

Laczeski, Margarita*, **
Novosak, Marina*, **
Quiroga, Marina*
Vergara, Marta*

Primer estudio molecular de *Streptococcus agalactiae* serotipo V en Misiones, Argentina

Streptococcus agalactiae serotype V, first molecular study in Misiones, Argentina

Fecha de aceptación: Septiembre 2014

Resumen

ANTECEDENTES. *Streptococcus agalactiae* (SGB) serotipo V, es uno de los serotipos más frecuentemente asociado a infección invasiva en adultos y neonatos. Sus factores de virulencia y su asociación a resistencia a macrólidos, ha sido ya destacada.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se estudiaron 14 cepas de SGB serotipo V de un total de 197. Se utilizó PCR convencional para la búsqueda de genes de virulencia y de resistencia a macrólidos. La sensibilidad a estos antimicrobianos se determinó por D-test y CIM.

RESULTADOS. Los genes *bca* y *hylB* se detectaron en el 100% de las cepas. En 78.6% de ellas se detectaron 4 o más genes asociados a la virulencia.

El 21.43 % de las cepas presentó resistencia a macrólidos (un fenotipo constitutivo cMLS_B y 2 fenotipos inducibles iMLS_B) y en ellos se identificaron los genes *ermB*, *ermTR* y *mefA*.

CONCLUSIONES. La frecuencia elevada de genes asociados a la virulencia y la resistencia a macrólidos detectada en este estudio de SGB serotipo V, nos alienta a reforzar las estrategias de vigilancia epidemiológica de estas cepas, dado el impacto que pudieran tener en el tratamiento de infecciones en alérgicos a penicilina y en el diseño de estrategias vacunales.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae* serotipo V, Eritromicina, Clindamicina, genes de virulencia, genes de resistencia.

Abstract

BACKGROUND. *Streptococcus agalactiae* (GBS) serotype V, is one of the most common serotypes associated with invasive infection in adults and neonates. Virulence factors and their association with resistance to macrolides, has already been highlighted.

MATERIAL AND METHODS. 14 strains GBS serotype V from a total of 197 were studied. Conventional PCR was used to search for genes for virulence and resistance to macrolides. The sensitivity to these antimicrobials was determined by D-test and CIM.

RESULTS. *hylB* and *bca* genes were detected in 100% of the strains. In 78.6% of them 4 or more genes associated with virulence were detected. The 21.43% of the strains were resistant to macrolides (a constitutive phenotype cMLS_B and 2 inducible phenotypes iMLS_B) and in them the *ermB*, *mefA* and *ermTR* genes were identified.

CONCLUSIONS. The high frequency of genes associated with virulence and resistance to macrolides detected in this study of GBS serotype V, encourages us to strengthen epidemiological surveillance strategies of these strains, given the impact they may have in the treatment of infections in patients allergic to penicillin and vaccine design strategies.

Keywords: *Streptococcus agalactiae* serotype V, Erythromycin, Clindamycin, virulence genes, resistance genes.

*Departamento de Microbiología, Cátedra de Bacteriología.

**Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. Ebe Reca" (InBioMis).
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales; Universidad
Nacional de Misiones; Posadas, Argentina.
Correspondencia: Margarita Laczeski

Cátedra de Bacteriología. Universidad Nacional de Misiones. Avda.
Mariano Moreno 1375. Posadas, Misiones, Argentina.
CP 3300LQH.

Teléfono / Fax: (+54) 03764 – 4435118

Dirección electrónica: melaczeski@fceqyn.unam.edu.ar

Introducción

Streptococcus agalactiae del grupo B (SGB) permanece aún como una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en recién nacidos. La colonización del tracto genital de la embarazada a término de su edad gestacional, está significativamente asociada a estas infecciones. Los recién nacidos adquieren SGB en el útero por vía ascendente a través de la ruptura de membranas intactas o durante el proceso del parto.¹

SGB es un microorganismo parte de la microbiota habitual de los tractos genitourinario y gastrointestinal humanos. Es también reconocido como un importante patógeno en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes, siendo responsable de infecciones de piel y tejidos blandos, de endocarditis e infecciones osteoarticulares, principalmente.

Con el objetivo de prevenir la morbilidad y mortalidad del recién nacido, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC),² ha recomendado dos estrategias con la finalidad de identificar a las madres que, en edad gestacional a término, están colonizadas con SGB y prevenir la enfermedad perinatalógica.

Estas estrategias consisten en identificar los siguientes factores de riesgo: nacimiento previo con enfermedad invasiva por SGB, bacteriuria por SGB durante el embarazo, parto prematuro (antes de las 37 semanas de gestación), temperatura intraparto igual o mayor de 38°C, rotura prematura de membrana igual o mayor de 18 horas y la portación de SGB en el tracto génito-anal de la embarazada entre las 35 – 37 semanas de gestación.

El implementar estas recomendaciones ha redundado en un significativo descenso de la enfermedad neonatal invasiva en aquellas regiones que las han adoptado.³

En Argentina, la búsqueda de SGB en todas las mujeres embarazadas con edad gestacional entre las 35 y 37 semanas que presenten o no factores de riesgo, es obligatoria por Ley N° 26.369 para todo el territorio nacional desde abril de 2008.⁴

La frecuencia de la colonización vaginal varía ampliamente entre áreas geográficas. En nuestro país, se han comunicado cifras de 1.4 %⁵ hasta 18.15 %.⁶

Un importante factor de virulencia es la cápsula. Su estructura polisacárida posibilita la distinción en 10 serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX). Estos serotipos capsulares presentan en su distribución variaciones temporales, étnicas y según el lugar de residencia de la embarazada.⁷

Una característica de las cepas de SGB es que la mayoría de los genes asociados a la virulencia, codifican proteínas necesarias para la interacción célula- huésped – bacteria, en el proceso de la patogenicidad.

