

DETERMINACIÓN DE FENOTIPOS DE RESISTENCIA DE LA FAMILIA MLS_B EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* EN EL HOSPITAL DE NIÑOS DE CÓRDOBA, ARGENTINA.

Carandino, María Virginia¹
Jacome, Oscar Javier¹
Montanaro, Patricia Cristina¹

¹ Laboratorio de Microbiología-Hospital de Niños de la Santísima Trinidad-Córdoba-Argentina

Correspondencia: Carandino, María Virginia. Laboratorio de Microbiología, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Bajada Pucará .Córdoba. Tel: 0351-153267630.

vickycarandino@hotmail.com

RESUMEN

Staphylococcus aureus meticilino resistente (SAMR) es el principal agente de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad; los antibióticos macrólidos y lincosamidas son importantes opciones terapéuticas para dichas infecciones. El objetivo del presente trabajo fue detectar en cepas de *Staphylococcus aureus* la prevalencia de los principales fenotipos de resistencia a dichos antibióticos, en particular el fenotipo mediado por la enzima lincosamida nucleotidiltransferasa (fenotipo L) el cual confiere una inusual resistencia a lincosamidas, en muestras remitidas al laboratorio de Bacteriología del Hospital de Niños Santísima Trinidad. Se realizó un estudio retrospectivo en el cual se analizaron 143 cepas provenientes de sitios nobles (n=42), esputos de pacientes con fibrosis quística (n=30), muestras de infección de piel y partes blandas (n=26) e hisopados nasales (n=45) en el período de enero-diciembre 2013.

El mecanismo de resistencia que se presentó con mayor frecuencia fue el fenotipo constitutivo, seguido por el fenotipo inducible. El fenotipo en el que está presente la enzima lincosamida nucleotidiltransferasa no se detectó en las muestras analizadas. Clindamicina es una buena opción terapéutica para las infecciones causadas por SAMR por su bajo porcentaje de resistencia acompañante. No obstante es importante la vigilancia de todos los mecanismos de resistencia a esta familia de antibióticos.

Palabras clave: lincomicina, *Staphylococcus aureus*, resistencia.

INTRODUCCIÓN

El primer aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR) se detectó en Europa en 1960. Desde entonces, SAMR se ha convertido en el principal agente causal de infecciones nosocomiales en todo el mundo, destacándose también su alta prevalencia en las infecciones adquiridas en la comunidad. Las infecciones de piel y tejidos blandos son las manifestaciones clínicas más comunes de los SAMR de la comunidad, aunque en los últimos años han aumentado los informes de infecciones graves en niños con altas tasas de mortalidad (1-3).

Macrólidos y lincosamidas se han convertido en opciones terapéuticas importantes en el tratamiento de las infecciones causadas por SAMR (1,4).

