



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

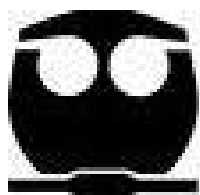
Evaluación de la susceptibilidad a penicilina G en cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* aisladas de exudados faríngeos.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

GUADALUPE EKATERINA SÁNCHEZ MORENO



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	Raúl Garza Velasco
VOCAL:	Profesora:	María del Carmen Cortés Decuir
SECRETARIO:	Profesor:	Luis Manuel Perea Mejía
1er. SUPLENTE:	Profesor:	Alejandro Camacho Cruz
2° SUPLENTE:	Profesora:	Rosalía Guevara Leonel

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Departamento de Salud Pública. Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Medicina. UNAM. Este trabajo forma parte del proyecto de investigación “Tipificación y caracterización molecular de cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* de origen clínico.” Financiado por el PAPIIT de la DGAPA-UNAM con clave IN215608.

M. en C. Luis Manuel Perea Mejía (asesor)

M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel (supervisor técnico)

Guadalupe Ekaterina Sánchez Moreno (sustentante)

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Manuel Perea Mejía. Gracias por abrirme las puertas en su laboratorio y sobre todo por su gran apoyo en la realización de este trabajo.

A la M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel. Por su paciencia, ayuda y apoyo en todo el tiempo que estuve en el laboratorio de Biología Molecular.

A las madres: Cleotilde Herrero, Elena García, Lucía Juárez, Rosario Martello, Rocío Sánchez, Juana Arcos y Verónica Villegas. Por haber tenido consejos sabios cuando los necesité, por siempre estar pendiente de mí y por hacer de mi estancia en la Ciudad de México la mejor.

A mi mamá, Socorro Moreno López. Por ser una gran amiga y confidente que siempre me llena de alegría, pero sobre todo por ser un pilar en mi vida.

A mi papá, Isauro Sánchez Cortés. Por todo tu apoyo, tu ejemplo de disciplina y tenacidad, y por siempre haberme educado con sabiduría buscando lo mejor para mí, porque gracias a ello es que he logrado llegar hasta este día.

A mi esposo, Javier Hernández de la Sancha. Gracias por regalarme muchos momentos alegres casi siempre en medio del estrés que me caracterizaba, y por apoyarme en mi carrera en todos los sentidos.

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.....	V
II.	INTRODUCCIÓN.....	1
III.	OBJETIVOS.....	6
	Objetivo general.....	6
	Objetivos específicos.....	6
IV.	MARCO TEÓRICO.....	8
1.	Estreptococos.....	8
1.1.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	11
1.1.1.	Factores de virulencia.....	11
1.1.2.	Epidemiología y enfermedades.....	15
1.1.3.	Identificación.....	19
1.1.4.	Tratamiento.....	21
1.2.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	21
1.2.1.	Factores de virulencia.....	22
1.2.2.	Epidemiología y enfermedades.....	25
1.2.3.	Identificación.....	27
1.2.4.	Tratamiento.....	29
2.	Exudado faríngeo.....	30
3.	Antibióticos.....	32
4.	Penicilinas.....	34
4.1.	Estructura molecular.....	34

Método de difusión en placa (Kirby - Bauer).....	61
5. Determinación de la susceptibilidad a penicilina G por el Método de E-test.....	62
VI. RESULTADOS.....	66
1. Observación de la hemólisis.....	66
2. Pruebas de Bacitracina y CAMP.....	66
3. Prevalencia de los aislamientos de <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> por sexo de los pacientes.....	67
4. Prevalencia de los tipos M de <i>Streptococcus pyogenes</i> y los tipos capsulares de <i>Streptococcus agalactiae</i>	68
5. Susceptibilidad a penicilina G por el Método de Kirby – Bauer y el Método de E-test.....	72
5.1. Susceptibilidad a penicilina G (Método de Kirby – Bauer).....	72
5.2. Susceptibilidad a penicilina G (Método de E- test).....	76
5.3. Comparación de los resultados de susceptibilidad a penicilina G obtenidos por el Método de Kirby – Bauer con los obtenidos por el Método de E-test.....	80
5.4. Susceptibilidad a penicilina G (Método de Kirby – Bauer y E-test) de las cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> asociados al tipo M.....	83
5.5. Susceptibilidad a penicilina G (Método de Kirby – Bauer y	

	E-test) de las cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> asociados al tipo capsular.....	90
VII.	DISCUSIÓN.....	96
VIII.	CONCLUSIONES.....	112
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	114

ABREVIATURAS:

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ASO	Antiestreptolisina O
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Peterson
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMN 20 Nov.	Centro Médico Nacional 20 de Noviembre
CMNSXXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HGGC	Hospital General Doctor Gonzalo Castañeda
HJM	Hospital Juárez de México
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente
MurNAc	Ácido N-acetilmurámico
NH	No Hemolítica
NT	No Tipificable
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBP	Penicillin Binding Protein
PYR	L-pirrolidonil- β -naftilamida
SHV	Variable Sulfhidrilo
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UDP	Uridina Difosfato
UMP	Uridina Monofosfato
UTP	Uridina Trifosfato
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

INTRODUCCIÓN

El género *Streptococcus* está constituido por alrededor de 20 especies, siendo *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pneumoniae* las más importantes por su gran virulencia⁽⁵⁹⁾.

La identificación de las especies de estreptococos se realiza tomando en cuenta tres propiedades^(52, 59):

- Propiedades hemolíticas en gelosa sangre de carnero al 5%.
- Propiedades antigénicas.
- Propiedades bioquímicas o fisiológicas.

Streptococcus pyogenes puede causar enfermedades supurativas (faringitis, escarlatina, pioderma, erisipela, fascitis necrosante y síndrome del shock tóxico) y no supurativas (fiebre reumática y glomerulonefritis)^(31, 40, 52, 59); es por ello que cuando se aísla a esta bacteria de un exudado faríngeo de un paciente con faringitis, es muy importante darle a éste un tratamiento adecuado inmediatamente⁽⁵²⁾.

Streptococcus agalactiae puede causar infecciones genitourinarias, corioamnionitis, endometritis posparto e infección de heridas quirúrgicas de la

cesárea; además, es el principal causante de sepsis y meningitis en neonatos que son infectados durante su paso por el canal de parto, por lo que es muy importante administrar un tratamiento profiláctico en mujeres que se encuentren en las últimas semanas de embarazo las cuales pueden ser portadoras^(16, 21, 34, 35, 52, 54, 63).

El tratamiento de elección para las infecciones causadas por *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* sigue siendo la penicilina, específicamente la penicilina G^(6, 27, 34, 52, 59).

La penicilina, antibiótico β -lactámico producido por hongos del género *Penicillium*, fue descubierta por Alexander Fleming en 1928^(45, 55). La primera penicilina usada en la clínica fue la penicilina G, que es una penicilina natural; sin embargo, se ha dado la necesidad de crear penicilinas semisintéticas, pues desde la introducción de este antibiótico a la clínica se ha observado la aparición de cepas bacterianas resistentes^(43, 55, 57).

Las penicilinas se clasifican según su espectro antimicrobiano en^(2, 55, 57):

- Corto espectro. Potentes contra bacterias grampositivas. Dentro de este grupo se encuentran las penicilinas resistentes a las β -lactamasas.
- Amplio espectro. Potentes contra bacterias grampositivas y gramnegativas.

- Espectro extendido. Abarcan los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Klebsiella*.

Las penicilinas son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, al unirse a las proteínas de unión a la penicilina (PBP por sus siglas en inglés “Penicillin Binding Protein”), entre las que destacan las transpeptidasas, que catalizan las reacciones de transpeptidación en la síntesis de peptidoglicano de la pared celular. Al unirse las penicilinas a estas enzimas se bloquea la síntesis de la pared celular bacteriana provocando así la muerte de la bacteria^(23, 45, 52, 55, 57).

La mejor manera de medir la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano es a través de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que actualmente se realiza en los laboratorios de microbiología por el método de microdilución en caldo; sin embargo, esta prueba es muy costosa y laboriosa comparada con la prueba de difusión en placa (Método de Kirby – Bauer) y las 2 tienen el mismo objetivo, por lo que se prefiere realizar esta última⁽⁶⁴⁾.

Dado el sobreuso de las penicilinas, algunas bacterias se han vuelto resistentes. La resistencia a estos antibióticos se debe a 3 mecanismos diferentes^(43, 51, 52, 55, 64, 71).

- Modificación de la estructura de las PBPs. Las moléculas de penicilina ya no se pueden unir a estas proteínas para inactivarlas.
- Producción de β -lactamasas. Rompen el enlace C – N del anillo β -lactámico de las penicilinas, evitando así que estas se unan a las PBPs.
- Inhibición del paso del antibiótico al interior de la célula. Muy común en bacterias gramnegativas. Las penicilinas no entran o entran más lentamente al espacio periplásmico, donde interactuarían con las PBPs que se encuentran en la membrana interna de estas bacterias.

De los tres mecanismos de resistencia, el más encontrado en bacterias grampositivas es la modificación de la estructura de las PBPs^(43, 51).

Hasta hoy, *Streptococcus pyogenes* no se ha reportado que sea resistente a penicilina (sigue siendo sensible a penicilina *in vitro*)^(3, 13, 51); sin embargo, se han descrito fracasos en los tratamientos con penicilina, para tratar la faringitis causada por esta bacteria. Varios investigadores sugieren que este hallazgo se puede deber a la presencia, en el tracto respiratorio superior, de flora bacteriana productora de β -lactamasas, a reinfecciones por contacto con personas portadoras o a la baja susceptibilidad de las cepas al β -lactámico (tolerancia)^(11, 13, 33). Se ha demostrado que la inactivación del gen *rgg* que codifica para glicosiltransferasa G está involucrada en la tolerancia de *Streptococcus pyogenes* a la penicilina⁽¹³⁾.