Los antígenos de las proteínas de superficie y los genes que las codifican se consideran importantes para la caracterización epidemiológica de las cepas.

Las proteínas de superficie, incluyen entre otras α -C y β -C, Rib, HylB, Lmb.

La proteína α -C codificada por el gen *bca* está asociada a la adherencia a la célula epitelial y la β -C codificada por *bac*, a la invasión.⁸

La proteína Rib codificada por el gen *rib* es muy semejante a la proteína α -C y es expresada por la mayoría de las cepas invasivas. La proteína HylB codificada por el gen *hylB*, colabora en la diseminación y la Lmb codificada por el gen *lmb* media en la adherencia a la laminina humana.^{8,9}

La frecuencia de estas proteínas y los genes que las codifican varían según origen de las cepas (colonizantes o invasivas), períodos de estudio, zonas geográficas y tipo, social, étnico de la población estudiada, etcétera.¹⁰

Detectada la colonización materna la profilaxis intra-parto (PIP) administrada con penicilina o ampicilina, previene la enfermedad neonatal invasiva por SGB.¹¹

En aquellas embarazadas con intolerancia a la penicilina, la administración de eritromicina (ERI) y clindamicina (CLI) están recomendadas.

En la mayoría de los casos, esta profilaxis resulta en una disminución significativa de las infecciones invasivas neonatales.¹²

La vigilancia epidemiológica de la distribución de los serotipos circulantes en una región determinada y su susceptibilidad antimicrobiana, tiene importancia, no sólo en relación a una probable enfermedad perinatal, sino tiene particular importancia a la hora de diseñar estrategias vacunales.

El serotipo V es uno de los serotipos, junto al III, más frecuentemente asociado a infección invasiva en adultos y neonatos, por sus factores de virulencia y su asociación a resistencia a macrólidos.¹²⁻¹⁵

Ante la ausencia de estos datos en nuestra provincia (límitrofe con los países de Brasil y Paraguay en un 90% de sus fronteras), realizamos esta investigación, con el propósito de aportar al conocimiento de la sensibilidad a macrólidos de este serotipo en particular y su perfil molecular de virulencia.

Material y métodos

Se estudiaron 14 (de 197) cepas de SGB identificadas con el serotipo V.

Todas las cepas fueron recuperadas de hisopados vagino-rectales realizados en mujeres embarazadas con 35-37 semanas de edad gestacional. Este estudio se realizó entre los años 2004 y 2011.

Todas las cepas fueron conservadas en leche descremada al 20% y mantenidas -80° C, con la finalidad de preservar sus originales características, tanto morfológicas como químicas, bioquímicas y genotípicas.

- **Caracterización bioquímica y serológica de grupo:** se realizó con pruebas bioquímicas convencionales y kit comercial para aglutinación con partículas de látex (Phadebact Strep B Test-ETC internacional-Bactus AB, Suiza).
- **Determinación de serotipo:** se utilizó el test de aglutinación del Statens Serum Institut (Strep-B.Latex. Copenhagen, Dinamarca), que contiene 10 serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI).

- **Caracterización genotípica:** la extracción de ADN cromosómico se realizó según protocolo de Sambrook,¹⁶ modificado por Cariaga Martinez y Zapata.¹⁷ La evaluación de la calidad y cantidad de ADN extraído se realizó mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1% teñidas con Gel-Red™, Biotium, Inc.; EEUU, en cuba electroforética (Electrophoresis Subsystem 70 Labnet Internacional) y posterior observación de las bandas en transiluminador UV (Modelo MUV 21-312-220).
- **Se investigaron por PCR los genes de resistencia:** *ermB* (metilasa expresada constitutivamente), *ermTR* (metilasa expresada de manera inducible) y *mefA* (mecanismo de eflujo) y los genes de virulencia fueron los que codifican para la proteína C (*bac* y *bca*), la proteína Rib (*rib*), laminina (*lmb*) y hialuronidasa (*hylB*).

Todas las PCR fueron realizadas mediante una predesnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, 30 ciclos (30 segundos a 94 °C, 60 segundos a 50 °C, 60 segundos a 72 °C) y una elongación final a 72 °C durante 2 minutos, en un termociclador Multigene TM II (Labnet internacional Inc., EEUU).

Los cebadores usados para la búsqueda de genes de resistencia y virulencia y sus respectivos números de acceso de GenBank (GB), fueron: *ermB*: 5' GAAAAAGTACTCAACCAAATA y 5' AGTAATGGTACTTAAATTGTTTAC (GB: DQ355148.1); *ermTR*: 5' TTGGGTCAGGAAAAGGA y 5' GGGTGAAAATATGCTCG (GB: AF00216.1); *mefA*: 5' GGTATCTTTAATCACTAGTGC y 5' TTCTTCTGGTACTAAAAG (GB: DQ445272.1); *bac*: 5' TGTAAGGACGATAGTGTGAAGAC y 5' CATTTGTGATTCCCTTTTGC (GB: AB221536.1); *bca*: 5' CAGGAAGGGGAAACAACAGTAC y 5' GTATCCTTGTATCATCTGGATACG (GB: M97256.1); *rib*: 5' CAGGAAGTGCTGTTACGTAAAC y 5' CGTCCCATTAGGGTCTTCC (GB: U58333.1); *hylB*: 5' TTATCATCCAGCGCCTCCTAG y 5' GTG-GTATAACTGACTTCTTGGGA (GB: Y15903.1); *lmb*: 5' GAC-GCAACACACGGCAT y 5' TGATAGAGCACTTCCAAATTG (GB: AF062533.1).