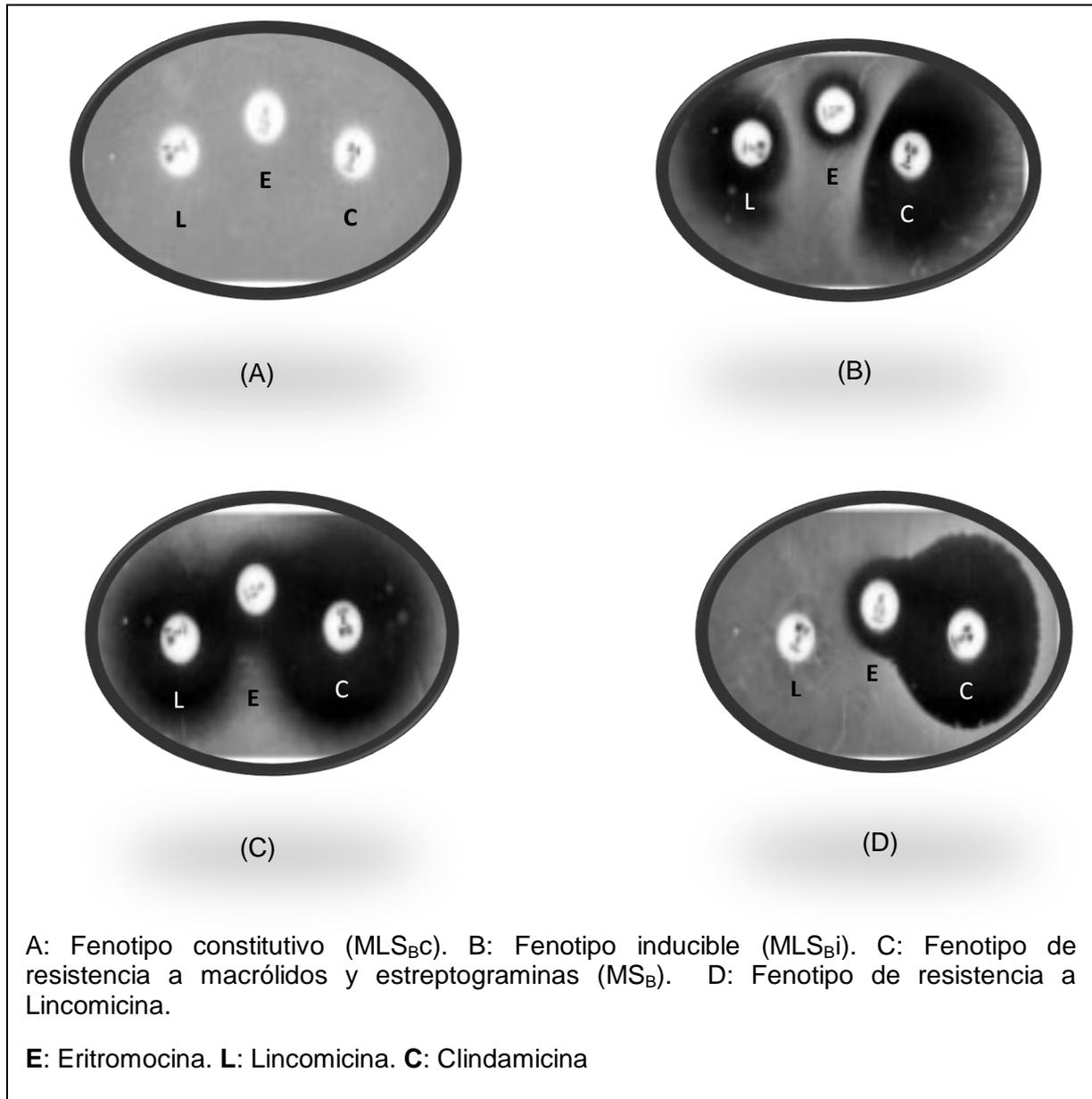
Los macrólidos son macromoléculas lipofílicas con un anillo lactona central que se clasifican según el número de átomos de carbono (C) en la lactona en 12, 14, 15, 16 y 17 miembros. El antibiótico (ATB) más representativo del grupo de 14 C es eritromicina. Las lincosamidas son un grupo de antibacterianos que incluyen lincomicina, de origen natural, producida por varias especies de actinomyces, y clindamicina, la cual es un derivado semi-sintético de lincomicina. Estos ATB son activos frente a la mayoría de las bacterias gram positivas aeróbicas y anaeróbicas (5,6). En cuanto a su mecanismo de acción, ambos grupos de ATB actúan sobre la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano impidiendo la elongación de la cadena polipeptídica, y son clasificados junto con las estreptograminas B (grupo MLS_B) debido al hecho de que comparten el mismo sitio de unión ribosomal (7).

Tres mecanismos básicos de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B) han sido descritos para estafilococos (8,9). El principal mecanismo es mediado por genes "erm" (en estafilococos se han descrito los genes *ermA* y *ermC*) los cuales codifican enzimas que catalizan la metilación postranscripcional de una adenina del ARNr 23 S confiriendo resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B conocido como resistencia MLS_B (10, 11) La expresión de este fenotipo puede ser constitutiva (MLS_BC) (Figura I A) o inducible (MLS_Bi) (Figura I B) (8,12).

Otro mecanismo descrito es el que involucra a las bombas de eflujo MsrA que confiere resistencia sólo a los macrólidos de 14 y 15 miembros y a estreptograminas (fenotipo MS_B) (Figura I C) (8,13).

