



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

Infecciones por variantes de colonia pequeña de *Staphylococcus aureus*: implicaciones clínicas y microbiológicas



Infections due to small colony variants of *Staphylococcus aureus*: clinical and microbiological implications

Fernando Chaves

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

Las variantes de colonia pequeña (VCP) se han descrito en una amplia variedad de géneros y especies bacterianas¹, entre ellos en algunos de los microorganismos más comúnmente implicados en infecciones comunitarias y hospitalarias, como son: *Staphylococcus aureus* (sensible y resistente a meticilina), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Neisseria gonorrhoeae*. Estas VCP han sido aisladas de una gran variedad de muestras clínicas, entre otras de exudados purulentos de infecciones de piel y tejidos blandos, particularmente abscesos, sangre, muestras óseas y articulares, y secreciones del tracto respiratorio. La ocurrencia de VCP en muchas especies bacterianas se interpreta como un mecanismo natural de supervivencia en determinadas circunstancias². Aun así, es importante reseñar que no se ha encontrado un mecanismo genético común que explique estos fenotipos especiales en especies diferentes.

Singularmente, las infecciones por VCP de *S. aureus* han sido las más frecuentemente descritas en la literatura científica y las más detalladamente estudiadas^{1–3}. Las VCP de *S. aureus* se caracterizan por su lento crecimiento y por la morfología puntiforme de las colonias en agar sangre, con ausencia o disminución de la pigmentación y de la beta-hemólisis¹. En algunos casos esta morfología puede coexistir con otra de apariencia normal, y también a veces las colonias pueden mostrar en placas de agar sangre un aspecto de «huevo frito». Además de estas características morfológicas, las VCP de *S. aureus* presentan frecuentemente una reducida actividad en algunas reacciones bioquímicas claves para la identificación de *S. aureus*, como son la actividad coagulasa y la utilización del manitol. Aunque diversas alteraciones en el metabolismo bacteriano pueden ser responsables del lento crecimiento y de las características de VCP, se han encontrado diferentes sustratos cuya suplementación en los medios de cultivo consigue la reversión a un crecimiento normal. Entre los más conocidos y estudiados están la hemina y la

menadiona, y también la timidina^{1,2}. Factores como la exposición continuada a los aminoglucósidos favorecen la selección de VCP de *S. aureus* dependientes de hemina y menadiona². En el modelo metabólico propuesto por Proctor et al.¹ los autores describen mutaciones en los genes *menD* y *hemB* que bloquean la biosíntesis de menaquinona, menadiona y hemina, componentes esenciales para la biosíntesis de citocromos, y que finalmente interfieren en el sistema de transporte de electrones. También se ha demostrado que la exposición continuada a trimetoprim-sulfametoxazol favorece la selección de VCP de *S. aureus* dependientes de timidina. Esta combinación interfiere en la síntesis del ácido tetrahidrofólico, que actúa como cofactor para la enzima timidilato sintasa, clave en la conversión de uracilo a timidina. Mutaciones puntuales, inserciones y deleciones localizadas en el gen *thyA* son responsables del fenotipo VCP de *S. aureus* dependiente de timidina^{4,5}. Además, se ha observado que estas variantes morfológicas son hipermutables, lo que puede favorecer la adquisición de resistencia y la persistencia⁶. Otros tipos de VCP que ocasionalmente han sido descritos son los VCP de *S. aureus* dependientes de CO₂⁷. Estos tipos de VCP reversion a un fenotipo normal cuando se incuban en una atmósfera enriquecida con CO₂. En general, este fenotipo es inestable y reierte a la normalidad después de sucesivos subcultivos. Aunque se sabe que el CO₂ es un estimulante no específico del crecimiento de *S. aureus*, se desconocen las bases genéticas de los VCP de *S. aureus* dependientes de CO₂. Aunque menos estudiados, existen otros mecanismos que conducen a la selección de VCP de *S. aureus*².

El artículo publicado en este número de la revista *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* contribuye a resaltar las implicaciones microbiológicas en el aislamiento e identificación de los VCP de *S. aureus*⁸. Los autores investigaron la presencia de VCP en las muestras clínicas recibidas durante un año. Se detectó una prevalencia global del 1%, y en pacientes de fibrosis quística, del 11%. El estudio microbiológico y molecular realizado en estos aislamientos clínicos fue minucioso, y se observó que en algunos medios de cultivo crecían estos VCP, pero en otros medios utilizados comúnmente en el laboratorio, como agar Mueller-Hinton y agar Mueller-Hinton con sangre, ni siquiera se obtenía crecimiento. Los autores también señalan el fracaso en la identificación con el