Varios investigadores han reportado cepas de *Streptococcus agalactiae* con baja susceptibilidad a penicilina^(5, 15, 29, 35, 36, 49, 53, 69). Dos grupos de investigación han demostrado que las mutaciones en el gen que codifica para PBP 2X, son la causa más importante de la baja susceptibilidad a penicilina en cepas de *Streptococcus agalactiae*^(35, 53); sin embargo, no se ha podido demostrar si la existencia de estas cepas son la principal causa de las fallas en el tratamiento con penicilina⁽³⁶⁾.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la susceptibilidad a penicilina G de aislamientos faríngeos de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* provenientes de diferentes hospitales de la Ciudad de México.

Objetivos específicos:

- Determinar la susceptibilidad a 10 U de penicilina G de los aislamientos por el método de Kirby-Bauer.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de penicilina G de los aislamientos por el método de E-test.
- Comparar los resultados obtenidos por los dos métodos de determinación de susceptibilidad a penicilina G.
- Comparar la susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* con la susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus agalactiae*.

- Observar si existe alguna relación entre los valores de susceptibilidad a penicilina G y los tipos M de las cepas de *Streptococcus pyogenes*, así como los tipos capsulares de las cepas de *Streptococcus agalactiae*.
- Comparar los resultados obtenidos con los resultados que se han reportado en otros países.

MARCO TEÓRICO

1. Estreptococos

Los Estreptococos son un género de bacterias que pertenecen a la familia *Streptococcaceae* que fue descrita por primera vez en 1874 por Billroth^(8, 59).

Existen alrededor de 20 especies de Estreptococos, destacando por su mayor virulencia *Streptococcus pyogenes* (grupo A de Lancefield), *Streptococcus agalactiae* (grupo B) y *Streptococcus pneumoniae*⁽⁵⁹⁾.

Los estreptococos (*Strep*, cadena; *coccus*, cocos) son cocos Gram positivos agrupados en cadenas o en pares^(8, 52, 59). La pared celular de estos mide de 20 a 40 nm y está constituida por una capa gruesa de peptidoglicano, ácido lipoteicoico, carbohidratos específicos de grupo y algunos poseen proteínas como antígenos M, T o R^(8, 55, 58).

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento de estreptococos es gelosa sangre de carnero al 5% el cual es un medio libre de azúcares reductores, características importantes para el desarrollo de estas bacterias nutricionalmente exigentes y fermentadoras de carbohidratos^(18, 52, 59). Estas bacterias son facultativas y algunas especies requieren de un ambiente con 5

a 10% de CO₂⁽⁵²⁾. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de ellas es de 37 °C⁽⁸⁾.

Las colonias de estreptococos son grisáceas, aunque pueden existir algunas ligeramente rojizas, como algunas cepas de *Streptococcus agalactiae*. Su consistencia puede ser butirácea o dura, pueden ser planas o convexas y su tamaño es variable ya que pueden observarse colonias de 1 a 4 mm de diámetro.

La diferenciación de las especies de este género se logra tomando en cuenta tres propiedades^(18, 52):

- Propiedades hemolíticas en gelosa sangre de carnero al 5%.
- Propiedades antigénicas.
- Propiedades bioquímicas o fisiológicas.

Propiedades hemolíticas. Los estreptococos producen una hemolisina extracelular llamada estreptolisina⁽⁶⁴⁾ de la cual existen dos tipos, la estreptolisina S que es no inmunogénica y estable en presencia de oxígeno, y la estreptolisina O que es inmunogénica y lábil al oxígeno⁽⁵²⁾. En función del efecto que ejercen los estreptococos sobre los eritrocitos, Brown los clasifica en ^(52, 59): β-hemolíticos (hemólisis total) que producen tanto estreptolisina O

como S, α -hemolíticos (hemólisis parcial) que producen solo estreptolisina S, y γ o no hemolíticos que no producen ninguna estreptolisina.

Propiedades antigénicas. Los estreptococos poseen un carbohidrato C que forma parte de su pared celular, el cual es específico de grupo (grupo de Lancefield) y se puede extraer enzimáticamente para detectar el grupo al que pertenece un estreptococo a través de una prueba rápida de inmunoaglutinación. Anticuerpos de conejo unidos a partículas de látex están dirigidos en contra de esos carbohidratos, los más utilizados actualmente son los anticuerpos comerciales contra el grupo A, B, C, D, F y G^(8, 52, 64).

Otras propiedades antigénicas de los estreptococos que ayudan a su clasificación son los antígenos de la pared celular, como la proteína M de *Streptococcus pyogenes* y el polisacárido capsular de *Streptococcus agalactiae*^(8, 52).

Propiedades fisiológicas. Incluyen reacciones bioquímicas de fermentación de azúcares, pruebas para determinar la presencia de enzimas y pruebas de susceptibilidad o resistencia a ciertos agentes químicos. Estas pruebas se realizan una vez que se han observado las características de crecimiento y el tipo de hemólisis de los estreptococos⁽⁸⁾.

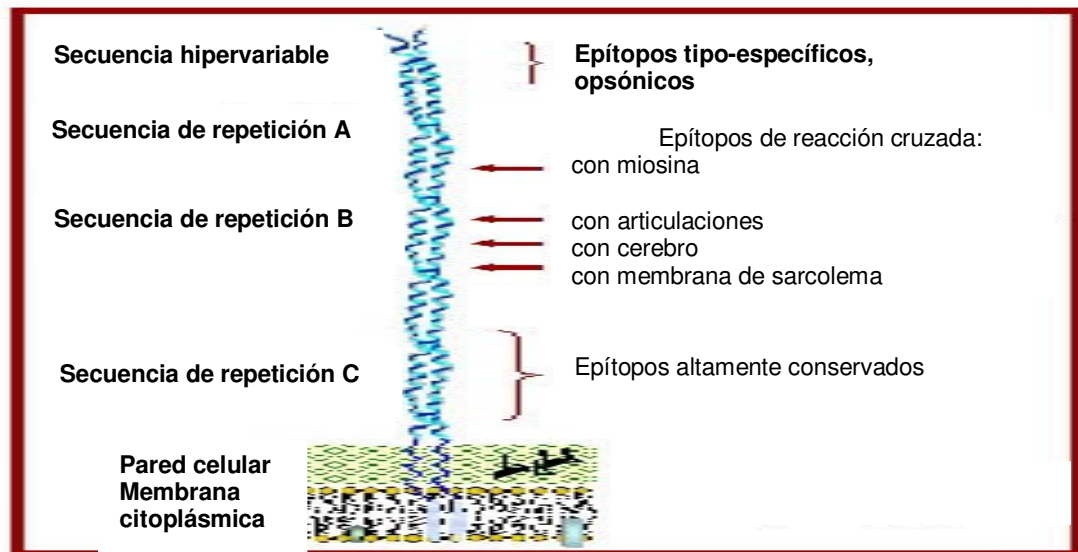
1.1. *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes (*pyus*, pus; *gennaio*, producir = productor de pus) pertenece al grupo A de Lancefield siendo su carbohidrato un dímero de N-acetilglucosamina y de ramnosa; además, es β -hemolítico, por lo que también es llamado Estreptococo β -hemolítico del grupo A⁽⁵²⁾.

1.1.1. Factores de virulencia

Streptococcus pyogenes posee numerosos factores de virulencia (Tabla No. 1, Figura No. 2) siendo el más importante la proteína M.

Proteína M. Está codificada por el gen *emm* y ayuda a la tipificación de estas bacterias, de las cuales existen más de 200 tipos⁽³¹⁾. Está compuesta por dos cadenas polipeptídicas que forman una α -hélice, su extremo carboxilo está anclado a la membrana de los *Streptococcus pyogenes* y su extremo amino se localiza en la parte externa de la bacteria. Está conformada por 4 unidades de repetición (A a D); la subunidad A se encuentra en la parte variable de la molécula y es la que da la especificidad de tipo; la subunidad C está en una zona muy conservada de la molécula (Figura No. 1)^(31, 34). La proteína M ayuda a la adhesión e internalización de la bacteria a las células epiteliales del hospedero y se une, a través de su región conservada, al factor H sérico el cual prepara para su degradación al componente C3b del complemento, evitando de esta manera la opsonofagocitosis de la bacteria⁽⁵²⁾.

Figura No. 1. Estructura de la proteína M⁽³¹⁾.

Ácido lipoteicoico. Forma un complejo con la fibronectina de las células del hospedero, participando así en la unión de *Streptococcus pyogenes* a estas células.

Proteína F. Forma un complejo con la fibronectina y, además de ayudar a la unión, también promueve la internalización del estreptococo a las células del hospedero.

Cápsula. Está constituida por ácido hialurónico. Debido a que las células de tejido conjuntivo del hospedero también contienen ácido hialurónico, las células fagocíticas no reconocen a la bacteria como extraña y por lo tanto no la fagocitan.

C5a peptidasa. Es una proteasa que degrada a la molécula C5a del complemento, un quimioatrayente de células fagocíticas; de esta manera, las células fagocíticas no son reclutadas y se reduce el proceso de inflamación⁽⁵²⁾.

Exotoxinas pirógenas estreptocócicas. Son superantígenos, 4 de ellos son: Spe A, Spe B, Spe C y Spe F. Interactúan con macrófagos y linfocitos T CD4⁺ que liberan IL-1, IL-2, IL6, TNF- α , TNF- β e IFN- γ , los cuales provocan shock e insuficiencia multiorgánica en el síndrome del shock estreptocócico, y el exantema en la escarlatina^(52, 64).

Estreptolisina S. Liza eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Destruye las células fagocíticas al estimular la liberación de su contenido lisosomal.

Estreptolisina O. Liza eritrocitos, leucocitos y plaquetas, además es cardiotóxica. Durante una infección faríngea por *Streptococcus pyogenes*, se producen anticuerpos Antiestreptolisina O (ASO) que ayudan a identificar una infección reciente por esta bacteria. Cuando la infección es cutánea no se generan estos anticuerpos pues se inhiben con el colesterol de los lípidos cutáneos.

Estreptocinasa. Convierte al plasminógeno en plasmina (proteasa), que actúa degradando la fibrina y el fibrinógeno, evitando así la formación de coágulos y ayudando a la diseminación de las bacterias⁽⁵²⁾.

