

“Resistencia feno y genotípica  
a Macrólidos y Lincosamidas  
en aislamientos de  
*Streptococcus agalactiae* de la  
provincia de Neuquén”

NORMA RIHL

2017

Director: Mg-Esp. Luis Alfredo Pianciola



# RESISTENCIA DE EGB A LOS ANTIBIOTICOS

Según las recomendaciones del CDC de EE.UU (2010), se debe emplear **penicilina o ampicilia** y en combinación con **gentamicina**, en el tratamiento de sepsis neonatales y endocarditis.

**Cefazolina** (embarazadas alérgicas a beta-lactámicos pero sin riesgo de shock anafiláctico).

**Eritromicina o clindamicina** (embarazadas con riesgo de shock anafiláctico).

**Vancomicina** (en este último caso, pero con aislamiento de EGB resistente a clindamicina).

Aunque sigue siendo susceptible a penicilina, ampicilina y cefalosporinas de primera generación; se han reportado aislamientos con aumento de las concentraciones inhibitorias mínimas a estas drogas

Los porcentajes de *S. agalactiae* con resistencia in vitro a clindamicina o eritromicina han aumentado en los últimos 20 años

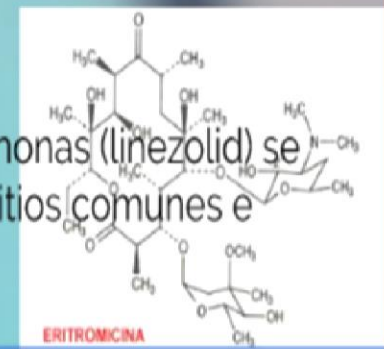
De todos modos, **ampicilina y penicilina G continúan siendo activas contra EGB, ambas constituyen la terapia antimicrobiana de elección** para el tratamiento de las infecciones por este patógeno



# MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS MACRÓLIDOS

## MACRÓLIDOS

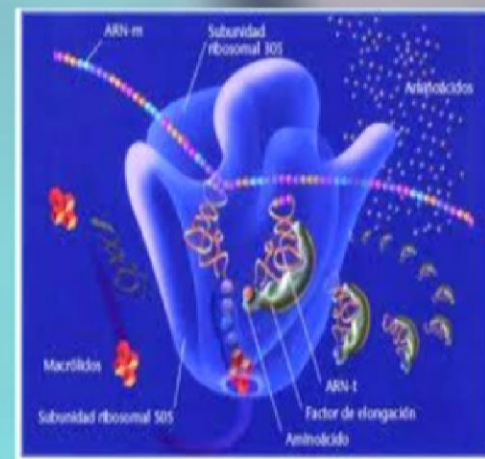
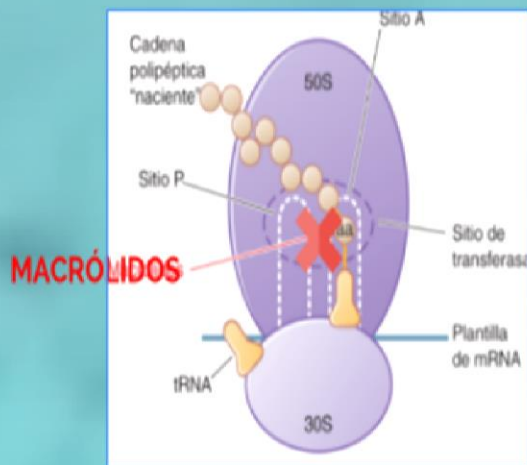
- Los macrólidos son antibióticos naturales o semisintéticos de amplio espectro, útiles para el tratamiento de infecciones por gérmenes intracelulares. Son principalmente bacteriostáticos o bactericidas para ciertos microorganismos según la concentración alcanzada y el tiempo de exposición.
- Químicamente son lactonas macrocíclicas con azúcares unidos mediante enlaces glicosídicos
- De acuerdo con el número de átomos que presenta el anillo lactónico se clasifican en:
  - a) Macrólidos de 14 átomos: eritromicina, claritromicina, diritromicina, roxitromicina, telitromicina (cetólido).
  - b) Macrólidos de 15 átomos: azitromicina
  - c) Macrólidos de 16 átomos: espiramicina, josamicina, midecamicina.
- Los macrólidos y cetólidos, las lincosamidas, el cloranfenicol y las oxazolidinonas (linezolid) se unen al rRNA 23S de la subunidad mayor del ribosoma. Todos comparten sitios comunes e interfieren entre sí.





