de casos estudados, os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN) mostraram-se prevalentes, entretanto, entre os coagulase positivo, o *S. aureus* foi à espécie bacteriana mais frequente, estando presente em 14,5% dos pacientes.

No estudo epidemiológico realizado em um hospital de Ohio nos Estados Unidos da América (EUA) que analisou a prevalência do *S. aureus* em infecções diversas de 400 pacientes hospitalizados, foi confirmada a alta prevalência deste agente, que se fez presente em 25% dos casos investigados (KAPOOR et al., 2014). Já no estudo retrospectivo, desenvolvido por Bonnal e colaboradores (2015) na França, foi relatado que o *S. aureus* é o principal causador de bacteremias associadas aos cuidados de saúde, sendo detectado em 18% dos casos analisados. Stefani e Colaboradores (2012) relatam que a prevalência de infecções hospitalares por HA-MRSA nos países da América do Sul é superior a 50%, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Prevalência de HA-MRSA no mundo



Fonte: Adaptado de Stefani et al. (2012).

Estes dados reforçam a importância clínica e epidemiológica do *S. aureus*, que merece posição de destaque entre os microrganismos de importância médica, pois representa um verdadeiro desafio a saúde pública mundial.

### 1.5 RESISTÊNCIA DO *S. aureus* AO GRUPO DE MACROLÍDEOS, LINCOSAMIDAS E ESTREPTOGRAMINAS B (MLS<sub>B</sub>)

Os antimicrobianos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas tipo B (MLS<sub>B</sub>) são opções terapêuticas utilizadas no tratamento de infecções estafilocócicas, principalmente nas que afetam a pele e tecidos moles, além de ser uma alternativa para tratar indivíduos com hipersensibilidade às penicilinas. Estes fármacos exercem efeitos inibidores semelhantes sobre a síntese de proteína bacteriana, mas são quimicamente distintos (JUYAL et al., 2013).

Os macrolídeos são fármacos caracterizados pela presença de um anel macrocíclico de lactona, com função de inibir a síntese proteica dependente de RNA, através da ligação em receptores localizados na porção 50S do ribossoma bacteriano, impedindo que ocorram as reações de transpeptidação e translocação

de microrganismos sensíveis. Dentre os antimicrobianos dessa classe, destacam-se a eritromicina, que foi introduzida em 1952 como o primeiro antimicrobiano macrolídeo e a azitromicina. Infelizmente, dentro de um ano, após a descoberta da eritromicina estafilococos resistentes à este antimicrobiano foram descritos nos Estados Unidos, Europa e Japão (ROBERTS et al., 1999; SILVA FILHO et al., 2015).

As lincosamidas têm propriedades antibacterianas similares aos macrolídeos e agem pelo mesmo mecanismo de ação, estes são derivados alquil de prolina e são desprovidos de um anel de lactona. Da classe das lincosamidas, a clindamicina é um antimicrobiano amplamente utilizado para tratar infecções causadas por *S. aureus* principalmente as que acometem a pele e os tecidos moles, pois apresentam melhor atividade e maior absorção quando administrada por via oral, com cerca de até, 90% de biodisponibilidade (CHUMACERO, 2010; DUBEY et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2010). Além disso, Saderi e colaboradores (2011) relatam que este medicamento é capaz de inibir a produção de toxinas e de fatores de virulência em bactérias Gram-positivas por meio da inibição da síntese de proteínas.

Já as estreptograminas, constituem um grupo de antimicrobianos formados por uma mistura de duas classes de componentes distintos quimicamente, designados estreptograminas A e B. São agentes bactericidas e também agem na inibição da síntese proteica ao ligar-se aos ribossomos bacterianos. Seu principal uso clínico é na terapia de infecções por microrganismos Gram-positivos, particularmente nas ocasionadas por *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes à meticilina. Com a disponibilidade de linezolida e da daptomicina, as indicações para esse agente se tornaram limitadas (CHUMACERO, 2010).

A resistência do *S. aureus* aos MLS<sub>B</sub> pode ocorrer por dois diferentes mecanismos: resistência mediada pelo gene *msrA* (*specific methionine sulfoxide reductase*) e resistência mediada pelos genes *erm*. O primeiro mecanismo de resistência envolve efluxo ativo por meio de bomba ATP – dependente capaz de manter antimicrobianos em concentrações intracelulares suficientemente baixas impedindo que se liguem ao seu sítio alvo no ribossoma bacteriano. Este mecanismo cria resistência aos macrolídeos e as estreptograminas, mas não as lincosamidas (MAHESH et al., 2013). O segundo mecanismo ocorre por alteração ribossômica através de enzimas rRNA metilases, mediadas principalmente pelos genes *ermA*, *ermB* ou *ermC*, embora também possa ocorrer, em menor frequência,

por outros genes *erm* como os *ermF*, *ermG* e *ermY* (SCHWENDENER; PERRETER, 2012).

Esta alteração ribossômica dificulta a ligação destes antimicrobianos em seu sítio de ação e pode ocorrer de forma constitutiva ou induzível (MIMICA, 2012). A resistência cMLS<sub>B</sub> ocorre quando o RNAm relativo à metilase é ativo sem a presença de um agente indutor, expressando resistência a todos os fármacos do grupo MLS<sub>B</sub>. Já a resistência iMLS<sub>B</sub> ocorre quando o RNAm inativo é transcrito e, na presença de um indutor, torna-se ativo demonstrando resistência aos antimicrobianos macrolídeos como a eritromicina, sendo porém, sensível às lincosamidas (clindamicina) e estreptograminas B (COUTINHO et al., 2010; SASIREKHA et al., 2014).

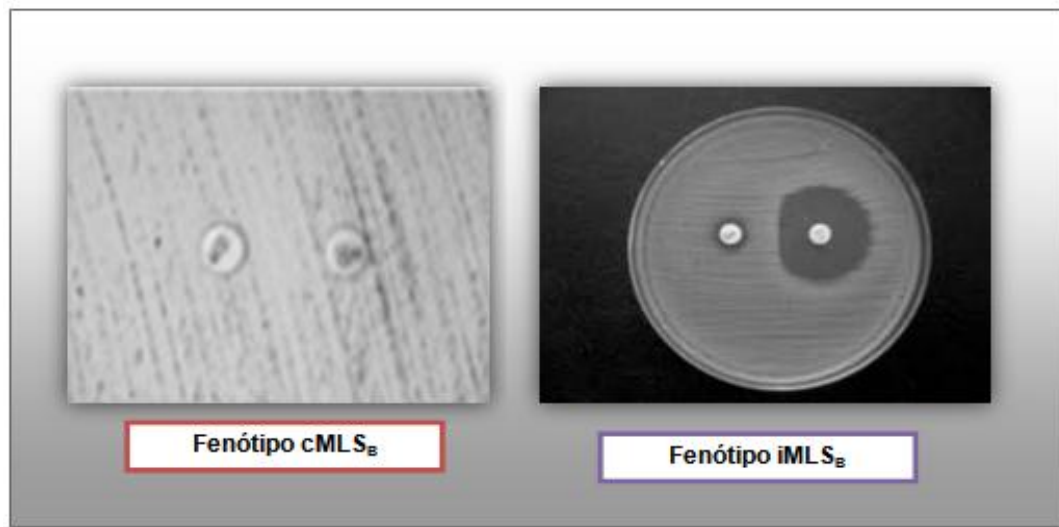
Conhecer o tipo de resistência MLS<sub>B</sub> é importante para estabelecer a terapia antimicrobiana eficaz, uma vez que isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência induzível podem selecionar mutantes *erm* constitutivos, que podem resultar em falhas terapêuticas (COUTINHO et al., 2010; PRABHU; RAO; RAO, 2011).

Dessa forma, o CLSI recomenda a realização do teste de indução por disco-aproximação (D-teste) na rotina laboratorial de todos os laboratórios clínicos, pois este permite detectar o fenótipo induzível e auxiliar no uso correto e efetivo da clindamicina nas infecções estafilocócicas (CLSI, 2014).

O D-teste consiste em colocar em cultivo de *S. aureus* o disco de eritromicina posicionado a uma distância de 20 mm (centro a centro) ao disco da clindamicina, incubando em estufa bacteriológica por um período de 18 a 24 horas para posterior análise dos halos de inibição que irão permitir identificar os fenótipos de resistência aos MLS<sub>B</sub> (CASTELLANO et al., 2015). Nas cepas com resistência constitutiva, ocorre a formação de halos circulares ao redor de ambos os discos de antimicrobianos utilizados, já nas que apresentam resistência induzível há formação de uma zona de inibição em formato de letra D ao redor do disco da clindamicina, conforme ilustrado na Figura 2.



Figura 2 – Fenótipos  $MLS_B$  encontrados no teste de indução por disco aproximação (D-teste)



Fonte: Angelita Bottega/Autora (2016).

De acordo com Prabhu et al. (2011), o teste apresenta alta sensibilidade e especificidade, é de fácil execução e de baixo custo. Apesar da recomendação de realização universal do teste pelo CLSI (2014), infelizmente, o mesmo não é realizado com tamanha frequência. Dados americanos divulgados no estudo de Patra et al. (2011), demonstram isso com clareza e, em nosso meio, não é esperado que a adesão à esta recomendação seja muito maior.