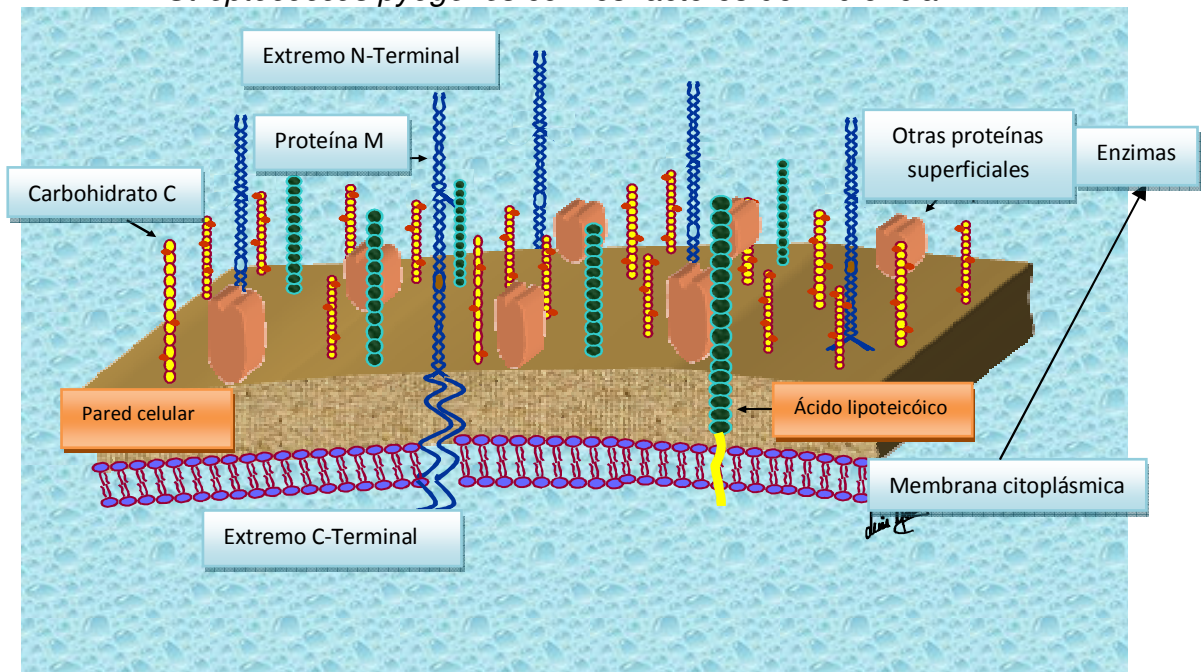
ADNasa. Existen cuatro tipos, A a D. Despolimerizan el ADN de las células de los abscesos, los cuales dejan de ser viscosos y ello favorece la movilidad y diseminación de las bacterias^(52, 59).

Hialuronidasa. Desdobla el ácido hialurónico que es la matriz que une a las células del hospedero, lo cual favorece la diseminación de las bacterias^(8, 59).

Tabla No. 1. Participación de los factores de virulencia de *Streptococcus pyogenes* en la invasión al hospedero^(8, 52, 59, 64).

Factor de virulencia	Función	
Ác. lipoteicoico, Proteína M, Proteína F	Adherencia a las células del hospedero	
Proteína M, Proteína F	Internalización de la bacteria a las células del hospedero	
Proteína M, Cápsula	Interferencia de la fagocitosis	
C5a peptidasa	Reducción del proceso de inflamación	Enzimas y toxinas
Estreptolisinas S y O	Acción citolítica	
Estreptocinasa, ADNasa, Hialuronidasa	Promoción de la diseminación	
Spes	Estimulación de pirogenicidad, hipersensibilidad e inmunosupresión	

Figura No. 2. Representación de la membrana y pared celular de *Streptococcus pyogenes* con los factores de virulencia⁽⁵⁴⁾.



1.1.2. Epidemiología y enfermedades

Enfermedades supurativas

Faringitis. *Streptococcus pyogenes* es el principal agente causal de faringitis aguda⁽⁶⁾, la cual es más prevalente en pacientes de entre 5 y 15 años de edad⁽⁵²⁾. Se caracteriza por un comienzo brusco de dolor de garganta, cefalea, fiebre y amígdalas con microabscesos, enrojecidas y aumentadas de tamaño^(40, 52, 59). Los niños pueden presentar dolor abdominal, náuseas y vómito^(40, 52).

Escarlatina. Es provocada por cepas de *Streptococcus pyogenes* productoras de exotoxina pirógena A y es una complicación de la faringitis^(40, 52). Se caracteriza por la aparición de lesiones rojas (exantema eritematoso) en la parte superior del tórax que más tarde se disemina a las extremidades dejando libres las palmas y la cara; los pliegues del cuerpo se observan enrojecidos (líneas de Pastia) y la lengua se torna al principio blanca con las papilas enrojecidas (lengua de fresa blanca) y después rojiza (lengua de fresa roja)⁽⁴⁰⁾.

Pioderma. Es una infección cutánea y es más frecuente en niños^(52, 59). La bacteria entra a través de alguna cortada en la piel y forma vesículas que evolucionan a pústulas que se rompen dejando costras. La infección se disemina fácilmente⁽⁵²⁾.

Erisipela. Es más común en niños pequeños y ancianos y aparece después de una faringitis o de alguna infección cutánea por *Streptococcus pyogenes*. Es una infección cutánea que generalmente se observa en las piernas, se caracteriza por inflamación (eritema, calor y dolor), la piel se observa sobreelevada y lustrosa^(52, 59).

Fascitis necrosante. Es una enfermedad de rápida evolución que comienza con la entrada de la bacteria a través de un traumatismo (ej. quemaduras o cortadas); la bacteria destruye lípidos y músculo causando una infección

profunda. Hay celulitis, después ampollas, después gangrena e insuficiencia multiorgánica, por lo que los pacientes generalmente no sobreviven.

Síndrome del shock tóxico estreptocócico. Generalmente lo padecen pacientes que tienen otra enfermedad (ej. VIH o diabetes) que los hace propensos. Se caracteriza por la presencia de dolor en las partes blandas acompañado de fiebre, conforme el síndrome avanza el dolor se agudiza hasta causar shock, insuficiencia multiorgánica y finalmente la muerte.

Bacteriemia. Casi todos los pacientes que padecen fascitis necrosante y síndrome del shock tóxico presentan bacteriemia, la cual no es tan común en pacientes con faringoamigdalitis, pioderma y erisipela⁽⁵²⁾.

Enfermedades no supurativas

Fiebre reumática. Es un síndrome autoinmune asociado a faringitis estreptocócica^(31, 52), aparece después de 2 a 3 semanas de la infección faríngea y es de muy baja incidencia en adultos⁽⁶⁾. Una persona con una infección por *Streptococcus pyogenes* produce anticuerpos antiproteína M que se unen a determinantes antigénicos de la proteína M, favoreciendo la opsonización de la bacteria; sin embargo, pueden ocurrir reacciones cruzadas al unirse la antiproteína M a moléculas del cuerpo como la miosina cardíaca, tropomiosina, keratina y laminina (Figura No. 1). Consecuencia de estas interacciones son las manifestaciones articulares, cardíacas y los nódulos

subcutáneos^(31, 52, 59). El diagnóstico de la enfermedad se logra a través de los síntomas (Criterios de Jones), identificación de *Streptococcus pyogenes* por cultivo y el título de antiestreptolisina O > 250 unidades Todd⁽⁵⁹⁾.

Criterios de Jones para el diagnóstico de una fiebre reumática

- Síntomas mayores: Carditis, poliartritis, eritema marginal, nódulos subcutáneos y corea de Sydenham^(31, 59).
- Síntomas menores: Fiebre, artralgias, aumento de la velocidad de sedimentación globular y aumento de la proteína C reactiva^(31, 59).

Glomerulonefritis. Es una enfermedad autoinmune consecuencia de una faringitis o afección de la piel por *Streptococcus pyogenes*, la cual puede aparecer de 2 a 3 semanas después de dicha afección y es más frecuente en niños. La enfermedad sucede por un mecanismo similar al de la fiebre reumática, la antiproteína M en este caso se une a los glomérulos. Se caracteriza por edema agudo, oliguria e hipertensión. En la orina se observa cilindruria, hematuria, proteinuria y leucocituria. Generalmente los adultos que llegan a padecer esta enfermedad terminan con insuficiencia renal⁽⁵⁹⁾.

1.1.3. Identificación

A partir de muestras de exudado faríngeo u otras, se realiza una tinción de Gram así como la inoculación en una placa de gelosa sangre. Después de incubar de 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C, se observan colonias β -hemolíticas que deben aislarse para realizar las pruebas de identificación que a continuación se mencionan (Figura No. 3)⁽³⁷⁾.

Prueba de susceptibilidad a 0.04 U de Bacitracina. La mayoría de las cepas de *Streptococcus pyogenes* (99.5%) son sensibles a esa concentración de Bacitracina. Después de la incubación de la bacteria previamente inoculada en gelosa sangre con el disco correspondiente, se observará un halo de inhibición del crecimiento, a partir de 1mm, alrededor de éste^(18, 34, 52).