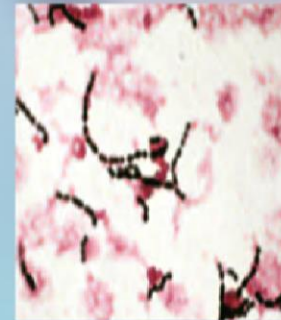
## SITIO DE UIÓN AL RIBOSOMA

Los macrólidos se unen de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr (especialmente, A2058 y A2059). Probablemente, se produce además una interacción débil entre la cladinosa y el dominio II del ARNr 23S. Telitromicina establece el mismo tipo de uniones, pero la interacción con el dominio II (adenina 752), es más fuerte. Tanto los macrólidos como los cetólidos inhiben el orificio de entrada al canal por donde sale la proteína del ribosoma.



# MECANISMO DE RESISTENCIA DE MLSB

- Los sitios de unión ribosomal son los mismos, esto lleva a resistencia cruzada
- La resistencia a macrólidos está codificada fundamentalmente en tres genes: ermA, ermB y mefA
- Los dos primeros codifican para una metilasa de rRNA 23S que altera la unión a la diana del antibiótico y se expresa como resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLSB) de manera constitutiva o inducible.
- Los genes mefA/E codifican para una bomba de eflujo que expresa resistencia a eritromicina y sensibilidad a lincosamidas (fenotipo M)



- **Modificación de la diana mediada por metilasas del rRNA 23S**
- Modificación de la diana por mutación puntual específica en el 23S rRNA (Las mutaciones cromosómicas que generan cambios de la proteína L4 o de la secuencia de bases del ARNr 23S son muy raras, probablemente porque hay múltiples del ARNr 23S)
- Mecanismo de expulsión activa (Eflujo)
- Otros



# Modificación del sitio diana

Esta es la forma más frecuente de resistencia y se debe a una reacción catalizada por las adenil-N6 metil transferasas, enzimas metilantes del rRNA 23S, que genera dimetiladenina. Las bases modificadas son incapaces de interactuar con el macrólido, por lo cual éste pierde afinidad por los ribosomas.

Se debe recordar que la **A2058 es la más importante para estabilizar la interacción macrólido-ribosoma; como esta base participa también en la unión de las lincosamidas y las estreptograminas B, las metil transferasas y sus genes codificantes, erm (erythromycin ribosome methylation), determinan un fenotipo de resistencia cruzada que afecta a estos tres grupos de antibióticos, llamado MLSB**

La expresión fenotípica de la resistencia MLSB puede ser constitutiva (cMLSB) o inducible (iMLSB), y en este caso, eritromicina es el principal inductor. Cuando la expresión es constitutiva, el microorganismo manifiesta resistencia a los tres. Cuando es inducible, el microorganismo continúa siendo sensible in vitro a la clindamicina. El riesgo del uso de clindamicina en este caso es la falla terapéutica.

# DETERMINACIÓN DE FENOTIPOS DE RESISTENCIA

La caracterización fenotípica del mecanismo de resistencia a macrólidos se realizó mediante la técnica de difusión por doble disco, empleando discos de eritromicina y clindamicina separados entre sí 12 mm, en agar Mueller Hinton sangre de carnero al 5%, inoculado con una suspensión del germen ajustada a 0.5 de Mc Farland.

