

SENSIBILIDAD A TRIMETOPRIMA-SULFAMETOXAZOL DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* AISLADOS DE INFECCIONES INVASIVAS

LAURA VIGLIAROLO¹, LUCIANA GAZZELI¹, LAURA BONOFILIO², MARTA MOLLERACH², HORACIO LOPARDO¹

¹Cátedra de Microbiología Clínica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata,

²Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires-CONICET, Buenos Aires, Argentina

Resumen Se cree erróneamente que los estreptococos del grupo A (EGA) son universalmente resistentes a trimetoprima-sulfametoxazol (TMS). Esto se debe a que la timidina presente en los medios habitualmente usados para determinar sensibilidad *in vitro* a antibióticos antagoniza el efecto antibiótico de TMS. El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad de EGA a TMS, en presencia y ausencia de timidina. A tal fin, fueron analizados 95 aislamientos clínicos obtenidos de tejidos normalmente estériles con infección invasiva por EGA. Las pruebas de sensibilidad por difusión con discos de TMS fueron realizadas en agar Mueller Hinton adicionado ya sea con 5% de sangre de carnero (MH-SC) o con 5% de sangre equina lisada (MH-SEL). La sangre equina lisada contiene timidina fosforilasa, que degrada este nucleósido. Como método de referencia se utilizó la epsilometría (*Etest*). El control de calidad con la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fue satisfactorio para ambos medios. La sensibilidad a TMS por difusión fue 100% en MH-SEL; en agar MH-SC 6 (6.3%) aislamientos resultaron resistentes; por *Etest* todos fueron sensibles, excepto uno de esos seis que presentó sensibilidad intermedia (CIM = 1.5/28.5 µg/ml). En este aislamiento no se encontraron las mutaciones genéticas de EGA más frecuentemente asociadas a resistencia a TMS. Probablemente, si se establecieran mejores puntos de corte para difusión, específicos para EGA, podría optimizarse la correlación con métodos de dilución o con *Etest*, aun empleando MH-SC.

Palabras clave: sensibilidad, trimetoprima-sulfametoxazol, *Streptococcus pyogenes*

Abstract **Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* isolated from invasive infections to trimethoprim-sulfamethoxazole.** It is erroneously believed that group A streptococci (GAS) are universally resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole (TMS). This is mainly because media commonly used for *in vitro* determination of susceptibility to antibiotics contain thymidine, a nucleoside that antagonizes the antibiotic effect of TMS. The objective of this work was to determine EGA sensitivity to TMS in the presence and absence of thymidine. To this aim, 95 GAS isolates obtained from clinical tissues with invasive infections were analyzed. Susceptibility tests were performed by diffusion with TMS discs in Mueller Hinton agar supplemented either with 5% sheep blood or with 5% lysed equine blood (MH-LEB). Lysed equine blood contains thymidine phosphorylase, which degrades this nucleoside. Epsilometry (*Etest*) was used as gold standard. Quality controls with *Enterococcus faecalis* strain ATCC 29212 were satisfactory with both media. A 100% sensitivity to TMS was found in MH-SEL whereas 6 isolates (6.3%) resulted resistant in MH-SC; only one of them was found to have intermediate susceptibility by *Etest* (MIC > 1.5/28 µg/ml). The genetic determinants most frequently associated to TMS resistant EGA were not found in this isolate. Probably, if more accurate GAS-specific cut-off points were established for diffusion, the correlation with dilution methods or with the *Etest* could be improved, even employing MH-SB.

Key words: susceptibility, trimethoprim-sulfamethoxazole, *Streptococcus pyogenes*

La estructura química de las sulfamidas es muy similar a la del ácido p-aminobenzoico, precursor en la síntesis del ácido fólico. Debido a esa analogía, las sulfamidas inhiben la síntesis del folato al unirse competitivamente a la enzima dihidropteroato sintetasa. En el mismo camino

metabólico actúa la trimetoprima y lo hace sinérgicamente con las sulfamidas, inhibiendo la acción de la dihidrofolato-reductasa. La combinación trimetoprima-sulfametoxazol (TMS) se utiliza en proporción 1:5 (trimetoprima: sulfametoxazol) en el producto denominado cotrimoxazol¹.

La resistencia a las sulfamidas está actualmente bastante difundida y es común a todos los compuestos del grupo. En las bacterias Gram positivas los mecanismos de resistencia más importantes son el eflujo activo o las alteraciones enzimáticas que comprenden vías metabólicas alternativas e hiperproducción de enzimas, a través

Recibido: 8-V-2018

Aceptado: 27-VIII-2018

Dirección postal: Dr. Horacio A. Lopardo, Cátedra de Microbiología Clínica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina
e-mail: hlopar25@gmail.com

de mutaciones, plásmidos u otros elementos genéticos transmisibles.