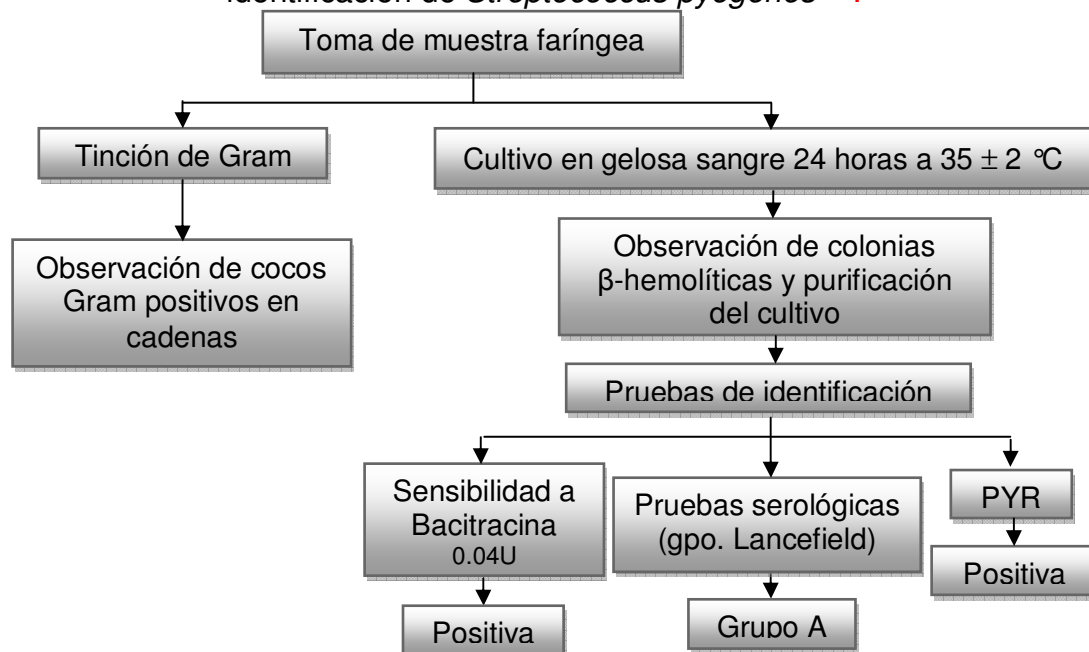
Se han reportado cepas de estreptococos del grupo B, D y del grupo *Viridans* que también son sensibles, aproximadamente 6%, 1% y 8%, respectivamente^(18, 37).

Determinación del grupo de Lancefield. *Streptococcus pyogenes* pertenece al grupo A de Lancefield por lo que debe aglutinar con el suero anti A en la prueba de inmunoaglutinación⁽³⁷⁾.

Prueba de PYR. En esta prueba se detecta la enzima pirrolidónilarilamidasa (PYR) y consiste en inocular el microorganismo en un medio líquido que contiene L-pirrolidónil- β -naftilamida e incubarlo 4 horas a 35 °C; la PYR hidroliza este sustrato liberando β -naftilamida que se detecta agregando p-dimetilaminocinamaldehído al medio con lo que se forma una base de Schiff de color rojo^(37, 52).

Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos. La detección de anticuerpos ASO, Anti-DNasa B, antiestreptocinasa y antihialuronidasa ayudan a identificar una infección previa por *Streptococcus pyogenes*^(21, 34).

Figura No. 3. Diagrama de flujo que esquematiza los pasos a seguir en la identificación de *Streptococcus pyogenes*⁽³⁷⁾.



1.1.4.Tratamiento

El tratamiento de elección es la Penicilina G. Alternativas son otras penicilinas (ampicilina o amoxicilina), las cefalosporinas y los macrólidos ^(6, 34, 59). Para pacientes alérgicos a la penicilina, los antibióticos de elección son la eritromicina y la vancomicina^(34, 52).

Las infecciones graves de partes blandas se deben tratar con un drenaje y debridamiento quirúrgico, además de la administración de penicilina junto con clindamicina⁽⁵²⁾. Los pacientes con fiebre reumática requieren de un tratamiento largo del antibiótico ya que la enfermedad puede volver a presentarse, además se administra un anti-inflamatorio⁽⁶⁾. La evolución de la glomerulonefritis no es modificada por el tratamiento antibiótico, por lo que el tratamiento se basa en aliviar los síntomas⁽⁵²⁾.

Actualmente se encuentra en desarrollo una vacuna polivalente dirigida en contra de las proteínas M de los *Streptococcus pyogenes*; sin embargo, es un reto tomando en cuenta la gran cantidad de tipos M que se han encontrado hasta la fecha⁽³⁴⁾.

1.2. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae (*agalactia* = necesidad de leche) pertenece al grupo B de Lancefield y su carbohidrato está formado por ramnosa, N-

acetilglucosamina y galactosa. Es un estreptococo β -hemolítico, también llamado Estreptococo β -hemolítico del grupo B⁽⁵²⁾.

1.2.1. Factores de virulencia

A continuación se mencionan los factores de virulencia de *Streptococcus agalactiae* (Tabla No. 2):

Polisacáridos capsulares específicos de tipo. La mayoría de las cepas de *Streptococcus agalactiae* son capsuladas, sus cápsulas están formadas por polisacáridos, conformados a su vez por unidades de repetición que contienen 4 ó 5 de los azúcares siguientes: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ramnosa y ácido siálico⁽⁴⁷⁾. Hasta hoy han sido identificados 9 tipos capsulares cuyas estructuras moleculares de su unidad de repetición son diferentes; estos son **la**, **lb** y del **II** al **VIII**. En años recientes se ha propuesto la existencia del tipo capsular **IX**^(30, 61).

Los polisacáridos capsulares de todos los tipos contienen ácido siálico que es importante en algunos de ellos para completar su antigenicidad⁽⁴⁷⁾, como en los polisacáridos de tipo **la**, **lb** y **II** cuyo residuo terminal de ácido siálico se une al factor H sérico; este último promueve la inactivación del componente C3b de la vía alterna del complemento, el cual ya no se deposita sobre el microorganismo y, por lo tanto, se evita la opsonofagocitosis de la bacteria^(34, 52).

C5a-peptidasa. degrada a la molécula C5a del complemento y, por lo tanto, se reduce el proceso de inflamación.

Ácido lipoteicoico. Participa en la unión de *Streptococcus agalactiae* a las células del hospedero, de la misma manera que ocurre en *Streptococcus pyogenes*.

Proteínas de superficie. Estas son las proteínas C, R y Rib cuya expresión varía significativamente entre los tipos capsulares.

- Proteína C. Está formada por dos componentes (α y β), evita la opsonofagocitosis de la bacteria, además causa mayor mortalidad en modelos de ratas infantiles.
- Proteína R. Existen 4 (R1 – R4). Se ha observado que los sueros de conejo con antiproteína R (de clase IgG) previenen enfermedades invasivas en neonatos humanos, protegiéndolos contra cepas de *Streptococcus agalactiae* del tipo II y III con proteína R.
- Proteína Rib. Los antisueros contra Rib confieren protección pasiva a ratones contra infecciones letales causadas por cepas de *Streptococcus agalactiae* con Rib.

Hialuronidasa. Degrada al ácido hialurónico que une a las células de los tejidos favoreciendo la invasión de la bacteria.

Proteasas. Por ejemplo: Colagenasa que degrada al colágeno que forma parte de la piel y huesos de mamíferos.

Factor de CAMP. Es una proteína que lisa los eritrocitos de carnero previamente tratados con la esfingomielinasa estafilocócica; por sí sola no es capaz de lisar a los eritrocitos.

Nucleasas. Actúan contra el ARN y el ADN, su actividad es diferente a la ADNasa de *Streptococcus pyogenes* y aún no se ha estudiado⁽⁶³⁾.

Tabla No. 2. Factores de virulencia de *Streptococcus agalactiae* y su función⁽²⁰⁾.

Factor de virulencia	Función
Ácido lipoteicoico, proteína C α , C5a peptidasa.	Adherencia a la superficie del epitelio
Proteína C α , C5a peptidasa, β -hemolisina/citolisina.	Invasión celular de barreras epiteliales y endoteliales
β -hemolisina/citolisina, proteasas, colagenasa, factor de CAMP, hialuronidasa.	Daño directo a tejido
Polisacárido capsular, C5a peptidasa, proteína C α .	Evasión al sistema inmune
Peptidoglicano	Inducción de sepsis

1.2.2.Epidemiología y enfermedades

Streptococcus agalactiae reside en el aparato digestivo inferior y, por su proximidad, coloniza el tracto genital femenino sin producir enfermedad (del 10 al 30% de las mujeres son portadoras)^(16, 52). Es más común que la bacteria cause infecciones en mujeres embarazadas que en mujeres no embarazadas y hombres⁽⁵²⁾.

Infecciones en mujeres embarazadas. *Streptococcus agalactiae* causa infecciones vaginales y de vías urinarias en estas pacientes; además pueden padecer otras infecciones como corioamnionitis por la que pueden desarrollar bacteriemia y parto prematuro, y endometritis posparto a través de la cual desarrollan abscesos pelvianos y shock séptico. Esta bacteria también puede provocar infección de la herida quirúrgica de la cesárea^(21, 52).

Aproximadamente en el 60% de los casos una mujer embarazada colonizada con *Streptococcus agalactiae* infecta al producto^(34, 52).

Enfermedad neonatal. *Streptococcus agalactiae* es el principal causante de sepsis y meningitis en neonatos^(30, 34, 35, 52, 61). Dependiendo de la edad en la que se presente la enfermedad, esta se clasifica como sigue^(34, 52):

- De comienzo precoz. Aparece en niños menores a una semana de edad los cuales adquirieron la bacteria en el útero o durante el paso por

el canal de parto. Se caracteriza por bacteriemia, neumonía o meningitis⁽⁵²⁾.

- De comienzo tardío. Aparece en niños de una semana a 3 meses de edad los cuales adquirieron la bacteria de forma exógena por otros niños o por la madre. Se caracteriza por bacteriemia y son más frecuentes los casos de meningitis que en comienzo precoz; además, se presentan infecciones locales de huesos y articulaciones^(34, 52).

La tasa de mortalidad de los neonatos es del 5%, y los sobrevivientes sufren secuelas neurológicas como ceguera o retraso mental^(52, 54).

Infecciones en hombres y mujeres no embarazadas. Estos pacientes generalmente presentan otra enfermedad que los predispone a padecer una infección por *Streptococcus agalactiae*, como diabetes, cáncer, alcoholismo o edad avanzada y, debido a que tienen comprometido su sistema inmune, la tasa de mortalidad es mayor que en mujeres gestantes (15 – 32%). Los síntomas son bacteriemia, neumonía, infecciones cutáneas y de partes blandas, así como infecciones óseas y articulares^(32, 52).

