

Resistencia de *Streptococcus pyogenes* a los antibióticos. Experiencia de once años en un hospital pediátrico de Buenos Aires*

► Horacio A. Lopardo^{1*}, Claudia Hernández^{2*}, Patricia Vidal^{2**}

1. Doctor en Ciencias Bioquímicas. Especialista en Microbiología, AAM.

2. Bioquímica. Especialista en Microbiología, AAM.

* Servicio de Microbiología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Combate de los Pozos 1881. 1245 Buenos Aires.

** Laboratorio de Bacteriología del Hospital Ramón Carrillo, Los Polvorines, Provincia de Buenos Aires.

Resumen

En 1989 era escasa la preocupación acerca de la resistencia de *Streptococcus pyogenes* a los antibióticos habida cuenta de su sensibilidad universal a la penicilina. No obstante, algunos brotes puntuales en Japón y Australia de cepas resistentes a macrólidos en las décadas anteriores impulsaron a comenzar con la vigilancia de la resistencia de *S. pyogenes* a los antibióticos, primero en este hospital y luego en forma multicéntrica junto a otros centros de todo el país. En este trabajo se presentan los resultados de esta vigilancia, realizada durante once años (período 1989-2000). No se encontraron cepas resistentes ni con sensibilidad intermedia a penicilina en estreptococos del grupo A. Tampoco fue detectada resistencia a cloranfenicol ni a tetraciclina. La resistencia a eritromicina ascendió de un 0 – 2,0% a un 9,9% durante el período citado y ese aumento se debió principalmente a aislamientos que presentaban el fenotipo M (probable eflujo), algunos de los cuales demostraron poseer el genotipo *mefA*. En aislamientos de infecciones invasivas no se detectó resistencia a eritromicina. Al comparar la evolución de la resistencia a eritromicina entre 1990 y 2000 con el consumo nacional de macrólidos se pudo observar una tendencia similar a la publicada previamente por investigadores finlandeses.

Palabras clave: *Streptococcus pyogenes* * grupo A * eritromicina * resistencia.

Summary

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN STREPTOCOCCUS PYOGENES. AN ELEVEN-YEAR SURVEILLANCE IN A PEDIATRIC HOSPITAL FROM BUENOS AIRES

Provided its universal susceptibility to penicillin, there was little interest about antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* before 1989. However, the knowledge about some outbreaks of erythromycin-resistant streptococci in Japan and Australia prompted us to begin a surveillance in the hospital and then as multicentre studies involving all the country. The results of such eleven-year surveillance (1989-2000) are being presented. Penicillin-resistant or intermediately-penicillin-susceptible group A streptococci were not found.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Resistance to chloramphenicol or tetracycline was not detected. Erythromycin resistance changed from 0 – 2.0% to 9.9% along this period. These rates were due to the increasing isolation of streptococci showing the M phenotype (probably active efflux), some of them showing the mefA genotype. Among isolates obtained from invasive infections erythromycin resistance was not found. Comparing the evolution of erythromycin resistance with the national consumption of macrolides, a similar trend as that published by finnish authors was appreciated .

Key words: *Streptococcus pyogenes* * group A * erythromycin * resistance.

Introducción

A partir de la década del '80 revivió el interés por el conocimiento de la patogenia, diagnóstico y terapéutica de las infecciones estreptocócicas, especialmente por el incremento observado en las infecciones invasivas productoras del llamado "shock tóxico estreptocócico", de elevada mortalidad (1). Hasta el momento no han sido descritos aislamientos de *S. pyogenes* resistentes ni con sensibilidad intermedia a penicilina. La eritromicina (ERY) ha sido ampliamente utilizada en el manejo de infecciones pediátricas desde su descubrimiento, en 1952. En un principio, se constituyó en la alternativa para casos de infecciones estreptocócicas en pacientes alérgicos a penicilina o para infecciones producidas por microorganismos resistentes, especialmente estafilococos. El uso de macrólidos aumentó en las últimas dos décadas por la introducción de compuestos que presentan mejores propiedades farmacocinéticas, mejor tolerancia gastrointestinal y menor número de interacciones con otras drogas comúnmente utilizadas. La resistencia a ERY primeramente fue descrita en cepas de *Staphylococcus aureus*, muy poco tiempo después de lanzada al mercado de los medicamentos (2), y unos años más tarde fue detectada en *Streptococcus pyogenes* (3).