Incubación: atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 35+/-2 °C por 20-24 hs

Luego de leer el diámetro de los discos con luz reflejada, de acuerdo al resultado del test se determinaron cinco fenotipos posibles:

Antimicrobiano	Abreviatura	Concentración del monodisco	S	I	R
Penicilina	P	10 U	≥ 24	-	-
<u>Eritromicina</u>	ERY	15µg	≥21	16-20	≤15
<u>Clindamicina</u>	CLI	2µg	≥19	16-18	≤15

S: sensible I: intermedio R: resistente

La cepa ATCC *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 se utilizó para el control de calidad de medios de cultivo y discos de antibiograma.



# FENOTIPOS DE RESISTENCIA

- Cuando eritromicina y clindamicina fueron sensibles: **fenotipo S(sensible)**.
- Cuando eritromicina y clindamicina fueron resistentes: **fenotipo cMLSB** (resistencia constitutiva).
- Cuando eritromicina fue resistente y clindamicina sensible y se observó achatamiento entre ambas, denominado «efecto D»: **fenotipo iMSLB** (resistencia inducible).
- Cuando eritromicina fue resistente y clindamicina sensible sin achatamiento: **fenotipo M (eflujo)**.
- Cuando eritromicina fue sensible y clindamicina resistente: **fenotipo L**





## PORCENTAJES DE RESISTENCIA



**100% S a P**



**10.4% R a CLI**

**18.20% R a ERY**

Porcentajes de resistencia a eritromicina, clindamicina y penicilina en cepas de *S. agalactiae* de la provincia de Neuquén.

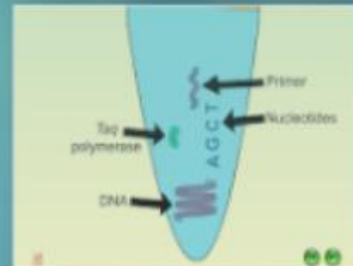
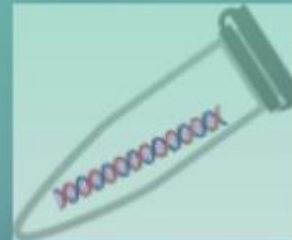
## DETERMINACIÓN GENOTIPO DE RESISTENCIA

Se realizó a todas las cepas una prueba de **PCR multiplex** para identificar los genes de resistencia **ermB**, **ermTR** y **mefA** (Gygax et al., 2006)

