

Estudio de sensibilidad de 115 cepas de *Streptococcus agalactiae* a distintos antimicrobianos de uso clínico

Truppia, Luis; Mollerach, Analía; Perisutti, Rosana; Mendosa, Alejandra; Méndez, Emilce

Hospital "Dr. José María Cullen". Av. Freyre 2150. Santa Fe (3000). Argentina. Emilce Méndez. Riobamba 6647. Teléfono: 0342-4607457. e-mail: emilmen@arnet.com.ar

RESUMEN: *Streptococcus agalactiae* ha adquirido gran importancia en los últimos años como agente etiológico de infecciones serias. El objetivo fue evaluar la sensibilidad de 115 cepas a 9 antibióticos de uso clínico.

Las cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas y se determinó la sensibilidad por el método de dilución en agar (NCCLS) a penicilina, ampicilina, cefotaxima, eritromicina, claritromicina, levofloxacina, vancomicina y gentamicina.

El fenotipo de resistencia a eritromicina y clindamicina fue evaluado por la prueba de difusión con doble discos utilizándose clindamicina 2 mg y eritromicina 15 mg

Los antibióticos beta-lactámicos mostraron buena actividad, con valores similares de MIC_{50} .

Seis cepas fueron resistentes a eritromicina de las cuales dos también lo fueron a clindamicina; estas dos últimas indicarían más de un mecanismo de resistencia. Las restantes hacen pensar en la presencia de bombas de eflujo

Todo las cepas fueron sensibles a vancomicina y levofloxacina, excepto una sola cepa que mostró sensibilidad disminuida al último antibiótico.

Palabras claves: *Streptococcus agalactiae* - sensibilidad - Betalactámicos - Eritromicina.

SUMMARY: Susceptibility of 115 strain of *Streptococcus agalactiae* to different clinical antimicrobials agents. Truppia, Luis; Mollerach, Analía; Perisutti, Rosana; Mendosa, Alejandra; Méndez, Emilce. *Streptococcus agalactiae* has great importance acquired in the last year as etiological agent of serious infections. The objective was evaluate the susceptibility of 115 strains to 9 antibiotics. They were identified by biochemical test and the susceptibility to penicillin, ampicillin, cefotaxime, erythromycin, clarithromycin, levofloxacin, vancomycin and gentamicin was determined by the agar dilution method (NCCLS).

The erythromycin and clindamycin phenotypic resistance was evaluated by the double disk diffusion test, using clindamycin 2 mg and erythromycin 15 mg disks.

The beta-lactam antibiotics showed good activity, with similar MIC_{50} values.

Six strains were resistant to erythromycin and two of them showed resistance to clindamycin, what could indicate in these last two strains more than one resistance mechanism. The other erythromycin resistant strains suggest the presence of resistance by efflux mechanism.

All the strains were susceptible to vancomycin and levofloxacin, except one strain that showed intermediate sensibility to the last antibiotic.

Key words: *Streptococcus agalactiae* - Susceptibility - beta-lactam - Eritromycin.

Introducción

Streptococcus agalactiae pertenece al grupo B (SGB) de la clasificación de Lancefield; son diplococos gram positivos facultativos, catalasa negativa y presentan una zona de b-hemólisis aunque entre el 1 y 2 % de las cepas son no hemolíticas

Se lo aisló por primera vez en bovinos con mastitis y pérdida de la capacidad de producir leche, hecho del cual deriva su nombre. (1)

Lancefield y Hare habían identificado este microorganismo en cultivos vaginales de mujeres puerperales asintomáticas pero recién en 1935 fue reportado como patógenos humano por Fry, quien

describió tres casos de sepsis puerperal fatal. Sin embargo, la infección humana por SGB no fue comunicada con mucha frecuencia hasta principios de 1970 cuando comenzaron a tomar importancia convirtiéndose en una causa común de infección en mujeres que atravesaban el puerperio y en neonatos febriles. (1, 2).