Correo electrónico: fernando.chaves@salud.madrid.org

sistema comercial utilizado y la dificultad en la interpretación de la sensibilidad o la resistencia a los antibióticos incluidos en dicho sistema. Existen estudios que han evaluado la utilización de diferentes medios de cultivo para el aislamiento e identificación de VCP de *S. aureus*⁹, y también de diferentes métodos para detectar la resistencia a meticilina¹⁰. Los autores de estos estudios señalan como medios más idóneos para el aislamiento agar Columbia con sangre y el medio cromogénico agar sangre ID (SAID). En cuanto a la detección de resistencia a meticilina, estos autores señalan que tanto los métodos de difusión como de microdilución pueden dar resultados de falsa sensibilidad a meticilina. En esos casos la detección mediante PCR del gen *mecA* o la detección de la proteína PBP2a, utilizando un elevado inóculo bacteriano, son los métodos más fiables para detectar resistencia a meticilina. Otros autores también recomiendan la incubación de alguno de los medios de cultivo en una atmósfera de CO₂, lo que favorecerá el crecimiento y permitirá detectar VCP de *S. aureus* dependientes de CO₂⁷. Desde el punto de vista microbiológico lo más importante es conocer la existencia de este tipo de variantes. Esto aumentará el índice de sospecha de la presencia de VCP de *S. aureus* y ayudará a solventar las dificultades en la identificación e interpretación de la sensibilidad a los antimicrobianos.

Aunque se han aislado VCP de *S. aureus* en muy diversas muestras clínicas correspondientes a una gran variedad de infecciones, hay una serie de situaciones clínicas donde se han descrito con mayor frecuencia. Entre estas situaciones clínicas se encuentran las infecciones respiratorias de los pacientes con fibrosis quística^{1,11}, las infecciones osteoarticulares^{1,12} y las infecciones relacionadas con dispositivos^{1,13-15}. Un factor común de estas infecciones es la relación entre la presencia de VCP de *S. aureus* y la persistencia y recurrencia de las infecciones¹¹⁻¹⁶. La emergencia de infecciones por VCP de *S. aureus* en pacientes con fibrosis quística está muy relacionada con el tratamiento prolongado con trimetoprim-sulfametoxazol^{1,2,17}. Estudios realizados en Europa indican que la prevalencia de colonizaciones/infecciones por VCP de *S. aureus* en pacientes con fibrosis quística oscila entre el 8 y el 33%^{11,18}. Un estudio reciente realizado en pacientes con fibrosis quística en Estados Unidos detectaba una prevalencia de VCP del 24%, y una de las conclusiones de más impacto era la asociación de la presencia de estas VCP de *S. aureus* con una peor evolución en la función pulmonar¹⁷. Esta asociación persistía después de controlar variables como la colonización por *P. aeruginosa* o por *S. aureus* resistente a meticilina. En cuanto a la osteomielitis, varios investigadores han demostrado la relación entre la exposición a gentamicina u otros aminoglucósidos, mediante el uso de sistemas de liberación controlada del antibiótico en la zona infectada, y la emergencia de VCP de *S. aureus*^{1,12}.

Existen múltiples factores en las infecciones por VCP de *S. aureus* que eventualmente pueden condicionar la respuesta al tratamiento antimicrobiano. En primer lugar es importante tener en cuenta que *S. aureus* no es únicamente un patógeno extracelular, sino también intracelular, pudiendo entrar y persistir en células fagocíticas no profesionales como células endoteliales y epiteliales, fibroblastos, y osteoblastos¹. Un estudio reciente demostraba que las VCP de *S. aureus* invadían de forma muy eficiente las células endoteliales, lo que se atribuyó a la elevada expresión de la adhesina FnBPA (proteína de unión a fibronectina A), y que una vez que estas VCP se localizaban intracelularmente, evitaban la activación del sistema de inmunidad innata del huésped y no destruían las células durante su persistencia¹⁹. Así, estas VCP son capaces de persistir dentro de las células eucariotas, lo que las protege del sistema defensivo del huésped y de los antibióticos. Además, algunas de las características de las VCP, como son una actividad metabólica reducida y un lento crecimiento, pueden reducir la efectividad de algunos antimicrobianos, como por ejemplo las de los que actúan sobre la pared bacteriana¹. También, las dificultades de crecimiento y los