Sus secuencias fueron cotejadas con el GenBank y sintetizados por Operon Molecules for Life (EEUU).

Se utilizaron para el estudio de los genes de resistencia, controles positivos cedidos por el Instituto de Referencia en Argentina "Dr. Carlos G. Malbrán" (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – A.N.L.I.S.):

- *Streptococcus pneumoniae* AZ1: Genes *ermB* y *mefA*.¹⁸ *Streptococcus agalactiae* 6394: Gen *ermTR*.¹⁹ Para los genes de virulencia (*bac*, *bca*, *rib*, *hylB* y *lmb*) se trabajó con controles positivos internos obtenidos luego de secuenciar por INVITROGEN, Corea; los productos de PCR y cotejar las secuencias en el programa BLASTX.VII, VIII y IX).
- **Pruebas de sensibilidad:** se determinaron los fenotipos de resistencia a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B (MLS_B) con el ensayo de doble-disco (D-test) en agar Mueller-Hinton (Britania, Argentina) suplementado con sangre ovina al 5% con discos de ERI (15 µg) y CLI (2 µg) provistos por laboratorios

Britania, Argentina, según recomendaciones e interpretación del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).²⁰

La confirmación de la susceptibilidad a ERI y CLI se realizó por E-test que permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), con tiras provistas por Oxoid, Reino Unido y Biomerieux, Francia; respectivamente. Los resultados fueron interpretados según recomendaciones del CLSI.²⁰

Como control se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Los aislamientos y las cepas controles fueron considerados susceptibles o resistentes de acuerdo con los puntos de corte recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).²⁰

Resultados

Las 14 cepas pertenecientes al serotipo V representan el 7,1 % de 197 cepas estudiadas.

Caracterización genética

Genes de virulencia: todas las cepas presentaron algunos de los genes de virulencia investigados en distintas combinaciones.

Solo *bca* y *hylB* estuvieron presentes en las 14 (100%) cepas estudiadas. El gen *lmb* se detectó en 11 (78.6%) cepas, *rib* en 9 (64.3%) seguido de *bac* encontrado en 6 (42.8%) aislamientos.

En 11 de 14 cepas se detectaron 4 o más genes asociados a la virulencia. Los resultados de la búsqueda de genes de virulencia se muestran en la Figura 1.

- **Genes de resistencia:** en los tres aislamientos con fenotipo de resistencia detectado por D-Test se pudo identificar la presencia de genes asociados a la resistencia a macrólidos (*ermB*, *ermTR* y *mefA*). Todos presentaron los genes *ermB* y *ermTR* y una cepa con fenotipo inducible, además presentó el *mefA*.

En otros dos aislamientos se detectaron genes de resistencia (*ermB* en 1 cepa y *mefA* en otra) no así su expresión fenotípica. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Once cepas fueron sensibles a ERI y CLI. Ninguna de ellas presentó fenotipos cMLS_B o iMLS_B ni M, por la técnica de doble disco (D-test).

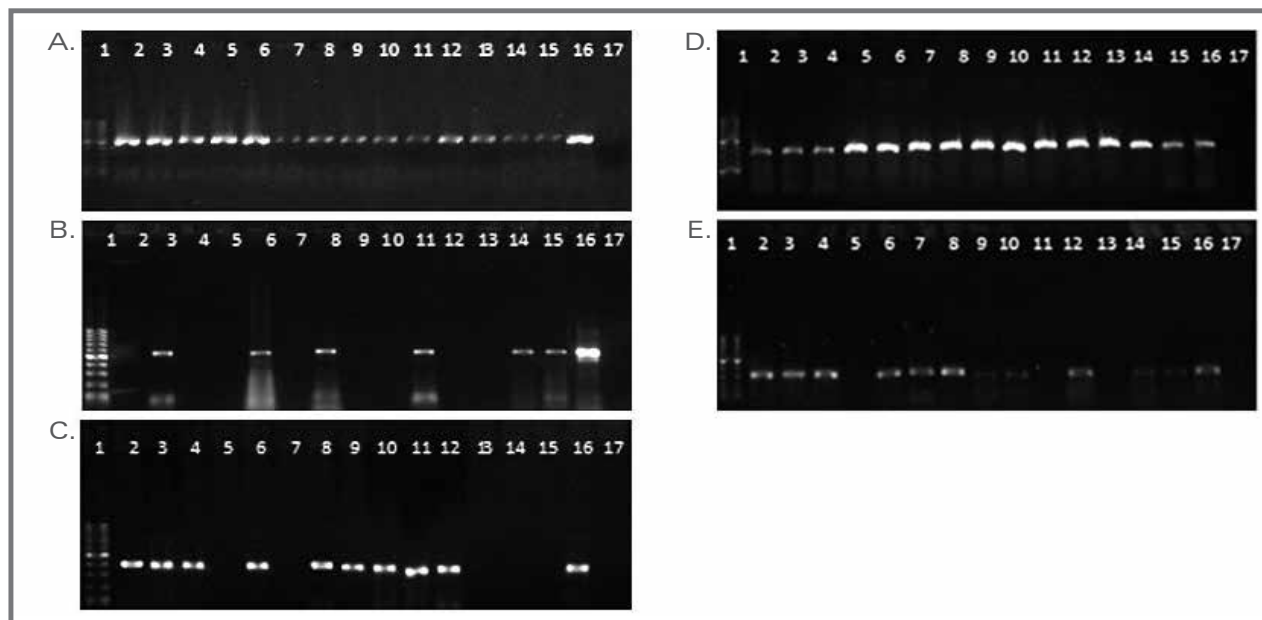
Para estos aislamientos, la confirmación por CIM arrojó idénticos resultados, obteniéndose valores para ERI en un rango comprendido entre 0.06 – 0.19 µg/ml y de 0.032 – 0.19 µg/ml para CLI.

