

SHORT COMMUNICATIONS/NOTE

Distribuzione dei fenotipi di eritromicino-resistenza di *Streptococcus pyogenes* isolati in un'area circoscritta del Piemonte.

Giuliana Banche¹, Janira Roana¹, Valeria Allizond¹, Narcisa Mandras¹, Aurelio Malabaila², Silvia Andreotti¹, Vivian Tullio¹, Nicola Carlone¹, Dianella Savoia³, Ester Gaido⁴, Anna Maria Cuffini¹.

¹Dip. di Sanità Pubblica e Microbiologia, Università degli Studi di Torino

²Lab. Analisi e Microbiologia, Ospedale degli Infermi, Biella

³Dip. di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino

⁴Lab. di Microbiologia, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino

Key words: *Streptococcus pyogenes*, erythromycin resistance, resistance phenotypes

Distribution of erythromycin-resistance phenotypes in Piemonte Region clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*.

SUMMARY

The frequency of erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in different Piemonte Region hospitals between January and August 2006 has been studied. The incidence of erythromycin-resistance was 20.2%. Among erythromycin resistant *S. pyogenes* 13.8% belonged to constitutive resistance phenotype, 5.3% to M phenotype and 1.1% to inducible resistance phenotype.

INTRODUZIONE

Lo *Streptococcus pyogenes*, uno dei più comuni ed ubiquitari patogeni umani, è responsabile della maggior parte dei casi di faringo-tonsilliti nei pazienti pediatrici ma è anche l'agente causale di infezioni più severe come sepsi, fascite necrotizzante, sindrome dello shock tossico e di sequele non suppurative come la febbre reumatica e la glomerulonefrite acuta (5). Particolare attenzione va posta alla prevenzione delle sequele post-streptococciche con la completa eradicazione di questo patogeno mediante adeguato trattamento farmacologico (1). Sebbene le penicilline siano ancora oggi considerate la terapia di elezione per le faringiti da *S. pyogenes*, non essendo descritti ceppi resistenti *in vitro*, i macrolidi sono spesso i sostituti raccomandati come una valida alternativa da impiegare in caso di intolleranza ai β -lattamici (4,10). Tuttavia, il loro impiego clinico è stato recentemente limitato a causa della crescente incidenza di resistenza batterica a questi farmaci. Quindi, la problematica della resistenza osservata *in vitro*, che molto raramente ne pregiudica l'efficacia *in vivo*, rappresenta un evento alquanto diffuso e da tenere in costante osservazione (5,6,12).

L'eritromicino-resistenza tra gli streptococchi del gruppo A è dovuta alla modificazione, per metilazione, del bersaglio ribosomiale oppure al trasfe-

rimento meccanico dell'antibiotico all'esterno della cellula per la presenza di una pompa di efflusso. Il primo dei meccanismi citati, legato al gene *erm*, conferisce resistenza allargata nei confronti di tutto lo spettro dei macrolidi ed è inoltre condiviso dalla classe dei lincosamidi e delle streptogramine B (fenotipo MLS_B). L'espressione di tale fenotipo di resistenza può essere di tipo costitutivo (fenotipo cMLS) o inducibile (fenotipo iMLS). Nella resistenza cMLS il batterio produce una metilasi sempre attiva, mentre per quella iMLS la metilasi per essere attiva necessita della presenza del macrolide che agisca da induttore. Al contrario, il meccanismo basato sul trasferimento meccanico dell'antibiotico all'esterno della cellula batterica (fenotipo M) è operante nei confronti di alcuni macrolidi. Infatti, il trasferimento dell'antibiotico che si realizza grazie ad una pompa di efflusso, codificata dal gene *mef*, conferisce resistenza ai macrolidi a 14 e 15 atomi ma non a quelli a 16, lincosamidi o analoghi della streptogramina B (5,8,9).

PRESENTAZIONE DELLO STUDIO

Al fine di verificare una corrispondenza dei dati della letteratura su un campione di ceppi omogeneo dal punto di vista della provenienza geografica, nel presente lavoro è stato valutato il fenotipo di resistenza ai macrolidi su 94 ceppi di *S. pyoge-*

nes isolati, nel periodo gennaio - agosto 2006, da tamponi oro-faringei di pazienti provenienti tutti da un'area circoscritta del Piemonte centro e nord-orientale (Ospedale San Giovanni Battista di Torino, Ospedale San Luigi Gonzaga di Orbassano ed Ospedale degli Infermi di Biella). I campioni sono stati seminati su agar Columbia con 5% di sangue di montone ed applicazione del dischetto contenente 0.04 UI di bacitracina (Becton Dickinson Italia S.p.A., Milano, Italia). Dopo incubazione a 37°C con il 5% di CO₂ per 24 ore le colonie che presentavano gli aloni di β-emolisi e che risultavano essere inibite dalla bacitracina, venivano isolate ed identificate mediante il sistema APIStrept (Biomerieux Italia, Roma, Italia).