La colonización de las mucosas de los neonatos es consecuencia de la transmisión vertical de la bacteria desde la madre, ya sea en el interior del útero por vía ascendente o en el momento del parto, lo que provoca una infección neonatal de comienzo precoz, cuyas principales manifestaciones clínicas son bacteriemia (50%), neumonía (35%) y meningi-

tis (15%). Se han documentado varios factores que aumentan la incidencia de la invasión rápida de estos microorganismos en niños nacidos de madres colonizadas, tales como la ruptura de las membranas más de 18 horas antes del parto, nacimientos múltiples, ruptura prematura de membrana antes de transcurridas 37 semanas del embarazo y la presencia de fiebre o amnionitis materna. (1, 2).

Además de la adquisición en el momento del nacimiento, se ha observado que la transmisión horizontal (nosocomial) del germen contribuye al índice de colonización de los niños en algunas de las salas neonatales originando una infección neonatal tardía la cual se manifiesta entre los 7 días y los 3 meses, con una edad media de comienzo de 24 días. Los síntomas son inespecíficos como letargo, problemas de alimentación, irritabilidad; en general se asocian con fiebre de 38°C y en algunos casos también osteomielitis ó infecciones articulares. (1, 2, 3) Estos niños pueden presentar un cuadro fulminante con un alto riesgo de muerte o secuelas neurológicas permanentes; un tercio de los pacientes cursan con ceguera, sordera, o un retraso global del desarrollo mientras que en el resto de los casos el déficit neurológico es menos pronunciado y sólo pueden detectarse mediante una evaluación cuidadosa del lenguaje y de las funciones intelectuales. (1, 3) Este microorganismo es causa también de infecciones postparto, ocasionando en un 20% endometritis post parto, 25% de bacteriemias luego de la cesárea y entre 25-30% de bacteriuria asintomática durante el curso de la gestación.

En teoría la quimioprofilaxis podría estar destinada a las mujeres durante el embarazo y en el momento del parto o a los neonatos al nacer. Esto último se debe a que la terapéutica antimicrobiana durante el embarazo no logra erradicar la colonización por SGB en el momento del parto en casi un 70% de las mujeres. Se ha logrado interrumpir la transmisión vertical por parte de madres colonizadas por SGB mediante la administración de ampicilina intravenosa durante el trabajo de parto siendo también un método eficaz para la prevención de la sepsis neonatal de aparición temprana y la morbilidad febril materna postparto. (1, 3)

Los adultos con bacteriemia no relacionada con el embarazo generalmente son personas de edad avanzada, aunque el espectro etario abarca desde

los 18 a los 99 años con un promedio de 67 años registrándose la mayoría de los casos en hombres. La incidencia aumenta con la edad y es mayor en la raza negra. (1) Las patologías predisponentes son diabetes mellitus, inmunocomprometidos, HIV, neoplasias, cirrosis alcohólica, falla renal y enfermedades pulmonares y cardiovasculares. (1, 2)

Los SGB son uniformemente sensibles in vitro a las penicilinas, siendo la penicilina G el fármaco de elección una vez establecido el diagnóstico de certeza. Estos microorganismos también muestran sensibilidad in vitro a ampicilina, vancomicina, teicoplanina, y cefalosporinas de primera, segunda (excepto cefoxitina) y tercera generación incluyendo los agentes orales cefixima y cefpodoxima, aunque en grados diversos. Imipenem tiene buena actividad tanto in vivo como in vitro. Ciprofloxacina ejerce una actividad moderada in vitro pero no ha sido evaluada para establecer su eficacia in vivo. Los macrólidos y clindamicina son alternativas útiles en pacientes alérgicos a antibióticos betalactámicos, sin embargo la aparición de cepas resistentes hace necesario evaluar la sensibilidad a los mismos. (1)