Tres aislamientos presentaron fenotipos de resistencia a macrólidos.

Los halos de inhibición para ERI y CLI, los fenotipos obtenidos por D-test, los valores de CIM y los genes de resistencia encontrados en estas cepas se muestran en el Cuadro 1.

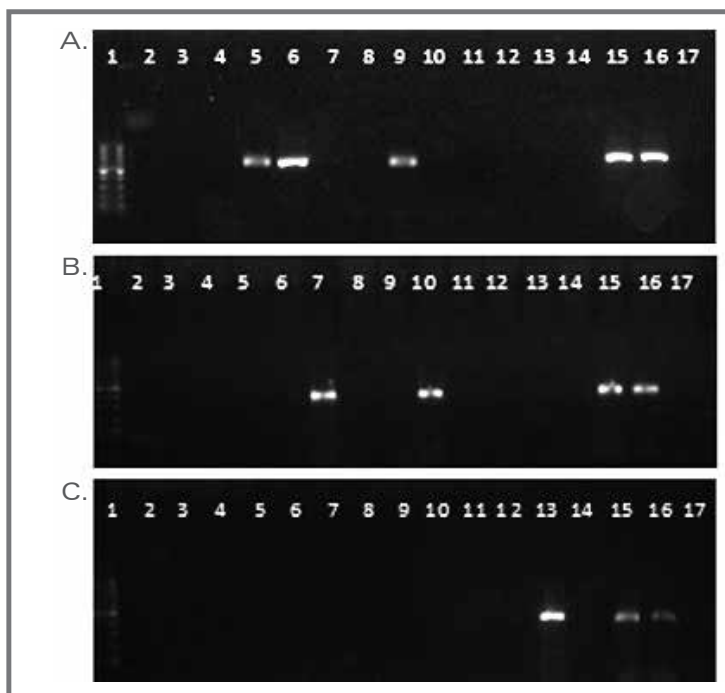
Los resultados mostraron 21.43% (3/14) de resistencia a macrólidos en las cepas serotipo V estudiadas.

Figura 1
Genes de virulencia. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR para los genes



A. *bca*, B. *bac*, C. *rib*, D. *hylB* y E. *lmb*. Primera calle, marcador de peso molecular, marcador de ADN (D0017) 100 a 1000 pb-INBIO, Argentina; calle 2 a 15, cepas *Streptococcus agalactiae* (SGB) serotipo V: 29, 31, 32, 93, 1020, 1090, 1175, 1249, 1337, 836, A19, 222, 1, 369; calle 16, control positivo (SGB221 para genes *bca*, *hylB* y *lmb*; SGB264 para gen *bac*; SGB43BB para gen *rib*); última calle, control negativo.

Figura 2
Genes de resistencia a macrólidos.
Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR para los genes



A. *ermB*, B. *ermTR*, C. *mefA*. Primera calle, marcador de peso molecular, marcador de ADN (D0017) 100 a 1000 pb-INBIO, Argentina; calle 2 a 15, cepas *Streptococcus agalactiae* (SGB) Serotipo V: 29, 31, 32, 93, 1020, 1090, 1175, 1249, 1337, 836, A19, 222, 1, 369; calle 16, control positivo (*Streptococcus pneumoniae* AZ1 para genes *ermB* y *mefA* genes, *Streptococcus agalactiae* 6394 para gen *ermTR*); última calle, control negativo.

Cuadro 1
Cepas SGB serotipo v con resistencia a macrólidos. Resultados de difusión, D-test, CIM y genes de resistencia

Cepas SGB	Difusión (en mm)		D-test; Fenotipo	CIM (µg/ml)		Genes de Resistencia		
	ERI	CLI		ERI	CLI	<i>ermB</i>	<i>ermTR</i>	<i>mefA</i>
1090	11	22	POSITIVO; iMLS _B	2	≤0.25	(+)	(+)	(-)
1337	7	8	N/D; cMLS _B	2	2	(+)	(+)	(-)
369/10	6	20	POSITIVO; iMLS _B	16	0.094	(+)	(+)	(-)

N/D: No Detectado; iMLS_B: Fenotipo inducible. cMLS_B: Fenotipo constitutivo. (+): Presencia; (-): Ausencia.