Por último, la resistencia específica a lincosamidas (fenotipo L) es debida a la inactivación enzimática de los ATB cuya enzima responsable es lincosamida nucleotidiltransferasa (Lnu) codificada por los genes *Inu* (Figura I D) (1). Cinco genes *Inu* han sido descritos: *Inu(A)*, *Inu(B)*, *Inu(C)*, *Inu(D)*, y *Inu(F)*, los cuales fueron observados en cepas de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* tanto de origen animal como humano (5,7,16-18). Estudios realizados en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos han demostrado la presencia en dicho género de los genes *Inu(A)* y *Inu(B)* (19,20,7). En dichos estudios se determinó que ambos genes se encuentran codificados en plásmidos, mientras que los *Inu(B)*, además, estarían integrados al cromosoma bacteriano circundado por secuencias de inserción que serían capaces de movilizar a dichos genes de manera horizontal (7). Las enzimas Lnu inactivan lincosamidas por adenilación y son responsables del fenotipo L, de resistencia sólo a lincomicina (1,7,14,15). Sin embargo, se han descrito fallas terapéuticas con clindamicina en las infecciones causadas por microorganismos con dicho mecanismo de resistencia; de allí la importancia clínica de su detección.

Figura I: Fenotipos de resistencia investigados.



El objetivo del presente trabajo fue detectar en cepas de *Staphylococcus aureus* la prevalencia de los principales fenotipos de resistencia a la familia MLS_B , en particular el fenotipo mediado por la enzima lincosamida nucleotidiltransferasa (fenotipo L), el cual confiere una inusual resistencia a lincosamidas, en muestras pediátricas remitidas al laboratorio de Bacteriología del Hospital de Niños Santísima Trinidad

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo en el cual se analizaron 143 cepas: 98 provenientes de muestras clínicas tales como sitios nobles (n=42), esputos de pacientes con fibrosis quística (n=30) y muestras de infección de piel y partes blandas (n=26) recolectados en el período de

enero-diciembre 2013; y 45 provenientes de estudios de portación de hisopados nasales correspondientes al mismo período.

Se determinó la sensibilidad por método de difusión de Kirby Bauer en agar Müller Hinton ensayando los discos de lincomicina (15 µg), eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg), 18 mm de centro a centro (21), con suspensión bacteriana de 0,5 en la escala de Mc Farland. Los criterios de interpretación de eritromicina y clindamicina se realizaron según las normas CLSI vigentes al momento de realizar el trabajo (21) y los de lincomicina según la Sociedad Francesa de Microbiología 2010 (22).

Los discos de ATB y el medio Müller Hinton fueron sometidos a control de calidad utilizando la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

RESULTADOS

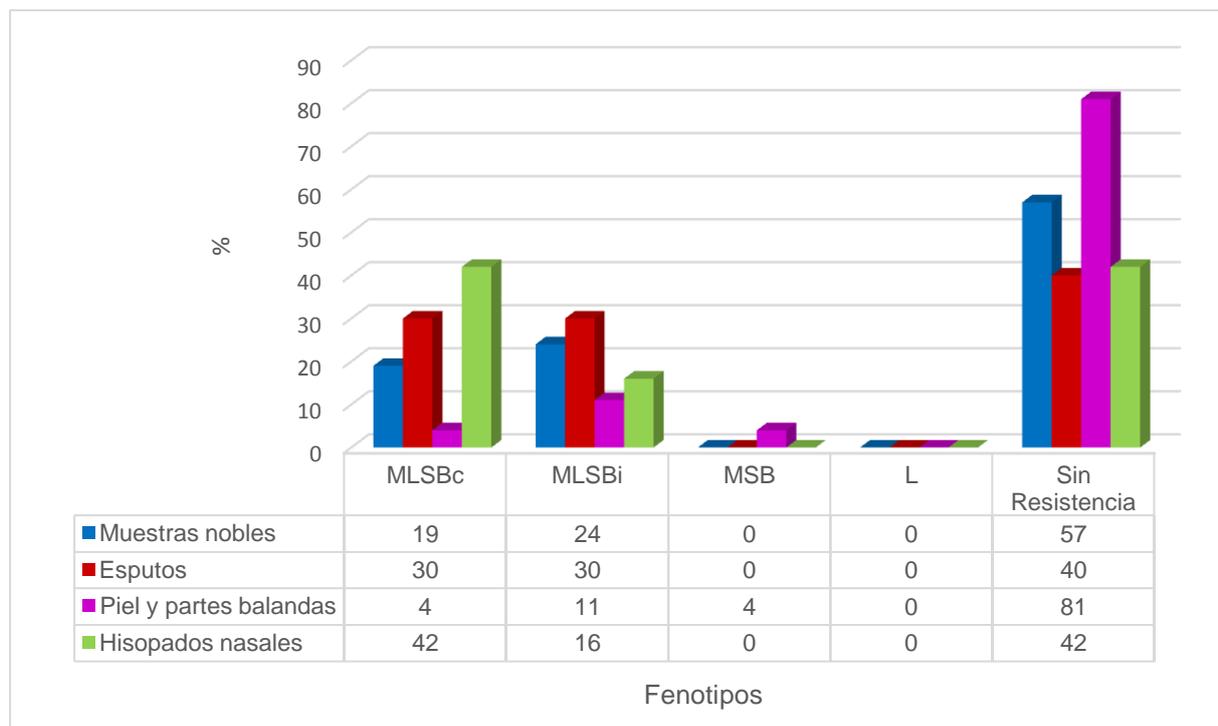
Del total de cepas provenientes de muestras clínicas (sitios nobles, esputos y piel y partes blandas) el 41,8% (41/98) de los aislamientos presentó resistencia a la familia MLS_B; del cual la variante fenotípica con mayor predominio fue MLS_Bi con un 53,7% (22/41), seguida por el fenotipo MLS_Bc con 43,9% (19/41) y por último MS_B 2,4% (1/41). El fenotipo L no fue hallado (Ver Tabla 1 y Gráfico I).

