

## STREPTOCOCCUS PYOGENES: SENSIBILIDAD A PENICILINA Y ERITROMICINA EN LAS CIUDADES DE NEUQUEN Y CIPOLLETTI

SILVIA V. SORIANO<sup>1</sup>, SUSANA BRASILI<sup>2</sup>, MONICA SAIZ<sup>3</sup>, CRISTINA CARRANZA<sup>4</sup>, PATRICIA VIDAL<sup>5</sup>, JORGE CALDERON<sup>1</sup>, HORACIO A. LOPARDO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Sección de Bacteriología y Servicio de Infectología, Policlínico Neuquén; <sup>2</sup> Sección de Bacteriología, Hospital Bouquet Roldán, Neuquén; <sup>3</sup> Sección de Bacteriología, Policlínico Modelo, Cipolletti, Río Negro; <sup>4</sup> Sección de Bacteriología, Hospital Pedro Moguillansky, Cipolletti, Río Negro; <sup>5</sup> Laboratorio de Microbiología, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires

**Resumen** Hasta la fecha no se ha detectado resistencia a penicilina en *Streptococcus pyogenes*. No obstante se ha registrado un aumento en la resistencia a macrólidos en varios países del mundo. En la Argentina se han observado escasos porcentajes de resistencia a eritromicina, a excepción de un 11.1% registrado en Mendoza. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la sensibilidad *in vitro* a penicilina y eritromicina de 251 aislamientos sucesivos de *S. pyogenes* obtenidos en cuatro centros asistenciales localizados en las ciudades de Neuquén y Cipolletti durante el período abril-diciembre de 1998. Se empleó el método de difusión con discos de penicilina y el método del doble disco (eritromicina 15 µg y clindamicina 2 µg) para observar la resistencia a macrólidos y el mecanismo involucrado. Los aislamientos resistentes a macrólidos fueron estudiados por E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) para establecer los niveles de sensibilidad a eritromicina, y por dilución en agar para penicilina, eritromicina, ceftriaxona, azitromicina y clindamicina. Todos los aislamientos fueron sensibles a penicilina y treinta de ellos (12.0%) fueron resistentes a eritromicina. Estos últimos mostraron el fenotipo M, característico del mecanismo de eflujo activo. Todos los aislamientos resistentes a eritromicina (CIM entre 8 y 16 mg/l) también resultaron resistentes a azitromicina, pero sensibles a clindamicina, penicilina y ceftriaxona. De acuerdo a estos resultados concluimos que *S. pyogenes* continúa siendo sensible a la penicilina, pero creemos que en nuestra zona es necesario realizar estudios rutinarios de pruebas de sensibilidad a macrólidos debido al relativamente elevado porcentaje de resistencia a eritromicina observado.

**Abstract** *Streptococcus pyogenes: penicillin and erythromycin susceptibility in the cities of Neuquen and Cipolletti.* Penicillin resistance has not yet been detected in *Streptococcus pyogenes*. However macrolide-resistant streptococci have emerged in several countries. Only low rates of erythromycin-resistant *S. pyogenes* were reported in Argentina, with the exception of a 11.1% observed in Mendoza. The aim of the present study was to determine the susceptibility to penicillin and to erythromycin of 251 consecutive clinically-significant isolates of *S. pyogenes* obtained from four centers of Cipolletti and Neuquén during the period April-December 1998. The double disk test with erythromycin and clindamycin disks was employed as a screening method to detect ERY-resistant streptococci and to determine the phenotype of macrolide resistance. Disk diffusion was also employed for determining penicillin susceptibility. Macrolide-resistant isolates were also tested for penicillin, ceftriaxone, erythromycin, clindamycin and azithromycin susceptibility by the agar dilution method. Additionally they were also tested for erythromycin susceptibility by E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). All streptococci studied were susceptible to penicillin and thirty of them (12.0%) were resistant to erythromycin. All these resistant isolates were also resistant to azithromycin but susceptible to ceftriaxone and clindamycin. They showed the phenotype M (probably efflux-mediated mechanism) and the MICs of erythromycin ranged between 8 and 16 µg/ml. According to these results we conclude that in spite of universal susceptibility to penicillin in *S. pyogenes*, macrolide resistance is a matter of concern in Neuquén and Cipolletti. At least in those cities it appears to be necessary to routinely perform macrolide susceptibility tests in beta-hemolytic streptococci.