requerimientos nutricionales de estas VCP no permiten muchas veces interpretar adecuadamente los resultados de sensibilidad a los antimicrobianos de acuerdo con los criterios establecidos por las agencias internacionales. En este sentido, no existen recomendaciones específicas para este tipo de VCP de *S. aureus*. Por otra parte, la interrupción del transporte de electrones que se produce en los VCP reduce la entrada de antibióticos como gentamicina y otros aminoglucósidos. Por ello, se recomienda no utilizar estos antibióticos en el tratamiento de las infecciones por VCP^{1,3}. Además, se conoce que la exposición continuada a gentamicina y antifolatos, y probablemente a otros antibióticos, contribuye a seleccionar VCP de *S. aureus*. Todos estos factores limitan las opciones de tratamiento, al menos para las infecciones persistentes por VCP. No existen estudios clínicos prospectivos que demuestren cuál es la terapia óptima para estas infecciones, y además las revisiones realizadas recientemente sobre la actividad de los agentes antimicrobianos contra los VCP no muestran recomendaciones precisas sobre cuál es el mejor régimen de tratamiento²⁰. Basado en el conocimiento de que las VCP pueden persistir intracelularmente, una recomendación clara es la utilización de antibióticos con actividad antiestafilocócica intracelular como es la rifampicina³. La utilización de este antibiótico en monoterapia genera rápidamente resistencias, por lo que se recomienda su asociación con otro antibiótico, por ejemplo con un betalactámico para el tratamiento de VCP de *S. aureus* sensible a meticilina o con vancomicina para los resistentes a meticilina³. También se recomienda la combinación de rifampicina con una fluoroquinolona¹⁵, aunque esta pauta podría ser inadecuada al menos para el tratamiento de *S. aureus* resistente a meticilina, que con frecuencia presenta resistencia a fluoroquinolonas. De cara al tratamiento, es necesario considerar si existen mecanismos o condiciones que generan estas subpoblaciones de VCP, si coexisten diferentes tipos de subpoblaciones bacterianas en el foco de infección, cuál es la mejor combinación de antibióticos, y determinar nuevas estrategias de tratamiento que eventualmente puedan evitar no solo el desarrollo de resistencias sino también de subpoblaciones de VCP de *S. aureus*²¹.

Financiación

Financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III - FEDER, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD12/0015/0009).

Agradecimientos

Mi agradecimiento al Dr. Joaquín R. Otero por la revisión del artículo.

Bibliografía

- Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:295-305.
- Kahl BC. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* — A bacterial survival strategy. *Infect Genet Evol*. 2013. doi:pii: S1567-1348(13)00205-0. 10.1016/j.meegid.2013.05.016.
- Von Eiff C. *Staphylococcus aureus* small colony variants: A challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:507-10.
- Besier S, Ludwig A, Ohlsen K, Brade V, Wichelhaus TA. Molecular analysis of the thymidine-auxotrophic small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2007;297:217-25.
- Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimann N, Proctor RA, et al. In vivo mutations of thymidylate synthase (encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2008;190:834-42.
- Besier S, Zander J, Kahl BC, Kraiczky P, Brade V, Wichelhaus TA. The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2183-9.

7. Gómez-González C, Acosta J, Villa J, Barrado L, Sanz F, Orellana MA, et al. Clinical and molecular characteristics of infections with CO₂-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2010;48:2878–84.
8. Delgado-Valverde M, Fernández-Echauri P, Batista-Díaz N, Pascual-Hernández N. Variantes pequeñas de *Staphylococcus aureus*: utilidad de distintas pruebas para su diagnóstico y estudio de sensibilidad. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014;32:96–8.
9. Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, et al. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. J Clin Microbiol. 2005;43:1956–9.
10. Kipp F, Becker K, Peters G, von Eiff C. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2004;42:1277–9.
11. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 1998;177:1023–9.
12. Von Eiff C, Bettin D, Proctor RA, Rolauffs B, Lindner N, Winkelmann W, et al. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. Clin Infect Dis. 1997;25:1250–1.
13. Seifert H, Wisplinghoff H, Schnabel P, von Eiff C. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* and pacemaker-related infection. Emerg Infect Dis. 2003;9:1316–8.
14. Von Eiff C, Becker K. Small-colony variants (SCVs) of staphylococci: A role in foreign body-associated infections. Int J Artif Organs. 2007;30:778–85.
15. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. Clin Infect Dis. 2006;43:961–7.
16. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 1995;20:95–102.
17. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin X, Cochrane E, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. Clin Infect Dis. 2013;57:384–91.
18. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect. 2013;19:77–84.
19. Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. J Infect Dis. 2010;202:1031–40.
20. Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, et al. Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of in vitro, animal and clinical data. J Antimicrob Chemother. 2013;68:1455–64.
21. Imamovic L, Sommer MO. Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development. Sci Transl Med. 2013;5:204ra132, <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3006609>.