

## Distribución de tipo capsular y sensibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* productores de infecciones en Argentina

J. PEREZ<sup>1</sup>, A. LIMANSKY<sup>1</sup>, I. TORESANI<sup>1</sup>, G. EBNER<sup>1</sup>, S. DI BARTOLOMEO<sup>2</sup>, I. DE INOCENTI<sup>3</sup>, G. PRETTO<sup>3</sup>, N. SALAZAR<sup>4</sup>, M. LAFERRARA<sup>4</sup>, M. BOTTIGLIERI<sup>5</sup>, D. BALLESTER<sup>6</sup>, M. MORALES<sup>6</sup>, L. RIVERA<sup>6</sup>, M.L. CACACE<sup>7</sup>, H. CASTRO<sup>8</sup>, L. ROLDÁN<sup>9</sup>, R. NOTARIO<sup>10</sup>, N. BORDA<sup>10</sup>, G. CERA<sup>11</sup>, M.J. SPOLETTI<sup>11</sup>, E. GREGORINI<sup>11</sup>, E.G. SUTICH\*<sup>1-12</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Bacteriología, Depto de Microbiología, Fac. Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Suipacha 531, 2000, Rosario, <sup>2</sup>Hosp. Posadas-Palomar, Pcia de Bs. As.; <sup>3</sup>Hosp. R. Saenz Peña, Rosario, Pcia. de Santa Fe; <sup>4</sup>Hosp. Reg. Río Grande, Pcia. de Tierra del Fuego; <sup>5</sup>Clín. Reina Fabiola, Córdoba; <sup>6</sup>Hosp. Gral. de Agudos Parmenio Piñero, Bs. As.; <sup>7</sup>Hosp. San V. de Paul, Orán, Pcia. de Salta, <sup>8</sup>Hosp. Dr. M. Quiroga, San Juan, Pcia. de San Juan, <sup>9</sup>San. 7 de Marzo, S. Tomé, Pcia. de Santa Fe; <sup>10</sup>Hosp. Español, Rosario, Pcia. de Santa Fe, <sup>11</sup>Hosp. Pcial Centenario, Rosario, Pcia. de Santa Fe,

<sup>12</sup>Centro Médico IPAM, Rosario, Pcia. de Santa Fe, Argentina

\*Correspondencia: esutich@fbioyf.unr.edu.ar

### RESUMEN

*Streptococcus agalactiae* es una bacteria colonizante que ha emergido en los últimos años como causante de infecciones neonatales, perinatales y en pacientes con compromiso inmunológico. La caracterización del polisacárido capsular, de las proteínas de superficie (c, X, R), así como el análisis de marcadores moleculares, permiten su clasificación en serotipos y genotipos. Esto resulta de utilidad para fines epidemiológicos y para estudios de virulencia de la bacteria. El objetivo de este trabajo fue conocer los serotipos prevalentes y la sensibilidad antimicrobiana de aislamientos provenientes de procesos infecciosos en pacientes de distintas zonas de Argentina. En la muestra analizada se obtuvo predominio de los serotipos Ia y III, seguido de II y IV. Todas las cepas resultaron sensibles a penicilina. Se observó 6% de resistencia a eritromicina y 4,5% a clindamicina. En 3 de las cepas se detectó fenotipo MLS (resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptograminas) constitutiva y en una cepa, resistencia MLS inducible. Los resultados logrados en este estudio destacan la importancia de efectuar un relevamiento de los serotipos más frecuentes en nuestro país en vistas a la prevención de esta infección con una vacuna que realmente sea eficaz, como así también el conocimiento de la sensibilidad antimicrobiana para lograr éxito terapéutico en los tratamientos.

**Palabras clave:** *Streptococcus agalactiae*, estreptococos grupo B, serotipos, sensibilidad antimicrobiana

### SUMMARY

**Distribution of capsular types and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* causing infections in Argentina.** *Streptococcus agalactiae* is an endogenous bacterium that has emerged in the last 20 years as an etiological agent in both neonatal and perinatal infections, and in immunocompromised patients. The differentiation of the capsular polysaccharide, the presence of surface proteins c, X, R, and molecular methods allow classification in serotypes and genotypes. This identification is a useful tool for epidemiological purposes and virulence studies in this bacterium. The objective of this work was to study the serotypes and the antimicrobial susceptibility of isolates recovered from invasive diseases in different areas of Argentina. In the analyzed sample a fair predominance of Ia and III serotypes was recovered, followed by II and IV serotypes. All the isolates were found to be sensitive to penicillin. A 6% of resistance to erythromycin and a 4.5% to clindamycin were detected. In three of the isolates, constitutive MLS phenotype (resistance to macrolides, lincosamins and streptogramins) was founded, while in the remaining one, inducible MLS phenotype was detected. These results stress the importance of conducting a surveillance of the prevalent serotypes in our country with the goal of future prevention of this disease with an effective vaccine. The knowledge of the antimicrobial susceptibility profile will be also important to obtain therapeutic success in the treatment.