**Key words:** *Streptococcus pyogenes*, erythromycin, penicillin

El *Streptococcus pyogenes* se ha mantenido sensible a bajas concentraciones de penicilina a través del

tiempo<sup>1</sup>. Este antibiótico continúa siendo el de primera elección para el tratamiento de muchas de las infecciones producidas por este microorganismo. Eritromicina, clindamicina, y los nuevos macrólidos (roxitromicina, claritromicina, azitromicina, etc.) son drogas alternativas especialmente indicadas en casos de hipersensibilidad a penicilina. El uso de los nuevos macrólidos para el tratamiento de las faringitis estreptocócicas es cada vez

Recibido: 17-IV-2000

Aceptado: 8-VI-2000

**Dirección postal:** Dr. Horacio A. Lopardo, Laboratorio de Microbiología, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Combate de los Pozos 1881, 1245 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4308-5325 e-mail: hlopardo@garra.giga.com.ar

más frecuente debido a su cómoda administración y buena tolerancia gástrica.

A diferencia de la uniforme sensibilidad a penicilina, se ha descrito el aumento de la resistencia a macrólidos en varios países del mundo: Reino Unido<sup>2</sup>, Australia<sup>3</sup>, Japón<sup>4</sup>, Finlandia<sup>5</sup>, Italia<sup>6</sup>, España<sup>7</sup>, Taiwan<sup>8</sup>.

En la Argentina, los estudios publicados hasta el momento coincidieron en señalar la sensibilidad a penicilina de las cepas estudiadas e informaron porcentajes muy bajos de resistencia a eritromicina y macrólidos. En 1987, Casellas y col. no detectaron ninguna cepa resistente a eritromicina sobre 30 aislados de *S. pyogenes* estudiados<sup>9</sup>. En otro estudio, realizado entre 1989 y 1994 con 373 cepas, se detectó un 0.5% de resistencia a eritromicina considerando todo el período. Las cepas resistentes fueron aisladas solamente durante 1989 elevando la incidencia para ese año al 1.5%. En 1994 se realizó un estudio multicéntrico que incluyó 1767 cepas de *S. pyogenes* aisladas en 58 centros de todo el país durante los meses de mayo y octubre. La resistencia global a eritromicina resultó del 0.14% en mayo y del 0.28% en octubre<sup>11</sup>. Sin embargo, se observaron diferencias regionales ya que las cepas aisladas en algunos lugares tuvieron una resistencia mayor (Concordia: 6.2-7.7%, Mendoza: 0-1.6%). En un estudio adicional realizado en Mendoza en 1995 la resistencia a eritromicina fue del 11.1%<sup>11</sup>.

Teniendo en cuenta estas diferencias regionales, decidimos realizar el presente trabajo para evaluar la sensibilidad a penicilina y eritromicina en nuestra zona. En el mismo intervinieron cuatro centros asistenciales: Policlínico Neuquén y Hospital Bouquet Roldán de la ciudad de Neuquén y Policlínico Modelo y Hospital Pedro Moguillansky de la ciudad de Cipolletti. Estas dos ciudades, si bien pertenecen a diferentes provincias argentinas, se encuentran geográficamente muy próximas e integradas en una misma región.

Se estudiaron 251 aislamientos sucesivos de *S. pyogenes* obtenidos a partir de materiales clínicos de pacientes atendidos en los cuatro centros participantes durante el período abril-diciembre de 1998.

Del total de cepas estudiadas, 69 (27.5%), fueron recuperadas de pacientes adultos y 182 (72.5%) de pacientes pediátricos. Doscientas treinta y dos cepas (92.4%) fueron aisladas de exudados de fauces y 19 (7.6%) de otros materiales (heridas: 9; oído medio: 3; sangre: 3; flujo vaginal: 2; esputo: 1; senos paranasales: 1).

La identificación de los microorganismos aislados se realizó mediante las siguientes pruebas: sensibilidad a 0.04 UI de bacitracina con discos comerciales (*Britania*, Buenos Aires, Argentina) e hidrólisis de PYR (L-pirroliodonil-B-naftilamida) en discos (*PYR-A-ENT*, *Britania*, Buenos Aires). Como pruebas confirmatorias se emplearon la de Voges-Proskauer y la aglutinación con antisuero

específico con partículas de látex (*Slidex Strepto-Kit BioMérieux*, Marcy l'Étoile, Francia).

Para estudiar su sensibilidad a los antibióticos se empleó el método de difusión en medio sólido según normas NCCLS<sup>12</sup>. Los inóculos se realizaron a partir de estrías en medio sólido de 24 horas de incubación, resuspendiendo colonias aisladas en caldo Mueller-Hinton. La concentración bacteriana se ajustó de modo de obtener una turbiedad equivalente a la del tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland.

Se utilizó agar Mueller-Hinton (*Britania*, Buenos Aires), adicionado con sangre ovina al 5% (Alfredo Gutiérrez S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Se emplearon discos comerciales de 10 UI de penicilina y 15 µg de eritromicina. (*Britania*). Las placas se incubaron 18 horas a 35° C.