## 1.6 JUSTIFICATIVA

Em razão da emergência das infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a múltiplos antimicrobianos e do aumento nas taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções hospitalares e comunitárias relacionadas a esse patógeno, as opções de tratamento têm se tornado cada vez mais restritas. Os antimicrobianos  $MLS_B$  representam uma alternativa terapêutica em alguns casos de infecções estafilocócicas, destacando-se a lincosamida clindamicina, pelas suas excelentes propriedades farmacocinéticas, e representa uma alternativa em casos de intolerância à penicilina ou à meticilina. No entanto, cepas de *S. aureus* carreadoras do gene *erm* somente expressam a resistência à clindamicina na presença de um agente indutor (eritromicina/azitromicina), o que aumenta as chances de ocorrerem falhas terapêuticas na utilização deste antimicrobiano.

Portanto, a investigação da expressão constitutiva e induzível em nosocômios, tanto por métodos fenotípicos quanto moleculares é importante, uma vez que estes testes permitem um diagnóstico precoce e mais sensível deste tipo de resistência, que poderão direcionar condutas terapêuticas, reduzindo o ônus tanto para os pacientes como para o sistema de saúde, além de aumentar a eficácia no tratamento da infecção.

## 1.7 OBJETIVOS

### 1.7.1 Objetivo Geral

Avaliar a prevalência da resistência constitutiva e induzível aos MLS<sub>B</sub> em isolados clínicos de *S. aureus* obtidos de pacientes admitidos em um Hospital Terciário de Santa Maria.

### 1.7.2 Objetivos Específicos

a) Determinar a prevalência da resistência constitutiva e induzível nos isolados clínicos de *S. aureus* por meio do teste de indução por disco aproximação (D-teste).

b) Avaliar a presença dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrA* por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), nos isolados que apresentaram resistência fenotípica MLS<sub>B</sub> comparando as duas metodologias utilizadas.

## 2. PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

### 2.1 ARTIGO



Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 47(5):589-592, Sep-Oct, 2014  
<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0140-2014>

Major Article

## Evaluation of constitutive and inducible resistance to clindamycin in clinical samples of *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital

Angelita Bottega<sup>[1]</sup>, Mônica de Abreu Rodrigues<sup>[1]</sup>, Fernanda Aguirre Carvalho<sup>[1]</sup>,  
 Tatiana Feyh Wagner<sup>[1]</sup>, Isabel Agne Souza Leal<sup>[1]</sup>, Silvana Oliveira dos Santos<sup>[1]</sup>,  
 Roberta Filipini Rampelotto<sup>[1]</sup> and Rosmari Hörner<sup>[1]</sup>

[1] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

### ABSTRACT

**Introduction:** Infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have become common in hospitals and the community environment, and this wide resistance has limited patient treatment. Clindamycin (CL) represents an important alternative therapy for infections caused by *S. aureus*. Antimicrobial susceptibility testing using standard methods may not detect inducible CL resistance. This study was performed to detect the phenotypes of resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) antibiotics, including CL, in clinical samples of *S. aureus* from patients at a tertiary hospital in Santa Maria, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Methods:** One hundred and forty clinical isolates were submitted to the disk diffusion induction test (D-test) with an erythromycin (ER) disk positioned at a distance of 20mm from a CL disk. The results were interpreted according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Results:** In this study, 29 (20.7%) of the 140 *S. aureus* samples were resistant to methicillin (MRSA), and 111 (79.3%) were susceptible to methicillin (MSSA). The constitutive resistance phenotype (cMLS<sub>B</sub>) was observed in 20 (14.3%) MRSA samples and in 5 (3.6%) MSSA samples, whereas the inducible resistance phenotype (iMLS<sub>B</sub>) was observed in 3 (2.1%) MRSA samples and in 8 (5.8%) MSSA samples. **Conclusions:** The D-test is essential for detecting the iMLS<sub>B</sub> phenotype because the early identification of this phenotype allows clinicians to choose an appropriate treatment for patients. Furthermore, this test is simple, easy to perform and inexpensive.

**Keywords:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. D-test. Clindamycin bacterial resistance.

### INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is responsible for a variety of diseases that range in severity from skin and soft tissue infections to life-threatening conditions, such as endocarditis, pneumonia and sepsis<sup>1</sup>. The clinical importance of *S. aureus* has grown particularly because of the increased occurrence of serious infections caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)<sup>2</sup>, which are among the most frequent bacteria in health-care-associated infections (HAIs)<sup>3</sup>.

Changes in susceptibility patterns to  $\beta$ -lactam antibiotics have led to a renewed interest in the use of macrolides-lincosamides-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>)<sup>4</sup> antibiotics. Clindamycin (CL) is the preferred agent for the treatment of MRSA due to

its excellent pharmacokinetic properties, such as optimal tissue penetration and accumulation in abscesses<sup>5,6</sup>. Furthermore, CL is a frequent choice for treating staphylococcal infections because this antibiotic can be orally administered and is well tolerated<sup>7,8</sup>. However, the indiscriminate use of MLS<sub>B</sub> antibiotics has led to an increase in the number of *Staphylococcus* spp. isolates that are resistant to these drugs<sup>9</sup>.

MLS<sub>B</sub> antimicrobials are structurally unrelated; however, these drugs are microbiologically related because of their similar modes of action. These drugs inhibit bacterial protein synthesis in susceptible organisms by reversibly binding to the 23S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) receptor of the 50S ribosomal subunit<sup>10</sup>.

The MLS<sub>B</sub> resistance phenotype can be either constitutive [constitutive resistance to CL (cMLS<sub>B</sub>)] or inducible [inducible resistance to CL (iMLS<sub>B</sub>)]. Organisms that express erythromycin ribosomal methylase (*erm*) genes may exhibit *in vitro* resistance to erythromycin (ER), CL and other drugs of the MLS<sub>B</sub> group. This resistance is referred to as the cMLS<sub>B</sub> phenotype. However, organisms with *erm* genes that requires an inducing agent to express CL resistance, have the iMLS<sub>B</sub> phenotype, which is resistant to ER and falsely susceptible to CL *in vitro*<sup>11</sup>.

Antimicrobial susceptibility testing using standard methods that involve broth or agar dilutions erythromycin/azithromycin disk diffusion that is not adjacent to CL, may

Address to: Dr. Rosmari Hörner, Laboratório de Bacteriologia/DACT/CCS/UFMS, Campus da UFMS, Prédio 26, Sala 1201, 97015-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.  
 Phone: 55 55 9111-9691; Fax: 55 55 3220-8751  
 e-mail: rosmari.ufsm@gmail.com  
 Received 11 June 2014  
 Accepted 21 October 2014

not detect the iMLS<sub>II</sub> phenotype<sup>8</sup>. The iMLS<sub>II</sub> phenotype may limit the effectiveness of CL, thereby increasing the chance of therapeutic failures<sup>12</sup>. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommends performing the disk diffusion induction test (D-test), which is a phenotypic screening method for inducible CL resistance<sup>13</sup>.

This study aimed to determine the prevalence of constitutive and inducible CL resistance in clinical samples of *S. aureus* from patients at a tertiary hospital in Santa Maria, State of Rio Grande do Sul, Brazil.

## METHODS

*Staphylococcus aureus* isolates were obtained from 140 different clinical specimens (e.g., urine, blood, and respiratory tract secretions) from patients who were treated at the University Hospital of Santa Maria (HUSM), from April 2011 to December 2011. The Department of Microbiology at the Clinical Analyses Laboratory identified the samples as *S. aureus* using phenotypic (Gram staining, catalase and coagulase tests and D-test) and automated (MicroScan<sup>®</sup>, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) methods.

The strains were stored in tryptone soya broth, which contained glycerol 15%, at -80°C. The strains were kept in the Bacterial Collection of the Bacteriology Laboratory of the Department of Clinical and Toxicological Analyses at the Federal University of Santa Maria (UFSM).

All of the collected isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing using the D-test (Kirby-Bauer) to classify the strains as susceptible, intermediate or resistant to cefoxitin (CFO, 30µg) (Sensidisc<sup>®</sup> BD Diagnostics, New Jersey, USA); CL (2µg) (Sensidisc<sup>®</sup>, BD Diagnostics, New Jersey, USA) and ER (15µg) (Sensifar<sup>®</sup>, Cefar Diagnóstica Ltda, São Paulo, SP, Brasil). *S. aureus* ATCC 25923 was used as the quality control strain for the discs, as recommended by the CLSI<sup>13</sup>.

The strains were inoculated in tryptone soya agar and incubated for 24h in a bacterial incubator (35°C ± 2°C). The bacterial inoculum was prepared in a sterile solution, and the turbidity was adjusted to McFarland standard 0.5. The suspensions were inoculated in Mueller-Hinton agar and incubated under the previously described conditions. Oxacillin resistance was detected in the MRSA strains using the CFO disc-diffusion method and the oxacillin broth microdilution method<sup>13</sup> with the MicroScan<sup>®</sup> automated system (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

Strains that were resistant to ER and susceptible to CL were submitted to the D-test to detect inducible CL resistance. The ER disk was placed at a distance of 20mm (center to center) from the CL disk and incubated for a period of 18h<sup>13</sup>. The inhibition zone diameters were interpreted as follows: susceptible (S) ≥ 23mm; intermediate (I) = 14 to 22mm; resistant (R) ≤ 13mm for ER; S ≥ 21mm; I = 15-20mm; R ≤ 14mm for CL; and S ≥ 22mm and R ≤ 21mm for CFO. When the zone diameter of the ER disk was ≤ 13mm, and the diameter of the CL disk was ≥ 21mm and when both zones were circular, the test was

considered to be negative for inducible resistance (negative D-test). When the zone diameter of ER disk was ≤ 13mm and the diameter of the CL disk was ≥ 21mm and the inhibition zone around the CL disc was D-shaped, the test was considered to be positive for inducible resistance (positive D-test).

## Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the UFSM under approval number 0117.0.243.000-08.