La determinazione dei fenotipi di resistenza ai macrolidi è stata effettuata mediante il test del triplo disco secondo la metodica di Sutcliffe J. *et al.* (14), utilizzando dischetti commerciali di eritromicina, clindamicina e josamicina. Secondo questa metodica l'assenza di aloni d'inibizione attorno ai tre dischetti indica un fenotipo di resistenza costitutivo (cMLS); la crescita attorno all'eritromicina e presenza di aloni smussati attorno alla clindamicina e josamicina sono propri del fenotipo iMLS; la crescita batterica attorno all'eritromicina e la presenza di aloni d'inibizione attorno alla clindamicina ed alla josamicina caratterizza il fenotipo M (figura I).

Tabella 1. Percentuali di isolamento di *S. pyogenes* eritromicino-sensibili ed eritromicino-resistenti (ER) con distribuzione dei differenti fenotipi di resistenza all'eritromicina.

<i>S. pyogenes</i>	n. ceppi (n=94)	%
Eritromicino-sensibili	75	79.8
Eritromicino-resistenti	19	20.2
ER* cMLS	13	13.8
ER* iMLS	5	5.3
ER* fenotipo M	1	1.1

* fenotipo cMLS, resistenza costitutiva; fenotipo M, fenotipo con pompa di efflusso; fenotipo iMLS, resistenza inducibile.

CONCLUSIONI

La resistenza ai macrolidi tra gli streptococchi di gruppo A è in continua crescita nel mondo; in particolare, in Italia attualmente il livello di eritromicino-resistenza, in aumento dagli anni '90, si aggira attorno a valori del 25% indicando comunque una prevalenza di isolamento di ceppi eritromicino-sensibili (3,7,13). Dai nostri risultati, ottenuti saggiando ceppi di *S. pyogenes* provenienti da un'area circoscritta del Piemonte, si evince che la maggior parte dei ceppi isolati (79.8%) risulta eritromicino-sensibile ed il 20.2% eritromicino-resistente, confermando i dati della letteratura (tabella 1). All'interno di questo gruppo il 13.8% dei ceppi mostra un fenotipo di resistenza costitutivo (tabella 1 e figura IA), il 5.3% risulta resistente ai macrolidi per attivazione di una pompa di efflusso (fenotipo M; tabella 1 e figura IB) e l'1.1% presenta una resistenza inducibile (tabella 1 e figura IC). Alcuni autori riportano che eventuali differenze di percentuali di isolamento dei tre fenotipi di resistenza potrebbero essere dovute a differenti sierotipi dei ceppi che circolano nelle diverse aree geografiche e nei diversi periodi di osservazione. Anche notevoli differenze nel livello di resistenza ai macrolidi da parte di *S. pyogenes* sono dovute a differenti livelli di prescrizione medica di questa classe di antibiotici, a conferma del fatto che il macrolide è in grado di esercitare una pressione selettiva molto forte sui ceppi resistenti (2,3,6,11).

Nel presente lavoro si è voluto quindi dimostrare come il test del triplo disco permetta di rivelare facilmente i fenotipi di resistenza con meccanismi a pompa di efflusso ed inducibile, non altrimenti evidenziabili se non con tecniche di biologia molecolare (6). Inoltre, questo saggio di laboratorio di rapida esecuzione e basso costo, è in grado di fornire dati preziosi e d'immediata applicazione clinica nel trattamento delle infezioni delle alte vie