La resistencia a macrólidos de *S. pyogenes* posteriormente llegó a superar cifras del 10% en varios países de distintos continentes (4-10). El origen de este aumento en la resistencia parece haber estado relacionado al incremento en la utilización de estos antibióticos (4) (6) y, precisamente, ese problema pudo ser superado en Finlandia apelando a la reducción de su consumo (6). Posteriormente, en ese país se retornó a los niveles de resistencia iniciales por la misma causa.

Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a macrólidos es la dimetilación inducible o constitutiva de la metilasa que actúa sobre la subunidad 23S ribosomal (iMLS_B o cMLS_B respectivamente). Este mecanismo no sólo involucra a macrólidos de 14 y 15 miembros en su grupo macrolactona, sino que también afecta a lincosamidas, estreptograminas B y a macrólidos de 16 miembros (11). Si bien la forma inducible de este mecanismo parece no actuar sobre estas úl-

timas moléculas, se ha descrito la selección de mutantes constitutivas intratratamiento con clindamicina en *Staphylococcus aureus*. Este hecho sugiere el uso restringido de lincosamidas en bacterias que presenten el mecanismo MLS_B. Los genes implicados en *S. pyogenes* han sido *ermA* (*ermTR*) y *ermB*. El primero es más frecuente en bacterias con resistencia inducible y el segundo en aquellas con resistencia constitutiva, aunque ambos pueden coexistir.

Otro mecanismo descrito en *S. pyogenes* es el de eflujo activo, por el cual las moléculas de macrólidos de 14 y 15 miembros en el anillo macrolactona son expulsadas activamente del interior de las bacterias. El gen involucrado en *S. pyogenes* ha sido denominado *mefA* (12).

Recientemente se han descrito mutaciones en la proteína L4 y en la subunidad 23S ribosomal como responsables de resistencia a eritromicina en estreptococos beta-hemolíticos del grupo A (13).

Se describieron distintos mecanismos capaces de generar resistencia a tetraciclinas en estreptococos beta-hemolíticos. El más difundido es la protección ribosomal, mediada por genes *tetM*, *tetO*, *tetQ* o *tetT* aunque también ha sido descrita la presencia de un mecanismo de eflujo activo (*tetK* o *tetL*) (14). También ha sido documentada la resistencia a cloranfenicol, a través del clásico mecanismo de inactivación de la droga por diacetilación (15).

Se ha encontrado muy escasa información referente a la resistencia a los antibióticos en *S. pyogenes* en América Latina. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos en *S. pyogenes* según su sitio de aislamiento y los mecanismos de resistencia involucrados.

Materiales y Métodos

DISEÑO

El presente es un estudio descriptivo, retrospectivo.

BACTERIAS

Se consideraron para este estudio los estreptococos aislados a partir de infecciones clínicamente significa-

tivas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" de la ciudad de Buenos Aires entre el 1 de enero de 1989 y el 31 de diciembre de 2000.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Los estreptococos beta-hemolíticos aislados fueron identificados a nivel de especie según métodos convencionales (16): la prueba de hemólisis fue realizada en agar Columbia EH (Difco, EEUU) con 5% de sangre ovina (A. Gutiérrez, Buenos Aires). Las pruebas de leucinaminopeptidasa (LAP) y sensibilidad a bacitracina se efectuaron utilizando discos (Britania, Buenos Aires). La prueba de pirrolidónilarilamidasa (PYR) fue alternativamente determinada por discos (Britania, Buenos Aires) o por reacción en medio líquido. La observación de formación de cadenas en medio líquido fue realizada a partir de un desarrollo en caldo tioglicolato. En algunos casos la identificación debió completarse con las pruebas de Voges Proskauer, glucuronidasa (Coli-Brit, Britania, Buenos Aires) y pruebas miniaturizadas (Rapid Strep ID 32, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Como cepas de referencia para estas pruebas se emplearon *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