## RESULTS

Of the 140 samples of *S. aureus*, 29 (20.7%) were identified as MRSA and 111 (79.3%) as methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). The cMLS<sub>II</sub> phenotype was observed in 20 (14.3%) MRSA samples, and the iMLS<sub>II</sub> phenotype was observed in 3 (2.1%) MSSA samples. Additionally, the cMLS<sub>II</sub> phenotype was found in 5 (3.6%) MSSA samples, whereas the iMLS<sub>II</sub> phenotype was found in 8 (5.8%) MSSA samples.

Concomitant susceptibility to CL and ER was observed in most (57.9%) of the isolate samples, and this phenotype was predominant in the MSSA samples. Other susceptibility profiles were found in 21 isolates as shown in Table 1. The clinical samples with *S. aureus* isolates are described in Table 2.

## DISCUSSION

Of the 140 samples of *S. aureus* in this study, 20.7% were MRSA and 79.3% were MSSA. Similar results were obtained in a study conducted in India by Ciraj et al.<sup>10</sup> where in the MRSA prevalence was 17.3%. The relatively low frequency of MRSA in the present study may be due to the work of the Infection Control Hospital Committee, which has been developing measures to control the use of antibiotics and to implement proper hygienization practices by the hospital staff of HUSM since 2006.

The iMLS<sub>II</sub> phenotype was found in 3 (10.3%) of the 29 MRSA samples and in 8 (7.2%) of the 111 MSSA samples. Our results confirm the findings in the study by Juyal et al.<sup>11</sup> in which a higher frequency of the iMLS<sub>II</sub> phenotype was found in MRSA strains (19.4%) than in MSSA strains (6.3%).

However, the study by Amorim et al.<sup>14</sup> at Marília Medical School Hospitals in State of São Paulo, Brazil and the study by Eksi et al.<sup>15</sup> at Gaziantep University Hospital in Turkey indicated a higher prevalence of the iMLS<sub>II</sub> phenotype in MSSA strains. The incidence of this phenotype in *S. aureus* varies according to the population of patients studied, geographic region, hospital characteristics and susceptibility or resistance to methicillin<sup>16</sup>.

In the present study, we found a higher prevalence of the cMLS<sub>II</sub> phenotype in the MRSA strains (20/29; 68.9%) compared with the MSSA strains (5/111; 4.5%). In addition, other authors have found a higher frequency of constitutive resistance in MRSA isolates. Prabhu et al.<sup>17</sup> observed the cMLS<sub>II</sub> phenotype in 16.7% of the MRSA strains, and Seif et al.<sup>18</sup> observed this phenotype in 52.3% of MRSA strains.



TABLE 1 - The erythromycin and clindamycin susceptibility profiles of clinical samples of *Staphylococcus aureus*.

Phenotype	MRSA		MSSA		Total	
	n	%	n	%	n	%
ER-S, CL-S	4	2.9	77	55.0	81	57.9
ER-R, CL-R (constitutive MLS <sub>B</sub> )	20	14.3	5	3.6	25	17.9
ER-R, CL-S (D-test +) (inducible MLS <sub>B</sub> )	3	2.1	8	5.8	11	7.9
ER-R, CL-S (D-test -)	1	0.7	1	0.7	2	1.4
ER-S, CL-R	0	0.0	2	1.4	2	1.4
ER-S, CL-I	0	0.0	7	5.0	7	5.0
ER-I, CL-S	0	0.0	10	7.1	10	7.1
ER-I, CL-I	1	0.7	0	0.0	1	0.7
ER-I, CL-R	0	0.0	1	0.7	1	0.7
Total	29	20.7	111	79.3	140	100.0

MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; ER: erythromycin; CL: clindamycin; S: susceptible; R: resistant; I: intermediate; MLS<sub>B</sub>: macrolides-lincosamides-streptogramin B.

TABLE 2 - Isolation of *Staphylococcus aureus* in clinical samples.

Clinical samples	Total samples collected	Number of samples with iMLS <sub>B</sub> resistance
General secretions*	48	3
Respiratory tract secretions**	37	1
Peripheral blood	31	2
Urine	11	2
Body fluids***	7	2
Catheter's tip	4	0
Breast abscess and soft tissue	2	1
Total	140	11

iMLS<sub>B</sub>: inducible resistance to clindamycin. \*Secretion from surgical wounds, pressure ulcers and bone tissue. \*\*Sputum, broncho-alveolar lavage and tracheal aspirates. \*\*\*Pleural, peritoneal, pre-patellar and dialysis.

Among the clinical samples of *S. aureus*, the iMLS<sub>B</sub> phenotype was identified more frequently in general secretions, peripheral blood, urine and body fluids.

In this study, we found a higher frequency of the cMLS<sub>B</sub> and iMLS<sub>B</sub> phenotypes in MRSA strains. Therefore, the D-test is essential for monitoring susceptibility to CL and should be included in routine antimicrobial susceptibility testing because the inducible resistance phenotype can inhibit the action of CL, thereby rendering treatment ineffective. In addition, decisions

regarding the method for routinely detecting *Staphylococcus* spp. with the iMLS<sub>B</sub> phenotype (ER-R/I, CL-S) should be discussed at individual institutions based on local data.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the pharmaceutical staff of the Clinical Analyses Laboratory at HUSM.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

### REFERENCES

- Dong J, Quin J, Li H, Dai X, Zhang Y, Tan W, et al. Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett* 2013; 338:124-131.
- Skov R, Christiansen K, Dancer SJ, Daum RS, Dryden M, Huang YC, et al. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:193-200.
- Oliveira AC, Oliveira PA. Descolonização de portadores de *Staphylococcus aureus*: indicações, vantagens e limitações. *Texto & Contexto-Enferm* 2012; 21:448-457.
- Vivak JS, Rajesh GN, Mukesh S, Manpreet K, Misra RN, Matmani GB et al. The prevalence of inducible clindamycin resistance among community- and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary care hospital in India. *Biomedical Res* 2011; 22:465-469.
- Fiebelkora KR, Crawford SA, McInnes ML, Jorgensen JH. Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4740-4744.
- Deotale V, Mendiratta DK, Raut U, Narang P. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Indian J Med Microbiol* 2010; 28:124-126.
- Schreckenberger PC, Ikedo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2777-2729.
- Costinho VL, Paiva RM, Reiter EC, de-Paris F, Barth AL, Machado AB. Distribution of erm genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates. *Braz J Infect Dis* 2010; 14:564-568.
- Saiman L, O'Keefe M, Graham PL III, Wu F, Said-Salim B, Kraiwirth B, et al. The hospital transmission of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis* 2003; 37:1313-1319.
- Ciraj AM, Vinod P, Sreejith G, Rajani K. Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of Staphylococci. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52:49-51.
- Juyal D, Shamasht AS, Shukhar P, Sharma MK, Prakash HR, Sharma N. The prevalence of inducible clindamycin resistance among Staphylococci in a tertiary care hospital - A study from the Garwal hills of Uttarakhand, India. *J Clin Diagn Res* 2013; 7:61-65.
- Patel M, Waites KB, Moser SA, Cloud GA, Hooley CJ. Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance among Community- and Hospital-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2481-2484.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Second Informational Supplement, Document M100-S22. Wayne, PA, USA: CLSI; 2013.
- Amorim DM, Person OC, Amaral PJ, Tanaka II. Resistência induzível a clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. *O Mundo da Saúde* 2009; 33:401-405.
- Ekici F, Gayyurhan ED, Bayran A, Karşigil T. Determination of antimicrobial susceptibility patterns and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from southeast Turkey. *J Clin Microbiol Immunol Infect* 2011; 10:1-6.
- Sasirekha B, Usha MS, Amruta JA, Ankit S, Brinda N, Divya R. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance among hospital-associated *Staphylococcus aureus*. *3 Biotech* 2014; 4:85-89.
- Prabha K, Rao S, Rao V. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* which was isolated from clinical samples. *J Lab Physicians* 2011; 3:25-27.
- Seif N, Kahani N, Askari E, Mahdipour S, Nadari NM. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. *Iran J Microbiol* 2012; 4:82-86.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS

#### 3.1 DETECÇÃO GENES *erm* E *msrA* POR REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

##### 3.1.1 Seleção de isolados e extração do DNA bacteriano

Para realização da técnica de PCR, foram utilizadas cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes admitidos no HUSM, entre os meses de abril a dezembro de 2011, as quais se encontravam armazenadas em glicerol 15% a temperatura de -80°C na bacterioteca do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM, cuja utilização para pesquisa clínica, foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) sob o número: 0117.0.243.000-08.

Foram selecionadas as 36 cepas que no teste fenotípico expressaram resistência MLS<sub>B</sub>, sendo que 25 apresentavam fenótipo constitutivo (cMLS<sub>B</sub>) e 11 o fenótipo induzível (iMLS<sub>B</sub>). Posteriormente, as 104 cepas utilizadas no estudo fenotípico, que não expressaram fenótipo MLS<sub>B</sub>, também serão submetidas a PCR para pesquisa dos genes de interesse.

A extração do DNA dos isolados de *S. aureus* baseou-se nos protocolos desenvolvidos por Fuverki et al., (2008) e Moosavian et al. (2014), com adaptações. As bactérias armazenadas foram inicialmente reativadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2°C por um período de 18 a 24 horas. Após o crescimento das colônias, com auxílio de uma alça bacteriológica, transferiu-se de 2 a 5 colônias de cada isolado para tubos de *ependorf* de 1,5 mL contendo 750 µl de tampão TE (10 mM Tris, 1mM de EDTA, pH 8). A seguir, os tubos foram levados a banho seco a 80°C por 20 min., sendo submetidos após este período a choque térmico em freezer – 80°C por mais 20 min., para que ocorresse a lise da parede celular com consequente liberação da molécula de DNA bacteriano. As amostras permaneceram armazenadas no -80°C até a realização da técnica da PCR.