Las infecciones por *Streptococcus pyogenes* fueron de las primeras en ser tratadas con sulfamidas en la década de los 30². Estas drogas demostraron ser efectivas en el tratamiento y en la profilaxis de estas infecciones, aunque algunos resultados *in vitro* y el fracaso de programas de profilaxis masiva en soldados determinaron que dejaran de ser utilizadas para el tratamiento de las infecciones estreptocócicas³. Además, se ha generado la creencia errónea sobre la resistencia universal de los estreptococos del grupo A (EGA) (*Streptococcus pyogenes*) a trimetoprima-sulfametoxazol (TMS). Esta creencia proviene de utilizar *in vitro* medios con timidina y de las fallas observadas con el uso de TMS en infecciones purulentas de piel y tejidos blandos o en las que se producía gran destrucción de tejidos. Si bien no se realizaron estudios clínicos controlados, en la década de los 40 se observó que la inhibición de las sulfamidas por el pus podría ser una de las causas de fallas de tratamiento⁴. Uno de los principales componentes del pus es el ADN liberado por las células inflamatorias y los tejidos dañados. Los microorganismos son capaces de obtener timidina por degradación del ADN a través de sus DNAsas y ésta es teóricamente capaz de antagonizar el efecto antibiótico de los inhibidores de la síntesis del folato como TMS⁵. La timidina es el principal producto metabólico para el que se necesita la presencia del ácido fólico. *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y los EGA pueden incorporar timidina externa e independizarse de la síntesis de ácido fólico, no así *Streptococcus pneumoniae* ni estreptococos del grupo viridans⁵.

Una nueva mirada a este problema descubrió que la falta de sensibilidad *in vitro* en muchos casos en realidad podría deberse al uso estandarizado del agar Mueller Hinton con 5% de sangre ovina en las pruebas en medio sólido que contiene concentraciones suficientes de timidina para inhibir la acción de TMS². La sangre de caballo lisada es la única sangre de mamífero que contiene timidina fosforilasa, la que neutraliza la timidina y revierte la falsa resistencia generada por la presencia de > 0.03 µg/ml de timidina en el medio⁶. Bowen y col. publicaron una lista de 14 estudios de diferentes países (Alemania, Bélgica, EE.UU., India, Israel, Nepal, Noruega) y distintas épocas, en los que la resistencia oscilaba entre 0 y 100%². Esto dependía de las condiciones de trabajo y, en particular, del medio de cultivo utilizado. Los que informaron valores elevados de resistencia no describieron apropiadamente el medio utilizado o usaron medios con alto contenido de timidina².

No obstante, la resistencia real a trimetoprima existe en EGA y *S. pneumoniae*^{2, 7} y es por ello que es importante conocer la prevalencia de la resistencia generada por mutación de la enzima dihidrofolato reductasa y diferenciarla de la falsa resistencia debida al uso de agar

Mueller Hinton con 5% de sangre ovina⁸. La resistencia genuina a trimetoprima puede estar mediada por al menos cinco mecanismos: (i) permeabilidad⁹, (ii) presencia de una dihidrofolato-reductasa naturalmente insensible⁸, (iii) mutaciones espontáneas en la dihidrofolato-reductasa^{10, 11}, (iv) producción aumentada de la enzima sensible por sobre-regulación o duplicación de los genes¹² y (v) adquisición horizontal (mediada por plásmidos o por conjugación) de genes *dfp* que codifican dihidrofolato-reductasa resistente. Solo unos pocos genes transmisibles se han identificado en bacterias Gram positivas. Dos de ellos, el *dfpG* y el *dfpF* fueron detectados en *S. pyogenes*¹³.

También se identificaron mutaciones en el cromosoma de *S. pyogenes* que codifican dihidrofolato sintetasas modificadas responsables de la resistencia a las sulfamidas¹⁴. No obstante, el conocimiento de los genes y mutaciones que confieren resistencia a sulfas y trimetoprima en *S. pyogenes* aún es insuficiente.

En infecciones de piel y tejidos blandos, la coexistencia de EGA y *Staphylococcus aureus* resistente a metilina adquirido en la comunidad (CA-MRSA), habitualmente sensible a TMS, ha impulsado nuevos estudios de sensibilidad *in vitro* a esta combinación⁴.

El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad real a TMS de aislamientos clínicos de estreptococos beta-hemolíticos obtenidos de pacientes con infecciones invasivas y observar las diferencias entre los resultados de sensibilidad a este antibiótico en agar Mueller Hinton con 5% de sangre equina lisada (MH-SEL) versus agar Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero (MH-SC).

Materiales y métodos

Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron aisladas en el marco de un estudio multicéntrico nacional de infecciones invasivas por estreptococos de grupo A realizado entre el 1 de julio de 2011 y el 30 de junio de 2012 (Traverso F, Villalón P, Blanco MA, et al. Invasive infections due to group A streptococci in Argentina (2011-2012). Trabajo N° 0314. XIX *Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases*, Buenos Aires 9-12 de noviembre de 2014).