SEROTIPIFICACIÓN

La serotipificación a nivel de grupo, complementaria para la identificación a nivel de especie, fue realizada por aglutinación con partículas de látex (Slidex Strep-kit, bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

Método de difusión

Se empleó el método de difusión con discos de Bauer y Kirby según normas de NCCLS (17). Se utilizaron discos de tetraciclina (30 µg), penicilina (10 UI) y cloranfenicol (30 µg) en agar Mueller Hinton (Difco, EEUU) con 5% de sangre ovina (A. Gutiérrez, Buenos Aires). La incubación se efectuó a 35 ± 1 °C durante 24 h. Para determinar la sensibilidad a los macrólidos y lincosamidas con la visualización de los distintos fenotipos de resistencia se empleó el método del doble disco (eritromicina 15 µg y clindamicina 2 µg) con una separación de 2 cm en las mismas placas de agar Mueller Hinton - sangre ovina (11). El corte producido sobre el halo de inhibición de CLI en las cercanías del disco de ERY se consideró indicativo de un posible mecanismo MLS_B inducible (Fig. 1). La resistencia a ambos antibióticos se interpretó como un posible mecanismo MLS_B constitutivo, mientras que la sensibilidad a CLI, sin modificación del halo de inhibición y acompañada de resistencia a ERY, se interpretó como probable mecanismo de eflujo (fenotipo M) (6).

Para determinar la resistencia a altos niveles de aminoglucósidos se utilizaron discos de gentamicina de 120 µg, de kanamicina de 120 µg y de estreptomina de 300 µg efectuando la interpretación según los puntos de corte establecidos para enterococos (17) (18).

Se emplearon las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y

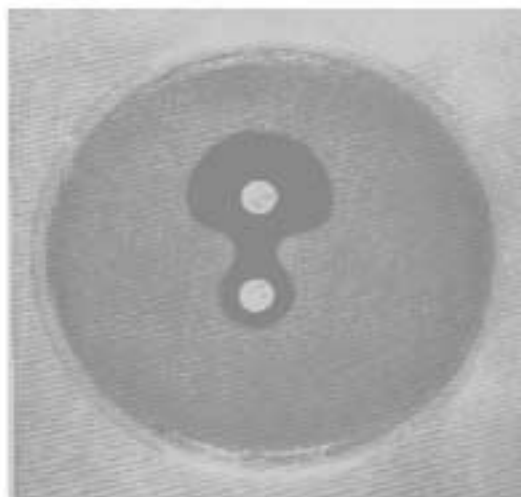


Figura 1. Observación del fenotipo MLS_B por producción del achatamiento del halo de inhibición generado por un disco de clindamicina en virtud de la inducción de la metilasa ejercida por el disco de eritromicina.

Enterococcus faecalis ATCC 51299 para el control de calidad de estas pruebas.

Método de dilución en medio sólido

Se efectuó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en medio sólido (agar Mueller Hinton con 5% de sangre ovina) según recomendaciones de NCCLS para PEN, ERY, CLI, azitromicina (AZI), TET y minociclina (MIN). Los inóculos fueron de aproximadamente 10⁵ ufc/gota luego de la aplicación con el replicador de Steers. La interpretación de los resultados se realizó también siguiendo las recomendaciones de NCCLS.

Las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 se usaron para efectuar los controles de calidad de las pruebas de dilución (19).

Determinación genética del mecanismo de resistencia involucrado

Se realizó por detección por PCR de secuencias genéticas determinantes de los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR* y *mefA* según un método previamente publicado (20).

DEFINICIONES

Streptococcus beta-hemolíticos

Cocos gram positivos que daban positiva la prueba de LAP, eran sensibles a vancomicina, daban negativas las pruebas de bilis-esculina y CINA (6,5%), crecían formando cadenas en caldo tioglicolato y producían hemólisis beta en agar sangre de oveja.