**ermB 639 pb**

**ermTR 395 pb**

**mefA 346 pb**

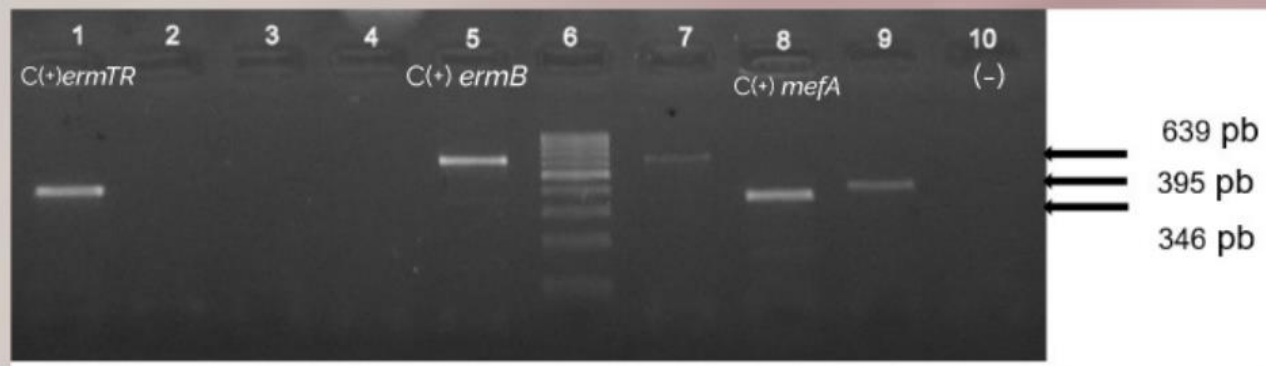


PCR  
MULTIPLEX



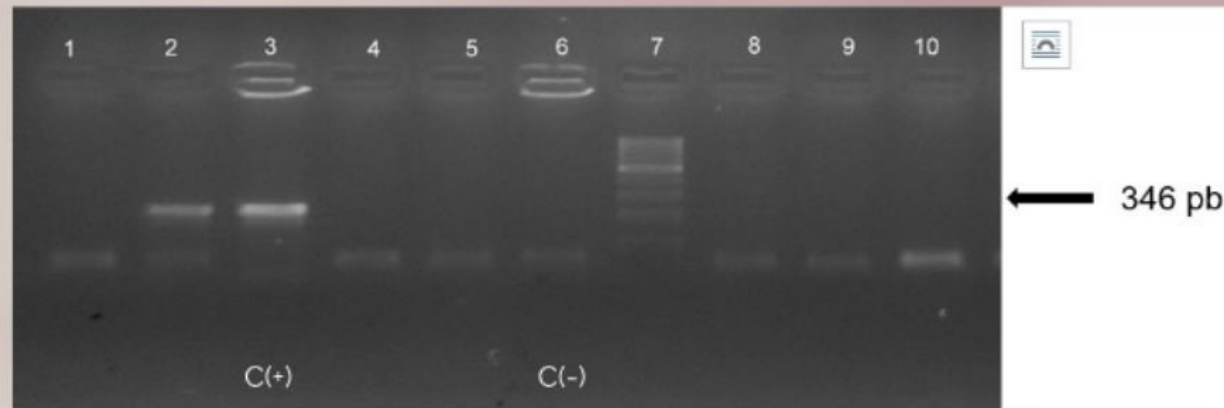
# PCR MULTIPLEX

## *ermB ermTR mefA*



Gel de agarosa 2% de los productos de PCR para los genes *ermB* *ermTR* y *mefA*.  
Calle 6: marcador de peso molecular; calle 10: control negativo; calles 2, 3 y 4: muestras negativas; calle 1: muestra positiva para gen *ermTR*; calle 7: muestra positiva para gen *ermB*; calle 5: control positivo gen *ermB*; calle 8: control positivo gen *mefA*; calle 9: control positivo gen *ermTR*.

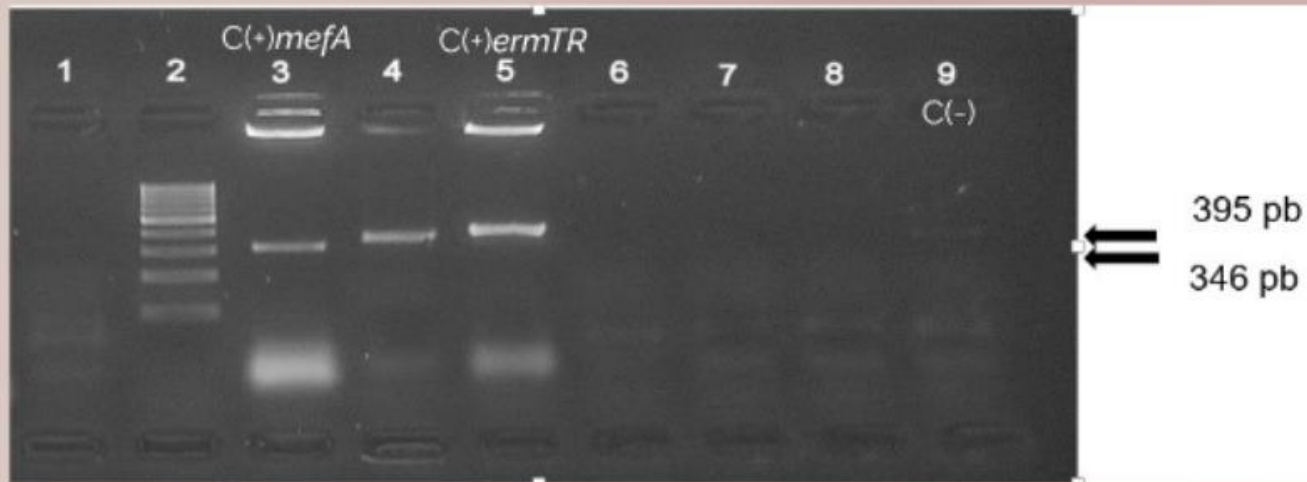
# PCR para el gen *mefA*



Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para el gen *mefA*. Calle 7: marcador de peso molecular; calle 6: control negativo; calles 1, 4, 5 y 8 a 10 muestras negativas; calle 2: muestra positiva; calle 3: control positivo.