A quantificação do DNA total extraído de cada isolado foi feita pela técnica de fluorometria, utilizando-se o equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (INVITROGEN®), no qual quantidade ideal de material genético deveria estar entre 20 e 50ng/µl de DNA conforme adaptações realizadas a partir dos protocolos acima citados.

Quando as quantificações do DNA extraído ficavam abaixo de 20ng/μl, as amostras eram concentradas, centrifugando-se o material a 14.000 rpm durante 1min., sendo o sobrenadante retirado e ressuspensão novamente em 100 μl de TE, para nova quantificação. Já, quando as amostras apresentavam quantificações acima de 50ng/μl, eram diluídas em TE em uma relação 1:1 se ficassem entre 51 a 75ng, e de 1:2 se estas ficassem entre 76 a 100ng de DNA.

### 3.1.2 Sequências de *primers* e condições de ciclagem dos genes

Os isolados foram inicialmente submetidos à PCR para a pesquisa do gene 16s, considerado o método de referência para identificação de DNA bacteriano, sendo utilizado como controle de qualidade dessas amostras (LANGE et al., 2011). A sequência de *primer* utilizada na pesquisa deste gene, foi a descrita por Lina et al., (1999).

O processo de amplificação consistiu em 30 ciclos sendo, desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s, extensão da cadeia de DNA a 72°C por 30s, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. As reações de amplificação ocorreram no termociclador modelo 2720-Thermal Cyclor, Biosystems, sendo que para cada reação de amplificação foi preparado um mix de 25 μL para cada tubo incluindo os reagentes e volumes apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Concentrações dos reagentes utilizados na PCR

GENES PESQUISADOS	REAGENTES/SOLUÇÕES (MIX – PCR)	VOLUME (μL /AMOSTRA)
16s erm A erm B erm C msrA	Água Milli-Q (Estérel)	18,05 μL
	Tampão 10X	2,5 μL
	MgCL2 50mM	0,75 μL
	dNTP 100Mm	0,5 μL
	<i>Primer</i>	0,5 μL F + 0,5 μL R
	TAQ 5U/ MI	0,2 μL
	DNA 20-50 ng/ μL	2 μL
	<b>VOLUME FINAL</b>	<b>25 μL</b>

Fonte: Angelita Bottega/Autora (2016).



Na pesquisa dos demais genes de interesse (*ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrA*), os pares de *primers* utilizados, as condições de ciclagem e as referências utilizadas, encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – *Primers* utilizados na execução da PCR

<b>PRIMERS</b>	<b>ACESSO GENBANK</b>	<b>SEQUENCIA PRIMERS</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>TAMANHO PRODUTO (pB)</b>	<b>CONDIÇÕES DA PCR (Ciclos)</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<b><i>erm A</i> – F <i>erm A</i> – R</b>	K02987	5' - GTTCAAGAACAATCAATACAGAG - 3' 5' - GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC - 3'	GBT Oligos®	421	30 (30s a 94 <sup>0</sup> C; 30s a 52 <sup>0</sup> ; 1 min a 72 <sup>0</sup> C).	Lina et al., 1999.
<b><i>erm B</i> – F <i>erm B</i> – R</b>	U35228	5' - CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAA GGGC -3' 5' - GAATCGAGACTTGAGTGTTGC-3'	GBT Oligos®	359	30 (30s a 94 <sup>0</sup> C; 30s a 55 <sup>0</sup> ; 1 min a 72 <sup>0</sup> C).	Lina et al., 1999.
<b><i>erm C</i> – F <i>erm C</i> – R</b>	M17990	5' - CTTGTTGATCACGATAATTTCC - 3' 5' - ATCTTTTAGCAAACCCGTATTC - 3'	IDT®	190	35 (30s a 95 <sup>0</sup> C; 30s a 58 <sup>0</sup> ; 45s a 72 <sup>0</sup> e 7 min a 72 <sup>0</sup> C).	Moosavian et al., 2014.
<b><i>msrA</i> – F <i>msrA</i> – R</b>	X52085	5' - TCCAATCATTGCACAAAATC - 3' 5' - AATTCCCTCTATTTGGTGGT - 3'	IDT®	163	35 (30s a 95 <sup>0</sup> C; 30s a 55 <sup>0</sup> , 45s a 72 <sup>0</sup> C e 7min a 72 <sup>0</sup> C).	Moosavian et al., 2014.

Fonte: Angelita Bottega/Autora (2016).

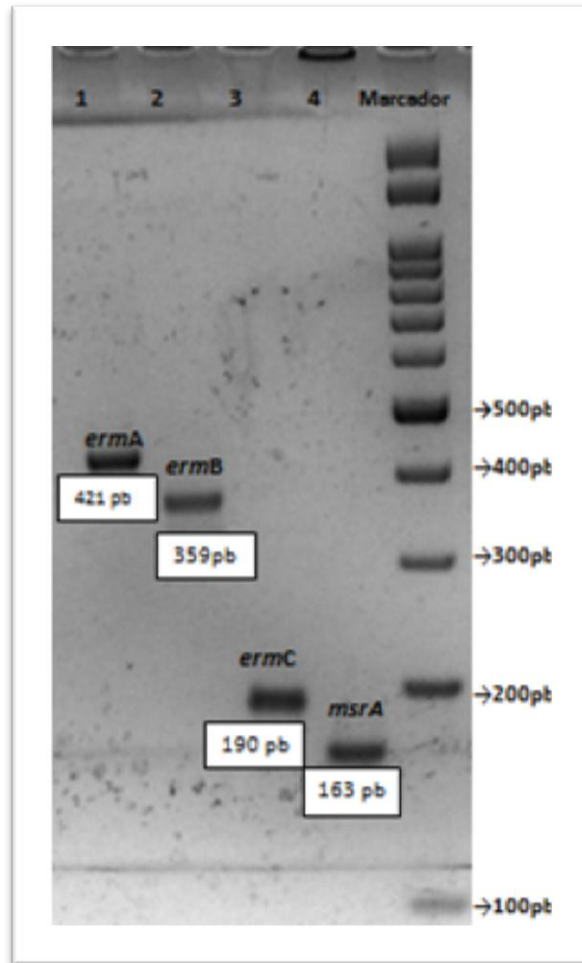
### **3.1.3 Análise dos produtos da PCR**

A análise dos produtos da PCR ocorreu através de eletroforese em gel de agarose a 2% (40 minutos, a 300mA e 100V) em tampão TAE 1x (Tris, Acetato de Sódio, EDTA) com brometo de etídio. Neste procedimento, foi adicionado a 8 µl do produto da PCR, 2 µl de corante para comparação com o marcador de peso molecular (ladder de 100 pares de bases (100-1000 pb) da Ludwig (Biotec<sup>®</sup>). Após a corrida no gel, as bandas foram visualizadas no sistema de foto documentação KODAK DC 290, 1D (3.6).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES ADICIONAIS

O resultado da PCR dos genes *erm* e *msrA* de interesse são demonstrados na Figura 3.

Figura 3 – Genes *erm* e *msrA* e seus respectivos pares de base



Fonte: Angelita Bottega/Autora (2016).

O resultado da pesquisa dos genes *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC*) que conferem resistência constitutiva ou induzível aos MLS<sub>B</sub> e do gene *msrA* associado a bomba de efluxo dos isolados de *S. aureus* analisados neste estudo, encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Genes de resistência dos 36 isolados de *S. aureus* com fenótipo MLS<sub>B</sub>

N (%) DE AMOSTRAS CARREADORAS DOS GENES <i>erm</i> E <i>msrA</i> ENCONTRADAS NOS ISOLADOS MLS <sub>B</sub>				
Genes Pesquisados	MLS <sub>B</sub> CONSTITUTIVO (n=25)		MLS <sub>B</sub> INDUZIVEL (n=11)	
	MRSA (n= 20)	MSSA (n=5)	MRSA (n= 3)	MSSA (n=8)
<i>ermA</i>	2(10,0%)	-	1(33,34%)	1(12,5%)
<i>ermB</i>	1(5,0%)	1(20,0%)	-	-
<i>ermC</i>	4(20,0%)	1(20,0%)	1(33,33%)	2 (25,0%)
<i>msrA</i>	3(15,0%)	2(40,0%)	-	-
<i>ermA</i> + <i>ermB</i>	1(5,0%)	-	-	-
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	3(15,0%)	-	-	-
<i>ermA</i> + <i>msrA</i>	2(10,0%)	-	1(33,33%)	-
<i>ermB</i> + <i>msrA</i>	-	-	-	1(12,5%)
<i>ermC</i> + <i>msrA</i>	-	-	-	4 (50,0%)
Não amplificaram na PCR	4 (20,0%)	1 (20,0%)	-	-
<b>TOTAL (n=36)</b>	<b>20 (100%)</b>	<b>5 (100%)</b>	<b>3 (100%)</b>	<b>8 (100%)</b>

Fonte: Angelita Bottega/Autora (2016).

Considerando as associações dos isolados que amplificaram para dois genes de resistência concomitantemente, pode-se afirmar que das 20 cepas com fenótipo cMLS<sub>B</sub>, resistentes à meticilina (MRSA), 8 (40%) apresentaram o gene *ermA* e 7 (35%) o *ermC*. A amplificação do gene *ermB* ocorreu em apenas 2 (10%) dos isolados com este fenótipo de expressão.