Analizando las muestras provenientes de la portación nasal, encontramos un porcentaje de resistencia del 57,8% (26/45). Del total de cepas resistentes, el 73.1 % (19/26) de la misma correspondió al fenotipo constitutivo y el 26.9 % (7/26), al fenotipo inducible. En este grupo de muestras ni el fenotipo MS_B ni el fenotipo L fueron hallados.

Tabla 1: Fenotipos de resistencia en las muestras estudiadas.

	Fenotipo MLS _B c	Fenotipo MLS _B i	Fenotipo MS _B	Fenotipo L	Fenotipo sin Resistencia a MLS
Muestras nobles (n=42)	8	10	0	0	24
Esputos (n=30)	9	9	0	0	12
Piel y partes blandas (n=26)	1	3	1	0	21
Hisopados Nasaes (n=45)	19	7	0	0	19

Gráfico I: Porcentaje de los distintos fenotipos de resistencia en cada grupo de muestras.



DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que en las muestras clínicas el mayor porcentaje de *Staphylococcus aureus* resistentes a la familia MLS_B fueron aislados de las muestras de esputo (60,0%), seguidos por los provenientes de sitios nobles (42,9%) y por último, los de piel y partes blandas donde dicho porcentaje fue menor (19,2%). En consecuencia, y sumado a que el fenotipo L no fue hallado en las muestras analizadas, podemos inferir que en nuestra población pediátrica, clindamicina es un antibiótico útil para el tratamiento empírico de las infecciones de piel y partes y blandas.

El porcentaje de resistencia a la familia MLS_B evidenciado en el presente estudio en las muestras clínicas fue similar al obtenido por un estudio nacional multicéntrico realizado por el Instituto ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán” en el mes de abril de 2006 donde intervinieron 60 hospitales de 23 provincias y en el cual se analizaron 631 aislamientos de *Staphylococcus aureus* (23)

En cuanto a las muestras de hisopado nasal, se decidió realizar estudios de resistencia debido a que los mismos microorganismos son potenciales patógenos de futuras infecciones en los pacientes colonizados. En nuestro estudio obtuvimos similares valores de resistencia en los tres fenotipos con respecto al estudio anteriormente mencionado.