Como cepa de referencia para el control del método de difusión se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para la identificación de los mecanismos de resistencia a macrólidos se utilizaron discos comerciales de 15 µg de eritromicina y 2 µg de clindamicina colocados a 2.5 cm de distancia entre sí (método del doble disco). Este método se realizó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente para las pruebas de difusión. Adicionalmente se realizaron pruebas de E-test para eritromicina de acuerdo a las indicaciones del fabricante (AB Biodisk, Solna, Suecia). Además, se emplearon discos de lincomicina (10 µg), espiramicina (100 µg), pristinamicina I (estreptogramina B) (40 µg) y pristinamicina II (estreptogramina A) (20 µg) tal como se describiera previamente<sup>11</sup>.

Se utilizó también el método de dilución en medio sólido con placas de Agar Mueller Hinton adicionadas de 5% de sangre ovina y de las diluciones de los antibióticos: penicilina (0.007-8.0 mg/l), ceftriaxona (0.007-8.0 mg/l), eritromicina (0.06-128 mg/l), clindamicina (0.06-128 mg/l) azitromicina (0.06-128 mg/l). Los inóculos bacterianos fueron de 10<sup>4</sup> UFC/gota, utilizándose un replicador de Steers para su distribución en las placas. La incubación se realizó en atmósfera normal a 35 °C durante 24 horas.

Las 251 cepas estudiadas resultaron ser sensibles a penicilina, exhibiendo halos de inhibición entre 28 y 40 mm. Todas ellas fueron identificadas como *S. pyogenes* por producir aglutinación con el reactivo de látex correspondiente y por dar positivas las pruebas de PYR y bacitracina (sensible) y negativa la de Voges-Proskauer.

Treinta cepas (12.0%) fueron resistentes a eritromicina con halos de inhibición entre 9 y 17 mm y 221 (88.0%) resultaron sensibles, con halos mayores de 21 mm.

Todas las cepas resistentes a eritromicina fueron sensibles a clindamicina, lincomicina, pristinamicinas y

TABLA 1.— Resultados de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos con 30 aislamientos de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina obtenidos en las ciudades de Neuquén y Cipolletti, Argentina, año 1998

Antibiótico	Difusión con discos			Método empleado			E-test	
	Carga	Halo (mm)	Categoría <sup>1</sup>	Dilución en agar CIM (mg/l)	Categoría	CIM (mg/l)	Categoría	
Penicilina	10 UI	> 28	S	< 0.007-0.015	S	ND	ND	
Ceftriaxona	30 µg	> 28	S	< 0.015	S	ND	ND	
Eritromicina	15 µg	9-15	R <sup>2</sup>	8-16	R	12-16	R	
Clindamicina	2 µg	21-27	S <sup>2, 3</sup>	< 0.015	S	ND	ND	
Azitromicina	15 µg	ND	ND	32-64	R	ND	ND	
Lincomicina	10 µg	19-24	S <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND	
Pristinamicina I	40 µg	19-23	S <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND	
Pristinamicina II	20 µg	19-21	S <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND	
Espiramicina	100 µg	22-26	S <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND	

<sup>1</sup> Categoría: S = sensible, I = con sensibilidad intermedia, R = resistente, ND: no determinado  
CIM: concentración inhibitoria mínima.

<sup>2</sup> Estos resultados corresponden al esquema recomendado por Leclercq y Courvalin para poder reconocer los mecanismos involucrados en la resistencia a macrólidos<sup>13</sup>.

<sup>3</sup> Ningún aislamiento presentó antagonismo clindamicina-eritromicina por el método del doble disco

espiramicina cuando fueron ensayadas por el método de difusión. Ninguna de ellas presentó antagonismo eritromicina-clindamicina por el método de aproximación de discos (Tabla 1).

Tanto las pruebas de E-test como las de dilución en medio sólido mostraron datos de CIM para eritromicina entre 8 y 16 mg/l (Tabla 1).

En los ensayos de dilución, coincidentemente, las cepas resistentes a eritromicina resultaron ser sensibles a penicilina (CIM < 0.03 mg/l) a ceftriaxona (CIM < 0.015 mg/l) y a clindamicina (CIM < 0.06 mg/l). Las CIM de azitromicina oscilaron entre 32 y 64 mg/l (Tabla 1).

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo podemos decir que *S. pyogenes* continúa siendo altamente sensible a penicilina en nuestra zona. Sin embargo, la resistencia a eritromicina fue del 12.0%. Este valor difiere de los datos publicados hasta el momento en Argentina, donde la resistencia a este antibiótico habitualmente no superaba el 1.5%<sup>6, 7, 8</sup>, pero se asemeja al 11.1% de resistencia observada en Mendoza en 1995<sup>11</sup>.

