

Streptococcus agalactiae altamente resistente a fluoroquinolonas

Elisenda Miró^a, Montserrat Rebollo^a, Alba Rivera^{a,b}, M. Teresa Álvarez^c, Ferrán Navarro^{a,b}, Beatriz Mirelis^{a,b} y Pere Coll^{a,b}

^aServicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. ^bUnidad de Microbiología. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. ^cUnidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

ANTECEDENTES. *Streptococcus agalactiae* se mantiene sensible a la penicilina, si bien se ha descrito un incremento en la resistencia a otras familias de antimicrobianos como macrólidos y más raramente fluoroquinolonas.

MÉTODOS Y RESULTADOS. Entre 2003 y 2004 se detectaron dos cepas de *S. agalactiae* resistentes a fluoroquinolonas, que presentaron mutaciones en *parC* (*Ser*₇₉ → *Phe*) y *gyrA* (*Glu*₈₅ → *Ala* o *Glu*₈₅ → *Lys*).

CONCLUSIÓN. Se describen por primera vez en España cepas de *S. agalactiae* altamente resistentes a fluoroquinolonas.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*. Fluoroquinolonas. *parC*. *gyrA*.

Streptococcus agalactiae highly resistant to fluoroquinolones

BACKGROUND. *Streptococcus agalactiae* remains susceptible to penicillin; nevertheless, an increase in the resistance to other antimicrobial families, such as macrolides and more rarely fluoroquinolones, has been described.

METHODS AND RESULTS. From 2003 to 2004, two fluoroquinolone-resistant *S. agalactiae* strains were detected. The strains presented one mutation in *parC* (*Ser*₇₉ → *Phe*) and an additional mutation in *gyrA* (*Glu*₈₅ → *Ala* or *Glu*₈₅ → *Lys*).

CONCLUSION. This study describes the first *S. agalactiae* strains highly resistant to fluoroquinolones in Spain.

Key words: *Streptococcus agalactiae*. Fluoroquinolones. *parC*. *gyrA*.

Introducción

Streptococcus agalactiae es el principal agente causal de la sepsis neonatal; también es un importante agente de infecciones en gestantes y de infecciones sistémicas en adultos con enfermedad de base¹.

S. agalactiae conserva su sensibilidad a la penicilina, que continúa siendo su tratamiento de elección; por el contrario, se ha puesto de manifiesto en diversos estudios el incremento de la resistencia a los macrólidos. La resistencia a fluoroquinolonas en estreptococo se ha documentado principalmente en *S. pneumoniae*²⁻⁴ y, recientemente, también en *S. pyogenes*⁵. Hasta la fecha, sólo en dos publicaciones se han aislado y caracterizado cepas de *S. agalactiae* resistentes a fluoroquinolonas. Kawamura et al⁶ en el año 2003 describieron la primera cepa de *S. agalactiae* altamente resistente por un mecanismo atribuible a mutaciones en los genes *parC* y *gyrA*. En este contexto, sorprende la prevalencia del 4,4% descrita en un estudio realizado en EE.UU. durante el período 1999-2002⁷.

El presente estudio describe el aislamiento de dos cepas de *S. agalactiae* altamente resistentes a fluoroquinolonas y la caracterización del mecanismo de resistencia implicado.

Material y métodos

Desde enero de 2003 a diciembre de 2004 fueron estudiadas un total de 172 cepas de *S. agalactiae* aisladas de diferentes productos patológicos (53 genitales, 48 orinas, 38 piel y partes blandas, 18 sangre, 4 respiratorio y 11 de diversas procedencias). Se estudió de forma cotidiana la sensibilidad a penicilina G, ampicilina, cefotaxima, vancomicina, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, rifampicina, tetraciclina y levofloxacino por técnica de disco difusión según la normativa del CLSI⁸, determinando así mismo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de penicilina G, cefotaxima y levofloxacino por técnica de E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia).

En las cepas que mostraron sensibilidad disminuida a levofloxacino (CIM ≥ 2 mg/l), la sensibilidad se confirmó por técnica de microdilución utilizando paneles comerciales (STRHAE, Sensititre Trek Diagnostic, West-Sussex, Inglaterra). Además, se determinó la CIM de cinco fluoroquinolonas (norfloxacino, ciprofloxacino, sparfloxacino, moxifloxacino y clinafloxacino) por E-test, en ausencia y presencia de 10 y 20 mg/l de reserpina, un inhibidor de bombas de flujo.

