

# **Resistencia fenotípica a eritromicina en *Staphylococcus spp.* aislados de infecciones en perros**

**DENAMIEL,G<sup>1</sup>; MÁS,J<sup>1</sup>; PUIGDEVALL, T<sup>1</sup> y GENTILINI,E<sup>1</sup>.**

## **RESUMEN**

Un total de 98 cepas de *Staphylococcus spp.* resistentes a eritromicina, aislados a partir de infecciones en piel y oído de perros procedentes de la ciudad de Buenos Aires y el conurbano, se caracterizó el perfil fenotípico de resistencia frente a eritromicina (Eri). El 73,5 % (72) de los estafilococos presentó el fenotipo „MLS, el 10,2 % (10) el fenotipo ¡MLS y el 16,3 % (16) el fenotipo M. No se detectaron estafilococos con fenotipo L de resistencia. Todas las cepas presentaron una concentración mínima inhibitoria mayor a 256 µg/ml para eritromicina. A través del monitoreo de estos perfiles fenotípicos podremos aportar datos sobre la evolución epidemiológica de la eritromicina resistencia y minimizar los errores de interpretación en las lecturas de las pruebas de sensibilidad.

*Palabras clave:* (resistencia), (macrólidos), (eritromicina), (*Staphylococcus*)

<sup>1</sup>Microbiología Veterinaria

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires

Chorroarín 280 (1427) Bs.As. Argentina.

gdenam@fvet.uba.ar; [egenti@fvet.uba.ar](mailto:egenti@fvet.uba.ar)

recibido: septiembre 2003/aceptado: junio 2004

# Resistance phenotypes to erythromycin in *Staphylococcus* spp isolated from dog's infections

## SUMMARY

A total of 98 strains of erythromycin-resistant *Staphylococcus* spp isolated from otitis and skin infections in dogs from Buenos Aires city and outskirts were tested for their resistance phenotype profile to erythromycin (Eri). Of these, 73.5% (72) of *Staphylococcus* showed  $\mu$ MLS phenotype, 10.2% (10) showed  $\mu$ MLS phenotype and 16.3% (16) showed M phenotype. *Staphylococci with L phenotype were not found*. The Eri MIC for all the strains was over 256  $\mu$ g/ ml. Throughout these studies, we can have more information about the evolution in the epidemiological resistance to erythromycin, and errors in the interpretation of sensibility test could be reduced.

*Key words* (resistance), (macrolides), (erythromycin), (*Staphylococcus*)

## INTRODUCCIÓN

Las asociaciones mundiales encargadas de la estandarización de la metodología e interpretación de las pruebas de sensibilidad *in vitro*, tienen como objetivo colaborar en la elección adecuada del antimicrobiano para el tratamiento según el microorganismo aislado y localización de la infección<sup>5</sup>. Para el caso de estafilococos de importancia clínica, se recomienda ensayar en primera instancia los antibióticos betalactámicos (penicilina y oxacilina), sin embargo es habitual encontrar cepas resistentes a los mismos<sup>8, 9, 13, 17, 20</sup>, por lo que se deben probar otros grupos de antimicrobianos, como los macrólidos.

Estos antibióticos conforman un grupo que estructuralmente poseen azúcares unidos a un gran anillo lactónico. Su mecanismo de acción está dado por la inhibición de la síntesis proteica al actuar sobre la fracción 50S de los ribosomas

bacterianos, resultante del bloqueo de la translación del ARN-t-aa por interferencia estérica<sup>18</sup>. La eritromicina es uno de los más utilizados en medicina veterinaria.

Los macrólidos junto con las lincosamidas (Lin) y estreptograminas B, conforman un grupo de antimicrobianos vinculados por presentar un mismo mecanismo de acción y espectro antibacteriano. Los receptores ribosomales son comunes o se encuentran próximos por lo que es conocido desde hace tiempo que los cocos Gram positivos manifiestan resistencia cruzada frente a ellos, pudiendo aparecer como drogas activas “*in vitro*” pero ser clínicamente inefectivas

Los cocos Gram positivos poseen diferentes mecanismos de resistencia frente macrólidos que se reconocen como los fenotipos: MLS, M y L<sup>2,4,5,6,18</sup>

El fenotipo MLS es originado por la producción de una enzima llamada metilasa, que causa un cambio en la conformación del sitio blanco, reduciendo la unión del antibiótico a la subunidad 50S del ribosoma. Este fenotipo puede ser constitutivo (cMLS) o inducible (iMLS) e indica resistencia cruzada frente a todos los macrólidos, incluyendo los derivados con núcleos de 14, 15 y 16 átomos de carbono, así como a lincosamidas y estreptograminas B.