Discusión

Entre los principales serotipos de SGB que causan infecciones invasivas en neonatos y adultos se encuentra el serotipo V, que emergió recientemente asociado además a una elevada propensión a adquirir resistencia a macrólidos.^{21, 22}

El serotipo V fue aislado hacia 1976 en EEUU, identificado como SGB no tipable, siendo reconocido como V con la posterior disponibilidad de los sueros para su identificación.¹³⁻²³

Es a partir de 1980 que se lo reconoce como un serotipo común no solo en EEUU, sino en Francia, Indonesia, Japón, Suecia, entre otros. También fue frecuente su recuperación de enfermedad invasiva en adultos no gestantes y en mujeres gestantes y neonatos con infección temprana.¹³

La ausencia de datos en nuestra provincia, Misiones, una provincia Argentina que limita casi totalmente con la repúblicas de Paraguay y Brasil, motivó este estudio.

SGB serotipo V fue detectado en 7.1% de 197 cepas estudiadas recuperadas de gestantes colonizadas en Misiones.

A fin de conocer la potencial virulencia de estos aislamientos, se estudiaron algunos genes asociados a la misma, así como, su perfil de resistencia fenotípico y genotípico a macrólidos, antimicrobianos recomendados por el CDC para la profilaxis intraparto en pacientes alérgicas a betaláctámicos.²

Al carecer de aislamientos invasivos de serotipo V en la región, hasta la fecha, el estudio se realizó sobre cepas aisladas de gestantes portadoras, resaltando que en publicaciones previas de nuestro grupo de trabajo realizado con cepas colonizantes se detectaron *bac*, *bca*, *rib*, *hylB* y *lmb*,³ sin registros de nacimiento con enfermedad invasiva por SGB, dado que las gestantes colonizadas recibieron la profilaxis intraparto.

La detección de los genes de virulencia estudiados se mostró en resultados.

Es de destacar que en 11 de las 14 cepas de serotipo V estudiadas, se detectaron 4 o más genes (*rib*, *bca*, *hylB*, *lmb*) asociados a la virulencia, lo que confiere a este serotipo una elevada probabilidad de patogenicidad.

Coincidimos con¹⁰ quien trabaja con serotipo V colonizante, en la detección de los genes *bac*, *bca* y *rib* en las 14 cepas serotipo V.

Nuestros resultados concuerdan con Safadi y cols.²⁴ en la elevada presencia de genes *hylB* y *lmb* en aislamientos humanos, los que fueron detectados en nuestro estudio en 100% y 78,6% respectivamente.

Nuestros resultados también coinciden con investigadores²⁵ que asocian la proteína alfa, codificada por el gen *bca* con serotipo V, detectado en todos los aislados de SGB para este serotipo en el presente estudio.

Diferimos con otros autores que encontraron una mayor frecuencia para *bac* (44.4%) seguido de *rib* (33.3%)²⁶ o frecuencias mayores de *lmb* (100%) seguido de *bca* (42.8%) y *bac* (2.4%)⁸ o incluso otros investigadores con muy bajos porcentajes de detección de *bca* (29.2%) e *hylB* (4.2%).²⁷

La importancia en la detección de estos genes y su distribución reside en las estrategias desarrolladas en la generación de vacunas.¹¹

La ERI y CLI son los fármacos de elección a ser usados en la PIP y prevenir la severa enfermedad perinatólogica temprana, por SGB, en gestantes alérgicas a penicilina.

La distribución de los serotipos de SGB varía según la región geográfica y el origen étnico de las mujeres embarazadas y la resistencia a macrólidos de los mismos está sujeta a las modificaciones de las políticas de uso de antimicrobianos en diferentes regiones.⁷

Los fenotipos de resistencia a macrólidos se presentaron en tres cepas lo que informa de un porcentaje de resistencia en serotipo V del 21.43%.

Se han detectados dos mecanismos de resistencia a macrólidos en SGB.

El mecanismo más frecuente es el de modificación del sitio blanco ribosomal por metilación y el mecanismo llamado de eflujo o transporte activo del fármaco.

La metilación de la subunidad 23S del rARN por el gen *erm* (eritromicina ribosomal metilasa) *ermB*, *ermA* (subclase *ermTR*), causa un cambio conformacional en el ribosoma procariota y bloquea la unión de los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B al sitio de unión en la subunidad 50S, conduciendo a resistencia.⁸

Este mecanismo confiere resistencia a macrólidos-lincosamidas y estreptogramina B (MLS_B). Las metilasas pueden expresarse constitutivamente (fenotipo de resistencia constitutivo cMLS_B) o en forma inducible (fenotipo de resistencia inducible iMLS_B).²⁸

El mecanismo llamado de eflujo activo fue descrito como mediado por el *mefA* y confiere resistencia a macrólidos pero no a lincosamidas ni a estreptogramina B (fenotipo M).^{29, 30}

La inducción se ha relacionado con la presencia de cladinosa en los macrólidos de 14 (ERI) y 15 átomos. Los macrólidos de 16 átomos y CLI, no inducen la actividad de la metilasa porque carecen de este azúcar. La sensibilidad a CLI se ve afectada en presencia de un inductor por lo tanto en presencia de este mecanismo debe informarse la cepa en estudio, como resistente, ya que no es clínicamente efectiva.³¹

Como vimos antes, la capacidad de SGB de generar resistencia a ERI y CLI a estos antimicrobianos se ve reflejada en la resistencia al grupo MLS_B, la cual presenta dos variables, la resistencia constitutiva cMLS_B y la inducible iMLS_B, ambas está relacionadas con la expresión genes *erm*.