La relación clonal entre las cepas resistentes a fluoroquinolonas se determinó por análisis del ADN cromosómico mediante digestión con la enzima de baja frecuencia de corte *Sma*I (Roche, Mannheim, Alemania) y electroforesis en campo pulsante (PFGE). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa Seakem al 1% (FMC BioProducts, Maine, EE.UU.) en el aparato CHEF-DRIII (BioRad, Hercules, EE.UU.) con las condiciones de 5 a 50 s, 24 h a 6 V/cm² a 14 °C.

Las mutaciones en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *parC* y *gyrA* de las cepas resistentes fueron determinadas tras secuenciación del producto amplificado. En la PCR se usaron los iniciadores *gyrA*_{up}Saga (5'-TCGTCGTATTT-TATATGGT-3', posiciones 129 a 147) y *gyrA*_{dn}Saga (5'-ACCAGTTG-CACCATTGACTA-3', posiciones 513 a 494) obtenidos a partir de la secuencia del gen *gyrA* de *S. agalactiae* (GenBank AE014235); y *parC*_{pyoup} (5'-GGATTGAAACCCGTTTCAGCG-3', posiciones 106 a 125) y *parC*_{pyodn} (5'-GGATTGAAACCCGTTTCAGCG-3', posiciones 469 a 450) obtenidos a partir de la secuencia publicada del gen *parC* de

Correspondencia: Dra. B. Mirelis.
Departamento de Microbiología.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Avda. Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España
Correo electrónico: bmirelis@santpau.es

Manuscrito recibido el 13-10-2005; aceptado el 21-2-2006.

S. pyogenes (GenBank AF220946). La secuenciación de los productos amplificados se realizó en las dos cadenas mediante el método dideoxi con los mismos iniciadores, el kit Thermo Sequenase™ Cy™5 Dye Terminator Sequencing (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Inglaterra) y el secuenciador ALF Express (Automatic Laser fluorescent DNA Sequencer, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Las secuencias fueron analizadas mediante el software disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados

De las 172 cepas de *S. agalactiae* estudiadas en los años 2003 y 2004, dos mostraron resistencia a fluoroquinolonas, lo cual representa una prevalencia del 1,2% durante el período estudiado.

Una de las cepas (P0162) fue aislada de una muestra de orina procedente de un paciente varón de 74 años diagnosticado de prostatitis crónica y tumor vesical, portador de sonda urinaria. Dicho paciente había recibido múltiples tratamientos con fluoroquinolonas. La otra cepa (P0425) fue aislada de material purulento de un tumor vesical abscesificado en un paciente varón de 83 años, también portador de sonda urinaria, que había recibido profilaxis con ciprofloxacino con periodicidad trimestral durante 10 años.

Las dos cepas fueron sensibles a penicilina (0,06 y \leq 0,03 mg/l, respectivamente), ampicilina (\leq 0,25 mg/l), cefotaxima (\leq 0,06 mg/l), vancomicina (0,5 mg/l), eritromicina (\leq 0,25 mg/l), clindamicina (\leq 0,25 mg/l), quinupristina-dalfopristina (\leq 1 mg/l), cloranfenicol (\leq 2 mg/l) y rifampicina (\leq 1 mg/l), y resistentes a tetraciclina ($>$ 4 mg/l), ciprofloxacino ($>$ 4 mg/l) y levofloxacino ($>$ 4 mg/l) mediante la técnica de microdilución. Los valores de la CIM de las diferentes fluoroquinolonas de las cepas P0162 y P0425 obtenidos por E-test fueron los siguientes: norfloxacino $>$ 256 mg/l, ciprofloxacino $>$ 32 mg/l, levofloxacino 8 y $>$ 32 mg/l, sparfloxacino 4 y $>$ 32 mg/l, moxifloxacino 0,5 y 2 mg/l, y clinafloxacino 0,25 y 0,75 mg/l, respectivamente. En ningún caso se observó efecto alguno de la reserpina en los valores de CIM obtenidos.

