

Aumento de la resistencia a macrólidos mediada por metilasas en *Streptococcus pyogenes* en un hospital pediátrico de Barcelona

Amadeu Gené^a, Carmen Ardanuy^b, Edgar Palacín^a y Juan José García-García^a

^aUnidad de Infectología Pediátrica. Servicios de Microbiología y Pediatría. Hospital Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat.

^bServicio de Microbiología. Hospital Universitari de Bellvitge. IDIBELL. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN. Estudiamos los mecanismos genéticos y la evolución de la resistencia de *S. pyogenes* a claritromicina y clindamicina (1996-2003) en 480 aislamientos pediátricos de un hospital de Barcelona.

RESULTADOS. Se observa un aumento progresivo de cepas con fenotipo MLS_B (55,6% de los aislamientos resistentes en 2002) y una disminución relativa del fenotipo M. El porcentaje global de resistencia a macrólidos fue del 29,8% (27,4% en el periodo 1996-2001 y 35,8% en 2002-2003).

Se detectó el gen *mefA* en las cepas con fenotipo M, el gen *ermB* en las cepas con fenotipo MLS_B constitutivo y el gen *ermTR* en algunas cepas con fenotipo MLS_B inducible.

CONCLUSIÓN. El aumento de la resistencia y los cambios en los mecanismos implicados reducen la efectividad de macrólidos y clindamicina como tratamiento alternativo.

Palabras clave: *Streptococcus pyogenes*. Sensibilidad antibiótica. Macrólidos.

Increasing methylase-mediated resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* in a children's hospital in Barcelona (Spain)

INTRODUCTION. The genetic mechanisms and changes in resistance of *Streptococcus pyogenes* to clarithromycin and clindamycin were studied in 480 strains from a children's hospital in Barcelona (1996-2003).

RESULTS. There was a progressive increase of strains with the MLS_B phenotype (55.6% of resistant strains in 2002) and a relative decrease in the M phenotype. The overall rate of macrolide resistance was 29.8%, with an increase from 27.4% in the 1996-2001 period to 35.8% in the 2002-2003 period.

The *MefA* gene was detected in M phenotype strains, the *ermB* gene in constitutive MLS_B strains and the *ermTR* gene in some inducible MLS_B strains.

CONCLUSION. The increase of the resistance and the changes in the implied mechanisms reduce the effectiveness of macrolides and clindamycin as an alternative treatment.

Key words: *Streptococcus pyogenes*. Antimicrobial susceptibility. Macrolides.

Introducción

A diferencia de otros géneros de estreptococos, *S. pyogenes* es universalmente sensible a penicilina y mantiene una elevada tasa de sensibilidad frente a cefalosporinas¹.

En los últimos años la resistencia de *S. pyogenes* a macrólidos se ha incrementado de forma significativa^{1,2}. El principal mecanismo de resistencia se debe a la presencia de bombas de expulsión activa codificadas por el gen *mefA*. Éstas confieren resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos, mientras que permanecen sensibles los macrólidos de 16 átomos, las lincosamidas y la estreptogramina B (fenotipo M). Sin embargo, al igual que en otros estreptococos la resistencia a macrólidos puede deberse a la presencia de metilasas codificadas por los genes *ermB* o *ermTR*, que confieren resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (fenotipo MLS_B, constitutivo o inducible)³.

El objetivo de este estudio es relacionar los resultados de sensibilidad antibiótica de las cepas pediátricas de *S. pyogenes* aisladas en nuestro hospital los años 2002 y 2003 con los fenotipos de resistencia implicados (M y MLS_B) y analizar la evolución de las resistencias a claritromicina y clindamicina desde el año 1996, cuyos datos de sensibilidad fueron parcialmente publicados⁴.

Métodos

Entre los años 1996 y 2003 se aislaron, en el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, 480 cepas (137 en el periodo 2002-2003) de *S. pyogenes* procedentes de pacientes de entre 2 meses y 17 años de edad.

Un total de 247 cepas fueron obtenidas mediante frotis faríngeo en pacientes diagnosticados de faringoamigdalitis aguda y el resto de cepas procedían de diversas localizaciones no faríngeas (lesiones cutáneas, abscesos, muestras genitales, secreciones óticas y oculares, líquido articular, líquido pleural, sangre, etc.).

