

Hugo Edgardo Villar
Mónica Beatriz Jugo

Emergencia de *Streptococcus agalactiae* con resistencia de alto nivel a gentamicina y estreptomycin en Buenos Aires, Argentina

Departamento de Bacteriología Clínica, Laboratorio Hidalgo, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Introducción. *Streptococcus agalactiae* es responsable de infecciones en neonatos, gestantes, puérperas y adultos con enfermedad de base predisponente. En infecciones con riesgo de vida se recomienda la penicilina (PEN) o ampicilina en combinación con gentamicina (GEN). La resistencia de alto nivel (RAN) a los aminoglucósidos se asocia a una pérdida del efecto sinérgico bactericida de la combinación con un betalactámico. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la prevalencia de RAN a GEN y estreptomycin (EST) y establecer la utilidad de los discos de alta carga y las placas de corte para su detección.

Métodos. El estudio se realizó con 141 cepas únicas de *S. agalactiae* aisladas de muestras vaginales o rectales de embarazadas a término. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a GEN y EST con el método Etest y se obtuvo el halo de inhibición con discos de GEN 120 µg y EST 300 µg. Se utilizaron placas de corte con GEN 100 mg/L, GEN 500 mg/L y EST 2000 mg/L para detectar la RAN.

Resultados. La prevalencia de RAN fue 13,5% a GEN, 16,3% a EST y del 7,8% en forma simultánea. Las cepas con ausencia de halos en el disco de alta carga de GEN y EST tuvieron una CMI ≥ 512 mg/L y ≥ 1024 mg/L. Las cepas con halos ≥ 13 mm a GEN y EST mostraron una CMI ≤ 64 mg/L y ≤ 512 mg/L respectivamente. En estos aislamientos las placas de corte fueron negativas. La RAN a aminoglucósidos se asoció (83,9%) con resistencia a eritromicina y/o clindamicina.

Conclusiones. Destacamos la emergencia de cepas con RAN a los aminoglucósidos. El empleo de discos de alta carga y placas de corte de manera similar a *Enterococcus* spp. es una estrategia sencilla y aplicable a *S. agalactiae*.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*; resistencia; gentamicina; estreptomycin.

Correspondencia:
Hugo Edgardo Villar
Departamento de Bacteriología Clínica, Laboratorio Hidalgo.
Ladislao Martínez 43 B1640EYA Martínez, Buenos Aires, Argentina
011 4898-5300
E-mail: hugo.villar@laboratoriohidalgo.com

Emergence of high-level resistance to gentamicin and streptomycin in *Streptococcus agalactiae* in Buenos Aires, Argentina

ABSTRACT

Introduction. *Streptococcus agalactiae* has become recognized as a cause of serious illness in newborns, pregnant women, and adults with chronic medical conditions. Optimal antimicrobial therapy for serious infections requires the use of synergistic combinations of a cell wall-active agent, such as a penicillin, with an aminoglycoside, which results in bactericidal activity against this organism. The synergistic effect is eliminated by the acquisition of high-level resistance (HLR) to aminoglycosides. The aim of our study was to determine the prevalence of HLR to gentamicin (GEN) and streptomycin (EST). The ability to detect HLR using a standard agar screen plate and high-content discs was investigated.

Methods. This study was conducted with 141 strains of *S. agalactiae* isolated from vaginal and rectal swabs of pregnant women at term. Minimum inhibitory concentrations (MICs) to GEN and STR were determined by the E-test method. Disks of GEN (120 µg) and STR (300 µg) were used to detect HLR. Agar screening plates were performed with GEN 100 mg/L, GEN 500 mg/L and STR 2000 mg/L.

Results. The HLR to GEN and STR was detected in 13.5% and 16.3% of the isolates respectively. Among 141 strains, 7.8% were simultaneously resistant to GEN and STR. With 120-µg GEN and 300-µg STR disks, strains for which MICs were ≥ 512 mg/L and ≥ 1024 mg/L had no zones of inhibition. Isolates with inhibitory zones for GEN and STR of ≥ 13 mm showed a MICs ≤ 64 mg/L and ≤ 512 mg/L. All the screening plates were negative for these isolates. HLR to aminoglycosides was associated (83.9%) with resistance to erythromycin and/or clindamycin.