Se definió como infección invasiva a toda aquella localizada en tejidos profundos, sangre, líquido cefalorraquídeo, pulmón, líquido articular u otros obtenidos por punción, diagnosticada sobre la base del aislamiento de microorganismos a partir de muestras que normalmente deberían ser estériles.

Se incluyeron en ese estudio todos los estreptococos del grupo A aislados de materiales previamente estériles de pacientes atendidos en los 28 centros participantes.

Las placas de MH-SC y MH-SEL fueron preparadas con base de agar Mueller Hinton Difco por Laboratorio Argentino, Buenos Aires. Cada lote de MH-SC y MH-SEL fue controlado con discos de TMS (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) y con la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 según recomendaciones del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Se realizaron pruebas de sensibilidad por difusión con discos de TMS en ambos medios según recomendaciones del CLSI¹⁵. Dado que CLSI no fijó puntos de corte para EGA, se utilizaron los establecidos por el CLSI para *S. pneumoniae*.

(S \geq 19 mm; R \leq 15 mm), muy similares a los recomendados por EUCAST, con un medio de cultivo algo diferente, para EGA (S \geq 18 mm; R \leq 15 mm)².

Como método de referencia se utilizó la epsilometría. Para ello, se efectuaron pruebas de *Etest* (Biomérieux Argentina) en MH-SC, con aislamientos que por difusión presentaban halos de inhibición cercanos al punto de corte. En este caso también se utilizaron los puntos de corte establecidos por el CLSI para *S. pneumoniae* (S \leq 0.5/9.5 $\mu\text{g/ml}$; R \geq 4/76 $\mu\text{g/ml}$), casi coincidentes con los del EUCAST para EGA (S \leq 1/19 $\mu\text{g/ml}$; R \geq 4/76 $\mu\text{g/ml}$)².

Se realizó un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para evaluar la presencia de las mutaciones más frecuentes en los genes *dfrG* y *dfrF*, que codifican las dihidrofolato-reductasas en EGA¹⁶. Las secuencias de los *primers* y el protocolo de reacción utilizado fueron descritos por Bergmann y col.¹⁶ (Tabla 1). Además, se utilizaron controles internos de amplificación (gen *16S rRNA*). Los productos fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% sometidos a electroforesis horizontal.

Resultados

El control de calidad con la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 fue satisfactorio con los dos medios: 22 mm en MH-SC y 24 mm en MH-SEL.

Fueron analizados 95 aislamientos de *S. pyogenes*. Por difusión la sensibilidad a TMS fue 93.7% en MH-SC y 100% en MH-SEL. Las diferencias observadas entre determinaciones con ambos medios fueron de 1 a 7 mm en el 92.8% de los 95 casos, con halos mayores en MH-SEL.

Por *Etest* solo en un caso se obtuvo un valor de CIM superior a 0.5/9.5 $\mu\text{g/ml}$ (1.5/28.5 $\mu\text{g/ml}$). En esta cepa no se detectó la presencia de los genes *dfrG* y *dfrF*. Los

controles positivos de amplificación arrojaron los resultados esperados.

Discusión

En total, seis aislamientos hubieran sido considerados resistentes a TMS por difusión con MH-SC y solo uno de ellos resultó tener sensibilidad intermedia por *Etest* (1.1%). Como ya se indicó anteriormente, en la literatura se encuentran porcentajes de resistencia que van de 0 a 100%, pero la metodología aplicada en muchos de ellos ha sido recientemente cuestionada². Bergmann y col.¹⁶ con la utilización de MH-SEL, observaron que solo el 1.6% (37/2371) de los EGA aislados en Alemania eran resistentes a TMS y que 25.7% (69/268) eran resistentes en la India. La mayor parte de los aislamientos resistentes provenientes de la India poseían los genes *dfrF* o *dfrG* (42/69), mientras que solo 4 de 37 aislamientos alemanes tenían el gen *dfrF*. Los mecanismos implicados en el resto de las bacterias resistentes no fueron identificados.

En este trabajo solo investigamos la presencia de los genes *dfrG* y *dfrF* por PCR en el aislamiento que resultó tener sensibilidad intermedia por *Etest*. Éste no era portador de estos determinantes genéticos, que son los más frecuentes según otros autores¹⁶. Este resultado negativo no descarta la presencia de alguna de las otras variantes descritas o mecanismos alternativos de resistencia.