Los pacientes que sufren una infección por *Streptococcus agalactiae* generan anticuerpos IgG en contra del polisacárido capsular específico del tipo de la cepa que causó la infección. Ello es de especial interés en el caso de mujeres embarazadas, ya que pueden transmitir esos anticuerpos al feto y darle una protección contra cepas de *Streptococcus agalactiae* de ese tipo capsular⁽³⁴⁾.

1.2.3. Identificación

Si se sospecha la presencia de *Streptococcus agalactiae*, sobre todo en gestantes, la muestra vaginal debe inocularse en un medio selectivo para estreptococos (caldo Lim o caldo Todd Hewitt con colistina y ácido nalidíxico), aparte de realizar la tinción de Gram^(7, 52). Después de incubar (24 horas a 35 ± 2 °C), se debe subcultivar en placas de gelosa sangre y proseguir con las pruebas de identificación que a continuación se mencionan (Figura No. 4).

Prueba de CAMP. (Christie, Atkins, Munch-Peterson). Se requiere para esta prueba, una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de β -lisina (esfingomielinasa C) que lisa los eritrocitos^(37, 52). *Streptococcus agalactiae* produce el factor de CAMP, una proteína termoestable y difusible codificada por el gen *cfb*. Cuando se inoculan cercanas estas dos cepas, el factor CAMP acentúa la hemólisis producida por la β -lisina, observándose una hemólisis en forma de punta de flecha que apunta hacia la cepa de *Staphylococcus aureus*⁽⁵²⁾.

Existen cepas de *Streptococcus agalactiae* que dan la prueba de CAMP negativa (aproximadamente 2%) y también cepas de *Streptococcus pyogenes* que son CAMP positivas (aproximadamente 10%)⁽¹⁸⁾.

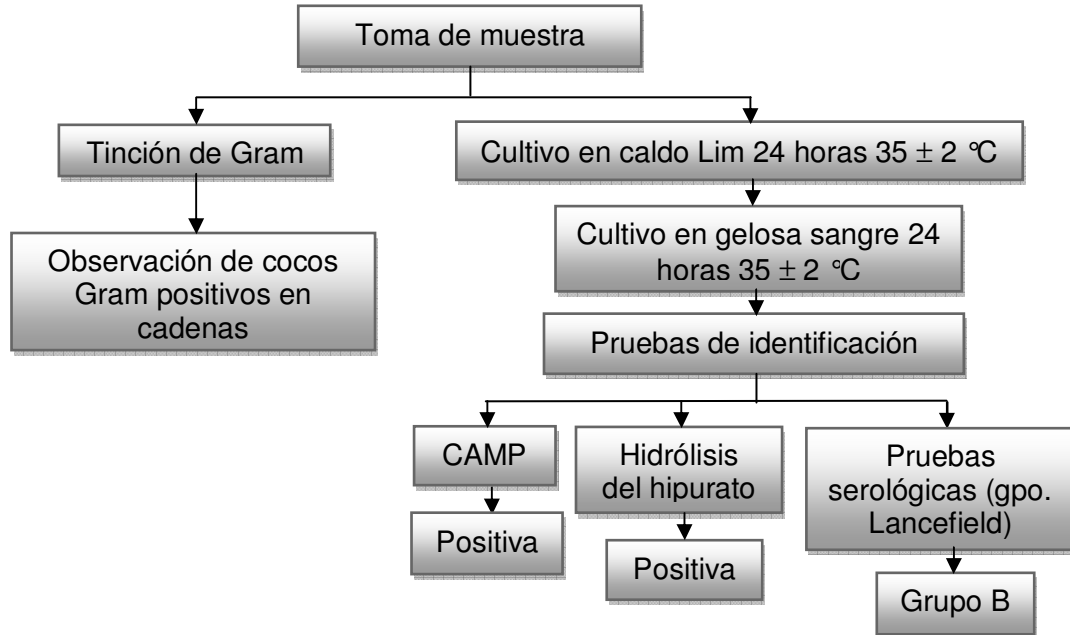
Prueba de hidrólisis del hipurato. *Streptococcus agalactiae* es capaz de hidrolizar el hipurato en glicina y ácido benzoico; por ello, para esta prueba se requiere caldo BHI con 1% de hipurato de sodio. La bacteria se inocula en el caldo, se incuba 20 horas a 35 °C y se centrifuga. El ácido benzoico se pone de manifiesto agregando a 0.8 mL del sobrenadante, 0.2 mL de FeCl₃·6H₂O al 12% en HCl al 2%, apareciendo un precipitado denso de color café que dura más de 10 minutos. Adicionalmente, se puede detectar con ninhidrina a la glicina libre, en cuyo caso aparecerá un color azul^(18, 37).

Algunas cepas de *Streptococcus pyogenes* dan positiva la prueba de hidrólisis del hipurato (aproximadamente 3%)⁽¹⁸⁾.

Determinación del grupo de Lancefield. Ello puede confirmar la presencia de *Streptococcus agalactiae* en una muestra clínica. Esta bacteria debe aglutinar con el suero anti B⁽⁵²⁾.

Identificación en medios especiales. *Streptococcus agalactiae* produce un pigmento carotenoide de color rojo-naranja en el nuevo medio de granada y el caldo zanahoria, ambos con un contenido similar. Después de 24 horas de incubación, preferentemente en una atmósfera con 5 a 10% de CO₂, el medio se torna de naranja a rojo. Aún se está determinando si esta forma de identificación es equivalente a la utilizada comúnmente sembrando en medio Lim y subcultivando en placas de gelosa sangre⁽³⁷⁾.

Figura No. 4. Diagrama de flujo que resume los pasos a seguir durante la identificación de *Streptococcus agalactiae* ^(7, 18, 37, 52).



La identificación de *Streptococcus agalactiae*, en mujeres embarazadas portadoras, se debe realizar antes del nacimiento, durante la semana 35 – 37 de gestación o durante la semana 30 en un embarazo múltiple, para así administrar un tratamiento profiláctico a la paciente^(10, 16).

1.2.4.Tratamiento

El tratamiento de elección es la penicilina, aunque algunos sugieren acompañar este antibiótico con un aminoglicósido (gentamicina o amikacina), ya que existen cepas de *Streptococcus agalactiae* tolerantes a la penicilina.

Para los pacientes alérgicos a la penicilina, el tratamiento de elección es vancomicina.

En el caso de las pacientes gestantes portadoras de *Streptococcus agalactiae*, el tratamiento es penicilina G intravenosa, al menos 4 horas antes del parto; a las alérgicas se les administra clindamicina o cefazolina.

Se encuentra en proceso una vacuna pentavalente dirigida en contra de los tipos capsulares más frecuentes en la clínica, **la, lb, II, III y V**⁽⁵²⁾.

2. Exudado faríngeo

En un exudado faríngeo, la principal bacteria que se busca es *Streptococcus pyogenes*⁽³⁷⁾.

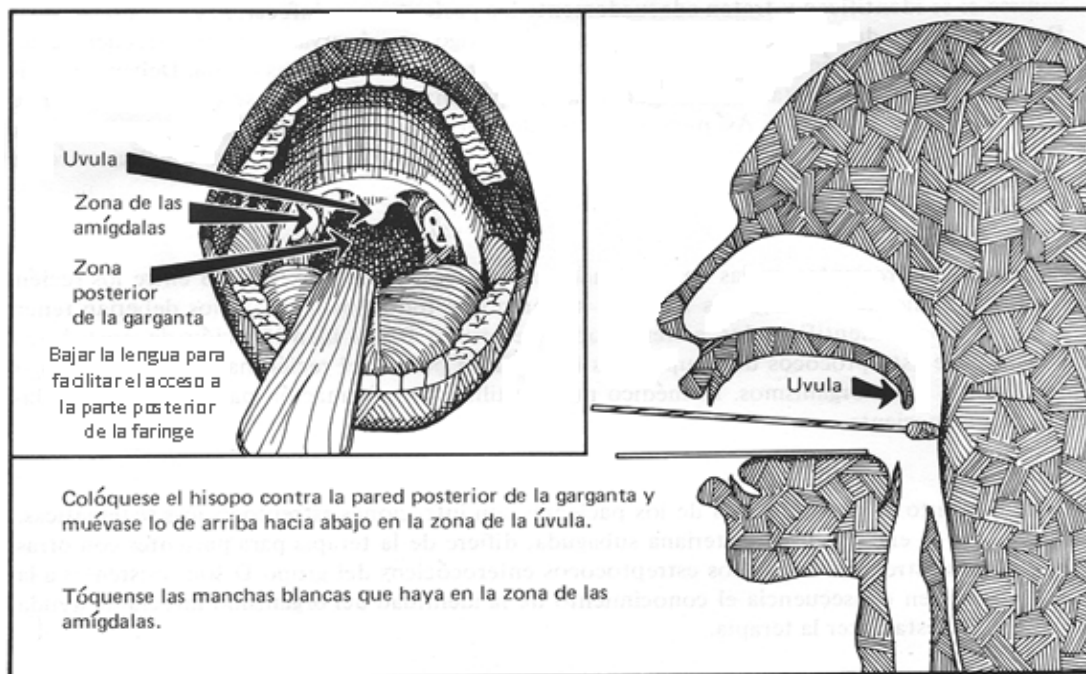
Para la toma de muestra se utiliza un hisopo de rayón o dacrón estéril seco o humedecido con medio de transporte Stuart o Amies, si es que no se va a procesar rápidamente^(18, 21).

El paciente debe estar en ayunas y sin aseo bucal para que la concentración de bacterias en la faringe sea mayor⁽¹⁸⁾.

La forma correcta de tomar la muestra es pedirle al paciente que abra la boca y diga “ah” lo cual ayuda a levantar la úvula además de disminuir el reflejo de

arcadas; al mismo tiempo se hace presión sobre la lengua con ayuda de un abatelenguas⁽³⁷⁾ y se frota el hisopo en la parte posterior de la garganta, así como en las amígdalas, sobre todo en donde se observen placas blancas. La muestra se debe obtener de tal manera que se elimine la mayor cantidad de microorganismos contaminantes que interfieran en la recuperación de la bacteria patógena; es por ello que no se debe tocar la úvula, la lengua ni los carrillos (Figura No. 5)^(18, 21, 37).

