

Caracterización de los aislamientos de *Streptococcus agalactiae* asociados a un brote en pacientes del Servicio de Neonatología, Hospital San Juan de Dios, mayo 2020

Fecha: 19 de junio de 2020

Resumen



Streptococcus agalactiae es una bacteria que coloniza el tracto gastrointestinal y urogenital del ser humano causando diversos tipos de infecciones, principalmente en neonatos y mujeres embarazadas. Por solicitud del Servicio de Neonatología del H. San Juan de Dios, el Inciensa realizó la confirmación y prueba de sensibilidad a los antibióticos (PSA) de diez cepas de *S. agalactiae*, pertenecientes a seis pacientes hospitalizados en ese Servicio, tres de los cuales fallecieron. Además, se realizó la caracterización del genoma completo (WGS) de una cepa de cada uno de los afectados. Los resultados de la PSA mostraron para todas las cepas valores idénticos de concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada antibiótico, resultando sensibles para ampicilina, levofloxacina, moxifloxacina, linezolid y vancomicina y resistentes a tetraciclina y clindamicina. La caracterización genómica mostró que los seis aislamientos analizados corresponden al secuenciotipo ST17 y al comparar la totalidad de su genoma por *wgMLST* (1 748 locus) se identificó que tres de ellos eran indistinguibles y los tres restantes se diferenciaban únicamente en dos alelos. Evidenciando así que los aislamientos pudieron provenir de una fuente común y la utilidad de las técnicas genómicas para establecer relaciones epidemiológicas en la investigación de brotes nosocomiales.

Cita sugerida: Chanto Grettel*, Duarte Francisco**, Cordero Estela, Godínez Adriana, Calderón Melany, Rojas Priscilla, Rodríguez Alejandra: “**Caracterización de los aislamientos de *Streptococcus agalactiae* asociados a un brote en pacientes del Servicio de Neonatología Hospital San Juan de Dios, mayo 2020**”. Tres Ríos, Costa Rica: INCIENSA, 2020. Disponible en: <http://www.inciensa.sa.cr>

* gchanto@inciensa.sa.cr; ** fduarte@inciensa.sa.cr

Caracterización de aislamientos de *Streptococcus agalactiae* asociados a un brote en pacientes del Servicio de Neonatología Hospital San Juan de Dios, mayo 2020

Streptococcus agalactiae (*Streptococcus* del grupo B, *group B streptococcal* GBS), es una bacteria que coloniza el tracto gastrointestinal y urogenital del hombre causando diversos tipos de infecciones, principalmente en neonatos y mujeres embarazadas. Más recientemente se ha asociado a infecciones en pacientes con condiciones médicas de riesgo, como cáncer e inmunosupresión y en adultos mayores (Palmeiro *et al.* 2010).

De acuerdo a la literatura, la colonización de mujeres embarazadas y neonatos oscila entre 15 % y 40 %. En el caso de las gestantes, *S. agalactiae* puede provocar corioamnionitis, endometritis post-parto, infección de herida quirúrgica post-cesárea e infección del tacto urinario. Además, constituye un factor de riesgo crítico para el desarrollo de enfermedad invasora neonatal, ya que el recién nacido se infecta durante el parto. Dicha enfermedad continúa siendo significativa, pese al uso de antibióticos como profilaxis durante el parto.

La gran mayoría de los aislamientos de GBS son sensibles a penicilina, siendo esta la droga de elección para el tratamiento y profilaxis de estas infecciones. Los macrólidos y las lincosamidas son los antibióticos de segunda línea para tratamiento, especialmente para aquellos pacientes con alergia a penicilina. Sin embargo, ya se ha descrito resistencia a éstos debido a la presencia de genes *erm* que codifican para metilasas que afectan el sitio blanco del antibiótico o genes *mef* que codifican para bombas de eflujo (Compain *et al.*, 2014).

Por solicitud del Servicio de Neonatología del Hospital San Juan de Dios (HSJD), el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología (CNRB) del Inciensa realizó la confirmación y prueba de sensibilidad a los antibióticos de diez aislamientos de *S. agalactiae*, pertenecientes a seis pacientes hospitalizados en ese Servicio. Además, debido al fallecimiento de tres de ellos, se requería de una caracterización molecular de las cepas con el objetivo de determinar la posible relación epidemiológica entre las mismas, para lo que se contó con el apoyo del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Centro Nacional de Referencia en Inocuidad de Alimentos (CNRIMA) del Inciensa.