La identificación bacteriana se realizó mediante la determinación de la sensibilidad a bacitracina (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) en las cepas de estreptococos β-hemolíticas y posteriormente se confirmó mediante la determinación del serogrupo A (Phadebact® Strep A Test, Boule Diagnostics AB, Huddinge, Suecia). En los casos de cepas resistentes a bacitracina se completó la identificación con el sistema api® 20 STREP (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Correspondencia: Dr. Amadeu Gené.
Servicio de Microbiología. Hospital Sant Joan de Déu.
Pº Sant Joan de Déu, 2. 08950 Esplugues de Llobregat.
Barcelona. España.
Correo electrónico: agene@hsjdbcn.org

Manuscrito recibido el 8-2-2005; aceptado el 1-6-2005.

La determinación de la sensibilidad antibiótica se realizó por el método de E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia). Se estudiaron los siguientes antibióticos: penicilina, claritromicina y clindamicina, y en los aislamientos de los años 2002-2003 se estudió también el linezolid. La sensibilidad antibiótica de linezolid se determinó también por el método de discodifusión (Oxoid, Oxoid Limited, Inglaterra). La interpretación de los resultados se realizó según los criterios del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Como medio de cultivo se utilizó agar Müeller-Hinton suplementado con el 5% de sangre de cordero y la incubación se realizó a 35-37 °C durante 20-24 h en atmósfera aerobia con 5% de CO₂.

La caracterización fenotípica de la resistencia a macrólidos se hizo mediante la prueba del doble disco eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg)³ en placas de agar Müeller-Hinton con el 5% de sangre de cordero. Además, en las cepas de los años 2002 y 2003 se incluyó el disco de estreptogramina B (25 µg).

La detección de genes de resistencia a macrólidos se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a todos los aislamientos resistentes a macrólidos de los años 2002 y 2003 (49 cepas). Para la detección de los genes *mefA*, *ermB* y *ermTR* se utilizaron los cebadores y condiciones descritas por Sutcliffe⁵. Se incluyeron controles positivos y negativos en cada serie de amplificación. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% y tras tinción con bromuro de etidio se visualizaron bajo luz ultravioleta.

La comparación de variables cuantitativas se realizó mediante el test de la chi cuadrado.

Resultados

La tabla 1 muestra la evolución de la sensibilidad de *S. pyogenes* a macrólidos desde el año 1996 al 2003. Se observa una tendencia al aumento de la resistencia hasta alcanzar en el año 2002 un máximo del 48% de cepas resistentes. La resistencia media de estos años fue del 29,8% (27,4% entre 1996 y 2001 y 35,8% entre 2002 y 2003).

Durante el período de estudio, se ha observado un cambio en los fenotipos de resistencia a macrólidos. En el período 1996-1998 todas las cepas resistentes a claritromici-

na presentaron el fenotipo M. En 1999 se detectó la primera cepa con fenotipo MLS_B constitutivo y en los años siguientes se produjo un importante aumento de cepas con este fenotipo de resistencia, hasta superar el 50% de los aislamientos resistentes a macrólidos en 2002. El aislamiento de cepas con fenotipo MLS_B inducible fue anecdótico hasta 2003, en que representó el 18,2% de las cepas resistentes a claritromicina. El aumento del fenotipo MLS_B desde el año 1999 es estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

La tabla 2 muestra los valores de sensibilidad de los antibióticos estudiados en el período 2002-2003. La resistencia a claritromicina de las cepas del fenotipo M fue, como es habitual en este fenotipo, de bajo nivel, ya que en ningún caso la concentración inhibitoria mínima (CIM) superó los 32 µg/ml, mientras que clindamicina mantenía el mismo nivel de sensibilidad que las cepas sensibles a macrólidos. En todas las cepas con resistencia constitutiva la CIM de claritromicina y clindamicina fue superior a 256 µg/ml.

Todas las cepas fueron sensibles a penicilina y linezolid, sin diferencias de CIM entre las cepas sensibles y resistentes a macrólidos. El rango del halo de inhibición del disco de linezolid, obtenido mediante el método de disco difusión, fue de 26-34 mm.