**Key words:** *Streptococcus agalactiae*, serotypes, antimicrobial susceptibility

### INTRODUCCIÓN

El estreptococo grupo B (EGB, *Streptococcus agalactiae*) forma parte de la flora colonizante normal de tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital humano (7, 24). Actualmente, es la primera causa de sepsis bacteriana y meningitis neonatal y una de las mayores causas de endocarditis y fiebre en mujeres parturientas (23). En los últimos años ha decrecido el número de infecciones tempranas en el recién nacido debido a la pesquisa en la mujer embarazada y la profilaxis en el parto. Sin embargo, se ha observado un aumento de infecciones en adultos, particularmente en pacientes bajo ciertas condiciones de inmunosupresión como neoplasias, diabetes mellitus, enfermedades hepáticas, o en personas de edad avanzada (5, 7, 18, 22).

La diferenciación del polisacárido capsular permite la clasificación en serotipos y actualmente se reconocen nueve, denominados Ia, Ib, II al VIII. La identificación de los mismos es sumamente útil para fines epidemiológicos en el estudio de colonización y/o infección. Si bien el polisacárido capsular es uno de los mayores factores de virulencia, otros componentes proteicos de superficie, como las proteínas c, X y R están siendo estudiados. Se ha documentado que determinados serotipos, como III y Ia, acompañados de la proteína c, son causantes de infecciones perinatales con mayor incidencia (6, 23).

Actualmente, la combinación de la serotipificación con métodos moleculares ha provisto las herramientas necesarias para el análisis de la distribución de las cepas en las distintas poblaciones (13).

El estreptococo grupo B ha permanecido uniformemente sensible a la penicilina, aunque recientemente algunos autores aislaron cepas resistentes y de sensibilidad intermedia a penicilina (3, 10). También se ha informado la emergencia de resistencia a eritromicina y clindamicina (8, 16). La presencia de resistencia a estos últimos involucra un serio problema médico, ya que son drogas de elección en profilaxis o tratamientos de infecciones en pacientes alérgicos a los antimicrobianos beta-lactámicos.

El objetivo de este trabajo fue identificar los serotipos y el perfil de sensibilidad antimicrobiano de aislamientos de *Streptococcus agalactiae* recuperados de procesos infecciosos de pacientes de distintas zonas de Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se estudiaron 66 aislamientos clínicos de EGB, recuperados de procesos infecciosos de Centros Asistenciales de las provincias de Bs. As., Santa Fe, Córdoba, San Juan, Salta y Tierra del Fuego, República Argentina. Estos centros aceptaron una invitación que se efectuó a laboratorios de todas las provincias del país. Los aislamientos que se evaluaron correspondieron a pacientes con infecciones severas y/o invasivas, entendiéndose por invasivo, el aislamiento del EGB de sangre o de cualquier sitio del organismo estéril e infección severa cuando el aislamiento provenía de un sitio con nicho ecológico propio pero que clínicamente se consideró que este germen originó un foco infeccioso que comprometió la vida del paciente. Se aislaron de sangre (10), loquios (22), piel y partes blandas (29), LCR (2), orina (2) y líquido pleural (1). Todos los Centros enviaron las cepas a la Cátedra de Bacteriología de la Fac. de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, donde se confirmó su identificación inicial y se le efectuaron todos los estudios.

### Tipificación del EGB

La detección del antígeno de grupo se efectuó con *Streptococcal grouping kit* (Oxoid) y el antígeno tipo-específico o serotipo con *Specific type antigen detection* (Denka Seiken Co. LTD, Japón), según indicaciones de los fabricantes.