De acordo com Chavez e colaboradores (2005), a associação entre os genes *erm* (*ermA*, *ermB* e *ermC*), assim como a associação destes com o *msrA* pode ocorrer, uma vez que um microrganismo pode apresentar mais de um gene de resistência.

Essa informação corroborou com os resultados deste estudo, no qual observamos nas 25 cepas MRSA constitutivas, que 1 (5,0%) isolado apresentou concomitantemente os genes *ermA* e *ermB* e 3 (15,0%) apresentaram tanto o gene *ermA* como o *ermC*. A associação entre os genes *ermA* e *msrA*, também foi constatada, no qual 2 (10%) dos 20 isolados MRSA com fenótipo cMLS<sub>B</sub> apresentaram ambos os genes. A associação entre os genes *erm* e *msrA* em isolados de *S. aureus*, também foi relatada nos estudos de Aleksandra et al. (2014) na Sérvia, em 5% dos 20 isolados analisados, e de Goudarzi et al. (2016) no Iran, em 17% dos 51 isolados estudados.

Além desses estudos, no Hospital Universitário de Dallas nos Estados Unidos (EUA), Chavez e colaboradores (2005) ao pesquisarem 197 isolados de *S. aureus*, verificaram a associação entre genes *erm* e *msrA* em 18 dos isolados, sendo que 12 amplificaram concomitantemente para os genes *ermA* e *msrA* e 6 para o *ermB* e *msrA*.

Nas 5 cepas com expressão cMLS<sub>B</sub>, sensíveis a meticilina (MSSA), não ocorreu amplificação do gene *ermA*. Entretanto, os genes *ermB* (1(20,0%)) e *ermC* (1(20,0%)), foram encontrados em isolados distintos os quais apresentavam este fenótipo.

Dos 25 isolados cMLS<sub>B</sub>, 5 não expressaram molecularmente a presença de nenhum dos genes pesquisados. Possivelmente, a não expressão desses genes tenha ocorrido devido a presença de outros genes *erm* de resistência aos MLS<sub>B</sub> (*ermD*, *ermF*, *ermY*), não pesquisados neste estudo. Este fato também ocorreu nos estudos de Pereira et al., (2016), realizado em Pernambuco, Brasil, onde ao submeterem 44 cepas de *S. aureus* a técnica da PCR, 22 (50%) isolados não amplificaram para os genes *erm* pesquisados, e de Saderi et al. (2011), em

Teerã/Iran, onde das 126 cepas de *S. aureus* analisadas, 42 (33,3%) não amplificaram para nenhum dos genes *erm* de interesse.

Das 11 cepas com fenótipo de expressão induzível, 3 isolados eram MRSA e 8 MSSA. A presença do gene *ermA* foi evidenciada em 2 (66,7%) dos isolados MRSA, sendo que destes, 1 (33,33%) apresentava tanto o gene *ermA* como o *msrA*. Não ocorreu amplificação para o gene *ermB*, enquanto o gene *ermC* amplificou em apenas 1 (33,3%) dos isolados com este mecanismo de resistência.

Nas 8 cepas com fenótipo iMLS<sub>B</sub>, sensíveis à meticilina (MSSA), o *ermA* foi encontrado em apenas 1 (12,5%) dos isolados. O gene *ermC* amplificou isoladamente em 2 (25,0%) dos isolados enquanto 4 (50,0%) carregavam tanto o gene *ermC* como o *msrA*. Já o gene *ermB* foi identificado em 1 (12,5%) dos isolados com este fenótipo de expressão, em associação ao gene *msrA*.

Entre os genes *erm* pesquisados neste estudo, os genes *ermA* e *ermC* foram os prevalentes, sendo que das 36 cepas, 11 (30,5%) e 15 (41,7%) apresentavam estes genes, respectivamente. No estudo de Saderi e colaboradores (2011) com 126 isolados de *S. aureus* obtidos de pacientes atendidos em 4 hospitais universitários de Teerã, os pesquisadores também encontraram a prevalência desses genes, sendo que *ermA* e *ermC* amplificaram em 15 (11,9%) e 8 (6,4%) dos isolados respectivamente. Além disso, esses autores relataram que 61 (48,4%) dos isolados analisados, apresentaram concomitantemente, ambos os genes.

Na Coreia, Jung e colaboradores (2008) estudaram 280 cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos em 157 Hospitais particulares do país, coletadas entre os meses de janeiro a junho de 2005. Os pesquisadores, encontraram o gene *ermA* presente em 250 isolados, enquanto 14 carregavam o gene *ermC*. A prevalência desses genes também é relatada no estudo de Lim e colaboradores (2012), desenvolvido em um Hospital Universitário da Malásia com 188 isolados de *S. aureus*, onde os pesquisadores encontraram em 157 dos isolados, a presença do gene *ermA*, enquanto o gene *ermC* foi detectado em 40, sendo que desses, 9 isolados apresentavam os dois genes concomitantemente.

Coutinho e colaboradores (2010) também relataram a prevalência desses genes em seu estudo, realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, onde das 77 cepas de *Staphylococcus* spp., analisadas, os genes *ermA* e *ermC* foram encontrados em 49 (63,67%) e 20 (25,97%) amostras, respectivamente.

Em nosso estudo, o gene *ermA* (n=11(30,5%)) foi relativamente menos frequente que o gene *ermC* (n=15(41,6%)) entre os *S. aureus* pesquisados. Vallianou e colaboradores (2014) ao analisarem 142 cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos em um hospital terciário de Atenas, na Grécia, também encontraram maior frequência do gene *ermC*, sendo que 126 (88,7%) apresentavam este gene, enquanto o *ermA* em apenas 16 (11,3%). Os genes *ermB* e *msrA* não amplificaram nas amostras pesquisadas por estes autores.

De acordo com Fiebelkorn et al. (2003); Leclercq (2002); Mahesh et al. (2013) e Vallianou et al. (2014), os determinantes *ermA* e *ermC* são os predominantes nos estafilococos. Sendo que os genes *ermA* são mais difundidos em MRSA por serem transportados por transposons relacionados com TN554 que codifica resistência a eritromicina e a estreptomicina, enquanto que os genes *ermC* são responsáveis principalmente pela resistência à eritromicina em MSSA e são transportados por plasmídeos.

O gene *ermB* amplificou em 4 (11,1%) das 36 amostras desse estudo. A relativa baixa frequência do *ermB*, pode ter ocorrido pelo fato deste gene estar prevalentemente associado a *Staphylococcus* spp., de procedência animal (COUTINHO et al., 2010; DÍAS et al., 2007).

No estudo de Coutinho e colaboradores, (2010), a prevalência do gene *ermB*, também foi baixa, sendo que dos 152 *Staphylococcus* spp. analisados, apenas 3 amplificaram para o gene *ermB*. Entretanto, no estudo de Chavez et al. (2005), no Texas, com 67 isolados de *S. aureus* de origem pediátrica, 31 carregavam este gene, presença significativamente maior da encontrada em nosso estudo.

Quanto a pesquisa do gene *msrA*, a presença do gene foi encontrada em 13 (36,1%) das 36 cepas analisadas. Destas, 7 apresentavam fenótipo cMLS<sub>B</sub> e 6 fenótipo iMLS<sub>B</sub>. Nas amostras com expressão constitutiva, 5 apresentaram este gene isoladamente, sendo 3 (15%) MRSA e 2 (40%) MSSA. Os outros 2 (10%) isolados constitutivo, carregavam tanto o gene *msrA* como o *ermA*. Já nas cepas induzíveis, a expressão deste gene aconteceu associada aos genes *ermB* e *ermC* presentes em 1 (12,5%) e 4 (50%) dos isolados respectivamente.

No estudo desenvolvido por Zmantar e colaboradores (2008) na Tunísia com 35 *S. aureus*, a presença do gene *msrA* foi encontrada em 10 (28%) dos isolados pesquisados, assemelhando-se aos resultado obtidos em nosso estudo. Já na

pesquisa de Cetin et al. (2010), dos 47 *S. aureus* analisados, 13 (27%) carregavam o gene *msrA*, sendo que desses, 6 estavam associados aos genes *erm*.

Em um hospital Iraniano Momtaz e Hafezi (2014), analisaram 66 *S. aureus* e encontraram a presença do gene *msrA* em 30,3% desses, e não houve relato de associação com os genes *erm* pesquisados. Entretanto, Moosavian et al. (2014), ao analisarem 124 *S. aureus*, não encontraram a presença deste gene em nenhuma das cepas estudadas.

Essas diferenças encontradas nos estudos da literatura no que se refere a prevalência dos genes *erm* (*ermA*, *ermB* e *ermC*) e *msrA*, pode ser explicada, já que estas taxas podem variar entre diferentes hospitais de acordo com a região geográfica, o que salienta a importância da determinação dessas frequências em um local específico (COUTINHO et al., 2010; SADERI et al., 2011; SEIFI et al., 2012).