El fenotipo M consiste en un mecanismo de resistencia que incluye un sistema de eflujo activo específico con tres componentes, dos de los cuales median la unión al ATP mientras que el último es una proteína de membrana, hidrofóbica, que causa la expulsión del antibiótico al exterior. Este fenotipo indica únicamente resistencia a los compuestos de 14 y 15 átomos de carbono, incluida Eri, sin afectar a los de 16 átomos de carbono ni a lincosamidas y estreptograminas.

El fenotipo L, es producido por la presencia de una lincosamida nucleotidiltransferasa que puede presentarse en los estafilococos coagulasa negativos (ECN).

El objetivo de este trabajo es estudiar el patrón fenotípico de resistencia frente a eritromicina en cepas de *Staphylococcus* spp aisladas a partir de infecciones en perros de Buenos Aires y el Gran Buenos Aires.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Muestras:* Se trabajó con un total de 98 cepas de *Staphylococcus* spp resistentes a Eri, detectadas por el método de difusión en agar<sup>1</sup>, según recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS)<sup>14, 15</sup>. Las cepas fueron aisladas a partir de infecciones de piel y oído en perros, sin discriminar raza, sexo o edad, provenientes de Buenos Aires y Gran Bs. As, obtenidas entre enero de 2001 y mayo de 2003, e identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales (catalasa, fermentación de la glucosa, crecimiento con cloruro de sodio al 6.5% y coagulasa) según Manual Bergey<sup>3</sup>

*Caracterización de los fenotipos de resistencia a eritromicina:* Se realizó por antibiograma por difusión<sup>1</sup>, colocando un disco de Eri (15µg) a dos centímetros de un disco de clindamicina (Cli 2µg) y de lincosamida (Lin 2µg) siguiendo las recomendaciones del NCCLS<sup>14, 15</sup>.

La interpretación de los fenotipos se realizó según la siguiente lectura:

Fenotipo  $\phi$ MLS (Eri-R y Cli-R): se detectó por la ausencia de un halo de inhibición alrededor de los discos de Eri y Cli, indicando resistencia a ambos antimicrobianos.

Fenotipo  $\bar{\mu}$ MLS (Eri-R y Cli-S): se detectó por la ausencia de un halo de inhibición frente a Eri y un achatamiento del halo de Cli interpretándose como resistente a ambos antibióticos.

Fenotipo M (Eri- R y Cli-S): se detectó por la ausencia de halo de inhibición en el disco de Eri y presencia de halo de inhibición en el disco de Cli indicando resistencia a Eri y sensibilidad a Cli.

Fenotipo L (Eri-S y Lin-R): se detectó con presencia de halo de inhibición en el disco de Eri y ausencia de halo de inhibición en el disco de Lin interpretándose como Eri sensible y Lin resistente.

*Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) para eritromicina:* Se utilizaron tiras Etest AB Biodisk de eritromicina, según recomendaciones del fabricante y del suplemento M100-S 13 para la interpretación con M7- A6 (Tabla 2C) de la NCCLS<sup>14, 15</sup> (placas con un espesor de

4mm de agar Mueller Hinton, un inóculo equivalente a la turbidez del 0.5 de Mac Farland y cultivados a 35°C en aerobiosis por 18 horas).

## RESULTADOS

Se identificaron los fenotipos de resistencia a Eri de 98 cepas de *Staphylococcus* spp. con la prueba de doble disco. El 73,5 % presentó el fenotipo  $\mu$ MLS el 16,3 % el M y el 10,2 % el  $\dot{\mu}$ MLS. No se aislaron cepas con el fenotipo L. Todos los fenotipos de resistencia presentaron valores de CIM a eritromicina superiores a 256  $\mu$ g/ml.

Tabla 1. Fenotipos de resistencia a eritromicina hallados en 98 aislamientos de *Staphylococcus* spp .

Fenotipos de Resistencia	Porcentaje (n)
$\mu$ MLS	73,5 (72/98)
$\dot{\mu}$ MLS	10,2 (10/98)
M	16,3 (16/98)
L	-

## DISCUSIÓN

Debido al aumento de aislamientos de cepas de estafilococos resistentes a los betalactámicos a partir de muestras de infecciones en perros<sup>7, 8, 10, 13</sup> , los macrólidos pueden ser una buena alternativa como tratamiento antimicrobiano.

Hasta el presente son escasas las citas internacionales<sup>8, 9, 13, 17</sup> sobre los mecanismos de resistencia de estafilococos de origen canino frente a Eri. En nuestro país, no se ha encontrado información al respecto.