El nivel de resistencia a eritromicina encontrado en nuestro estudio nos plantea la necesidad de mantener una vigilancia epidemiológica activa de la misma y nos alerta sobre el riesgo del uso empírico de macrólidos en faringitis estreptocócicas. Creemos necesario en nuestra zona la realización rutinaria de pruebas de sensibilidad a macrólidos ante el aislamiento de *S. pyogenes* de materiales clínicos.

Teniendo en cuenta que las cepas resistentes a eritromicina fueron sensibles a clindamicina sin deformación de los halos de inhibición, los fenotipos encon-

trados parecen coincidir con un mecanismo de resistencia mediado por eflujo activo, ya descrito anteriormente en cepas argentinas<sup>11</sup>. La posibilidad de utilización de clindamicina frente a esas cepas motiva la necesidad del reconocimiento del posible mecanismo involucrado debido a las ventajas que parece aportar este antibiótico respecto de la penicilina en el tratamiento de infecciones estreptocócicas severas<sup>14</sup>.

**Agradecimientos:** A Alejandra Mastroianni por su excelente colaboración técnica. A Alfredo Gutiérrez S.A. por el aporte de sangre desfibrinada de oveja. A los Dres. Carlos Guardiano y Ronaldo Meda de Laboratorios Britania SRL por su constante apoyo técnico y por el aporte de discos de identificación y de antibiograma

## Bibliografía

- O'Brien TF. Global surveillance of antibiotic resistance. *N Engl J Med* 1992; 326: 339-40.
- Phillips G, Parratt D, Orange GV, Harper I, McEwan H, Young N. Erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25: 723-4.
- Stingemore M, Francis GRJ, Toohey M, McGeachie DB. The emergence of erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Fremantle, Western Australia. *Med J Aust* 1989; 150: 626-31.
- Maruyama S, Yoshioka H, Fujita K, Takimoto M, Satake Y. Sensitivity of group A streptococci to antibiotics. *Am J Dis Child* 1979; 133: 1143-5.
- Seppala H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 885-91.
- Cornaglia G, Ligozzi M, Mazzariol A, Valentini M, Orefici G. The Italian Surveillance Group for Antimicrobial

- Resistance, Fontana R. Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy 1993-1995. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 339-42.
7. Pérez Trallero E, Urbietta M, Montes M, Ayestarán I, Marimón JM. Emergence of *Streptococcus pyogenes* strains resistant to erythromycin in Gipuzkoa, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 16: 25-31.
  8. Hsueh P, Chen H, Huang A, Wu J. Decreased activity of erythromycin against *Streptococcus pyogenes* in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2239-42.
  9. Casellas JM, Goldberg M, D'Andrea E, Arduino S, Godin M. Actividad *in vitro* de roxitromicina y otros antimicrobianos frente a bacterias aisladas de pacientes pediátricos. *Arch Arg Pediatr* 1987; 85: 233-8.
  10. Lopardo H, Venuta ME, Vidal P, Fernández N, Conci AM, Rubaglio EA. *Streptococcus pyogenes*: Vigilancia de su resistencia a los antibióticos en un hospital pediátrico. *Infect Microbiol Clin* 1995; 7: 53-6.
  11. Lopardo H, Venuta ME, Vidal P, et al. The Argentinian Streptococcus Study Group (100 participants). Argentinian collaborative study on prevalence of erythromycin and penicillin susceptibility in *Streptococcus pyogenes*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28: 29-32.
  12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A5. Villanova, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1995.
  13. Leclercq R, Courvalin P. Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1273-6.
  14. Stevens DL. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 69-78.

-----

*Citas leídas en el Museo de Ciencias de Londres\**

### **Fumigador, late 18<sup>th</sup> Century**

*In 1773, Dijon Cathedral became so infected by putrid exhalations from bodies that it was deserted. L.B. Guyton de Morveau (1737-1816), a chemist, successfully purified the air with hydrogen chloride. Afterwards he used chlorine and developed the portable bottle for producing the gas (there in exhibition). It still contains the manganese dioxide on to which acid was poured.*

### **Fumigador (Finales del Siglo XVIII)**

En 1773, la Catedral de Dijon llegó a estar tan infectada por emanaciones de cadáveres, que quedó desierta. L.B. Guyton de Morveau (1737-1816), un químico, logró purificar el aire con ácido clorhídrico. Más tarde, usó cloro, y perfeccionó la botella portátil para producir el gas cloro (que se halla en exhibición en el Museo). Ella aún contiene el dióxido de manganeso sobre el que se volcaba el ácido.

*Traité des moyens de désinfecter l'air. (Tratado sobre la desinfección del aire).  
L.B. Guyton de Morveau. Paris, 2<sup>nd</sup> Ed., 1801*

\*Science Museum, Exhibition Road, London SW7 2DD