De las cepas aisladas en el período 2002-2003, 8 fueron resistentes a bacitracina (diámetro de inhibición de 0 mm), siete pertenecientes al fenotipo MLS_B constitutivo y uno al MLS_B inducible.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a sensibilidad antibiótica entre las cepas de origen faríngeo y no faríngeo.

En los 20 aislamientos con fenotipo M de resistencia a macrólidos se detectó la presencia del gen *mefA* y no se detectaron los genes *ermB* o *ermTR*. En los 24 aislamientos con fenotipo MLS_B constitutivo se detectó la presencia del

TABLA 1. Evolución de los fenotipos de resistencia a macrólidos de *S. pyogenes*

| Año | Cepas | Resistencia a macrólidos | | Fenotipo M | | Fenotipo MLS _B constitutivo | | Fenotipo MLS _B inducible | |
|------|-------|--------------------------|------------|------------|-------------|--|-------------|-------------------------------------|-------------|
| | | Número | Porcentaje | Número | Porcentaje* | Número | Porcentaje* | Número | Porcentaje* |
| 1996 | 24 | 6 | 25 | 6 | 100 | | | | |
| 1997 | 87 | 13 | 15 | 13 | 100 | | | | |
| 1998 | 48 | 12 | 25 | 12 | 100 | | | | |
| 1999 | 106 | 39 | 36,8 | 37 | 94,8 | 1 | 2,6 | 1 | 2,6 |
| 2000 | 31 | 8 | 25,8 | 6 | 75 | 2 | 25 | | |
| 2001 | 47 | 16 | 34 | 10 | 62,5 | 6 | 37,5 | | |
| 2002 | 56 | 27 | 48,2 | 11 | 40,7 | 15 | 55,6 | 1 | 3,7 |
| 2003 | 81 | 22 | 27,1 | 9 | 40,9 | 9 | 40,9 | 4 | 18,2 |

*Porcentaje sobre el total de cepas resistentes.

TABLA 2. Valores de sensibilidad antibiótica de *S. pyogenes* (2002-2003)

| Antibiótico | Porcentaje de sensibilidad | NCCLS* (µg/ml) | CMI ₅₀ (µg/ml) | CMI ₉₀ (µg/ml) | Rango (µg/ml) |
|----------------|----------------------------|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| Penicilina | 100 | ≤ 0,12 | 0,008 | 0,012 | 0,002-0,012 |
| Claritromicina | 64,2 | ≤ 0,25 | 0,094 | > 256 | 0,032-> 256 |
| Clindamicina | 78,8 | ≤ 0,25 | 0,125 | > 256 | 0,064-> 256 |
| Linezolid | 100 | ≤ 2 | 0,750 | 1 | 0,5-1,5 |

*Valores de referencia de sensibilidad.

gen *ermB* y no se detectaron los genes *mefA* ni *ermTR*. De los cinco aislamientos con fenotipo de resistencia MLS_B inducible, en dos se detectó la presencia del gen *ermB*, en uno los genes *ermB* y *mefA* y en otros dos el gen *ermTR*. Todas las cepas con fenotipo M y presencia del gen *mefA* mostraron halos de inhibición frente a la estreptogramina B superiores a 19 mm. Los aislamientos con la presencia del gen *ermB* mostraron halos de inhibición con el disco de estreptogramina B inferiores a 16 mm, con independencia del fenotipo (MLS_B o MLS_B inducible). Las dos cepas que presentaban un fenotipo inducible y en las que se detectó el gen *ermTR* mostraron halos de estreptogramina B superiores a 19 mm.

Discusión

En España, la resistencia de *S. pyogenes* a macrólidos se ha relacionado de manera casi exclusiva con cepas del fenotipo M, como resultado de la expresión de la bomba de expulsión activa MefA^{1,6}. Sin embargo, nuestros datos muestran, un aumento importante de cepas resistentes a macrólidos con fenotipo MLS_B, a partir de 1999 mayoritariamente de tipo constitutivo, con presencia predominante del gen *ermB*, las cuales suponen el 21% del total de aislamientos y el 59% de las cepas resistentes de los últimos 2 años.