## 5 CONCLUSÕES

- A maioria dos *S. aureus* analisados apresentou fenótipo sensível (ER-S, CL-S) correspondendo a 77 (55,0%) dos isolados.
- O fenótipo Constitutivo foi maior nesse estudo em relação ao induzível, abrangendo respectivamente 25 (69,4%) e 11 (30,5%) isolados.
- Dos 25 isolados de *S. aureus* com resistência constitutiva, 20 (14,3%) eram MRSA e 5 (3,6%) MSSA.
- Dos 11 isolados de *S. aureus* com resistência induzível aos MLS<sub>B</sub>, 3 (2,1%) eram MRSA e 8 (5,8%), MSSA.
- Apesar da menor frequência do fenótipo iMLS<sub>B</sub> (n = 11) em relação ao fenótipo cMLS<sub>B</sub> (n = 25) encontrada neste estudo, a realização do teste de indução por disco aproximação (D-teste) é importante, pois a identificação de isolados com resistência induzível pode direcionar condutas terapêuticas.
- Os genes *ermA* e *ermC* foram os prevalentes entre os genes *erm* pesquisados, sendo encontrados em 11(30,5%) e 15(41,6%) das 36 amostras submetidas a PCR, respectivamente.
- Embora a PCR seja considerada padrão ouro na pesquisa de genes, os custos de manutenção desta técnica acabam inviabilizando seu uso na rotina de grande parte dos laboratórios clínicos. Entretanto, o D-teste é um método considerado confiável para delinear resistência constitutiva e induzível à clindamicina, apresenta baixo custo, devendo fazer parte da rotina de todos os laboratórios clínicos, pois contribui no direcionamento da terapêutica.
- A obtenção de dados locais fenotípicos e moleculares a respeito da resistência constitutiva e induzível é útil, uma vez que pode enfatizar a importância da continuidade ou implementação de procedimentos que visem

controlar a disseminação desses mecanismos de resistência no nosocômio onde o estudo é realizado, reduzindo o ônus para os pacientes e para o sistema de saúde.

- Será realizado a PCR das 104 cepas, que não apresentaram fenótipos de resistência  $MLS_B$  no teste fenotípico realizado.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; NIRWAN, P. S.; SRIVASTAVA, P. Prevalence and antibiogram of hospital acquired-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and community acquired-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care hospital National Institute of Medical Sciences. **Community Acquired Infect**, Jaipur/Rajasthan/ India, v. 2, n. 1, p. 13-15, jan./mar. 2015. Disponível em: <<http://www.caijournal.com/article.asp?issn=22256482;year=2015;volume=2;issue=1;spage=13;epage=15;aulast=Abbas;type=0>>. Acesso em: 22 mar. 2016. DOI: 10.4103/2225-6482.153857.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Boletim Informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**. Brasil, 2014, p. 1-41. Disponível em: <<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/11-boletim-informativo-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 44**, de 26 de outubro de 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 10 mar. 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 20**, de 05 de maio de 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 10 mar. 2016.

AGUDO, L. G.; VAQUERO, M. H.; EGGEA, M. A. A. et al. Sensibilidad a antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina procedentes de pacientes ambulatorios. **Rev Esp de Quimioter**, Espanha, v. 24, n. 2, p. 91-95, Jun. 2011. Disponível em:< <http://seq.es/seq/0214-3429/24/2/garciaagudo.pdf>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

ALEKSANDRA, A. D.; MISIC, M. S.; MIRA, Z. V. et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated *staphylococcal* isolates in central Serbia. **Indian J Med Microbiol**, Servia, v. 32, n. 1, p. 49-52, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2014;volume=32;issue=1;spage=49;epage=52;aulast=Aleksandra>>. Acesso em: 10 jun. 2016. DOI: 10.4103/0255-0857.124304.

BAIU, S. H.; AL-ABDLI, N. Inducible Clindamycin Resistance in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Amer J Infec Dis Microbiol**, Líbia, v. 4, n. 1, p. 25-27, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.sciepub.com/journal/ajidm>>. Acesso em: 5 jun. 2016. DOI:10.12691/ajidm-4-1-5.

BONNAL, C.; BIRGAND, G.; LOLOM, I. et al. *Staphylococcus aureus* healthcare associated bacteraemia: An indicator of catheter related infections. **Méd Mal Infectieux**, Paris/França, v. 45, n. 3, p. 84-88, jan. 2015. Disponível em:<<http://europepmc.org/abstract/med/25676476>>. Acesso em: 29 mar. 2016. DOI:10.1016/j.medmal.2015.01.002.

BOUCHER, H. W.; COREY, G. R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin infect diseases**, Boston, v. 46, n.5, p. 344-349, Jun.2008. Disponível em: <[http://cid.oxfordjournals.org/content/46/Supplement\\_5/S344.full](http://cid.oxfordjournals.org/content/46/Supplement_5/S344.full)>. Acesso em: 11 jun. 2016. DOI: 10.1086/533590.

BRAGA, E. D. V.; ALVES, F. A.; FREITAS, M. F. N. et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. **BMC infect dis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 1-10, out. 2014. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287855>>. Acesso em: 1 jun. 2016. DOI: 10.1186/1471-2334-14-538.

BROOKS, G. F.; CARROL, K. C.; BUTES, J. S. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz Melnick e Adelberg**, 25. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill Interamericana, 2012, 813 p.

CALDERA, D. M. R.; DORIA, F. A. B.; PÉREZ. J. A. E. et al. Colonización y factores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en una población infantil de Montería. **Iatreia**, Montería/Colômbia, v. 28, n. 3, p. 259-268, jul./set. 2015. Disponível em: <<https://aprendeonlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/20019>>. Acesso em: 20 mar. 2016. DOI:10.17533/udea.iatreia.v28n3a04.

CARVALHO, J. F.; FONTES, F. L. Revisão dos achados sobre cepas *Staphylococcus aureus* resistentes no Brasil entre 2010-2013. **Arq. Ciênc. Saúde**, Rio Grande do Norte, v. 21, n. 3, p. 28-35, jul./set. 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid)>. Acesso em: 20 mar. 2016.

CASTAÑÓN, S. C. A. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. **Evi Médi Invest Salud**, Oaxaca/México, v. 5, n. 3, p. 79-84, jul./set. 2012. Disponível em:<<http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?idarticulo=38197>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

CASTELLANO, M. G.; PEROZO, M. A.; MOLERO, C. M. J. et al. Resistência a lá clindamicina inducida por eritromicina em cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. **Kasmera**, Venezuela, v. 43, n. 1, p. 13-15, jan./jun. 2015. Disponível em: <<http://produccioncientificaluz.org/index.php/kasmera/article/view/20069>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

CATÃO, R. M. R.; SILVA, P. M. F.; FEITOSA, R. et al. Prevalência de infecções hospitalares por *Staphylococcus aureus* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. **Rev Enferm UFPE on line**, Recife, v. 7, n. 8, p. 5257-64, ago. 2013. Disponível em: <[www.revista.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/.../6965](http://www.revista.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/.../6965)>. Acesso em: 8 jun. 2016. DOI: 10.5205/reuol.3452-28790-4-ED.0708201325.

CETIN, E.S.; GUNES, H.; KAYA, S. et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical *Staphylococcal* isolates in a Turkish university hospital. **J Microbiol Immunol Infect**, Turquia, v. 43, n. 6, p. 524-529, jul./dez. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118210600813>>. Acesso em: 13 mar. 2016. DOI: 10.1016/S1684-1182(10)60081-3.

CHAUDHARY, A. B.; SHAH K. K.; PARMAR, R. J. et al. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. **Int J Appl Res**, India, n. 1, v. 9, p. 922-924, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.allresearchjournal.com/archives/2015/vol1issue9/PartN/1-9-68.pdf>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

CHAVEZ-BUENO, S.; BOZDOGAN, B.; KATZ, K. Inducible clindamycin resistance and molecular epidemiologic trends of pediatric community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dallas, Texas. **Ant agen chemother**, Dallas/Texas, v. 49, n. 6, p. 2283-2288, jun. 2005. Disponível em: <<http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/35921391/2283.pdf>> Acesso em: 25 mar. 2016. DOI:10.1128/AAC.49.6.2283–2288.2005.

CHUMACERO, P. M. Mecanismo de Resistencia MLSB: Macrólidos, Lincosaminas y Estreptogramina B en Estafilococos Coagulasa Negativa y *Staphylococcus aureus*. Hospital "Jaime Mendoza". Sucre, 2009. **Arc Bol de Medicina**, Bolivia, v. 14, n. 82, p. 5-9, 2010. Disponível em: <<http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/abm/v14n82/v14n82a02.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, Document M100-S24.* Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.

CORREAL, J. C.; MARQUES, E. A.; GUILHERME, W. L. et al. Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Rev Hosp Univer Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 31-46, jul./set. 2013. Disponível em: <<http://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/7529>>. Acesso em: 4 jun. 2016. DOI: 10.12957/rhupe.2013.7529.

COUTINHO, V. D. L. S.; PAIVA, R. M.; REITER, K. C. et al. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. **Braz J Infect Dis**, Porto Alegre, v. 14, n. 6, p. 564-568, nov./set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340296>>. Acesso em: 15 de mar. 2016. DOI: 0.1590/S1413-86702010000600004.

DÍAZ, L. M.; LA CASA, A. C.; SÁNCHEZ, M. J. T. et al. Detección de resistència inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. **Enferm Infec Microbiol Clinica**, Sevilla/Espanha, v. 25, n. 2, p. 77-81, 2007. Disponível em: <[http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?f=10&pident\\_articulo=13098567&pident\\_usuario=0&pcontactid=&pident\\_revista=28&ty=138&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v25n02a13098567pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?f=10&pident_articulo=13098567&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=28&ty=138&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v25n02a13098567pdf)>. Acesso em: 12 mar. 2016. DOI: 10.1157/13098567.

DONG, J.; QIU, J.; WANG, J. et al. Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin. **FEMS Microbiol Lett**, China, v. 338, n. 2, p. 124-131, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23113475>>. Acesso em: 14 de mar. 2016. DOI: 10.1111/1574-6968.12040;

DUBEY, D.; RATH, S.; SAHU, M. C. et al. A report on infection dynamics of inducible clindamycin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from a teaching hospital in India. **Asian Pac J Trop Biomed**, Odisha/India, v. 3, n. 2, p. 148-153, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/.../pii/S2221169113600404>>. Acesso em: 10 jun. 2016. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60040-4.