Mediante PFGE se obtuvieron patrones de restricción con 7 y 9 bandas, evidenciándose 8 bandas de diferencia entre ambas cepas.

Las dos cepas de *S. agalactiae* estudiadas presentaron la misma mutación en *parC*, Ser(TCC)₇₉ → Phe(TTC), mientras que en *gyrA*, la cepa P0162 presentó la mutación Glu(GAA)₈₅ → Ala(GCA) y la cepa P0425 presentó el cambio Glu(GAA)₈₅ → Lys(AAA).

Discusión

En nuestro hospital se estudia la sensibilidad de *S. agalactiae* a las fluoroquinolonas de forma habitual desde su introducción para uso clínico en 1988, y no se encontró ninguna cepa resistente hasta el año 2003. En un estudio multicéntrico realizado en España entre 1997 y 2002 todas las cepas se mostraron sensibles a levofloxacino⁹.

Las dos únicas cepas resistentes descritas en el presente trabajo no mostraron relación clonal en función de los

patrones de bandas obtenidos mediante PFGE. El análisis molecular de las QRDR de los genes *parC* y *gyrA* reveló que las cepas eran portadoras de mutaciones en ambos genes, lo cual podría explicar el alto grado de resistencia observado. La mutación Ser₇₉ → Phe detectada en *parC* es una de las más frecuentemente descritas en *S. pneumoniae*^{3,4,10} y *S. pyogenes*⁵, y también se ha encontrado en *S. agalactiae*^{6,7}. En *gyrA*, la mutación Glu₈₅ → Lys ha sido identificada en *S. pneumoniae*^{3,4,10} y en *S. agalactiae*⁷, mientras que la mutación Glu₈₅ → Ala se describe en *S. agalactiae* por primera vez en este trabajo. La combinación de mutaciones detectada en los genes *parC* y *gyrA* en la cepa P0425 ya ha sido descrita anteriormente en *S. agalactiae*⁷, y las CIM de las diversas fluoroquinolonas son similares en ambos casos.

Los datos obtenidos permiten descartar la contribución de bombas de expulsión activa inhibidas por reserpina a los niveles de resistencia de estas dos cepas, aunque podrían estar implicadas otras bombas de expulsión y/o alteraciones de la permeabilidad. Así, las diferencias en las CIM de las diferentes fluoroquinolonas observadas podrían explicarse por las diferentes sustituciones en GyrA: Glu a Ala o Glu a Lys.

En conclusión, se describen por primera vez en España cepas de *S. agalactiae* altamente resistentes a fluoroquinolonas. El mecanismo de resistencia implicado es similar al descrito con anterioridad en otras especies de estreptococo: dobles mutaciones en las QRDR de los genes *gyrA* y *parC*.

Bibliografía

- Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:497-513.
- Liñares J, De la Campa AG, Pallarés R. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med.* 1999;341:1546-7; author reply 1547-8.
- Davies TA, Goldschmidt R, Pflieger S, Loeloff M, Bush K, Sahn DF, et al. Cross-resistance, relatedness and allele analysis of fluoroquinolone-resistant US clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* (1998-2000). *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:168-75.
- Richter SS, Heilmann KP, Beekmann SE, Miller NJ, Rice CL, Doern GV. The molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with quinolone resistance mutations. *Clin Infect Dis.* 2005;40:225-35.
- Malhotra-Kumar S, Lammens C, Chapelle S, Mallentjer C, Weyler J, Goossens H. Clonal spread of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:320-5.
- Kawamura Y, Fujiwara H, Mishima N, Tanaka Y, Tanimoto A, Ikawa S, et al. First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3605-9.
- Wehbeh W, Rojas-Díaz R, Li X, Mariano N, Grenner L, Segal-Maurer S, et al. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae*: epidemiology and mechanism of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2495-7.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests-Eighth edition. Approved standard M2-A8: NCCLS, Wayne, Pa, USA; 2003.
- González JJ, Andreu A, Spanish Group for the Study of Perinatal Infection from the Spanish Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Multicenter study of the mechanisms of resistance and clonal relationships of *Streptococcus agalactiae* isolates resistant to macrolides, lincosamides, and ketolides in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2525-7.
- Jones ME, Sahn DF, Martín N, Scheuring S, Heisig P, Thornsberry C, et al. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:462-6.