Estos resultados son equiparables a los observados en aislamientos pediátricos de *S. pyogenes* en Francia⁷, donde el aumento de cepas con el gen *ermB* (69,4% de las cepas resistentes a macrólidos) se relaciona con la cepa epidémica *emm28 T28*. Esta cepa epidémica ha sido también detectada recientemente en algunas zonas de nuestro país, asociada a resistencia a bacitracina⁸. Es probable que el incremento de cepas con fenotipo MLS_B (*ermB*) que hemos encontrado se deba en parte a la diseminación de este clon epidémico en nuestra área geográfica.

El fenotipo MLS_B inducible en *S. pyogenes* se ha asociado clásicamente al gen *ermTR*⁹. Sin embargo, en nuestro estudio el fenotipo inducible se relaciona indistintamente con los genes *ermTR* y *ermB*. Además, había relación entre el halo de inhibición del disco de estreptogramina B y el gen implicado en la resistencia de las cepas MLS_B inducibles. Así, las cepas con el gen *ermB* presentaron halos de inhibición inferiores a 19 mm, mientras que las cepas con el gen *ermTR* tuvieron halos superiores.

La situación descrita supone un importante cambio en los parámetros habituales de resistencia de *S. pyogenes* a macrólidos y lincosamidas, al haberse convertido el fenotipo MLS_B en predominante en los aislamientos pediátricos en nuestra zona geográfica durante los últimos 2 años estudiados. Un factor concomitante al aumento del fenotipo MLS_B es la diseminación de cepas resistentes a bacitracina, que puede dificultar la identificación presuntiva de *S. pyogenes*.

Los macrólidos de 16 átomos y la clindamicina constituían hasta ahora una alternativa eficaz en el tratamiento de infecciones producidas por cepas resistentes en pacientes alérgicos o intolerantes a betalactámicos, al mantener la actividad frente a cepas del fenotipo M. Sin embargo, el aumento del fenotipo MLS_B reduce drásticamente las posibilidades terapéuticas por vía oral.

En el actual contexto, linezolid podría ser una alternativa válida en el tratamiento por vía oral, debido a su buena actividad *in vitro*¹⁰.

Una característica destacable de las infecciones producidas por *S. pyogenes*, especialmente la faringoamigdalitis aguda, es que habitualmente el diagnóstico se realiza de forma clínica, sin cultivo bacteriano y, por tanto, el tratamiento es empírico. Esta circunstancia, unida a los cambios epidemiológicos descritos en los mecanismos de resistencia y la gran variabilidad geográfica de las tasas de resistencia a macrólidos, hace necesario incrementar la recogida de muestras para cultivo para conocer con mayor precisión la evolución de la sensibilidad antibiótica de este microorganismo y reducir la posibilidad de fracaso terapéutico. En nuestro caso será importante determinar si se mantiene la progresiva implantación del fenotipo MLS_B y la disminución relativa del fenotipo M o, por el contrario, se trata de variaciones circunstanciales y geográficamente limitadas.

Bibliografía

1. Cantón R, Loza E, Morisini MI, Baquero F. Antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* in the PROTEKT antimicrobial surveillance programme during 1999-2000. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50 Suppl 1:9-24.
2. Alós JI, Aracil B, Oteo J, Gómez-Garcés JL and the Spanish group for the study of infection in the primary health care setting (IAP-SEIMC). Significant increase in the prevalence of erythromycin-resistant, clindamicin- and miocamycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes* in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:333-7.
3. Seppälä H, Nissinen A, Yu Q, Houvinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother.* 1993;32:885-91.
4. Gené A, González-Cuevas A, Juncosa T, Luaces C, Latorre C. Sensibilidad antibiótica de *Streptococcus pyogenes* en pediatría. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1998;16:272-4.
5. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2562-6.
6. García de Lomas J, García-Rey C, López L, Gimeno C and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Susceptibility patterns of bacteria causing community-acquired respiratory infections in Spain: the SAUCE project. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50 Suppl. 2:21-6.
7. Bingen E, Bidet P, Mihaila-Amrouche L, Doit C, Forcet S, Brahimi N, et al. Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3559-62.
8. Pérez-Trallero E, García C, Orden B, Marimón JM, Montes M. Dissemination of *emm28* erythromycin-, clindamicin- and bacitracin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:123-6.
9. Seppälä H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:257-62.
10. Gemmell C. Susceptibility of variety of Clinical isolates to linezolid: a European inter-country comparison. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:47-52.