En nuestro estudio, la mayor parte de los aislamientos fue sensible a TMS en ambos medios. Consideramos que realizando los controles adecuados del medio y definiendo

TABLA 1.– Condiciones de PCR para la detección de los marcadores genéticos de resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol más frecuentes en *Streptococcus pyogenes* (modificadas de Bergmann et al¹²)

Amplicones y cebadores	
Amplicón <i>dfrG</i> 500 pb, temperatura de anillado 55 °C	<i>dfrGFw</i> atgaaagttctttgattgctgca <i>dfrGrev</i> caataagttttcttcatatacatg
Amplicón <i>dfrF</i> 200 pb, temperatura de anillado 52 °C	<i>dfrFFw</i> ttaacaacgggtaatgtgt <i>dfrFrev</i> aaatagttccatccaccag
Condiciones de ciclado	
95 °C 5 min, 30 × (95 °C 30 seg , 52 °C 30 seg, 72 °C 30 seg), 72 °C 5 min	
Mezcla de reacción	
Reactivo	Volumen (25 μl)
<i>Buffer</i> Taq 10 X libre de MgCl_2	2.5 μl
MgCl_2 25 mM	2 μl
dNTPs 10 mM	0.63 μl
oligonucleótido cebador <i>up</i> 10 pmol/ μl	2 μl
oligonucleótido cebador <i>down</i> 10 pmol/ μl	2 μl
Agua csp. 24 μl	14.75 μl
<i>Taq</i> polimerasa 5 U/ μl	0.12 μl

muy bien los puntos de corte específicos para *S. pyogenes*, la prueba de sensibilidad a TMS por difusión, aun en MH-SC podría ser un método confiable.

Será necesario realizar estudios de reproducibilidad de los métodos dado que, en algunos casos, la lectura de los halos de inhibición puede resultar engorrosa. También será necesario realizar estudios clínicos para determinar la correlación de esta sensibilidad con la eficacia de TMS en los tratamientos y establecer qué tipo de casos podrían beneficiarse con el uso de TMS.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Alberto Gutiérrez (Laboratorio Argentino) por la provisión de agar Mueller Hinton + sangre ovina y sangre equina lisada.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Calvo J, Martínez Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 44-52.
2. Bowen AC, Lilliebridge RA, Tong SY, et al. Is *Streptococcus pyogenes* resistant or susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole? *J Clin Microbiol* 2012; 50: 4067-72.
3. Hartman TL, Weinstein L. The problem of sulfonamide-resistant hemolytic streptococci. *N Engl J Med* 1948; 238: 560-3.
4. Goldstein EJC, Proctor RA. Role of folate antagonists in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 584-93.
5. Coll PF, Ausina VR, Vernis JV, Mirelis BO, Prats GP. Exogenous thymidine and reversal of the inhibitory effect of sulfamethoxazole-trimethoprim on streptococci. *Eur J Clin Microbiol* 1984; 3: 424-6.
6. Kärpänoja P, Nyberg ST, Bergman M, et al. Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2480-5.
7. Vicente D, Pérez Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28: 122-30.
8. Huovinen P, Sundstrom L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 279-89.
9. Pikis A, Donkersloot JA, Rodriguez WJ, Keith JM. A conservative amino acid mutation in the chromosome-encoded dihydrofolate reductase confers trimethoprim resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1998; 178: 700-6.
10. Adrian PV, Klugman KP. Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2406-13.
11. Brochet M, Couvé E, Zouine M, Poyart C, Glaser P. A naturally occurring gene amplification leading to sulfonamide and trimethoprim resistance in *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* 2008; 190: 672-80.
12. Bergmann R, Sagar V, Nitsche-Schmitz DP, Chhatwal GS. First detection of trimethoprim resistance determinant *dfpG* in *Streptococcus pyogenes* clinical isolates in India. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5424-5.
13. Cattoir V. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: basic biology and clinical manifestations*. [internet] Oklahoma (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016.
14. Swedberg G, Ringertz S, Skold O. Sulfonamide resistance in *Streptococcus pyogenes* is associated with differences in the amino acid sequence of its chromosomal dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1062-7.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, M2, A12 (12th ed), Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.
16. Bergmann R, van der Linden M, Chhatwal GS, Nitsche-Schmitz DP. Factors that cause trimethoprim resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 2281-8.

Vital statistics in the West are dominated by medicine and birth control: one diminishes death, the other births. The result is that the average age in the West increases: there is a smaller percentage of young people and a larger percentage of old people. Some consider that this must have unfortunate results, but speaking as an old person, I am not so sure.

Las estadísticas vitales en Occidente están dominadas por la medicina y el control de la natalidad: una domina la muerte y la otra los nacimientos. El resultado es que la edad promedio en Occidente aumenta: hay un menor porcentaje de jóvenes y un porcentaje mayor de viejos. Algunos consideran que esto puede tener infortunados resultados, pero, hablo como una persona vieja, yo no estoy tan seguro.

Bertrand Russell (1872-1970)

The impact of science in society (1953). New York: AMS Editions, 1968, p 27