Metodología

Los microorganismos fueron referidos al CNRB por el Laboratorio Clínico del HSJD en placas de agar sangre. Cada uno de los aislamientos venía acompañado con la boleta Inciensa-R86 Solicitud de Confirmación Diagnóstica, que incluía información demográfica y clínica de los pacientes.

En el CNRB la especie de cada uno de los aislamientos se confirmó tanto por sistema miniaturizado API®20 Strep, Vitek®2 Compact (con la tarjeta GP) y pruebas de bioquímica convencional.

La prueba de sensibilidad a los antibióticos (PSA) se realizó mediante determinación de la concentración inhibitoria mínima por sistema Vitek®2 Compact y la tarjeta AST-P577, que incluye

antibióticos de uso clínico y otros de utilidad para la vigilancia. Para la interpretación de la PSA se utilizó la CLSI, M100 S30, 2020.

No se realizó la determinación del serotipo pues en la actualidad en el CNRB no se dispone de los antisueros anti-polisacárido capsular específicos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII). Tampoco se realizó la tipificación molecular por electroforesis de campo pulsado (PFGE), debido a que se conoce que la caracterización de cepas de GBS por estas dos metodologías no es suficiente para determinar la relación de los diferentes aislamientos analizados.

La caracterización molecular de un aislamiento de cada paciente se realizó mediante la secuenciación del genoma completo (WGS, *whole genome sequencing*), utilizando tecnología Illumina que permitió obtener la información completa de todos los locus que constituyen el genoma de los aislamientos.

Los estudios genómicos se realizaron bajo el análisis comparativo gen por gen. Al contar con el genoma completo de las cepas secuenciadas, se realizó el análisis wgMLST (*whole genome MLST*), el cual se basa en la identificación de variaciones alélicas a lo largo de todo el genoma bacteriano. Para la comparación de los alelos identificados, se utilizó como coeficiente de correlación variables categóricas y como método de construcción del dendrograma UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*).

Resultados

De acuerdo a la información suministrada en las boletas de solicitud de análisis, las cepas referidas al CNRB fueron aisladas por el Laboratorio Clínico del HSJD como parte del tamizaje de neonatos, que incluye sitios no invasivos (nasal, vaginal, anal, umbilical) y de sitios invasivos (hemocultivo) en tres de los pacientes. De los pacientes, tres tenían un mes de edad y los tres restantes menos de 23 días de nacidos. Cuatro eran de sexo femenino y dos masculino, todos provenientes de comunidades de la provincia de San José (cuadro 1).

Los resultados de la PSA de los diez GBS analizados mostraron valores idénticos de CIM para cada antibiótico evaluado, por lo que las cepas son indiferenciables de acuerdo a su perfil fenotípico de sensibilidad a los antibióticos. Todas las cepas resultaron sensibles a ampicilina, levofloxacina, moxifloxacina, linezolid y vancomicina y resistentes a tetraciclina y clindamicina (cuadro 1). En el caso de clindamicina, a pesar de que las cepas presentaron un valor de CIM que se consideraría sensible ($\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$), el equipo Vitek realiza un cambio de interpretación por la posibilidad de tratarse de un fenotipo MLS_b, el cual confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamida y estreptogramina B. Además, por medio del análisis de las secuencias genómicas se identificaron los genes *erm* y *tet* que confieren resistencia a clindamicina y tetraciclina respectivamente.

Mediante WGS se corroboró que los aislamientos referidos correspondían a *S. agalactiae*. Además, se realizó la tipificación convencional multilocus de secuencias (*Multilocus sequence typing*, **MLST**) a partir de la cual se determinaron siete genes conservados de su genoma y las cepas se clasificaron como pertenecientes al secuenciotipo ST-17 (*sequence type*, **ST**).