Infecciones invasivas

Infecciones localizadas en tejidos profundos, sangre, líquido cefalorraquídeo u otros líquidos obtenidos por punción, cuyo diagnóstico microbiológico fue realizado por aislamiento de microorganismos a partir de muestras que normalmente deberían ser estériles.

Streptococos resistentes a eritromicina (ERY-R)

Streptococos que no presentaron sensibilidad a eritromicina por el método de difusión (halos de inhibición ≤ 21mm).

Consumo de macrólidos

El consumo de macrólidos en Argentina desde 1990 a 2000 fue obtenido del Boletín del IMS MAT (diciembre 2000).

Resultados

Se estudiaron aislamientos faríngeos de *S. pyogenes* obtenidos en el Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" entre el 1 de enero de 1989 y el 31 de diciembre de 2000.

Ninguna de las cepas ensayadas presentó resistencia o sensibilidad intermedia a penicilina o ceftriaxona (CIM ≤ 0,007 µg/mL). Tampoco se registró resistencia a altos niveles de ninguno de los aminoglucósidos ensayados.

La resistencia a ERY en el Hospital Garrahan, pasó de ser despreciable entre 1989 y 1997 hasta alcanzar niveles cercanos al 10% en el año 2000 (Fig. 2).

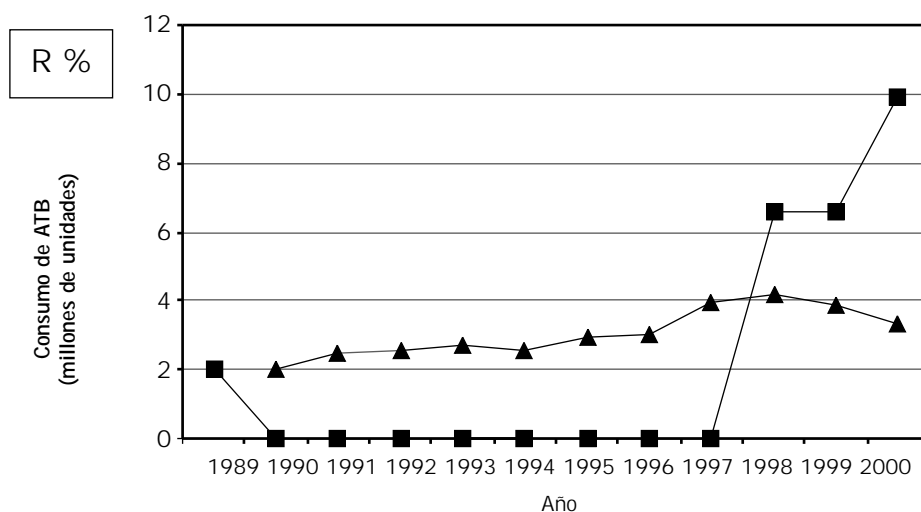


Figura 2. Porcentaje de resistencia a eritromicina en *Streptococcus pyogenes* aislados de exudados faríngeos en el Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires, entre 1989 y 2000 (■) y consumo de macrólidos en la Argentina (▲), en millones de unidades.

Las escasas cepas ERY-R de estreptococos del grupo A aisladas en 1989 presentaban el fenotipo MLS inducible. Una de ellas fue caracterizada como portadora del gen *ermTR*, actualmente incluido dentro del genotipo *ermA* por su homología (21) (Tabla I). Tres de los cuatro aislamientos del estudio multicéntrico de 1994 presentaban ese mismo fenotipo.

Se obtuvieron ochocientos ochenta y cuatro aislamientos de *S. pyogenes* a partir de 4.474 exudados faríngeos durante un año (agosto 1998 - julio 1999). Cincuenta y ocho de ellos (6,6%) eran resistentes a ERY. Los rangos de sensibilidad de las cepas resistentes, en $\mu\text{g}/\text{mL}$ fueron: PEN ($< 0,007 - 0,015$), CRO ($< 0,007$), ERY (4 - 16), CLI ($< 0,06 - 8$) y AZI (32 - 64). La mayor parte de los estreptococos resistentes a ERY (94,4%) tenían el fenotipo M, lo cual sugería la presencia de un mecanismo de eflujo activo. Sólo en uno de los aislamientos (el 5,6% restante) se reconoció un fenotipo MLS inducible (Tabla I).