DURMAZ, S.; KIRAZ, A.; TOKA ÖZER, T. et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. **Eur J Gen Med**, Kania/Turkia, v. 11, n. 4, p. 217-220, nov. 2014. Disponível em: <<http://openaccess.mevlana.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11608/371/durmaz.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2016. DOI:10.15197/sabad.1.11.75.

ESCOBAR, J. A.; GÓMEZ, I. T.; MURILLO, M. J. et al. Design of two molecular methodologies for the rapid identification of Colombian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Biomed**, Bogotá, v. 32, n. 2, p. 214-223, abr./jun. 2012. Disponível em: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572012000200009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572012000200009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 4 jun. 2016.

FIEBELKORN, K. R.; CRAWFORD, S. A.; MCELMEEL, M. L. et al. Practical disc diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci*. **J Clin Microbiol**, Texas, v. 41, p. 4740-4, out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC254362/>>. Acesso em: 1 jun. de 2016. DOI: 10.1128/JCM.41.10.4740-4744.

FRANCO, J. M. P.; MENEZES, C. D. A.; CABRAL, F. R. F. Resistência bacteriana e o papel do farmacêutico frente ao uso irracional de antimicrobianos: revisão integrativa. **Rev ciên**, Juazeiro do Norte/Ceara, v. 3, n. 2, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.fjn.edu.br/revista/index.php/eciencia/article/view/64>>. Acesso em: 3 de jun. 2016. DOI: 10.19095/rec.v3i2.64.

FUVERKI, R. B. N.; MURAKAMI, P. S.; BIONDO, A. W. et al. Uso da PCR para detecção e identificação de microbactérias a partir de amostras clínicas de bovinos. **Arc Veterinary Science**, Paraná, v. 13, n. 1, p. 73-77, jan. 2008. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/11562>>. Acesso em: 1 de jun. 2016. DOI:10.5380/avs.v13i1.11562.

GOLL, A. S.; FARIA, M. G. I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Braz J Surg Clin Research**, Maringá/Paraná, v. 5, n. 1, p. 69-72, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.mastereditora.com.br/bjscr>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

GOURDARZI, G.; TAHMASBI, F.; ANBARI, K. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides Among Staphylococci Isolated From the Nasal Cavity of Hospital Employees in Khorramabad, Iran. **Iran Red Crescent Med J.**, Iran, v. 18, n. 2, p. 1-8, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27195143>>. Acesso em: 3 jun. 2016. DOI: 10.5812/ircmj.25701.

GRILLO, S. T. R. S.; GONÇALVES, T. G.; CAMPOS, J. J. et al. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Rev Ciên Farm Básica Apl**, Porto Velho/Rondônia, v. 34, n. 1, p. 117-123, ago. 2013. Disponível em: <[http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/article/viewFile/2235/1371](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/2235/1371)>. Acesso em: 28 mar. 2016.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím nova**, Ribeirão Preto/São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, fev. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000300035](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300035)>. Acesso em: 15 de mar. 2016. DOI: 10.1590/S0100-40422010000300035.

JUNG, Y. H.; KIM, K. W.; LEE, K. M. et al. Prevalence and characterization of macrolide-lincomycin-streptogramin B-resistant *Staphylococcus aureus* in Korean hospitals. **J antimicrob chemother**, Korea, v. 61, n. 2, p. 458-460, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156279>>. Acesso em: 20 mar. 2016. DOI: 10.1093/jac/dkm483.

JUYAL, D.; SHAMANTH, A. S.; PAL, S. et al. The prevalence of inducible clindamycin resistance among *Staphylococci* in a tertiary care hospital – A study from the Garwal hills of uttarakhand, India. **J Clin Diagn Res**, India, v. 7, n. 1, p. 61-65, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576752/>>. Acesso em: 20 mar. 2016. DOI: 10.7860/JCDR/2012/4877.2671.

KAPOOR, R.; BARNETT, C. J.; GUTMANN, R. M. et al. Preoperative prevalence of *Staphylococcus aureus* in cardiothoracic and neurological surgical patients. **Front public health**. EUA, v. 2, n. 214, p. 1-4, nov. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2014.00204/full>>. Acesso em: 2 jun. 2016. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00204.

LANGE, C. C.; BRITO, M.; BRITO, J. R. F. et al. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesq Vet Bras**, v. 31, n. 1, p. 36-40, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0100-736X2011000100006>>. Acesso em: 15 mar 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2011000100006.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 4, p. 482-492, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797175>>. Acesso em: 15 jun. 2016. DOI: 10.1086/324626.

LIM, K. T.; HANIFAH, Y. A.; YUSOF, M. Y. M. et al. *ermA*, *ermC*, *tetM* and *tetK* are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. **Indian J medic microbiol**, Masaysia, v. 30, n. 2, p. 203-207, mai. 2012. Disponível em: <<http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2012;volume=30;issue=2;spage=203;epage=207;aulast=Lim>>. Acesso em: 10 mar. 2016. DOI: 10.4103/0255-0857.96693.

LINA, G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, M. E. et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *staphylococci*. **Ant Agents Chemoth**, Lyon/França, v. 43, n. 5, p. 1062-1066, mai. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89111/>>. Acesso em: 15 mar 2016. DOI: 0066-4804/99/\$04.0010.

LYALL, K. D.; GRUPTA, V., CHHINA, D. Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Mahatma Gandhi Instit Medic Scien**, Punjab/India, v. 18, n. 2, p. 112, set. 2013. Disponível em: <<http://medind.nic.in/jaw/t13/i2/jawt13i2p112.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2016. DOI: 10.4103/0971-9903.117799.

MAHESH, C. B.; KULKARNI, R. B.; SATARADDI, J. The prevalence of inducible and constitutive clindamycin resistance among the nasal isolates of *staphylococci*. **J Clinic Diagn Res**, Kamataka/India, v. 7, n. 8, p. 1620, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086856>>. Acesso em: 14 mar. 2016. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6378.3223.

MIMICA, M. J. Atualização sobre detecção laboratorial de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. **Arq Méd Hosp Fac Ciênc Med Santa Casa São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 6, p. 129-134, dez. 2012. Disponível em: <[http://www.fcmsantacasasp.edu.br/images/Arquivos\\_medicos/2012/57\\_3/07-AR15.pdf](http://www.fcmsantacasasp.edu.br/images/Arquivos_medicos/2012/57_3/07-AR15.pdf)>. Acesso em: 14 mar. 2016. DOI: 0.1590/S1676-24442007000600003.

MIRANI, Z. A.; AZIZ, M.; KHAN, M. N. et al. Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. **Microb Pathogenesis**, Pakistão, v. 61, p. 66-72, ago./set. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088240101300079X>>. Acesso em: 14 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.micpath.2013.05.002,

MOHAMMADI, S.; SEKAWI, Z.; MONJEZI, A. et al. Emergence of SCCmec type III with variable antimicrobial resistance profiles and spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from healthcare-and community-acquired infections in the west of Iran. **Int J Infec Dis**, Ilam/Iran, v. 25, p. 152-158, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909489>>. Acesso em: 13 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.02.018.

MOKTA, K. K.; VERMA, S.; CHAUHAN, D. et al. Inducible Clindamycin Resistance among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Sub Himalayan Region of India. **J Clin Diagn Res**, India, v. 9, n. 8, p. 20-23, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576536/>>. Acesso em: 13 mar. 2016. DOI:10.7860/JCDR/2015/13846.6382.

MOMTAZ, H.; HAFEZI, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Iranian hospitals: virulence factors and antibiotic resistance properties. **Bosn J Basic Med Sci**, Shahrekord/Iran, v. 14, n. 4, p. 219-226, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428674>>. Acesso em: 6 jun. 2016. DOI: 10.17305/bibms.2014.4.34.



MOOSAVIAN, M.; SHOJA, S.; ROSTAMI, S. et al. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to erm genes, Iran. **Iran J Microbiol**, Iran, v. 6, n. 6, p. 421-42, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926961>>. Acesso em: 10 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.02.270.

MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS, L. B. A. et al. Uso racional de antimicrobianos. **Medic**, Ribeirão Preto/São Paulo, v. 43, n. 2, p. 164-172, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/175>>. Acesso em: 1 jun. 2016. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v43i2p164-172.

MOTAMEDIFAR, M.; SARAI, H. S. E.; MANSURY, D. Patterns of Constitutive and Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples by D-test Method, Shiraz, Southwest of Iran. **G Medic J**, Shiraz/Iran, v. 3, n. 4, p. 216-221, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.gmj.ir/gmj/index.php/gmj/article/view/204>>. Acesso em: 12 mar. 2016. DOI: 10.1093/jac/46.6.941.

NAZARETH, R.; PEREIRA, J. G.; TAVARES, A. et al. Infecção por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente da comunidade em Portugal. **Rev Portug Pneumol**, Portugal, v. 18, n. 1, p. 34-38, jan./fev. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0873215911000717>>. Acesso em: 11 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.rppneu.2011.05.007.

OLIVEIRA, A. C.; PAULA, A. O. Descolonização de portadores de *Staphylococcus aureus*: indicações, vantagens e limitações. **Texto Contexto - Enferm**, Minas Gerais/Brasil, v. 21, n. 2, p. 448-457, abr./jun. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-07072012000200025](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-07072012000200025)>. Acesso em: 12 mar 2016. DOI: 10.1590/S0104-07072012000200025.

OLIVEIRA, C. F.; MOREY, A. T.; GARBIN, R. P. B. et al. Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo. **Rev Ciênc Médic Biológ**, Paraná, v. 13, n. 2, p. 242-247, mai./ago. 2014. Disponível em: <<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/9831>>. Acesso em: 12 jun. 2016. DOI: 10.9771/2236-5222cmbio.v13i2.9831.