Figura No. 5. Toma de muestra de un exudado faríngeo⁽¹⁸⁾.



Después de tomada la muestra, ésta debe ser inoculada en un medio de cultivo, siendo el de elección la gelosa sangre⁽²¹⁾, e incubada a 37 °C, 24

horas; se buscan colonias β -hemolíticas sospechosas de ser *Streptococcus pyogenes* o *Streptococcus agalactiae*⁽¹⁸⁾.

3. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias producidas por microorganismos que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo y/o ejercer una acción bactericida contra otros microorganismos.

Los antibióticos se clasifican comúnmente de acuerdo a su mecanismo de acción (Tabla No. 3)^(52, 55), y pueden presentar diferente espectro antimicrobiano así como diferente actividad antimicrobiana (Tabla No. 4)⁽⁵²⁾.

Tabla No. 3. Clasificación de los antibióticos por su mecanismo de acción⁽⁵⁵⁾.

Antibióticos	Mecanismo de acción
Penicilinas, Vancomicina, Isoniacida, Etambutol, Cicloserina, Bacitracina, etc.	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Aminoglucósidos, Tetraciclina, Oxazolidona, Macrólidos.	Inhibición de la síntesis de proteínas
Quinolonas, Rifampicina, Metronidazol.	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
Sulfonamidas, Trimetoprim.	Antimetabolitos

Tabla No. 4. Clasificación de los antibióticos por espectro y actividad antimicrobiana⁽⁵²⁾.

Clasificación		Descripción
Espectro antimicrobiano	Amplio espectro	Actúan sobre una gran variedad de bacterias, Gram positivas y Gram negativas.
	Corto espectro	Actúan contra ciertos microorganismos en específico.
Actividad antimicrobiana	Actividad bacteriostática	Inhiben el crecimiento microbiano.
	Actividad bactericida	Destruyen a los microorganismos.

La actividad bacteriostática de un antibiótico se determina con la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es la concentración más baja que puede inhibir el crecimiento de un microorganismo. La actividad bactericida se mide con la Concentración Mínima Bactericida (CMB), que es la concentración más baja que destruye al 99.9% de los microorganismos⁽⁵²⁾.

La determinación de la CMI es la prueba fundamental para determinar la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico y actualmente se realiza en los laboratorios de microbiología por el método de microdilución en caldo; sin embargo, es más cara y laboriosa que la prueba de susceptibilidad con discos (Kirby – Bauer) y ambas se realizan con el mismo propósito; por lo tanto, se prefiere realizar esta última⁽⁶⁴⁾.

Estas pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se realizan e interpretan de acuerdo a lo establecido por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ya que esta institución ha tratado de disminuir la variabilidad de los resultados⁽¹⁹⁾.

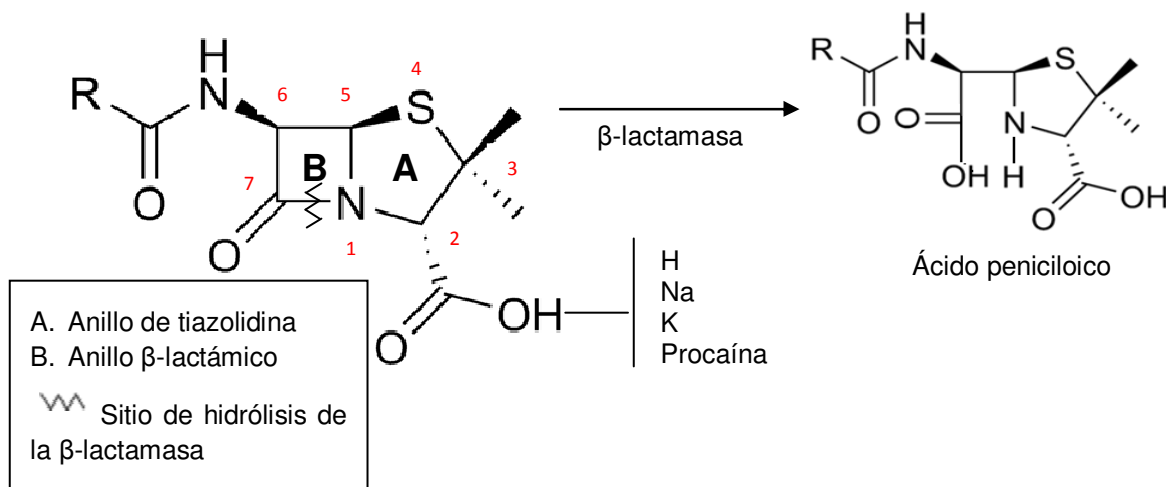
4. Penicilinas

Las penicilinas son antibióticos β -lactámicos producidos por los hongos *Penicillium glaucum*, *Penicillium notatum* y *Penicillium chrysogenum*, aunque la producción a nivel industrial se realiza con esta última especie⁽⁴⁵⁾.

4.1. Estructura molecular

La estructura molecular básica de las penicilinas consta de un anillo de tiazolidina unido a un anillo β -lactámico. En la posición 2 se encuentra un grupo carboxilo que le confiere solubilidad a las moléculas de penicilina sódica, potásica o procaínica. En la posición 6 hay un grupo amino con un grupo acilo y, unido a este, se encuentra una cadena lateral que varía de acuerdo al tipo de penicilina, que le confiere a la molécula las características antibióticas al igual que el anillo β -lactámico (Figura No. 6)^(17, 45, 55).

Figura No. 6. Estructura química de las penicilinas y el producto de la hidrólisis con β -lactamasa⁽⁵⁵⁾.



4.2. Clasificación

Las penicilinas se clasifican de acuerdo a su espectro antimicrobiano (Tabla No. 5)^(2, 55, 57).

Existen penicilinas naturales que se obtienen directamente del medio de fermentación por hongos del género *Penicillium*, y penicilinas semisintéticas que se obtienen por modificación de la molécula al adicionar enzimas o sustancias químicas a este medio. Con la aparición de cepas resistentes a las penicilinas naturales o a las penicilinas semisintéticas ya existentes, se ha presentado la necesidad de producir otras penicilinas semisintéticas eficaces contra microorganismos^(9, 43).

Tabla No. 5. Clasificación de las penicilinas por su espectro antimicrobiano ^(55, 57).

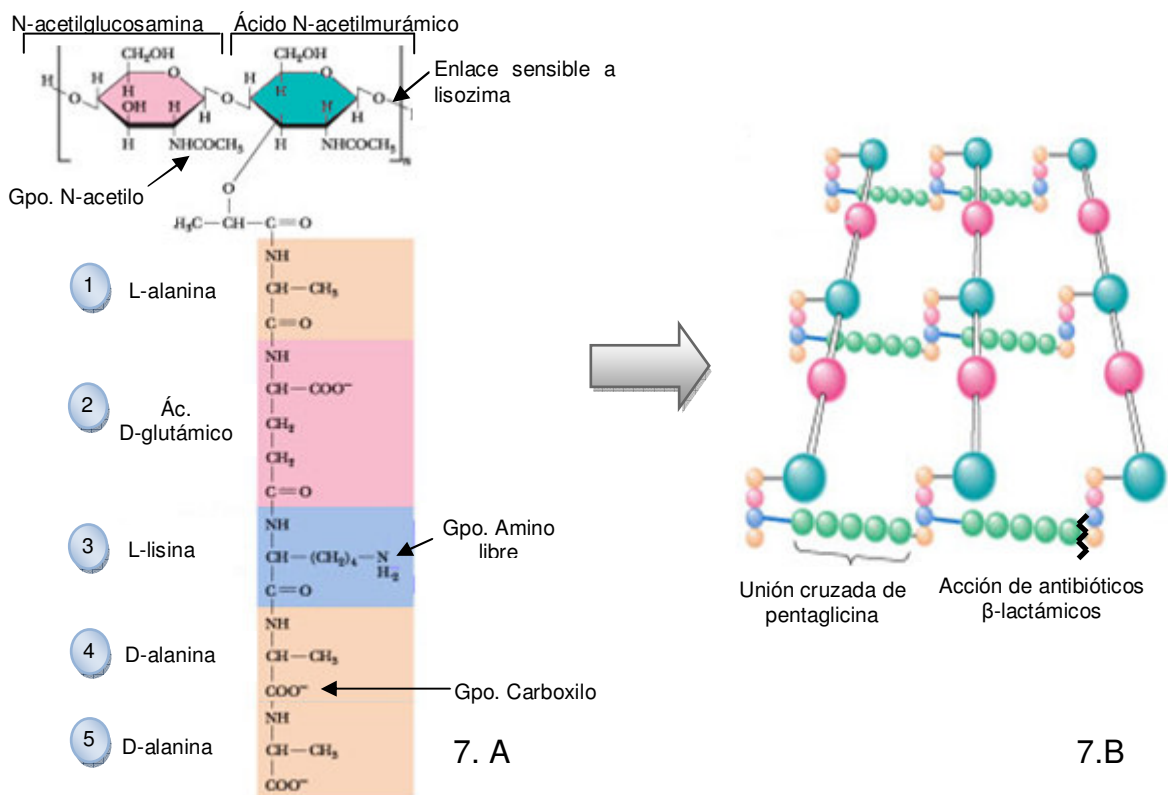
Penicilina	Espectro antimicrobiano
Penicilina G Penicilina V	Penicilinas de corto espectro , potentes contra cocos Gram positivos. <i>Staphylococcus aureus</i> es resistente a estas penicilinas debido a que es productor de β -lactamasas.
Meticilina Nafcilina Oxacilina Cloxacilina Dicloxacilina	Penicilinas de corto espectro resistentes a las β -lactamasas y, por lo tanto, útiles para tratar infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i> y por cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> no resistentes a meticilina.
Ampicilina Amoxicilina Bacampicilina	Penicilinas de amplio espectro . Además de actuar contra microorganismos Gram positivos, su espectro se ha ampliado para ser eficaces contra Gram negativos como <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> o <i>Haemophilus influenzae</i> ; sin embargo, algunas de estas cepas producen β -lactamasas.
Carbenicilina Carbenicilina Indanil Ticarclina	Penicilinas de espectro extendido , que abarcan a los géneros <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Proteus</i> .
Mezlocilina Azlocilina Piperacilina	Penicilinas de espectro extendido . Actúan contra <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> y algunas otras bacterias Gram negativas.