En el mercado se comercializan diferentes productos que incluyen antibióticos de la familia de los macrólidos y dado que estas drogas están estrechamente relacionadas, la determinación de la susceptibilidad *in vitro* de Eri, salvo excepciones, es indicadora de la actividad de los demás macrólidos<sup>5, 12</sup>

En este estudio se observa que los estafilococos aislados de infecciones en perros expresan con mayor frecuencia el fenotipo  $\mu$ MLS, esto coincide con las descripciones realizadas por otros autores, sobre cepas de origen humano<sup>10,11,16,19</sup>.

Este primer trabajo, constituye: - el primer escalón en el monitoreo de los perfiles fenotípicos de resistencia de los estafilococos en la población canina y aporta información : a) -para minimizar errores de interpretación en las lecturas de las pruebas de susceptibilidad en el laboratorio, principalmente con el fenotipo  $\mu$ MLS (resistencia cruzada entre Eri y Cli, pudiendo aparecer como drogas activas *in vitro* pero no ser efectivas clínicamente, por lo que deberían informarse como resistentes o no informarlas), y b) -permitir el control epidemiológico de la eritromicina resistencia, pues ésta suele estar asociada con una diseminación local de clones de resistencia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bauer, A.W; Kirby, W. M. M; Sherris, J. C.; Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J. Clin. Pathol.* 45:493-496
2. Betriu, C; Culebras, E; Gómez, M; Rodríguez-Avial, I; Sanchez, B.A.; Ágrda, M.C.; Picazo, J.J. 2003. Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in. *Antimicrob. Agents and Chemother.* Vol. 47 (3): 1112-1114
3. Holtt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J; Williams, S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Group 17, 544-551. (ISBN 0-683-00603-7) Williams and Wilkins 428 East Preston Street Baltimore, Maryland 21202, USA

4. Clancy, J; Dib-Hajj, F.; Petitpas, J. W; Yuan, W. 1997. Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, *mreA*, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 41(12): 2719-2723
5. Famiglietti A; Quinteros M; Predari S; Corso A; Lopardo H; Casella J M; Bantar C; Couto C; Galas M; Goldberg M; Gudkind G; Kovensky Pupko J; Marin M; Nicola F; Pastrerán F; Radice M; Soloaga R. 2003. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos gram positivos. *Rev. Argentina de Microbiología* 35:29-40 ISSN 0325-7541
6. Gaynor M, Mankin AS. 2003. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem.* 3(9):949-61.
7. Giovanetti E.; Montanari M.; Mingoia M. y Varaldo P. 1999. Phenotypes and genotypes of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pyogenes* Strains in Italy and Heterogeneity of Inducibly Resistant Strains. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43(8): 1935-19401.
8. Hoekstra KA, Paulton RJ. 2002. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staph. intermedius* in dogs. *J Appl Microbiol.* 93(3):406-13.
9. Holm BR, Petersson U, Mörner A, Bergström K, Franlin A, Greko C. 2002. Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrent cases in Sweden. *Vet Rec.* 16;151(20):600-5
10. LeClercq,R; Courvalin,P. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification. *J. of Antimicrob. Chemother* 35:1267-72
11. LeClercq,R; Courvalin,P. 1991. Intrinsic and unusual resistance to macrolide lincosamide and streptogramin antibiotics in bacteria. *J. of Antimicrob. Chemother.* 35: 1273-6
12. Livermore, D; Winstanley,T; Shannon, K. 2001. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J. of Antimicrob. Chemother.* 48, Suppl.SI.87-102
13. Mas, J; Denamiel, G; Bentancor, A; Rodríguez Fermepin, M; Gentilini, . 2000. Relación de la expresión fenotípica de la meticilina resistencia de un estafilococo coagulasa negativo de origen canino con la presencia del gen *mecA*. *InVet* 2: 7-11
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. M31-A, Vol.19 N°11, Replaces M31-T, Vol.17 N°11
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement (ISBN 1-56238-358-2. ISSN 0273-3099). Vol. 19 Number 1. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1998.
16. Omura, S; Tanaka, H. 1984. Production and antimicrobial activity of macrolides., p3-29. In S. Omura (ed), *Macrolides antibiotics*. Academic Press, London, United Kingdom
17. Pellerin JL, Bourdeau P, Sebbag H, person JM. 1998. Epidemiology of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolate from canine pyoderma. *Comp Immunol Microbiol. Infect. Dis.* 21(2):115-33
18. Poehlsgaard J, Douthwaite S. 2003. Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome. *Curr Opin Investig Drugs.* 4(2):140-8.

InVet

2004; Volumen 6, número 1: xxx-xxx

ISSN (soporte papel) 1514-6634

ISSN (on line) 1668-3498

19. Seppälä, IL; A Nissinem, Q.Yu y P. Iluovinen. 1993. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *S. pyogenes* in Finland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1817-1824
20. Schito GC. 2002. Is antimicrobial resistance also subject to globalization? *Clin Microbiol Infect.* 8 Suppl 3:1-8