Cuadro 1. Resultados de la concentración mínima inhibitoria de diez aislamientos de *S. agalactiae*, de diferentes orígenes, aislados de pacientes internados en el Servicio de Neonatología, Hospital San Juan de Dios, mayo – junio 2020

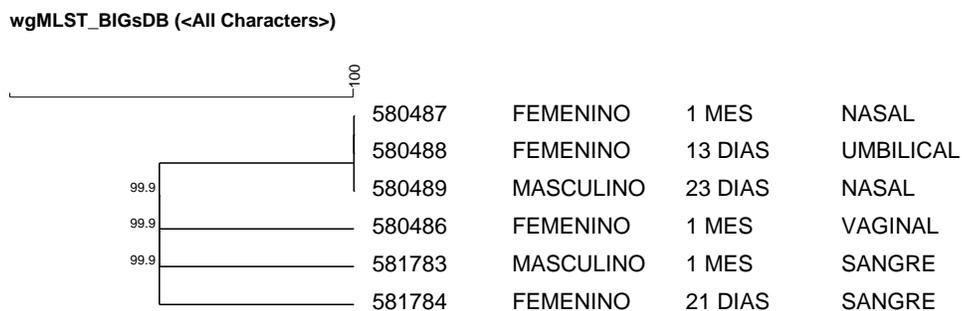
Paciente	Sexo	Muestra	Fecha	CIM (µg/ml)						
				AMP	LEV	MOX	DA	LDZ	VAN	TCY
1	F	Vaginal	23/05/2020	≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
		Anal		≤ 0,25	1	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
		Umbilical		≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
2	F	Nasal	23/05/2020	≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
3	F	Umbilical	23/05/2020	≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
		Nasal		≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
		Sangre	10/06/2020	≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
4	M	Nasal	23/05/2020	≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
5	M	Sangre	19/05/2020	≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16
6	F	Sangre	03/06/2020	≤ 0,25	1	≤ 0,25	≤ 0,25	2	≤ 0,5	≥ 16

CIM, concentración inhibitoria mínima; F, femenino; M, masculino; AMP, ampicilina; LEV, levofloxacina; MOX, moxifloxacina; DA, clindamicina; LDZ, linezolid; VAN, vancomicina; TCY, tetraciclina.

Fuente: Centro Nacional de Referencia de Bacteriología, Inciensa

En la comparación por wgMLST de los 1 748 locus obtenidos, las cepas fueron similares en al menos 1 746 locus para un 99,887 % de similitud y tres de ellas resultaron indistinguibles (pacientes 2 y 4 nasal, paciente 3 umbilical del cuadro 1; identificados con números Inciensa 580487, 580488 y 580489 respectivamente en figura 1). Los otros tres GBS no presentaron más de 2 alelos de diferencia entre ellos (figura 1).

Figura 1. Dendograma de similitud genética para *S. agalactiae* por wgMLST, utilizando como coeficiente de correlación variables categóricas y como método de construcción UPGMA



Fuente: Centro Nacional de Referencia de Inocuidad de Alimentos, Inciensa

Discusión

S. agalactiae se considera un organismo genéticamente muy diverso. Tal es así que se han documentado aislamientos de diferente serotipo en una misma persona y en grupos pertenecientes a un mismo pulso tipo (PFGE). Por tanto, era necesario recurrir a la secuenciación de genoma completo para poder contar con un criterio suficiente para discriminar entre las cepas y establecer su relación epidemiológica (Pillai *et al.*, 2009).

A partir de la caracterización molecular de los *S. agalactiae* aislados de pacientes del Servicio de Neonatología del HSJD se determina que éstos se encuentran estrechamente relacionados entre sí, siendo tres de ellos genéticamente indistinguibles. Los otros tres aislamientos, difirieron únicamente en dos alelos de los 1 748 locus analizados. Se concluye que los seis aislamientos pudieron provenir de una fuente común.

Los resultados obtenidos han permitido evidenciar la presencia de un importante agente infeccioso como colonizante y patógeno de niños de muy temprana edad, responsable de causar un brote en un Servicio de Neonatología, en donde lamentablemente se contabilizan tres fallecidos. Además, se ratifica la importancia de realizar estos estudios colaborativos que permiten poner a la disposición de la seguridad social metodologías de comparación apropiada que contribuyen a establecer con mayor exactitud la posible relación epidemiológica entre distintas cepas.

Referencias

Compain F, Hays C, Touak G. 2014. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates Harboring small *erm* (T)-carrying plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(11):6928–6930. doi:10.1128/AAC.03855-14.

Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Fracalanza SE. 2010. Phenotypic and genotypic characterization of group B Streptococcal isolates in Southern Brazil. *J Clin Microbiol.* 48(12):4397–4403. doi:10.1128/JCM.00419-10.

Pillai P, Srinivasan U, Zhang L, Foxman B. 2009. *Streptococcus agalactiae* pulsed-field gel electrophoresis patterns cross capsular types. *Epidemiol Infect.* 137(10):1420–1425. doi:10.1017/S0950268809002167.