Setecientos cuarenta y dos estreptococos del grupo A de 772 aislados a partir de 4.942 exudados de fauces en el año 2000 fueron estudiados con la misma metodología y se obtuvo un porcentaje de resistencia a ERY de 9,9% (Tabla I). En la Figura 1 puede verse

la correlación de la evolución de la resistencia a ERY en este hospital con el consumo de macrólidos registrado en la República Argentina durante la década pasada.

No se encontraron cepas resistentes a cloranfenicol ni cepas con alto nivel de resistencia a aminoglicósidos.

Cinco aislamientos fueron obtenidos a partir de niños con escarlatina en el año 2000.

Entre los aislamientos de estreptococos obtenidos de pacientes con infecciones invasivas no se encontró resistencia a penicilina ($\text{CIM} \leq 0,007 \mu\text{g}/\text{mL}$), ceftriaxona ($\text{CIM} \leq 0,007 \mu\text{g}/\text{mL}$), eritromicina ($\text{CIM} \leq 0,06 \mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina o cloranfenicol.

Discusión

Como era de esperar, no se observaron cepas de *S. pyogenes* resistentes o con sensibilidad intermedia a penicilina.

Tampoco se observaron aislamientos resistentes a TET ni a ERY entre las cepas aisladas de infecciones

Tabla I. Fenotipos y genotipos de resistencia a macrólidos hallados en distintos estudios nacionales.

Ciudad/ año	N° de cepas estudiadas	% de resistencia a eritromicina	Fenotipos	Genotipos hallados	Ref.
Buenos Aires 1989 (HG) ¹	126	1,5	iMLS	<i>ErmTR</i>	25
Buenos Aires 1991-94 (HG)	247	0	-	-	25
Multicéntrico 1994	1.767	0,14 - 0,28	iMLS (n = 3) M (n = 1)	<i>ErmTR</i> <i>MefA</i>	26
Multicéntrico 1994 (HG) ²	109	0	-	-	26
Mendoza 1995-96	135	11,1	M (100%)	<i>MefA</i>	26
Neuquén 1997-98	251	12,0	M (100%)	<i>MefA</i>	27
Buenos Aires 1999 (HG)	884	6,6	iMLS (5,6%) M (94,4%)	ND ND	Este estudio Este estudio
Buenos Aires 2000 (HG)	742	9,9	M (100%)	ND	Este estudio

^{1,2} HG = Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". ¹ Aislamientos considerados para el presente estudio. ² Aislamientos obtenidos en el Hospital Garrahan como parte de un estudio multicéntrico argentino.

invasivas en contraste con lo registrado en otros centros de Argentina donde aún incluyendo cepas del Hospital Garrahan se observó un 5,8% de resistencia a macrólidos en *S. pyogenes* (22).

Entre los aislamientos faríngeos se encontró un aumento abrupto de la resistencia a eritromicina entre 1998 y 2000 (de 0 a 9,9%), con una notable prevalencia de estreptococos que presentaban el fenotipo M. Entre estas cepas ERY - R se encontraron portadoras de los serotipos T1 (-) *emm1* (N = 1), y T9/13/28 (+) *emm77* (N = 1), y mucho más asiduamente T12 (-) *emm12* (N = 7) (22).

Un estudio genético reveló la presencia del gen *ermTR* en la única cepa con mecanismo MLS analizada. Los aislamientos estudiados que presentaban el fenotipo M fueron invariablemente portadores del gen *mefA*, como cuatro de las 15 cepas del mismo fenotipo aisladas en el Hospital Notti de Mendoza en 1995 (23) y otras 4 adicionales (no publicadas) aisladas en 1996 (tres en el citado hospital y una en San Rafael).