La variable constitutiva presenta elevado nivel de resistencia a cualquier antimicrobiano del grupo MLS_B, a diferencia de la resistencia inducida que presenta únicamente resistencia a los macrólidos de 14 átomos (ERI) y 15 átomos (azitromicina) y sensibilidad *in vitro* a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas (CLI) y estreptograminas B.

En las cepas MLS_Bi la expresión del gen *erm* es inducida por algunos compuestos como la ERI, un potente inductor para la resistencia iMLS_B, mientras que la CLI es un inductor débil que actúa lentamente. Por ello las cepas con resistencia iMLS_B aparentan susceptibilidad *in vitro* a CLI, pero al ser usado clínicamente ocurre *in vivo* la inducción de la resistencia con el consiguiente fracaso terapéutico.

Ello se explica por ser la CLI un inductor débil, lo que conduce, que a largo plazo, durante el tratamiento, se induzca resistencia a sí misma.

Las características de ERI de ser un inductor potente de la resistencia nos posibilita utilizarla en las pruebas para detectar iMLS_B.

El test de doble disco (D-test), recomendado por el CLSI,²⁰ permite ser utilizado para la detección del mecanismo iMLS_B, como prueba de la expresión fenotípica, de gran utilidad al presagiar la mutación hacia una resistencia constitutiva *in vivo*.³² Estos mecanismos no pueden ser detectados utilizando métodos convencionales de difusión en disco ni por métodos de dilución en caldo o en placas convencionales.

En este estudio los resultados obtenidos por CIM también se confirman para los fenotipos cMLS_B y iMLS_B, donde los valores de ERI son resistentes y los de CLI sensibles, indicando la necesidad de inducción para generar resistencia a macrólidos de 16 átomos.³³

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo en los diversos serotipos de SGB colonizantes, observaciones no publicadas, indican los siguientes niveles de resistencia a macrólidos: Ia, 1,51% (1/66); II, 3,57% (1/28); III, 20% (6/38); No Tipables (NT), 9,09% (1/11).

Analizando las resistencias encontradas en nuestros estudios previos y los datos de la presente investigación, informan de la mayor resistencia a macrólidos en serotipo V.

Estos datos coinciden con otros autores en su asociación a resistencia a macrólidos^{34,35} y difieren de otros que posicionan al serotipo III en primer lugar.^{15,36}

Otros investigadores^{34,37} muestran otros fenotipos que superan en resistencia a macrólidos como el IV, Ib y el III, lo que evidencia la variabilidad geográfica y también la importancia que existe en ciertas regiones sometidas a presiones de consumo de determinados fármacos en variados tratamientos o a políticas de antimicrobianos diferentes.

En nuestro estudio en las tres cepas con resistencia a macrólidos investigada por D-test y confirmada por CIM, se detectaron los genes *ermB* y *ermTR* asociados a fenotipo MLS_B constitutivo y MLS_B inducible respectivamente.

Una cepa con fenotipo inducible presentó, además, el gen *mefA*.

Nuestros resultados coinciden con algunos investigadores^{28,38} que demostraron la presencia de los genes *ermB*, *ermTR* asociados a los fenotipos MLS_B constitutivo y MLS_B inducible respectivamente.

Nuestros datos difieren de^{36, 39} donde no en todos los SGB con resistencia a ERI se detectó algún gen de resistencia investigado.

En otros 2 aislamientos sensibles a macrólidos, según E-test, se detectaron genes de resistencia (*ermB* en 1 cepa y *mefA* en otra) lo que confirma la ausencia de expresión fenotípica en nuestras cepas.

Informes recientes de la incidencia creciente de resistencia a macrólidos y clindamicina en diferentes países, como España⁴⁰ con datos similares a los reportados en EEUU³¹ preocupan sobre la posibilidad de tratamiento o profilaxis inadecuada con estos antibióticos.

Debido a que los genes asociados a la macrólido resistencia son ya reconocidos, entre ellos los genes de resistencia *ermB*, *ermTR*, *mefA*, así como otros genes de resistencia a otros antibióticos, y que todos ellos se encuentran asentados sobre elementos móviles como plásmidos y/o transposones, lo que posibilita la transferencia de los mismos entre organismos, da sustento a la necesidad de un monitoreo permanente de la resistencia en SGB, no sólo para caracterizar fenotípica y genotípicamente las cepas sino para conocer la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia.^{33,37}

Como ciertos investigadores^{41,42} sustentamos la idea de que es posible que cepas sensibles portando algunos de los genes de resistencia detectados, pueden comenzar a expresarlos y desarrollar resistencia bajo determinados estímulos ambientales aún no conocidos, en especial en SGB, que tiene ya reconocida capacidad para adquirir genes de resistencia del ambiente cérvico-vaginal y rectal.

Por todo lo expuesto, concluimos que existe la necesidad de la caracterización genotípica de la virulencia y de la resistencia a macrólidos por el D- test [el NCCLS, actual CLSI, desde 2004, recomienda realizar el test de D-test a todos los *Streptococcus* β-hemolítico, debido a la resistencia a CLI inducible (fenotipo iMLS_B) que conducen a fallas de tratamientos].

Esta recomendación es además de importancia en nuestra provincia, carente de datos de serotipo V.

Destacamos que hasta la fecha no registramos aislados serotipo V de pacientes con enfermedad invasiva.