Los SGB son uniformemente resistentes a ácido nalidixico, trimetoprima-sulfametoxazol, metronidazol y aminoglucósidos. La administración inicial de ampicilina más un aminoglucósido en caso de bacteriemia o meningitis neonatal presuntamente causada por SGB se basa en una acción bactericida sinérgica in vitro e in vivo contra estos microorganismos y en la importancia de instaurar un tratamiento antibiótico de amplio espectro antes de contar con un diagnóstico de certeza. Una vez establecido el diagnóstico de laboratorio y documentada la respuesta clínica, el tratamiento puede completarse con penicilina G exclusivamente. (1)

Se han descrito SGB tolerantes a penicilina que serían responsables, junto al elevado inóculo bacteriano, de fracasos terapéuticos en meningitis neonatal. (4-7)

Sin embargo el uso ampliamente difundido de la quimioprofilaxis intraparto ha provocado el desarrollo de cepas con sensibilidad intermedia tanto a penicilina como a ampicilina, motivo por el cual surge la necesidad de estudiar su comportamiento frente a distintos antibióticos. (8, 9)

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad in vitro de SGB a distintos antimicrobianos de uso clínico.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 115 cepas de SGB provenientes de diversas muestras clínicas (orina, sangre, heridas y exudado vaginal) en el período comprendido entre marzo de 1999 a noviembre de 2000.

Los microorganismos fueron identificados presuntivamente por las siguientes pruebas bioquímicas: coloración de Gram y agrupación en caldo, presencia o ausencia de hemólisis beta en agar sangre de camero al 5%, reacción de pirrolidónil-aril-amidasa (PYR), hidrólisis del hipurato de sodio, resistencia a bacitracina 0,04 UI, hidrólisis de bilis esculina y se confirmaron serológicamente por test de aglutinación con partículas de latex.

Pruebas de sensibilidad: se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en agar enriquecido con sange de camero al 5% incubándose a 35°C durante 24 hs. en atmósfera de dióxido de carbono al 5%, de acuerdo con las

recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)(10). Los antimicrobianos ensayados fueron: penicilina, ampicilina, cefotaxima, eritromicina, claritromicina, levoflo-xacina, vancomicina, y gentamicina. Cepas control: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Determinación de la resistencia fenotípica a eritromicina: El estudio se realizó mediante el test de difusión con doble disco, utilizando eritromicina (15 mg) y clindamicina (2 mg) a una distancia de 20 mm en placas de agar sangre de camero al 5 %, incubándose a 35°C durante 24 hs. en una atmósfera de dióxido de carbono del 5%. (11)

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados, CIM₅₀, CIM₉₀ y rango de las 115 cepas de SGB estudiadas

Antibióticos	Rango (µg/ml)	Cim (µg/ml)	Cim (µg/ml)	Modo (µg/ml)	Nº (%) Cepas		
					Sensible	Intermedia	Resistente
Penicilina	0,015-0,5	0,015	0,06	0,015	109 (94,8%)	6 (5,2%)	-
Ampicilina	0,015-1	0,06	0,12	0,06	111 (96,5%)	4 (3,5%)	-
Cefotaxima	0,03-0,25	0,03	0,12	0,03	115 (100%)	-	-
Eritromicina	0,015-8	0,03	0,25	0,03	105 (91,3%)	4 (3,5%)	6 (5,2%)
Claritromicina	0,015-4	0,03	0,06	0,015	112 (97,4%)	1 (0,9%)	2 (1,7%)
Levofloxacin	0,25-4	1	2	1	114 (99,1%)	1 (0,9%)	-
Vancomicina	0,12-0,5	0,25	0,5	0,25	115 (100%)	-	-
Gentamicina	32-1024	256	512	64	-	-	115 (100%)

Todas las cepas fueron sensibles a penicilina G, ampicilina y cefotaxima; 6 cepas (5,2 %) y 4 cepas (3,5 %) presentaron sensibilidad intermedia a penicilina G y a ampicilina respectivamente.

Los valores de CIM₉₀ para estos antibióticos fueron de 0,06 mg/ml para Penicilina G y de 0,12 mg/ml para ampicilina y cefotaxima; los cuales concuerdan con los expuestos por Betriu et al (12), Fernández et al (13) y Famiglietti et al(14), aunque estos últimos informan una CIM₉₀ inferior en una dilución en relación a nuestros datos.