### Determinación de proteínas de superficie «c», «R», «X»

Se efectuó con *Specific type antigen detection* (Denka Seiken Co. LTD, Japón), por aglutinación, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Estudio de sensibilidad antimicrobiana

Se efectuó por método de difusión en agar con discos de papel en medio Mueller Hinton 5% de sangre de carnero e incubación en CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 h. Se ensayaron los siguientes antimicrobianos: ampicilina 10 µg, penicilina (PEN) 10 U, ceftriaxona 30 µg, ofloxacina 5 µg, vancomicina 30 µg, tetraciclina 30 µg, cloranfenicol 30 µg, eritromicina (ERI) 15 µg, clindamicina (CLI) 2 µg, azitromicina (AZI) 15 µg, cefotaxima 30 µg. La lectura e interpretación se realizó según normas del NCCLS (20). Se utilizaron las cepas *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control.

### Determinación del fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptograminas (MLS)

Se estudió el fenotipo de resistencia a eritromicina por test de doble disco. Ante la alternativa que AZI fuera mejor inductor que ERI se colocó el disco de CLI en el centro de la placa a una distancia de 20 mm de los discos de ambos macrólidos. Se emplearon placas de agar Mueller Hinton 5% sangre de carnero incubándose en CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 h. Lectura e interpretación: ERI y AZI resistentes, CLI sensible (con achatamiento del halo de CLI) indica fenotipo MLS inducible (iMLS<sub>B</sub>); ERI-AZI-CLI resistentes (zona inhibición menor 21 mm) indica fenotipo MLS constitutivo (cMLS<sub>B</sub>) y ERI y AZI resistentes, CLI sensible (sin achatamiento del halo de CLI) indica fenotipo M (por eflujo).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La distribución de los serotipos en los 66 materiales clínicos procesados se describe en el Cuadro 1.

En este estudio se observó predominio de los serotipos Ia y III (32 y 20%, respectivamente, Cuadro 1), seguidos de II y V (15 y 12%). El 18% de los aislamientos no pudo ser tipificado, probablemente porque los antisueros para los serotipos VI, VII y VIII, no están incluidos en el equipo de aglutinación empleado. En E.E.U.U. también se presenta mayor incidencia de los serotipos Ia y III acompañados también del serotipo V (5, 7). Datos reportados por nuestro grupo con anterioridad para cepas provenientes de procesos invasivos mostraron predominio de los mismos serotipos (25). Por otra parte, se puede observar la notoria diferencia epidemiológica de presentación de los serotipos en la población de Taiwán y Zimbawe (11, 17).

En los 22 materiales provenientes del aparato genital se obtuvo un neto predominio del serotipo Ia (40%). Los otros serotipos fueron: Ib (5%); II (9%); III (14%); V (14%) y NT (18%) (Figura. 1). Sin embargo, en nuestro estudio anterior con aislamientos obtenidos exclusivamente de flujo vaginal en mujeres embarazadas, sobre 21 cepas de EGB el serotipo III presentó predominancia (47,6%) (24).

Analizando las 10 muestras de hemocultivos, 5 provenían de infecciones neonatales y perinatales, de las cuales 3 correspondieron al serotipo Ia coincidiendo con hallazgos en E.E.U.U. (7) y los otros 2 a serotipos II y V, las otras bacteriemias pertenecieron a los serotipos II, III, V y 2 NT.

Con respecto al estudio de serotipos aislados en piel y partes blandas, 7 aislamientos correspondieron al serotipo Ia (25%), 1 al Ib (3%), 6 al II (21%), 7 al III (24%), 3 al V (10%) y 5 no pudieron ser tipificadas (17%).

En la actualidad se estudia la presencia de otros antígenos de superficie de naturaleza proteica como c, X y R, que permiten un nuevo aporte a la clasificación serológica y a estudios epidemiológicos. La proteína c ha sido extensamente estudiada y se la describe análoga a la proteína M del *Streptococcus pyogenes*, jugando un papel importante en la virulencia e inmunidad. *In vitro* se demostró resistencia a la opsonofagocitosis y muerte celular, e *in vivo* los anticuerpos contra la proteína c ofrecen protección a la infección (12). Con respecto a la proteína R, el rol que juega en la patogénesis aún es incierto.

La proteína c se encontró asociada en un 100% a los serotipos Ia, Ib, III y la proteína R al serotipo II. No se encontró proteína de superficie asociada al serotipo V.

Por los estudios que hasta ahora se han realizado podemos plantear que una vacuna, para ser efectiva en nuestra población, debería proteger para los serotipos predominantes, es decir Ia, II, III y V.