Nuestros datos de resistencia a ERI publicados⁴³ soportan las recomendaciones de CDC de la vigilancia permanente. Agregado a ello, ante la posibilidad de la resis-

tencia inducible a clindamicina existente, los laboratorios deberían realizar de rutina el D-test sobre toda cepa de SGB.

La comunicación a las autoridades de la Salud Pública debería ser obligatoria a fin de implementar o no, modificaciones en la terapia profiláctica en la PIP en estas gestantes alérgicas a la penicilina.

La importancia de la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a macrólidos y lincosamidas

de las cepas de SGB serotipo V, se destacó a fin de contribuir en la PIP de gestantes alérgicas a penicilina y en el control de infecciones tardías por este microorganismo, aún no totalmente evitables, como así también aportar a la vigilancia epidemiológica de estas cepas y al conocimiento de la distribución y frecuencia de su aparición como prerrequisito en el diseño de estrategias vacunales.⁴⁴

Referencias

1. Poyart C, Réglier-Poupet H, Tazi A, Billoët A, Dmytruk N, Bidet P, et al. "Invasive group B *Streptococcal* infections in infants, France". *Emerg Infect Dis*. 2008;14(10):1647-1649. doi: 10.3201/eid1410.080185.
2. CDC-Centers for Disease Control and Prevention: "Prevention of perinatal group B : revised guidelines from CDC". *MMWR Recomm Rep*. 2010; 59 (RR-10):1-31.
3. Oviedo P, Pegels E, Laczeski M, Quiroga M, Vergara M. "Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina". *Braz J Microbiol*. 2013;44(1):253-258. doi: 10.1590/S1517-83822013005000030.
4. Información en: <http://test.e-legis-ar.msal.gov.ar/leis-ref/public/showAct.php?id=7539&word=#%27>. *Ley Nacional N° 26.369*. 2008. Consultado el 16 de junio de 2014.
5. Larcher JS1, Capellino F, De Giusto R, Travella C, Balangione FG, Kreiker G, et al. "Group B *Streptococcus* colonization during pregnancy and prevention of early onset of disease". *Medicina (B Aires)*. 2005;65(3):201-6.
6. García SD, Eliseth MC, Lazzo MJ, Copolillo E, Barata AD, de Torres R et al. "Group B *Streptococcus* carriers among pregnant women". *Rev Argent Microbiol*. 2003;35(4):183-187.
7. Udo EE1, Boswihi SS, Al-Sweih N. "Genotypes and virulence genes in group B *Streptococcus* isolated in the maternity hospital, Kuwait". *Med Princ Pract*. 2013;22(5):453-7. doi: 10.1159/000349932.
8. Dutra VG, Alves VM, Olendzki AN, Dias CA, de Bastos AF, Santos GO, et al. "*Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility". *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):323-330. doi:10.1186/1471-2334-14-323.
9. Lindahl G, Ståhlhammar-Carlemalm M, Areschoug T. "Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens". *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(1):102-127.
10. Manning SD, Ki M, Marrs CF, Kugeler KJ, Borchardt SM, Baker CJ, et al. "The frequency of genes encoding three putative group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates". *BMC Infect Dis*. 2006;6:116. doi:10.1186/1471-2334-6-116.
11. Burns G, Plumb J. "GBS public awareness, advocacy, and prevention—what's working, what's not and why we need a maternal GBS vaccine". *Vaccine*. 2013;31(4):D58-D65. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.039.
12. Castor ML, Whitney CG, Como-Sabetti K, Facklam RR, Ferrieri P, Bartkus JM, et al. "Antibiotic resistance patterns in invasive group B streptococcal isolates". *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2008; 727505. doi: 10.1155/2008/727505.
13. Le Thomas-Bories I1, Fitoussi F, Mariani-Kurkdjian P, Raymond J, Brahimi N, Bidet P et al. "Clonal relationship between U.S. and French serotype V group B *Streptococcus* isolates". *J Clin Microbiol*. 2001;39(12):4526-8.
14. Persson E, Berg S, Bevanger L, Bergh K, Valsö-Lyng R, Trollfors B. "Characterisation of invasive group B streptococci based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins". *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(1):66-73.
15. Savoia D, Gottimer C, Crocilla' C, Zucca M. "*Streptococcus agalactiae* in pregnant women: phenotypic and genotypic characters". *J Infect*. 2008;56(2):120-125. doi: 10.1016/j.jinf.2007.11.007.
16. Sambrook J, Russell DW. Cold Spring Harbor. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. NY. 2001; Vols. 1-3.
17. Cariaga Martinez AE, Zapata PD. Universitaria de Misiones. *Protocolos de Extracción de ADN. El Laboratorio de Biología Molecular. Edición Ampliada*. Posadas. 2007;23-39.
18. Corso A, Faccone D, Galletti P, Pace J, Regueira M, Pace J, et al. "Prevalence of *mef* and *ermB* genes in invasive pediatric erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentina". *Rev Argent Microbiol*. 2009;41(1): 29-33.
19. Faccone D, Lalondari F, Abel S, Machain M, Errecalde L, Littvik A, et al. "Multiple-Clones of *Streptococcus agalactiae* harbouring *InuB* gene". *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(9):580-582.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement*. 2013;33(1):M100S23.
21. Gherardi G, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Alfarone G, Recchia S et al. "Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy". *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):2909-2916.
22. Elliott JA, Farmer KD, Facklam RR. "Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type". *J Clin Microbiol*. 1998;36(7):2115-6.
23. Stephens DS, Modansky M, Erwin M, Elliot J, Facklam RR, et al. "Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. Blumberg HM1" *J Infect Dis*, Vol. 173, 2, 1996, págs. 365-73.
24. Al Safadi R, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, Mereghetti L, et al. "Enhanced expression of *Imb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS1548 in *scpB-Imb* intergenic region". *PLoS One*. 2010;5(5):e10794. doi: 10.1371/journal.pone.0010794.

25. Martins ER, Andreu A, Correia P, Juncosa T, Bosch J, Ramirez M, *et al.* "Group B streptococci causing neonatal infections in barcelona are a stable clonal population: 18-year surveillance". *J Clin Microbiol.* 2011; 49(8): 2911-2918. doi: 10.1128/JCM.00271-11. Epub 2011 Jun 22.
26. Hannoun A, Shehab M, Khairallah MT, Sabra A, Abi-Rached R, Bazi T, *et al.* "Correlation between Group B *Streptococcal* Genotypes, Their Antimicrobial Resistance Profiles, and Virulence Genes among Pregnant Women in Lebanon". *Int J Microbiol.* 2009; 796512. doi: 10.1155/2009/796512.
27. Dore N, Bennett D, Kaliszer M, Cafferkey M, Smyth CJ. "Molecular epidemiology of group B streptococci in Ireland: associations between serotype, invasive status and presence of genes encoding putative virulence factors". *Epidemiol Infect.* 2003;131(2):823-833.
28. Campelo FA, Pedrosa AC, Antúnez IÁ, Capuz BL. "Phenotypes and mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides in *Streptococcus agalactiae* isolates with clinical significance in an eight-year period (2002-2010)". *Rev Esp Quimioter.* 2012;25(1):42-46.
29. Famiglietti A, Quinteros M, Pedrari S, Corso A, Marín M, Nicola F, *et al.* *Actualización del Consenso Sobre las Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos en Cocos Grampositivos.* Buenos Aires, Argentina. SADE-BAC-AAM. 2004.
30. Mensa J, García-Vázquez E, Vila J. "Macrólidos, cetólidos y estreptograminas". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21(4):200-208.
31. Feng-Ying C. Lin, Parvin H. Azimi, Leonard E. Weisman, Joseph B. Philips III, *et al.* "Antibiotic Susceptibility Profiles for Group B Streptococci Isolated from Neonates, 1995-1998". *CID.* 2000;31:76-80.
32. Tamariz Ortiz J, Cruz Quintanilla J, Atencia Porras A, Figueroa Tataje J, Horna Quintana G, Guerra Allison H. "Resistencia a Clindamicina Inducida por Eritromicina en *Staphylococcus aureus* Aislados de Tres Hospitales de Lima, Perú". *Acta Med Peruana.* 2009;26(1):12-16.
33. Pinheiro S1, Radhouani H, Coelho C, Gonçalves A, Carvalho E, Carvalho JA, *et al.* "Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in *Streptococcus agalactiae* from healthy pregnant women". *Microb Drug Resist.* 2009;15(2):121-4. doi: 10.1089/mdr.2009.0895.
34. Von Both U, Ruess M, Mueller U, Fluegge K, Sander A, Berner R. "A serotype V clone is predominant among erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates in a southwestern region of Germany". *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):2166-2169.
35. De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N. "Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Vol. 2012;31(8):1741-7. doi: 10.1007/s10096-011-1495-4.
36. Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R. "Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in infants: results from a nationwide active laboratory surveillance study over 2 years in Germany". *Clin Infect Dis.* 2005; 40(5): 760-763.
37. Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, Ho SW, Yang PC, Luh KT. "High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan". *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;41(11):3205-3208.
38. Boswihi SS, Udo EE, Al-Sweih N. "Serotypes and antibiotic resistance in Group B *Streptococcus* isolated from patients at the Maternity Hospital, Kuwait". *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt1):126-31. doi: 10.1099/jmm.0.035477-0.
39. DiPersio LP, DiPersio JR. "High rates of erythromycin and clindamycin resistance among OBGYN isolates of group B *Streptococcus*". *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54(1):79-82.
40. Betriu, C., y otros. "Erythromycin and clindamycin resistance and telithromycin susceptibility in *Streptococcus agalactiae*". *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):1112-1114.
41. Ardanuy C1, Tubau F, Liñares J, Domínguez MA, Pallarés R, Martín R y (G03/103)., "Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Distribution of subclasses *mefA* and *mefE* of the *mefA* gene among clinical isolates of macrolide-resistant (M-phenotype) *Streptococcus pneumoniae*, viridans group streptococci, and *Streptococcus pyogenes*". *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):827-829.
42. Gyax SE, Schuyler JA, Kimmel LE, Trama JP, Mordechai E, Adelson ME. "Erythromycin and clindamycin resistance in group B *Streptococcal* clinical isolates". *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1875-1877.
43. Quiroga M, Pegels E, Oivedo P, Laczeski M, Vergara Marta. "Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Misiones, Argentina". A. Méndez-Vilas, *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Badajoz. 2011;444-447.
44. Chen VL, Avci FY, Kasper DL. "A maternal vaccine against group B *Streptococcus*: past, present, and future". *Vaccine.* 2013;31(4):D13-D19. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.080.