Conclusions. This study highlights the emergence of strains with HLR to aminoglycosides. The disk-agar diffusion test performed with high-content aminoglycoside disks and screening plates can provide laboratories with a convenient and reliable method for detecting *S. agalactiae* isolates that

are resistant to aminoglycoside–beta-lactam synergy.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*; resistance; gentamicin; streptomycin.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus agalactiae es una de las principales causas de infecciones severas en neonatos la cual se manifiesta en forma de neumonía, sepsis o meningitis^{1,2}. En gestantes y púerperas es responsable de infecciones como corioamnionitis, endometritis postparto, infección de la herida quirúrgica tras cesárea e infección del tracto urinario. Fuera del período postparto la mayoría de las infecciones en adultos se dan en pacientes con enfermedades predisponentes^{3,4}. En la actualidad se observa que la amplia mayoría de las infecciones invasivas se producen en adultos mayores de 18 años y también resulta llamativo que presenta una mayor mortalidad respecto de *Streptococcus pyogenes*^{5,6}.

La penicilina (PEN) o ampicilina continúan siendo las drogas de elección para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por *S. agalactiae*. En infecciones severas se recomienda la utilización de un aminoglucósido, habitualmente gentamicina (GEN), para lograr un efecto sinérgico bactericida. La resistencia de alto nivel (RAN) a GEN y a la estreptomycin (EST) se asocia a una pérdida del efecto sinérgico bactericida de la combinación con un betalactámico. La prevalencia de *S. agalactiae* con RAN a los aminoglucósidos es baja y solo ha sido detectada ocasionalmente⁷⁻¹⁰.

En un trabajo reciente observamos una alta prevalencia de resistencia a eritromicina (27,5%), clindamicina (30,3%) y levofloxacin (5,6%) en aislados de *S. agalactiae* provenientes de muestras vaginales y rectales de embarazadas a término¹¹. Todos los aislamientos fueron sensibles a PEN pero algunos ocasionalmente estudiados presentaron ausencia de halo de inhibición con discos de GEN 30 µg. Esta situación nos llevó a reevaluar ese grupo de cepas con el objetivo de determinar el estado actual de la RAN a los aminoglucósidos, comprobar la utilidad de las placas de corte y de los discos de alta carga de GEN y EST que se emplean habitualmente en la detección de la RAN en *Enterococcus* spp.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó con 142 cepas únicas de *S. agalactiae* aisladas consecutivamente de hisopados vaginales o rectales de mujeres embarazadas con edad gestacional de 35 a 37 semanas. Los aislamientos fueron conservados en viales VIABANK (Medical Wire & Equipment, Corsham, Wiltshire. UK.) y, en el momento de realizar el estudio, se subcultivaron en medio cromogénico chrom ID Strepto B (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las colonias que no presentaron color rojo ladrillo luego de 48 h de incubación fueron descartadas. Se reconfirmó la identificación por métodos convencionales en los aislamientos resistentes.

Se determinó el halo de inhibición frente a discos de eritromicina 15 µg, clindamicina 2 µg, GEN 120 µg y EST 300 µg

(Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) utilizando placas de Agar Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) con incubación a 35°C en 5% de CO₂ durante 24 h. La interpretación de los halos de inhibición para eritromicina y clindamicina se realizó según los criterios del CLSI¹². La caracterización fenotípica de la resistencia a macrólidos se realizó mediante la técnica de difusión por doble disco. El fenotipo MLSb-C (constitutivo) se definió como resistencia a eritromicina y clindamicina. La resistencia a eritromicina y el achatamiento del halo de clindamicina en forma de "D" en su zona próxima al disco de eritromicina se definió como fenotipo MLSb-I (inducible). La cepas resistentes a eritromicina y sensibles clindamicina sin modificación de halo se clasificaron como fenotipo M y las sensibles a eritromicina con resistencia a clindamicina como fenotipo L. Se obtuvo el valor de la CMI a GEN y EST con tiras Etest (AB Biodisk, Solna, Suecia) en iguales condiciones que el método de difusión y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizaron placas de corte inoculando 10 µl de una suspensión 0,5 McFarland de cada cepa en agar infusión cerebro corazón con GEN 100 mg/L y 500 mg/L y EST 2000 mg/L. Se consideró positivo al desarrollo de al menos 1 colonia luego de 24 h de incubación a 35°C en aerobiosis para placas con GEN y de 48 h de incubación para EST.