Se reconoce a la penicilina como droga de elección para profilaxis y tratamiento de infecciones por EGB, ya que prácticamente era uniformemente sensible. Sin embargo, recientemente, se han detectado cepas resistentes o con resistencia intermedia a penicilina (3, 4, 10). Los aislamientos de nuestro estudio resultaron sensibles a ampicilina, penicilina, ceftriaxona, cefotaxima, ofloxacina y vancomicina. Se detectó un 7% de aislamientos resistentes a cloranfenicol.

En pacientes alérgicos a PEN se recomienda como alternativa la utilización de macrólidos, pero pareciera que debido a su frecuente uso en otras infecciones ha comenzado a observarse un incremento de resistencia en esta bacteria.

En el Cuadro 2 se presenta un estudio comparativo de la resistencia a ERI y CLI en distintos países. Se puede concluir que de la resistencia inicial a macrólidos del 4% se ha llegado actualmente a 46% como en Taiwán. Estudios de diferentes años presentados por Murdoch y col.(19), Azavedo y col. (3), Morales y col. (16), comprueban un incremento de la resistencia en un 8-17% coincidente con los estudios de Ruess y col. (21) en Alemania. Datos de otros autores muestran resistencias cercanas al 30% (1, 15). Nuestros aislamientos presentan 6% de resistencia a eritromicina, coincidente con los resultados de Mendez y col. (26), en Santa Fe, Argentina. Respecto a clindamicina, obtuvimos 4,5% de resistencia. Esta resistencia en otros países oscila entre 4-20% con excepción de Taiwán con valores cercanos al 50% (Cuadro 2).

Los mecanismos de resistencia a macrólidos más frecuentes son modificación ribosomal por una metilasa codificada por el gen *erm* (28) y eflujo de la droga por una proteína de membrana codificada por el gen *mef* (14). Por el método de sensibilidad por difusión a partir de monodiscos, en nuestro estudio 3 cepas presentaron fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptograminas constitutivo (cMLS<sub>B</sub>) y una cepa fenotipo MLS inducible, todas correspondieron a aislamientos del serotipo III. Esta distribución de resistencia es similar a la presentada por Aracil y col (2), que dentro del 16,3% de EGB resistentes a eritromicina, 10,4% tenían fenotipo cMLS<sub>B</sub>, 3,2% iMLS<sub>B</sub> y 2,7% fenotipo M. Por su parte Fitoussi y col. (9)

muestran 71% fenotipo iMLS<sub>B</sub>, 23% cMLS<sub>B</sub> y 6% fenotipo M, valores obtenidos a partir de 88 cepas resistentes a eritromicina, presentándose mayoritariamente en los serotipos III y V. También para Tyrrell y col. (27) estos serotipos presentaron resistencia cMLS<sub>B</sub>. Por su parte, es importante la detección de cepas con fenotipo inducible de resistencia porque expone al paciente a fallas terapéuticas con lincosaminas.

A partir de los resultados presentados, es válido concluir la importancia del estudio de sensibilidad para asegurar el éxito en el tratamiento terapéutico en pacientes infectados y en la prevención de patologías severas neonatales con alto porcentaje de morbilidad y/o mortalidad, por medio de un tratamiento efectivo en la madre en el momento del parto, hasta que se establezca un efectivo programa de vacunación.

**Agradecimientos.** Este trabajo se realizó con el Subsidio PICT N° 05 07262 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica otorgado a Emma Sutich

## BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews JI, Diekema DJ, Hunter SK, Rhomberg PR, Pfaller MA, Jones RN, *et al* (2000) Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection: antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the Western Hemisphere. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183: 859-862.
2. Aracil B, Miñambres M, Oteo J, de la Rosa M, Gómez-Garcés JL, Alós JI (2002). Susceptibility of strains of *Streptococcus agalactiae* to macrolides and lincosamides, phenotype patterns and resistance genes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 745-748.
3. Azavedo J CS de, Mcgavin M, Duncan C, Low DE, Mcgeer A (2001) Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B *Streptococcus* isolates from Ontario, Canadá. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3504-3508.
4. Bland ML, Vermillion ST, Soper DE, Austin M (2001) Antibiotic resistance patterns of group B streptococci in late third-trimester rectovaginal cultures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184: 1125-1126.
5. Blumberg HM, Stephens DS, Modansky M, Erwin M, Elliot J, Fackland RR *et al* (1996) Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J. Infect. Dis.* 173: 365-373.
6. Edwards M S, Baker C J (2000). *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*). En Mandell, GI, Bennett, JE, Dolin, R. (ed), *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 2156-2167.
7. Farley MM (2001) Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis* 33: 556-561.
8. Fernández M, Hickman ME, Baker CJ (1998) Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1517-1519.
9. Fitoussi F, Loukil C, Gros I, Clermont O, Mariani P, Bonacorsi S *et al* (2001) Mechanisms of macrolide resistance in clinical group B streptococci isolated in France. *Antimicrob. Agents Chemother* 45: 1889-1891.
10. Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, Ho SW, Yang PC, Luh KT (2001) High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother* 45: 3205-3208.
11. Ko WC, Lee HC, Wang LR, Lee CT, Liu AJ, Wu JJ (2001) Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B *Streptococcus* over an eight-year in Southern Taiwan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 334-339.
12. Lancefield RC, Mc Carty M, Everly WN (1975) Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. *J. Exp. Med* 142: 165-179.
13. Limansky A, Sutich E, Guardati MC, Toresani I, Viale A. (1998) Genomic diversity among *Streptococcus agalactiae* isolated by a degenerate oligonucleotide-primed amplification assay. *J. Infect. Dis.* 177: 1308-1313.
14. Luna VA, Coates P, Eady EA, Cove JH, Nguyen TT, Roberts MC (1999) A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 19-25.
15. Manning SD, Foxman B, Pierson CL, Tallman P, Baker CJ, Pearlman MD (2003) Correlates of antibiotic-resistant group B *Streptococcus* isolated from pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 101: 74-79.
16. Morales WJ, Dickey SS, Bornick P, Lim DV (1999) Change in antibiotic resistance of group B *Streptococcus*: impact on intrapartum management. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181: 310-314.
17. Moyo SR, Mudzori J, Tswana SA, Maeland JA (2000) Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) colonization in pregnancy. *Cent. Afr. J. Med.* 46: 115-120.
18. Muñoz P, Llancaqueo A, Rodríguez-Creixems M, Pelaez T, Martín L, Bouza E (1997) Group B *Streptococcus* bacteremia in nonpregnant adults. *Arch. Intern. Med.* 157, 213-216.
19. Murdoch DR, Barth Reller L (2001) Antimicrobial susceptibilities of Group B isolated from patients with invasive disease: 10-year perspective. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3623-3624.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Tabla 2H del M2-A7 Vol. 22 N° 1, Villanova, Estados Unidos de América.
21. Ruess M, Muller U, Sander A, Berner R (2000) Antimicrobial susceptibility patterns of *Streptococcus agalactiae* in a German university hospital. *Scand. J. Infect. Dis.* 32: 623-626.
22. Schuchat A. (1998) Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 497-513.
23. Sutich E, Limansky A, Toresani I, Bogado I, Guardati M, Notario R *et al.* (1996) Estudio de la transmisión materno-

neonatal de *Streptococcus agalactiae* mediante serotipificación y análisis del polimorfismo del ADN Infect. Microbiol. Clin. 8: 14-20.

24. Toresani I, Limansky A, Bogado I, Guardati MC, Viale A, Sutich E (2001) Phenotypic and genotypic study of *Streptococcus agalactiae* in vagina of pregnant women in Argentina. Medicina (Bs As) 61: 295-300.
25. Toresani I, Limansky A, Francois S, Ebner G, Viale A, Sutich E (2000). Análisis de determinantes de virulencia de una población de *Streptococcus agalactiae*. XLV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y XLVIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología- Medicina (BsAs) 60: 839-840.
26. Trupia L, Mollerach A, Perisutti R, Mendosa A, Méndez E (2001) Estudio de sensibilidad de 115 cepas de *Streptococcus agalactiae* a distintos antimicrobianos de uso clínico. Revista FABICIB 5: 119-123.
27. Tyrrell GGJ, Senzilet LD, Spika JS, Kertesz DA, Alargaratnam M, Lovgreen M *et al.* (2000) Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study-1996. Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators. J. Infect. Dis. 182: 168-173.
28. Weisblum B (1985) Inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity and structural elements that regulate expression –a review. J. Antimicrob. Chemother. 16 (Suppl A): 63-90.

Recibido: 5/08/03 – Revisado: 17/03/04