Respecto de las cepas intermedias, nuestros resultados se muestran inversos a los comunicados por Betriu et al que reporta valores del 8 % y 2 % para ampicilina y penicilina G respectivamente; y se distancian significativamente de los expuestos por Liu et a (15), el cual sobre 32 cepas estudiadas en el período 93-94, reporta un valor de sensibilidad intermedia para penicilina G del 15,6 %.

Seis aislamientos (5,2 %) fueron resistentes a eritromicina, lo que concuerda con Betriu et al, Fernández et al y Ruess et al (16), pero resultaron

superiores a los hallados por Aitmand et al, 1,7% (17) y muy inferiores a los obtenidos por Pearlman et al, 16 % (18); Mcgavil et al, 17,8 % (9); Morales et al, 18% (19); Vermillion et al, 19 % (20) y Rouse et al, 22% (21).

Dos de las 6 cepas resistentes a eritromicina mostraron resistencia simultánea a claritromicina y sensibilidad intermedia tanto a penicilina G como a ampicilina.

En cuanto al estudio fenotípico, hubo correspondencia para eritromicina entre las pruebas de dilución y difusión; encontrándose 2 cepas resistentes tanto a eritromicina como a clindamicina. En ningún caso se observó efecto de inducción entre los discos de eritromicina y clindamicina.

Todos los aislamientos fueron sensibles a vancomicina y resistentes a gentamicina. Una sola cepa presentó sensibilidad intermedia a levofloxacina.

La CIM₉₀ a gentamicina fue de 512 mg/ml, situándose este valor varias diluciones por encima de los comunicados por diversos autores (11 - 22).

Conclusiones

Los datos antes expuestos muestran que los antibióticos beta lactámicos siguen siendo eficaces para el tratamiento de infecciones por SGB, resultando en nuestra experiencia ampicilina el antimicrobiano de elección.

Claritromicina mostró una actividad in vitro mayor que eritromicina con valores de CIM₉₀ de 0,06 mg/ml.

Del total de cepas estudiadas por el método de difusión, dos resultaron resistentes a eritromicina y clindamicina, lo que sugiere la presencia en las mismas de un mecanismo MLS_B del tipo constitutivo, lo que debería dilucidarse mediante técnicas de biología molecular. El resto de las cepas resistentes a eritromicina fueron sensibles a clindamicina sin observarse el efecto de inducción por lo que sugiere en estos microorganismos un mecanismo de resistencia mediado por bombas de eflujo (10).

La resistencia creciente de SGB a macrólidos dificulta el uso empírico en pacientes con hipersensibilidad documentada a antibióticos beta lactámicos lo cual obliga a determinar la actividad de los mismos.

En pacientes diabéticos e inmunocomprometidos alérgicos a antibióticos betalactámicos infectados por SGB resistente a macrólidos y clindamicina

, la levofloxacina y la vancomicina resultan una buena alternativa terapéutica aunque en pacientes embarazadas y en neonatos la única opción válida sería vancomicina.