Los antibióticos pertenecientes a la familia de lincosamidas se presentan como una alternativa útil en pediatría cuando se necesita reemplazar a los betalactámicos en infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Dentro de ellos, clindamicina es tres a

cuatro veces más activo que lincomicina a causa de su buena distribución en tejidos, siendo de preferencia en el tratamiento de infecciones de piel y partes blandas e infecciones osteoarticulares (24). A causa de su notable prescripción en los casos mencionados destacamos la importancia que tiene la detección de todos los fenotipos que pueden provocar fallas en el tratamiento con dicho antibiótico, especialmente el fenotipo L, debido a que el mismo sólo se detecta con el empleo de discos de lincomicina, práctica que no es llevada a cabo de rutina por la mayoría de los laboratorios de Microbiología.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Faccone D, Togneri AM, Podesta L, Perez M, Gagetti P, Sanchez S, Romero G, Corso A. MRSA Pediatric clone expressing ermC plus lnuA genes causing nosocomial transmission and healthcare workers colonization in a neonatal intensive care unit. *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 25: 78–80
- 2- Sola C, Cortes P, Saka HA, Córdoba MRSA Collaborative Study Group, Vindel A, Bocco JL. Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Córdoba, Argentina. *J. Clin Microbiol* 2006; 44: 192-200.
- 3- Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garneró A, Kevrik I, Culasso C, Vindel A, Study Group of CA-MRSA in Children Argentina-2007, et al. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset Staphylococcal infections in Argentinean children. *Plos ONE* 2012; 7: 1-12
- 4- Lin YC, Lauderdale TL, Lin HM, Chen PC, Cheng MF, Hsieh KS, Liu YC. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in patients of a pediatric intensive care unit and high carriage rate among health care workers. *J. Microbiol Immunol Infect* 2007; 40: 325–334.
- 5- Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, Leclercq R. A New Resistance Gen, lin B, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Apr. 1999; 925–929
- 6- Dhawan VK, Thadepalli H. Clindamycin: a review of fifteen years of experience. *Rev. Infect Dis* 1982; 4: 1133–1153.
- 7- Lozano C, Aspiroz C, Sáenz Y, Ruiz-García M, Royo-García G, Gómez-Sanz E, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Torres C. Genetic environment and location of the lnu(A) and lnu(B) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2804–2808
- 8- Novotna G, Adamkova V, Janata J, Melter O, Spizek J. Prevalence of Resistance Mechanisms against Macrolides and Lincosamides in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in the Czech Republic and Occurrence of an Undefined Mechanism of Resistance to Lincosamides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Aug. 2005; 49: 3586–3589
- 9- Roberts MC. Update on macrolide–lincosamide–streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 282: 147–159.
- 10- Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Kohrer K, Verhoef J, and Fluit AC. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; 45: 891–894
- 11- Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. erm(C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *J. Antimicrob Chemother* 2004; 53: 814–817.
- 12- Thakker-Varia S, Ranzini AC, Dubin DT. Ribosomal RNA methylation in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: effect of the “MLS” (erythromycin resistance) methylase. *Plasmid* 1985; 14: 152–161.
- 13- Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, and Wootton JC. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* 1990; 4: 1207–1214.

- 14- Leclercq R, Carlier C, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to lincomycin by inactivation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 421–424.
- 15- Morar M, Bhullar K, Hughes DW, et al. Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB. *Structure* 2009; 17: 1649-59.
- 16- Devriese LA. Two new types of resistance to lincomycin in pathogenic staphylococci from animals. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1980; 131B: 261-266
- 17- Dutta GN, Devriese LA. Degradation of macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics by *Lactobacillus* strains from animals. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1981; 132A: 51-57.
- 18- Dutta GN, Devriese LA. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics and degradation of lincosamide antibiotics in streptococci from bovine mastitis. *J. Antimicrob Chemother* 1982; 10: 403-408.
- 19- Brisson-Nöel A, Courvalin P. Nucleotide sequence of gene linA encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene* 1986; 43: 247-253.
- 20- Brisson-Nöel A, Delrieu P, Samain D, Courvalin P. Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J. Biol Chem* 1988; 263: 15880-15887.
- 21- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S25. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.
- 22- CA-SFM. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: Recommandations 2010 (Edition de Janvier 2010). 2010. http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2010.pdf. Consultado el 10/06/2015.
- 23- 29° Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos "Dra Alicia Rossi". 31° Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos. Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr Carlos G. Malbran". Mayo 2015
- 24- Garcia Pastrana T, Garcia Arnao O, Valerino Meriño I, Farramola LA, Bello. Aspectos generales sobre el uso de Antimicrobianos en Pediatría. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 2013; 32(1):21-28