4.3. Mecanismo de acción

Las penicilinas son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de bacterias en fase de crecimiento ^(23, 45, 55, 57).

Peptidoglicano o mureína. Está formado por unidades de muropéptidos. Un muropéptido está constituido por una molécula de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unido a una de ácido N-acetilmurámico (MurNAc) por un enlace glicosídico β -1,4; unido al MurNAc hay un péptido de 5 aminoácidos; los dos primeros son variables, el tercero es un diaminoácido (ej. lisina), y el cuarto y quinto son D-alanina. Entre el grupo amino libre del diaminoácido de un muropéptido y el grupo carboxilo de la D-alanina en posición 4 de otro, se forma un enlace cruzado y se libera la D-alanina en posición 5. Algunas bacterias tienen aquí otro péptido (Figura No. 7)^(12, 23, 57, 58, 62).

Figura No. 7. A. Unidad básica del peptidoglicano (muropéptido).
 B. Representación de la estructura de peptidoglicano en bacterias Gram positivas⁽²³⁾.

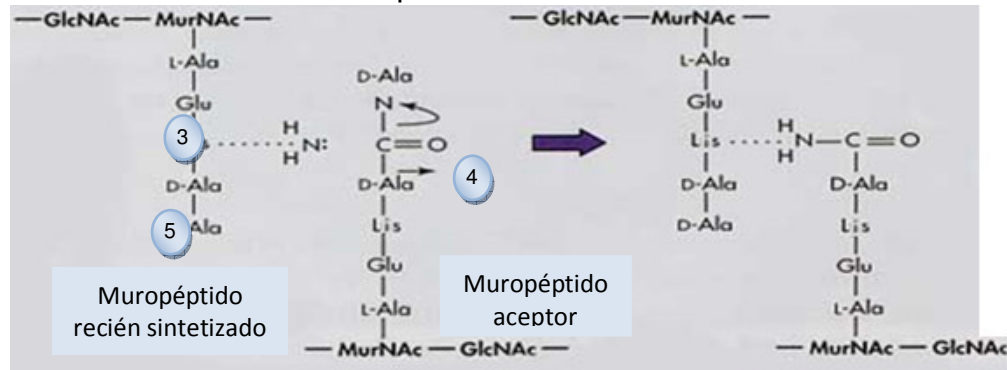


La síntesis del peptidoglicano ocurre en 3 etapas^(52, 58):

- a) Se inicia la síntesis del muropéptido dentro de la célula.
- b) Se une el muropéptido en síntesis al transportador bactoprenol y se finaliza la síntesis de este.
- c) El muropéptido es transportado al exterior de la célula y unido a la pared celular en crecimiento.

En esta última etapa participan las proteínas de unión a la penicilina que son las transglucosilasas, transpeptidasas y DD-carboxipeptidasas que son los “blancos” de las penicilinas. El disacárido GlcNAc – MurNAc de la unidad estructural (muropéptido) recién sintetizada se une al polisacárido de la molécula de peptidoglicano en crecimiento por acción de las transglucosilasas, liberándose pirofosfato de bactoprenol. Después ocurre la reacción de transpeptidación en la que se forma un puente peptídico cruzado entre el diaminoácido (en posición 3) del muropéptido nuevo y la D-alanina (en posición 4) de la molécula aceptora, reacción catalizada por las transpeptidasas (Figura No. 8). Por último, se libera la D-alanina de la posición 5 de la molécula aceptora por acción de las DD-carboxipeptidasas.

Figura No. 8. Reacción de transpeptidación blanco de los antibióticos β -lactámicos⁽⁵²⁾.



Las penicilinas se unen a las PBPs con actividad de DD-carboxipeptidasas y transpeptidasas, inactivándolas⁽⁷¹⁾; de manera que la reacción de transpeptidación catalizada por estas últimas, esencial para la síntesis de peptidoglicano, no se lleva a cabo (Figura No. 7 y 8)^(23, 45, 52, 55, 57).

Las penicilinas tienen una similitud conformacional con la D-Ala-D-Ala del muropéptido. Debido a esta similitud, las transpeptidasas, en presencia de penicilina, se unen a este fármaco en vez de unirse al muropéptido, formando así un complejo peniciloil en el que el nucleófilo de la serina de una transpeptidasa se une covalentemente al grupo carboxilo o al sustituyente R de la molécula de penicilina, quedando así inactivada esta enzima^(17, 71).

Durante la inhibición de la síntesis del peptidoglicano por las penicilinas, se inactiva la enzima que inhibe a las lisozimas, por lo que éstas actúan

rompiendo el enlace $\beta(1,4)$ entre el MurNAc y el GlcNAc del peptidoglicano, causando así la lisis y muerte celular (Figura No. 7)^(39, 45, 52, 55, 57).

La pared celular de las bacterias se encuentra en constante proceso de síntesis por acción de las PBPs, y de degradación por acción de las mureína hidrolasas; estas últimas participan en la separación de células hijas, en el crecimiento de la pared celular y en el reciclado de peptidoglicano^(52, 58). Se ha propuesto la existencia de un complejo enzimático, el de la holoenzima mureína replicasa, estructurada por mureína hidrolasas, que quitarían una unidad de muropéptido viejo a la pared celular; así, las PBPs adicionarían dos muropéptidos nuevos sin que hubiese lisis celular. La destrucción no lítica de las bacterias por las penicilinas podría comprender este mecanismo^(55, 58).

4.4. Efectos adversos

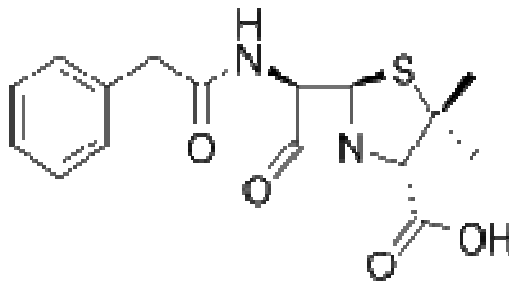
Las penicilinas pueden generar hipersensibilidad, ya que sus moléculas se convierten fácilmente en haptenos, en condiciones fisiológicas. En el 95% de los casos se forma el determinante antigénico mayor peniciloil al abrirse el anillo β -lactámico de la molécula de penicilina y formar un enlace covalente con las proteínas plasmáticas. En el 5% de los casos se forman determinantes antigénicos menores como el peniciloato y el peniloato. Existen pruebas cutáneas para determinar si una persona es alérgica a la penicilina; en ellas se genera una reacción de hipersensibilidad de tipo I^(28, 48, 66).

4.5. Penicilina G

La penicilina G, también llamada bencilpenicilina, es la única penicilina natural que se utiliza en la clínica. Es un antibiótico que actúa contra bacterias Gram positivas y unas pocas Gram negativas. Casi todos los estreptococos son sensibles a ella.

La estructura química de la penicilina G tiene como grupo R un grupo bencilo (Figura No. 9)⁽⁵⁵⁾.

Figura No. 9. Estructura química de la penicilina G⁽⁵⁵⁾.



4.5.1. Farmacocinética

Absorción. La penicilina G es muy lábil al pH ácido del estómago; por ello no se administra por vía oral, pues se absorbería sólo una pequeña cantidad del antibiótico⁽⁵⁵⁾.

Distribución. Se distribuye muy bien por órganos y tejidos. Atraviesa las meninges sólo cuando están inflamadas^(45, 55, 57). La penicilina G puede ser administrada en mujeres embarazadas y en período de lactancia, ya que el riesgo para el producto es mínimo comparado con el riesgo a otros medicamentos⁽¹⁴⁾.

Metabolismo. Este antibiótico no se metaboliza.

Excreción. La penicilina G se excreta principalmente por el riñón, donde el 90% es vía secreción tubular. El tiempo de vida media de eliminación es de 30 minutos aumentando en recién nacidos y en pacientes con insuficiencia renal^(55, 57).

4.5.2. Formas farmacéuticas disponibles

Las formas disponibles de penicilina G son^(2, 27, 46):

- Penicilina G sódica o potásica (acuosas). Se administran por vía intravenosa o intramuscular. Por esta última vía el antibiótico presenta una vida media de 30 minutos que se puede alargar administrando probenecid por vía oral, ya que disminuye la excreción de penicilina por el riñón.
- Penicilina G benzatínica y penicilina G procaínica. Se administran por vía intramuscular y se almacenan en los tejidos por mucho tiempo. La

penicilina G procaínica actúa por 24 horas, la benzatínica actúa hasta por 29 días.

5. Resistencia a penicilina

5.1. Historia

Pocos años después de la introducción de la penicilina a la clínica en 1942 por Florey y cols., aparecieron cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de β -lactamasas; se desarrollaron entonces penicilinas semisintéticas resistentes a estas enzimas, como la meticilina; sin embargo, en 1960 se reportaron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) cuyo mecanismo era la modificación en la estructura de las PBP 2a.

Más adelante se desarrollaron penicilinas semisintéticas contra bacterias Gram negativas (por ejemplo: ampicilina en 1963); sin embargo, aparecieron bacilos Gram negativos como *Escherichia coli* productores de β -lactamasas. De hecho, en 1963 se describió la primer β -lactamasa observada en Gram negativos, la TEM-1⁽⁴³⁾.

La resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina se observó desde los primeros años de la introducción del antibiótico a la clínica, pero no fue sino hasta los años 60's que se le dio la importancia que requería⁽³⁾.

En 1978 se introdujeron a la clínica las penicilinas contra *Pseudomonas*. En 1984 se empezaron a usar los inhibidores de β -lactamasas ya que, aunque las β -lactamasas aparecieron gradualmente, fue en los años 80's cuando se encontraron de manera alarmante; estos inhibidores hicieron posible el uso de penicilinas que ya no eran útiles para algunas infecciones⁽⁴³⁾.