Bibliografía

1. Morven S; Edwards; Carol y Baker. 2000. *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*). p. 2156-2167. In: Mandel, G. L.; Bennett, J. E.; Dolin, R. Principles and Practice on Infections Disease. 5th Edition. Vol. 2. Churchill Livingstone. Philadelphia, Pennsylvania 19106
2. Anne Schuchat. 1998. Epidemiology of Group B Streptococcal Disease in the United States: Shifting Paradigms. *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 3.497-513
3. Pautas para la prevención de la infección perinatal por estreptococos del grupo B. 1997. Informe especial en Contemporary OB/GYN. Edición Argentina. 5, 4: 37-46.
4. Broughthon DD, Mitchel WG, Grosman M, Hadley WK, Cohen MS. 1976. Recurrence of Group B Streptococcal Infection. *J Pediatr*. 89: 183-185.
5. Kim KS, Anthony BF. 1981. Penicillin Tolerance in Group B Streptococci Isolated from Infected Neonates. *J Infect Dis*; 144, 5: 411-419.
6. Siegel JD, Shannon KM, De Pacce BM. 1981. Recurrent Infection Associated with Penicillin-Tolerant Group B Streptococci: A Report of Two Cases. *J Pediatr*. 99: 920-923.
7. Feldman WE. 1976. Concentrations of Bacteria in Cerebrospinal Fluid of Patients with Bacterial Meningitis. *J Pediatr*. 88: 549-552.
8. Meyn L. and Hiller S. 1997. Ampicillin Susceptibility of Vaginal and Placental Isolates of Group B *Streptococcus* and *Escherichia coli* Obtained between 1992 and 1994. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1173-1174
9. M. K. H. Mcgavil, A Mcgeer, J. C. D.E Azavedo, L. Trpeski, S. Pong-Porter, C. Duncan, D.E. Low. 1999. Emergence of Erythromycin and Clindamycin Resistance in Group B Streptococci (SGB) Associated with Neonatal Disease in Toronto, Canada. Abstract of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 159.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M7 A5. Fifth Edition.
11. Order B., Perez Trallero E, Montes M and Martínez R. 1998. Erythromycin Resistance of *Streptococcus pyogenes* in Madrid. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17: 470-473.
12. Betriu, C., Gomez M., Sánchez A., Cruceía A., Romero J., Picazo J.J. 1994. Antibiotic Resistance and Penicillin Tolerance

in Clinical Isolates of Group B Streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **38**, 9: 2183-6.

13. Fernández M., Hickman M. E., Baker C.J. 1998. Antimicrobial Susceptibilities of Group B Streptococci Isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **42**, 6: 1517-9

14. Famiglietti A., de Mier C., Rodríguez H., Almuzara M., Barberis C. and Vay C. 1999. Epidemiology and Susceptibility of Group B *Streptococcus* in Argentina University Hospital. 4th World Congress of Perinatal Medicine. Buenos Aires, Argentina.

15. Liu J. W. Wu J. J., Ko W. C., Chuang Y. C. 1997. Clinical Characteristics and Antimicrobial Susceptibility of Invasive Group B Streptococcal Infections in Nonpregnant adults in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* **96**, 8: 628-33.

16. 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**, 6: 623-6.

17. Aitmhan R., Moustaoi N., Belabbes H., Elmdaghri N, Benbachir M. 2000. Serotypes and Antimicrobial Susceptibility of Group B *Streptococcus* Isolated from Neonates in Casablanca. *Scand J. Infect. Dis.* **32**, 3: 339-40.

18. Pearlman M. D., Pierson C. L., Faix R. G. 1998. Frequent Resistance of Clinical Group B Streptococci isolates to Clindamycin and Erythromycin. *Obstet Gynecol.* **92**, 2: 258-61.

19. Morales W. J., Dickey S. S., Bornick P., Lim D. V. 1999. Change in Antibiotic Resistance of Group B *Streptococcus*: Impact on Intrapartum Management. *Am J. Obstet Gynecol.* **181**, 2: 310-314.

20. Vermillion S. T., Bland M. L., Soper D. E., Austin M. 2000. Antibiotic Resistance patterns of Group B *Streptococcus* in late-third-trimester rectovaginal cultures. *Obstet Gynecol.* **95**, (4 Suppl 1): S79-80.

21. Rouse D. J., Andrews W. W., Lin F. Y, Mott C. W., Ware J. C., Phillips J. B. 1998. Antibiotic Susceptibility Profile of Group B *Streptococcus* acquired vertically. *Obstet Gynecol* **92**, 6 : 931-934.

22. Villar H., Jugo M., Farinati A. 1994. Eficacia de gentamicina en combinación con antibióticos betalactámicos frente a *Streptococcus agalactiae* tolerantes y no tolerantes a penicilina. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **12**: 385-389.