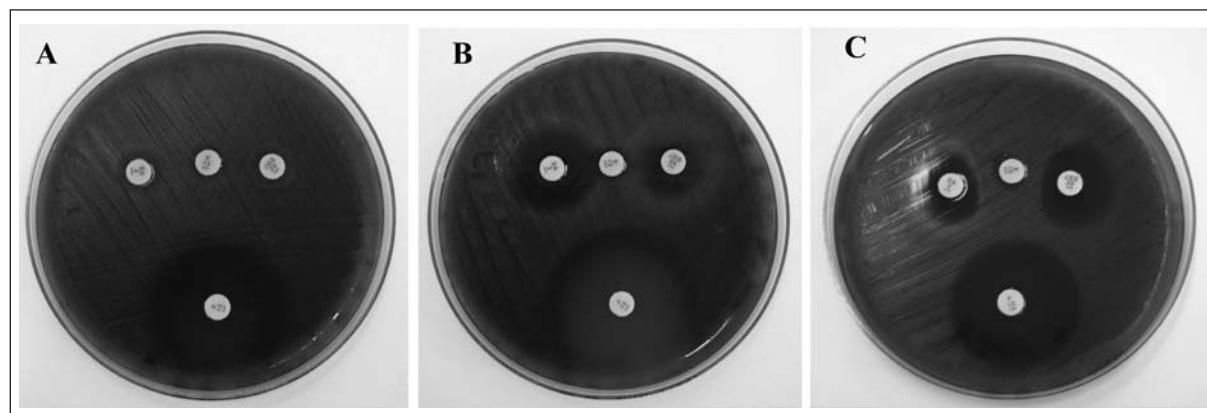


Figura I. Fenotipi degli streptococchi eritromicino-resistenti determinati con il test del triplo disco: al centro di ciascuna piastra è posta l'eritromicina (E; 15 µg), sulla sinistra la clindamicina (DA; 2 µg), sulla destra la josamicina (JOS; 30 µg) e sul fondo della piastra la penicillina come controllo interno (P; 10 Units). A fenotipo cMLS; B fenotipo M; C fenotipo iMLS

respiratorie. Infatti, dal momento che isolando streptococchi di gruppo A con fenotipi cMLS ed iMLS si dimostra una resistenza allargata nei confronti di tutto lo spettro delle molecole appartenenti al gruppo MLS_B, è necessario utilizzare una strategia terapeutica che escluda l'uso di tutti gli antibiotici facenti parte di questo gruppo. Invece, in caso di isolamento di ceppi di *S. pyogenes* con fenotipo di resistenza M, non potendo somministrare macrolidi a 14 e 15 atomi, non si esclude la possibilità di utilizzare comunque un antibiotico a 16 atomi (josamicina e rokitamicina) o i ketolidi che rappresentano una nuova famiglia di antimicrobici semisintetici, a 14 atomi, appartenenti al gruppo MLS_B (15). Ulteriori studi potrebbero essere mirati a confermare l'efficacia *in vitro* dei ketolidi nei confronti di *S. pyogenes* con fenotipo M.

BIBLIOGRAFIA

1. Antonetti R, Antonini F, Bandettini R, et al. Studio epidemiologico, mediante l'uso di internet, sulle resistenze *in vitro* di ceppi di *Streptococcus pyogenes* ai macrolidi e alla clindamicina. Anni 2001 e 2002. *Microbiologia Medica*, 2003; 18: 299-304.
2. Avanzini C, Bosio K, Volpe G, Dotti G, Savoia D. *Streptococcus pyogenes* collected in Torino (Northwest Italy) between 1983 and 1998: survey of macrolide resistance and trend of genotype by RAPD. *Microb Drug Resist*, 2000; 6: 289-95.
3. Canton R, Loza E, Morosini MI and Baquero F. Antimicrobial resistance amongst isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* in the PROTEKT antimicrobial surveillance programme during 1999-2000. *J Antimicrob Chemoter*, 2002; 50: 9-24.
4. Catalanotti P, Catania MR, Scarallo G, et al. Correlazione tra sierotipo T e profilo genomico di ceppi di *Streptococcus pyogenes* resistenti o sensibili all'eritromicina. *GIMMOC*, 2003; 7: 57-60.
5. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, et al. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemoter*, 2000; 45: 167-173.
6. Desjardins M, Delgaty KL, Ramotar K, Seetaram C and Toye B. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in group A and group B *Streptococcus*: implications for reporting susceptibility results. *J Clin Microbiol*, 2004; 42: 5620-3.
7. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Legnani D and Gismondo MR. Kinetic bactericidal activity of telithromycin, azithromycin and clarithromycin against respiratory pathogens. *APMIS*, 2005; 113: 655-63.
8. Giovanetti E, Brenciani A, Burioni R and Varaldo PE. A novel efflux system in inducibly erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemoter*, 2002; 46: 3750-5.
9. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*, 2002; 34: 482-92.
10. Malbruny B, Nagai K, Coquemont M, et al. Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *J Antimicrob Chemoter*, 2002; 49: 935-9.
11. Marchese A and Schito GC. Resistance patterns of lower respiratory tract pathogens in Europe. *Int J Antimicrob Agents*, 2000; 16 Suppl 1: S25-9. Review.
12. Piscina A, Castellani F, Testa G, et al. Monitoraggio della sensibilità di *Streptococcus pyogenes* a macrolidi e lincosamidi basata sull'uso di internet: risultati del secondo anno (2000) di attività. *GIMMOC*, 2002; 6: 25-39.
13. Savoia D, Avanzini C, Bosio K, et al. Macrolide resistance in group A streptococci. *J Antimicrob Chemoter*, 2000; 45: 41-7.
14. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A and Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemoter*, 1996; 40: 1817-24.
15. Zhalnel GG, Walters M, Noreddin A, et al. The ketolides: a critical review. *Drugs*, 2002; 62: 1771-804.

Anna Maria Cuffini
 Dipartimento di Sanità Pubblica e
 Microbiologia
 Università degli Studi di Torino
 Via Santena 9, 10126 Torino
 Tel.: 011 6705638 - Fax 011 6705648
 E-mail: annamaria.cuffini@unito.it