5.2 Mecanismos de resistencia a las penicilinas

Se conocen 3 mecanismos de resistencia bacteriana a los β -lactámicos^(55, 43):

- A) Modificación de la estructura de las PBPs
- B) Producción de β -lactamasas
- C) Inhibición del paso del antibiótico al interior de la célula

5.2.1. Modificación de la estructura de las PBPs

Las PBPs son enzimas bacterianas que se clasifican de acuerdo a su peso molecular^(24, 32, 71):

- PBPs de bajo peso molecular (< 60 kDa). Con actividad de DD-carboxipeptidasa, importantes pero no esenciales para el crecimiento celular.

- PBPs de peso molecular elevado (60 – 120 kDa). Son esenciales; la clase A corresponde a PBPs bifuncionales con actividad de transglicosilasas y transpeptidasas, la clase B corresponde a PBPs monofuncionales con actividad de transpeptidasas.

Las PBPs han sido numeradas de acuerdo al valor decreciente de su peso molecular; así, las PBPs 1 tienen un peso molecular mayor que las PBPs 2⁽²⁴⁾.

Se conocen 9 tipos de PBPs pero solo 4 son los blancos de los antibióticos β -lactámicos: PBP 1A, PBP 1B, PBP 2 y PBP 3, todas ellas de alto peso molecular^(24, 43).

Este mecanismo de resistencia consiste en la aparición de PBPs con baja afinidad por los β -lactámicos y es comúnmente encontrado en bacterias Gram positivas, como los MRSA y *Streptococcus pneumoniae*^(43, 51), aunque se ha reportado en cepas de bacterias Gram negativas como *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*⁽⁴³⁾.

Los MRSA son resistentes a los β -lactámicos por poseer PBP 2A (también llamado PBP 2') que no se une a estos antibióticos; esta PBP es codificada por el gen cromosómico *mecA*, el cual es transferido a la bacteria por transposición^(25, 52, 55, 64).

La resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los β -lactámicos se debe a procesos de transformación con ADN de otros estreptococos de la cavidad oral (grupo *Viridans*) que pueden tener genes que codifican para PBPs con baja afinidad por los β -lactámicos⁽⁶⁴⁾.

5.2.2. Producción de β -lactamasas

La principal causa de resistencia bacteriana a los β -lactámicos consiste en la producción de enzimas β -lactamasas. Las bacterias que utilizan este mecanismo producen β -lactamasas codificadas a nivel cromosómico o por plásmidos, que rompen el enlace C – N del anillo β -lactámico de estos antibióticos (Figura No. 6)^(22, 41, 43, 55).

A través de su grupo carboxilo, los β -lactámicos se unen a la serina del sitio activo de las β -lactamasas clase A, C y D, produciendo un intermediario acil-serina muy parecido al que se forma entre estos antibióticos y las PBPs. La unión entre un β -lactámico y una β -lactamasa clase B es más compleja y requiere de Zinc como cofactor. La unión β -lactámico - PBP es de corta duración y la enzima es inmovilizada; la unión β -lactámico - β -lactamasa es mucho más prolongada logrando así la destrucción del antibiótico^(22, 41).

Todas las bacterias Gram negativas producen β -lactamasas en poca cantidad que se ubican en el espacio periplásmico. Algunas bacterias Gram positivas

producen estas enzimas en gran cantidad liberándolas al exterior de la célula^(43, 55).

La expresión de β -lactamasas puede ser^(41, 43):

- a) Constitutiva, lo que implica su independencia a estímulos externos y suele mantenerse una cantidad basal de la enzima. Ej. β -lactamasas de bacterias Gram negativas mediadas por plásmidos.
- b) Inducible, lo que significa que se producen después de la exposición a un β -lactámico inductor que promueve la producción de β -lactamasas. Ej. β -lactamasas de bacterias Gram negativas codificadas a nivel cromosómico.

Existen inhibidores de β -lactamasas que, por su estructura molecular, tienen una mayor afinidad por estas enzimas que los β -lactámicos; estos son el Ácido Clavulánico, el Sulbactam y el Tazobactam^(41, 43).

5.2.3. Inhibición del paso del antibiótico al interior de la célula

Este mecanismo algunas veces está en conjunción con los otros dos antes vistos⁽⁵¹⁾. Es muy común en bacterias Gram negativas y se puede deber a 2 situaciones⁽⁴³⁾:

- 1) Alteración de la estructura molecular de las porinas. Las porinas son canales proteicos que se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, por las que pueden pasar al espacio periplásmico moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular como los β -lactámicos. La penicilina G no es efectiva contra Gram negativos ya que no es lo suficientemente polar para pasar por estos canales. Si se altera la estructura de las porinas, cambia también la permeabilidad a los antibióticos, los cuales ya no pueden pasar o lo hacen más lentamente hacia el espacio periplásmico para unirse a las PBPs e inhibir así la síntesis del peptidoglicano. Ej. *Escherichia coli* con mutaciones en los genes *AmpF* y/o *mar*, así como *Pseudomonas aeruginosa* o *Klebsiella pneumoniae* con mutaciones en el gen *1-Omp*^(43, 55, 64).

- 2) Mecanismos de eflujo. Se puede deber a la presencia de bombas de eflujo en la membrana citoplásmica de bacterias Gram negativas que transportan el fármaco al espacio periplásmico, o a complejos enzimáticos formados por una proteína transportadora en la membrana citoplásmica y un canal en la membrana externa, unidas por una proteína situada en el espacio periplásmico. Se han reportado cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a carbenicilina y ticarcilina que utilizan bombas de eflujo^(43, 55).

Aunque el mecanismo de resistencia a β -lactámicos más importante es la producción de β -lactamasas, en una bacteria puede existir más de un

mecanismo y cualquiera puede ser la causa más importante de resistencia a estos antibióticos⁽⁴³⁾.

5.2.4. Hallazgos en *Streptococcus pyogenes*

Aunque *Streptococcus pyogenes* sigue siendo muy sensible a la penicilina *in vitro* y no se han reportado casos de resistencia a este antibiótico^(13, 51), sí se han documentado desde 1980, fracasos en los tratamientos contra infecciones faríngeas causadas por esta bacteria; a tal respecto, diferentes investigadores sugieren que se puede deber a la presencia, en el tracto respiratorio superior, de flora bacteriana normal productora de β -lactamasas, a la baja susceptibilidad de las cepas al β -lactámico (tolerancia) o a reinfecciones con personas portadoras^(11, 13, 33).

Kaplan y Johnson, en 2001, realizaron un estudio con 271 pacientes con faringitis por *Streptococcus pyogenes*, a quienes se les administró penicilina G benzatínica intramuscular. Ellos detectaron fracasos del tratamiento en el 25% de los casos. Observaron también que la penicilina es pobremente efectiva para erradicar a *Streptococcus pyogenes* de los portadores, a diferencia de lo que ocurre en los casos de faringitis, lo cual sugiere que se debe a que las cepas de portadores puede que no se dividan a la misma velocidad que las otras, o bien, a la existencia de cepas intracelulares, ya que es difícil que la penicilina penetre a las células hospederas⁽³³⁾.

Casey y Pichichero, en 2004, realizaron un meta-análisis del éxito del tratamiento con penicilinas y cefalosporinas en la erradicación de *Streptococcus pyogenes* causantes de tonsilofaringitis en personas menores de 18 años. Ellos encontraron mayor éxito en el tratamiento con cefalosporinas orales que con penicilinas orales, y observaron que las fallas en el tratamiento con penicilinas han aumentado con el tiempo. Estos autores suponen que ello se puede deber a la presencia de flora normal productora de β -lactamasas en la faringe, a la mayor biodisponibilidad de las cefalosporinas, o a que las penicilinas erradican más efectivamente a los estreptococos del grupo *Viridans* que las cefalosporinas, disminuyendo la población de estos competidores biológicos⁽¹¹⁾.

Chaussee y cols., en 2006, demostraron que la inactivación del gen *rgg* en cepas de *Streptococcus pyogenes* está implicada en la tolerancia a la penicilina. Este gen codifica para la glicosiltransferasa G, una enzima que estimula la expresión de genes asociados a la virulencia, al catabolismo y a la respuesta al estrés. La inactivación del gen *rgg* provoca la disminución en la síntesis de la mureína hidrolasa Mur1.2, lo cual puede aumentar la tolerancia de las bacterias a la penicilina. Ellos demostraron que la biosíntesis de ácidos grasos protege a la bacteria contra la muerte celular. La penicilina provoca que el ácido lipoteicoico de la pared celular de *Streptococcus pyogenes* se libere al exterior; estos ácidos, así como todos los lípidos, inhiben a las mureína hidrolasas y ello protege a la célula de la lisis, haciéndola tolerante a la penicilina. Observaron también que *Streptococcus pyogenes* en fase

estacionaria es tolerante a la penicilina y explican que durante esta fase ya no hay división celular, lo cual promueve la excreción de lípidos por parte de la célula que la protege de la lisis⁽¹³⁾.

5.2.5. Hallazgos en *Streptococcus agalactiae*

Numerosos estudios han demostrado la existencia de cepas de *Streptococcus agalactiae* con baja susceptibilidad a la penicilina. En la tabla No. 6 se resumen los reportes de diferentes grupos de investigación, quienes no examinaron genéticamente las cepas de *Streptococcus agalactiae* con esta característica^(15, 69, 49, 29).

Kimura y cols., recolectaron recientemente 14 cepas de *Streptococcus agalactiae* con baja susceptibilidad a penicilina, encontrando en estas cepas, poca sustitución de aminoácidos en PBP 1A, PBP 1B, PBP 2A y PBP 2B. La sustitución de aminoácidos en PBP 2X fue mayor y resultó cerca de los sitios activos de la enzima (SSN y KSG); la sustitución de tipo V405A se encontró cerca de SSN y la sustitución de tipo Q557E cerca de KSG. