

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
ESCUELA DE GRADUADOS



Título:

Susceptibilidad antimicrobiana, serotipos capsulares, relación clonal y determinantes de resistencia a macrólidos en cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae* aisladas desde episodios bacteriémicos en población adulta de la Octava Región-Chile

Por

Cristian Gustavo Aguilera Rossi

Tesis de Magíster presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción para optar al Grado de Magíster en Ciencias, Mención Microbiología

CONCEPCION-CHILE

2007

## RESUMEN

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es una bacteria Gram positiva que tiene un rol preponderante como agente etiológico de infecciones menores o no invasoras (otitis media aguda, sinusitis aguda) e infecciones invasoras (neumonía, meningitis, bacteriemia y, más raramente, artritis o peritonitis). Las infecciones invasoras por *S. pneumoniae* constituyen un serio problema de salud pública en países en desarrollo debido a las elevadas tasas de mortalidad que presentan. La habilidad de neumococo para causar enfermedad está directamente relacionada con la presencia de una cápsula polisacárida que se encuentra rodeando la pared bacteriana. Los polisacáridos capsulares son de naturaleza química variada y actúan como antígenos específicos; los distintos serotipos se comportan de manera diferente en cuanto a su capacidad antigénica, virulencia y propiedad colonizadora. Otro factor que explica la importancia que ha adquirido este patógeno, y que ha complicado el manejo de las infecciones neumocócicas, es el incremento de la resistencia, inicialmente a penicilina y posteriormente a cefalosporinas y otras familias de antimicrobianos. En el caso de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ésta se debe a alteraciones en determinadas proteínas de unión a penicilina (PBPs) que disminuyen su afinidad natural por el fármaco (específicamente PBP1a, PBP2b y PBP2x). Estudios de epidemiología molecular han evidenciado que el aumento de la resistencia a penicilina en *S. pneumoniae* sería el resultado de dos fenómenos concomitantes, la importación de clones internacionales que poseerían un carácter epidémico y atributos especiales de virulencia y múltiples eventos de transferencia horizontal de resistencia a cepas susceptibles, que ocurren de manera independiente y localizada. Se ha logrado determinar, mediante extensos estudios de tipificación molecular en muchas regiones del mundo, un número importante de clones de *S. pneumoniae* resistentes a antimicrobianos que han alcanzado una diseminación geográfica importante en países individuales y, en algunos casos, cruzando límites internacionales. Resulta adecuado mencionar, que representantes de la familia de los macrólidos son importantes alternativas a antibióticos  $\beta$ -lactámicos para el tratamiento de infecciones a nivel del tracto respiratorio bajo, y destacar que el nivel de resistencia a macrólidos en cepas de *S. pneumoniae* se está incrementando a nivel mundial, con algunas variaciones entre países. En este estudio se logró obtener información regional sobre susceptibilidad antimicrobiana, serotipos comprometidos y

relación clonal, además, de investigar los determinantes de resistencia a macrólidos presentes en cepas clínicas de *S. pneumoniae* aisladas desde episodios bacteriémicos en población chilena adulta. Se investigó cada uno de los aislamientos obtenidos desde infecciones bacteriémicas neumocócicas en pacientes mayores de 15 años, hospitalizados en el Hospital Clínico Regional de Concepción, Hospital Higuera de Talcahuano y Hospital Naval de Talcahuano, durante el período Enero 2005-Agosto 2006. Las cepas fueron enviadas al Laboratorio de Antibióticos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción, donde se procedió a confirmar la identificación, de acuerdo a técnicas convencionales. Se realizaron estudios de susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en agar a los siguientes antibióticos oxacilina, vancomicina, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, levofloxacina y moxifloxacina. Las cepas resistentes a eritromicina fueron ensayadas, además, frente a discos de claritromicina, azitromicina, clindamicina y lincomicina. A las cepas resistentes o con susceptibilidad disminuida se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo. Las cepas de *S. pneumoniae* fueron serotipificadas mediante la reacción de Neufeld-Quellung, utilizando el sistema Pneumotest y la relación genética se evaluó mediante análisis de macrorestricción y electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE). A las cepas resistentes a eritromicina se les realizó caracterización fenotípica mediante el ensayo de proximidad con doble disco (test D); se determinó el mecanismo de resistencia a macrólidos por la amplificación de los genes *mef(E/A)* y *erm(B)* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se confirmó la presencia de los genes *mef(E/A)* y *erm(B)* tratando los productos de amplificación obtenidos con diversas enzimas de restricción mediante el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). La diferenciación de los genes *mef(A)* y *mef(E)* se realizó mediante un ensayo de amplificación y posterior restricción (PCR-RFLP) de un único e indiferenciado amplicón, para luego confirmar los resultados mediante secuenciación de estos productos. Se logró confirmar que cepas clínicas de *S. pneumoniae* aisladas desde episodios invasores (cuadros bacteriémicos) en población adulta chilena mantienen aún una importante susceptibilidad frente a penicilina y cefotaxima, antimicrobianos de elección al momento de iniciar terapia antibiótica. Se demostró la existencia de un número importante de cepas con multiresistencia, particularmente a macrólidos, tetraciclina y sulfametoxazol/trimetoprim. Del total de cepas

con susceptibilidad intermedia a penicilina, 72,7% (8/11) presentó resistencia a otro agente antimicrobiano, sólo 28,9% (13/45) de las cepas susceptibles a penicilina mostró coresistencia con otros agentes antibacterianos. No se presentaron cepas resistentes a levofloxacin, moxifloxacin y vancomicina.

Respecto de los polisacáridos capsulares prevalentes en estas cepas, se determinó que los serotipos 1, 5, 23F, 7F y 3 corresponden a los serotipos capsulares predominantes y que están incorporados en la formulación de la vacuna antineumocócica disponible comercialmente en nuestro país (Pneumo23®). Se determinó además, mediante tipificación molecular, que en las cepas de *S. pneumoniae* investigadas, existe una gran diversidad clonal con 31 patrones diferentes y 12 grupos clonales en un total de 52 cepas analizadas, no existiendo un componente clonal prevalente y descartándose la posibilidad de una posible relación genética con clones internacionales descritos, para población pediátrica, como presentes y circulantes en países sudamericanos (Spain<sup>23F</sup>-1, Spain<sup>6B</sup>-2, Spain<sup>9V</sup>-3, Colombia<sup>5</sup>-19 y Colombia<sup>23F</sup>-26).

Nuestra investigación determinó que 17,9% (10 cepas) de los aislados de *S. pneumoniae* recuperados desde episodios bacteriémicos en población adulta fue resistente a eritromicina. Se determinó que la resistencia a macrólidos en estas cepas se debe a modificación de sitio blanco y/o eflujo, la alteración de sitio blanco es mediada por metilasas (fenotipo MLS<sub>B</sub>), las cepas que presentaron el genotipo *erm*(B), expresaron los niveles de resistencia más elevados de toda la serie, con valores de CMI de 1.024->2.048 µg/ml, valores muy superiores a lo descrito en literatura para este fenotipo y presentaron en su mayoría, coresistencia con tetraciclina. El sistema de eflujo confiere resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, pero no a estreptograminas del grupo B y clindamicina (lincosamidas) (fenotipo M), se destaca la importancia clínica del eflujo como mecanismo prevalente en cepas chilenas (60%) y su asociación con serotipos presentes en la formulación de la vacuna polisacárida. Se logró establecer la presencia de 2 variantes, el gen *mef*(A) y el gen *mef*(E), presentes cada uno en tres aislamientos, se confirmó que la totalidad de las cepas de *S. pneumoniae* que presentaron el gen *mef*(A) fueron susceptibles a penicilina (CMI ≤ 0,06 µg/ml); sin embargo, para el caso de las cepas *mef*(E), la mayoría (2/3) presentó susceptibilidad disminuida frente a penicilina (CMI 0,12-1,0 µg/ml), por lo tanto, parece existir una asociación entre *mef*(A) y susceptibilidad a penicilina, y entre *mef*(E) y

susceptibilidad disminuida frente a la penicilina. El aumento en el uso de macrólidos ha sido asociado a un incremento en la resistencia neumocócica a estos agentes y actualmente, cepas de *S. pneumoniae* resistentes a macrólidos son mucho más frecuentes que los aislamientos resistentes a penicilina, en muchas partes del mundo. Se enfatiza de esta manera, el uso adecuado de cefalosporinas de 3<sup>ra</sup> generación en el tratamiento de estas infecciones y la necesidad de vacunación antineumocócica en pacientes de riesgo y mayores de 65 años, en un intento por disminuir la morbilidad y mortalidad por procesos infecciosos invasores causados por *S. pneumoniae*.