La resistencia a macrólidos presentaba cifras despreciables en este hospital y en todo el país hasta 1994 (23) (24). Entre 1995 y 1998 se observó un incremento significativo en Mendoza y Neuquén (23) (25). El aumento notable de la resistencia a ERY en *S. pyogenes* registrado en este hospital, es concordante con cifras obtenidas entre 1999 y 2001 (0,5 - 14,1%) en otros centros de Buenos Aires y de otras ciudades argentinas (26). El consumo de macrólidos siguió una tendencia similar aunque ligeramente anticipada en el tiempo, respecto del aumento de la resistencia. Aparentemente una elevación del consumo por encima de un presunto umbral (3 millones de unidades) disparó la resistencia a macrólidos desde cero hasta casi el diez por ciento. Resultados similares fueron obtenidos en Japón y Finlandia (4) (27). De este modo, surge que sería importante controlar el uso de macrólidos en esta población, dado que ha sido comprobado que estas medidas fueron capaces de reducir significativamente los niveles de resistencia en otros países (4) (27).

Estos resultados, además, sugieren que al menos algunos laboratorios "centinela" de la República Argentina deberían ensayar de rutina las pruebas de sensibilidad por difusión para ERY y CLI cuando aislen *S. pyogenes*, ya sea de exudados de fauces como de cualquier otro tipo de muestra. En localizaciones profundas es imprescindible hacerlo en forma rutinaria, jerarquizando el tipo de mecanismo involucrado, dado que CLI es el antibiótico de elección en esas instancias. La presencia de los mecanismos iMLS o con más razón cMLS impediría una buena acción de CLI, mientras que por el contrario, este antibiótico conservaría su actividad sobre cepas portadoras del genotipo *mefA* (fenotipo M) (27).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Richard R. Facklam, PhD y a Bernard Beall, PhD, de la "Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Respiratory Diseases Branch, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, por su colaboración en la tipificación *emm* y T de los estreptococos.

Los autores también agradecen el excelente trabajo técnico de Alejandra Mastroianni, José Luis Pinheiro, Jorge Grimberg, Margarita Angeloff, Adriana Núñez y Laura Lovadina.

CORRESPONDENCIA

Dr. HORACIO A. LOPARDO.

Servicio de Microbiología.

Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan".

Combate de los Pozos 1881.

1245 CIUDAD DE BUENOS AIRES.

Tel: 54-11-4308 4300. Fax: 54-11-4308 5325.

E-mail: hlopardo@garrahan.gov.ar.

Referencias bibliográficas

1. Stevens DL. The flesh-eating bacterium: what's next? *J Infect Dis* 1999; 179 (Suppl 2): S366-74.
2. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 577-85.
3. Lowbury EJJ, Hurst L. The sensitivity of staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleandomycin and spiramycin. *J Clin Pathol* 1959; 12: 163-9.
4. Maruyama S, Yoshioka H, Fujita K, Takimoto M, Satake Y. Sensitivity of group A streptococci to antibiotics. *Am J Dis Children* 1979; 133: 1143-5.
5. Stingemore N, Francis GRJ, Toohey M, Mc Geachie DB. The emergence of erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Fremantle, Western Australia. *Australia* 1989; 150: 626-31.
6. Seppälä H, Nissinen A, Järvinen H, Huovinen S, Henriksson T, Herva E, et al. Resistance to erythromycin in group A streptococci. *N Engl J Med* 1992; 326: 292-7.
7. Jasir A, Schälén C. Survey of macrolide resistance phenotypes in Swedish clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 135-7.
8. Cocuzza C, Blandino G, Mattina R, Nicoletti F, Nicoletti G. Antibiotic susceptibility of group A streptococci in 2 Italian cities. *Microb Drug Resist* 1997; 3: 379-84.
9. Palavecino EL, Riedel I, Berríos X, Bajaksouzian S, Johnson D, Kaplan E, et al. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* in Santiago, Chile. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 339-41.