# *mefA ermTR*



Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para los genes *ermTR* y *mefA*. Calle 2: marcador de peso molecular (1000 pb) calle 9: control negativo, calle 3: control positivo *mefA*, calle 4: muestra positiva para el *ermTR* y calle 5: control positivo gen *ermTR*, calles 1 y 6 a 8: muestras negativas.

# FENOTIPO Y GENOTIPO



Número de Cepas EGB (n=77)	Fenotipos	Genotipos		
		<u><i>ermB</i></u>	<u><i>ermTR</i></u>	<u><i>mefA</i></u>
62	Sensible	-	-	-
8	<u>cMLSB</u>	+	-	-
3	<u>iMLSB</u>	-	+	-
3	<u>iMLSB</u>	+	-	-
1	Sensible	-	-	+



# DISCUSIÓN

- ❖ **No se detectó ninguna cepa con resistencia a penicilina.** Esto sugiere que en la práctica se puede utilizar como antibiótico de primera línea para tratar infecciones por *S. agalactiae*.
- ❖ **Resistencia a eritromicina de 18,2% y a clindamicina de 10,4%,** de las cuales el 71% corresponde a muestras de screening de embarazadas.
- ❖ En el Hospital Castro Rendón de la ciudad de Neuquén, entre los años 2013 a 2016, se detectó una resistencia a eritromicina de 15-16% (excepto en el año 2014 que fue de 24%) y a clindamicina de 10-16%. En ese período no se reportó resistencia a penicilina

# *DISCUSIÓN*

- ❖ En cuanto a los datos informados por la **red Whonet a nivel nacional** entre los años 2013 - 2015, los resultados son similares, con una resistencia a eritromicina de 13- 14% y a clindamicina del 11% y no se informó resistencia a penicilina.
- ❖ **La relación entre fenotipo y genotipo de resistencia** de nuestras cepas, la mayoría es fenotipo sensible y no presenta ninguno de los genes investigados en el presente trabajo. Con excepción de una cepa que porta el gen *mefA* y presenta fenotipo sensible.

# *DISCUSIÓN*

## ❖ **Uso racional de los antibióticos en diversas patologías.**

- ❖ En este estudio el fenotipo de resistencia más frecuentemente detectado fue el cMLSB (8 cepas). Todas ellas portaban el gen *ermB* coincidiendo con lo que muestra la mayoría de la literatura. Además, en tres cepas hay discrepancia entre el fenotipo (iMLSB) expresado y el genotipo encontrado (*ermB*).



# DISCUSIÓN

❖ Eritromicina y clindamicina son las **drogas de segunda línea** usadas en pacientes alérgicas a la penicilina, se recomienda la monitorización de la sensibilidad de EGB a antibióticos mediante PCR multiplex y ensayos de difusión doble disco.

❖ Nuestros datos sugieren que la **ausencia de gen *erm*** predice sensibilidad *in vitro* a macrólidos, por lo cual podemos decir que este ensayo de PCR multiplex es clínicamente útil.

# CONCLUSIÓN

En nuestra provincia no se han reportado estudios sobre resistencia a antibióticos de este microorganismo. Por lo tanto estos resultados proporcionan una línea de base para el monitoreo de la resistencia a eritromicina/ clindamicina. Teniendo en cuenta los niveles de resistencia encontrados y lo sencillo de la metodología para su detección, consideramos que debe evaluarse rutinariamente el perfil de sensibilidad en todos los aislamientos de *S. agalactiae*, para vigilar la frecuencia y distribución de la resistencia a antibióticos.







GRACIAS GRACIAS

Gracias Gracias Gracias

Gracias Gracias Gracias

Gracias Gracias

Gracias Gracias

Gracias Gracias Gracias