OLIVEIRA, L. M. O.; HEIJDEN, I. M. V.; GOLDING, G. R. et al. *Staphylococcus aureus* isolates colonizing and infecting cirrhotic and liver transplantation patients: comparison of molecular typing and virulence factors. **BMC Microbiol**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 2-9, jun. 2015. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4647648/pdf/12866\\_2015\\_Article\\_598.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4647648/pdf/12866_2015_Article_598.pdf)>. Acesso em: 18 mar. 2016. DOI: 10.1186/s12866-015-0598-y.

PAIM, R. S. P.; LORENZINI, E. Estratégias para prevenção da resistência bacteriana: contribuições para a segurança do paciente. **Rev Cuid**, Caxias do Sul/Brasil, v. 5, n. 2, p. 757-764, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.revistacuidarte.org/index.php/cuidarte/article/view/88/229>>. Acesso em: 10 mar. 2016. DOI: 10.15649/cuidarte.v5i2.88.

PATRA, K. P.; VANCHIERE, J. A.; BOCCHINI, J. A. JR. Adherence to CLSI recommendations for testing of *Staphylococcus aureus* isolates in Louisiana hospitals: report of a clinical failure and results of a questionnaire study. **J Clin Microbiol**, Louisiana/EUA, v. 49, n. 8, p. 3019-3020, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632893>>. Acesso em: 13 mar. 2016. DOI: 10.1128/JCM.00944-11.

PEREIRA, G. C. B.; LIMA, L. S.; PINHEIRO, P. N. Q. et al. Perfil de uso de antimicrobianos em procedimentos de otorrinolaringologia. **Rev Paraense Med**, Belém/Pará, v. 28, n. 1, p. 31-39, jan./mar. 2014. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/0101-5907/2014/v28n1/a4162.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

PEREIRA, J. N.; RABELO, M. A.; LIMA, J. L. et al. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates of *Staphylococcus* spp. of a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Braz J Infec Dis**, Recife/Pernambuco, v. 20, n. 3, p. 276-281, mai./jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27094233>>. Acesso em: 2 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.bjid.2016.03.003.

PERES, D.; NEVES, I.; VIEIRA, F. et al. Estratégia para Controlar o *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina: A Experiência de cinco anos de um Hospital. **Acta Méd Port**, Matosinhos/Portugal. 27, n. 1, p. 67-72, jan./fev. 2014. Disponível em: <<http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewe/4736/3879>>. Acesso em: 1 jun. 2016. DOI:10.1590/S002175572009010700001.

PERUGINI, M. R. E.; PERUGINI, V. H.; FERREIRA, A. R. M. et al. Tendência de resistência entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em um hospital universitário do norte do Paraná de 2002 a 2011. **Semina: Ciên Biológic Saúde**, Londrina/Paraná, v. 36, n. 1Supl, p. 275-282, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/19395>>. Acesso em: 4 de jun. 2016. DOI: 10.5433/1679-0367.2015v36n1Suplp275.

PRABHU, K.; RAO, S.; RAO, V. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. **J Lab Physicians**, Karnataka/India, v. 3, n. 1, p. 25-27, jan./jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3118052/>>. Acesso em: 15 mar. 2016. DOI: 10.4103/0974-2727.78558.

PRADO, R. R.; FREITAS, E. A.; VALADARES, E. C. J. et al. *Staphylococcus* spp: importantes riscos à saúde pública. **Pub Vet**, Maringá, v. 9, n. 8, p. 363-368, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/uploads/2e9a2e1385b1e760cfd76667a660d779.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

RIZECK, F. C.; MATTÉ, M. H.; DROPA, M. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* Carrying the *mecA* Gene in Ready-to-Eat Food Products Sold in Brazil. **Food Pathogens Dis**, São Paulo, v.8, n.4, p.561-563, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/19815>>. Acesso em: 2 jun. 2016. DOI: 10.1089=fpd.2010.0706.

ROBERTS, M. C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **Antimicrob Agents Chemother**. Washington, v. 43, n. 12, p. 2823-30, dez. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10582867>>. Acesso em: 15 mar. 2016. DOI: 0066-4804/99/\$04.0010.

ROCA, D. *Staphylococcus aureus* resistente a metilina associado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. **An Fac Med**, Peru, v. 74, n. 1, p. 57-62, out. 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832013000100011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832013000100011&script=sci_arttext)>. Acesso em: 1 jun. 2016.

SADERI, H.; EMADI, B.; OWLIA, P. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. **Med Scien Mon**, Tehran/Iran, v. 17, n. 2, p. 48-53, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3524716/>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* Metilina Resistente: Um Desafio Para A Saúde Pública. **Acta Bioméd Bras**, França, v. 3, n. 1, p. 1-13, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.actabiomedica.com.br/index.php/acta/article/view/31>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

SASIREKHA, M. S.; USHA, M. S.; AMRUTA, J. A. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance among hospital-associated *Staphylococcus aureus*. **3 Biotech**, India, v. 4, n. 1, p. 85-89, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3909568/>>. Acesso em: 12 mar. 2016. DOI: 10.1007/s13205-013-0133-5.

SCHWENDENER, S.; PERRETEN, V. New shuttle vector-based expression system to generate polyhistidine-tagged fusion proteins in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 81, n. 9, p. 3243-54, mai. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747000>>. Acesso em: 2 Jun. 2016. DOI: 10.1128/AEM.03803-14.

SEIFI, N.; KAHANI, N.; ASKARI, E. et al. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. **Iran J Microbiol**, Iran, v. 4, n. 2, p. 82-86, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3434646/>>. Acesso em: 13 mar. 2016. DOI: 10.4103/0255-0857.62488.

SILVA FILHO, L. V. R. F.; PINTO, L. A.; STEIN, R. T. Use of macrolides in lung diseases: recent literature controversies. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p. 52-60, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26354869>>. Acesso em: 3 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.jpmed.2015.08.002.

SILVEIRA, A. C.; SAMBRANO, G. E.; PAIM, T. G. et al. Is prediffusion test an alternative to improve accuracy in screening hVISA strains and to detect susceptibility to glycopeptides/lipopeptides?. **Diag Microb Infect Dis**, Blumenau/Santa Catarina, v. 79, p. 401–404, mai. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906792>>. Acesso em: 10 mar. 2016. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2014.04.008.

SKOV, R.; CHRISTIANSEN, K.; DANCER, S. J. et al. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Int J Antimicrob Agents**, Florença/Itália, v. 39, n. 3, p. 193-200, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226649>>. Acesso em: 2 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.029

STEFANI, S.; CHUNG, D. R.; LINDSAY, J. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods. **Int J Antimicrob Agents**, Florença/Itália, v. 39, n. 4, p. 273-282, 2012. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230333.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230333.pdf)>. Acesso em: 2 jun. 2016. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.029.

TAMARIZ, J.; AGAPITO, J.; HORNA, G. et al. *Staphylococcus aureus* resistente a metilina adquirido en la comunidad aislados en três hospitales de Lima-Perú. **Rev Med Hered**, Lima/Peru, v. 21, n. 1, p. 4-10, jan. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130x2010000100002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130x2010000100002&script=sci_arttext)>. Acesso em: 15 mar. 2016. DOI:org/10.20453/rmh.v21i1.1139.

UZUN, B.; GUNGOR, S.; PEKTAS, B. et al. Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B (MLSB) Resistance Phenotypes in Clinical *Staphylococcus* Isolates and Investigation of Telithromycin Activity. **Microbiol Bul**, Turquia, v. 48, n. 3, p. 469-476, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25052113>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

VALLIANOU, N.; EVANGELOPOULOS, A.; HADJISOTERIOU, M. et al. Prevalence of macrolide, lincosamide, and streptogramin resistance among *staphylococci* in a tertiary care hospital in Athens, Greece. **J Chemother**, Athenas/Grécia, v. o, n. o, p. 1-5, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25112954>>. Acesso em: 10 mar. 2016. DOI: 10.1179/1973947814Y.0000000205.

VIANA A. P. P.; SOARES, S. R.; CASTRO, A. R. L. et al. Incidência bacteriana em hemoculturas de recém-nascidos e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos. **BioFar: Rev Biol Farm**, Paraíba, v. 5, n. 1, p. 102-110, ago. 2011. Disponível em: <[http://sites.uepb.edu.br/biofar/download/v5n2011/incidencia\\_bacteriana\\_em\\_hemoculturas\\_de\\_recemnascidos\\_e\\_perfil\\_de\\_suscetibilidade\\_frente\\_aos\\_antimicrobianos.pdf](http://sites.uepb.edu.br/biofar/download/v5n2011/incidencia_bacteriana_em_hemoculturas_de_recemnascidos_e_perfil_de_suscetibilidade_frente_aos_antimicrobianos.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2016.

VIVEK, J. S.; RAJESH, G. N.; MUKESH, S. et al. The prevalence of inducible clindamycin resistance among community-and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary care hospital in India. **Biomed Res**, India, v. 22, n. 4, p. 465-469, out./dez. 2011. Disponível em: <<http://web.a.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=0970938X&AN=836,pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: WHO; 2014. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)>. Acesso em: 12 mar. 2016.

ZMANTAR, T.; CHAIEB, K.; BEN ABDALLAH, F. et al. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from auricular infections. **Folia Microbiol**, Tunísia, v.53, n. 4, p.357-362, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759121>>. Acesso em: 10 jun. 2016. DOI: 10.1007/s12223-008-0055-5.