RESULTADOS

Se recuperaron 141 de las 142 cepas después de estar conservadas dos meses a -20°C en el sistema VIABANK. En 110 (78,0%) se observó ausencia de RAN (S) a GEN y EST mientras que 31 (22,0%), presentaron RAN al menos a uno de los aminoglucósidos. Analizando este grupo de 31 cepas se encontraron 8 RAN GEN-EST S, 12 GEN S- RAN EST y 11 RAN GEN y EST. De esta manera la prevalencia de RAN fue 13,5% a GEN, 16,3% a EST y del 7,8% en forma simultánea. En las tablas 1 y 2 se muestra la correlación de la CMI, los halos de inhibición con los discos de alta carga y las placas de corte. Se encontró una distribución bimodal para ambos aminoglucósidos. Las cepas con ausencia de halo en el disco de alta carga de GEN y EST tuvieron una CMI ≥ 512 mg/L y ≥ 1024 mg/L. Las cepas con halos ≥ 13 mm a GEN mostraron una CMI ≤ 64 mg/L y placa de corte negativa. Las aislamientos con halos ≥ 13 mm a STR correlacionaron con placa de corte negativa y CMI ≤ 512 mg/L. En el grupo de 31 cepas con RAN a GEN y/o EST se encontraron 26 (83,9%) con resistencia a eritromicina y/o clindamicina (21 MLSb C, 2 MLSb I y 3 L). Entre los 110 aislados sin RAN a aminoglucósidos solo 17 (15,5%) fueron resistentes a eritromicina y/o clindamicina (13 MLSb C, 3 MLSb I y 1 L).

DISCUSIÓN

En la última década se ha producido un incremento de infecciones invasivas por *S. agalactiae* en adultos con enfermedades predisponentes¹³⁻¹⁴. La PEN o la ampicilina son drogas de elección mientras que para infecciones invasivas se recomienda el agregado de un aminoglucósido como GEN. La RAN a los ami-

Tabla 1 Correlación de halos de inhibición obtenidos con discos de gentamicina 120µg, la concentración mínima inhibitoria y la placa de corte en 141 aislamientos de *S. agalactiae*

Aislamientos <i>S. agalactiae</i> (n)	Difusión por discos (mm) GEN 120 µg	CMI por Etest (mg/L) GEN	Placa de corte (mg/L)	
			GEN 100	GEN 500
19	6	512- ≥ 1024	+	+
0	7- 9	SA	SA	SA
0	10-12	SA	SA	SA
24	13-15	32-64	-	-
98	≥ 16	4-64	-	-

SA: Sin aislamientos; CMI: concentración mínima inhibitoria; GEN: gentamicina.

Tabla 2 Correlación de halos de inhibición obtenidos con discos de estreptomina 300µg, la concentración mínima inhibitoria y la placa de corte en 141 aislamientos de *S. agalactiae*

Aislamientos <i>S. agalactiae</i> (n)	Difusión por discos (mm) EST 300µg	CMI por Etest (mg/L) EST	Placa de corte (mg/L)
			EST 2000
23	6	≥ 1024	+
0	7- 9	SA	SA
0	10-12	SA	SA
29	13-15	128-512	-
89	≥ 16	16-256	-

SA: Sin aislamientos; CMI: concentración mínima inhibitoria; EST: estreptomina.

noglucoídos anula el efecto sinérgico en la combinación con un antibiótico betalactámico. En este estudio observamos una alta prevalencia de RAN a GEN (13,5%) a EST (16,3%) y 7,8 % para ambos. No encontramos en la literatura trabajos con esta prevalencia a excepción de lo publicado por Poyart et al. con un 9,7 % de RAN a EST¹⁵. Al disponer de aislamientos resistentes pudimos comprobar el excelente desempeño de los discos de GEN 120 µg, EST 300 µg aplicando los puntos de corte utilizados para *Enterococcus* spp. Sin embargo, no encontramos cepas con CMIs a GEN entre 128 a 256 mg/L por lo que no podemos asegurar la utilidad del disco de GEN 120 µg en estos casos. Lopardo et al. detectan en un aislamiento el gen *aac6/aph2* con CMI 128 mg/L a GEN, ausencia de sinergia en curvas de letalidad y 10 mm de halo en GEN 120 µg (sensible para sinergia). Para estos casos recomiendan el uso del disco de kanamicina 1000µg⁹. Grandlund et al. en cepas con CMI a GEN entre 32 y 128 mg/L también encuentran de utilidad este disco aunque no informan el resultado del disco de gentamicina 120 µg¹⁶.

En los aislamientos con RAN a los aminoglucoídos observamos resistencia asociada a macrólidos y lincosamidas en 83,9 % en comparación al 15,5 % en las cepas sin RAN. Es necesario realizar nuevos estudios para caracterizar los mecanismos de resistencia en estas cepas y probar si las resistencia a aminoglucoídos, macrólidos y lincosamidas están genéticamente vinculadas como ha sido descrito en *Enterococcus* spp.^{17,18}.

En conclusión consideramos que la RAN a los aminoglucoídos encontrada en este trabajo resulta preocupante y obliga a realizar la detección en todas las cepas provenientes de procesos infecciosos. La utilización de discos de alta carga o la placa de corte es una metodología sencilla y aplicable para *S. agalactiae*.

BIBLIOGRAFÍA

1. McCracken GH Jr. Group B streptococcus: the new challenge in neonatal infections. *J Pediatr* 1973; 82:703-6.
2. Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics* 2005; 116:595-02.
3. Skoff TH, Farley MM, Petit S et al. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 85-92.
4. Edwards MS, Baker CJ. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 839-47.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core surveillance report, Emerging Infections Program Network, group B Streptococcus. 2010. Disponible en: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs10.html>.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core surveillance report, Emerging Infections Program Network, group A Streptococcus. 2007. Disponible en: <http://www.cdc.gov/abcs/>

reports-findings/survreports/gas10.html.

7. Buu-Hoi A, Le Bouguenec C, Horaud T. High-level chromosomal gentamicin resistance in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:985-88.
8. Liddy H, Holliman R. Group B *Streptococcus* highly resistant to gentamicin. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:142-3.
9. Lopardo HA, Vidal P, Jeric P, Centron D, Paganini H, Facklam RR, et al. Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4688-94.
10. Kaufhold A, Podbielski A, Horaud T, Ferrieri P. Identical genes confer high-level resistance to gentamicin upon *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1215-8.
11. Villar HE, Jugo MB, Estevez R, Baserni MN. Elevada prevalencia de *Streptococcus agalactiae* resistente a eritromicina, clindamicina y fluoroquinolonas en Buenos Aires, Argentina. *Rev Panam Infectol*. En prensa
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement, M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
13. Lambertsen L, Ekelund K, Skovsted IC, Liboriussen A, Slotved HC. Characterization of invasive group B streptococci from adults in Denmark 1999 to 2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1071-77.
14. Phares CR, Lynfield R, Farley MM e Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 2008; 299: 2056-65.
15. Poyart C, Jardy L, Quesne G, Berche P, Trieu-Cuot P. Genetic Basis of Antibiotic Resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 794-7.
16. Granlund M, Axemo P, Bremme K, Bryngelsson AL, Carlsson Wallin M, Ekström CM et al. Antimicrobial resistance in colonizing Group B *Streptococci* before implementation of a Swedish intrapartum antibiotic prophylaxis program. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010 29:1195-201.
17. Bonafede ME, Carias LL, Rice LB. Enterococcal transposon Tn5384: evolution of a composite transposon through cointegration of enterococcal and staphylococcal plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1854-8.
18. Rice LB, Carias LL, Marshall SH. Tn5384, a composite enterococcal mobile element conferring resistance to erythromycin and gentamicin whose ends are directly repeated copies of IS256. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1147-53.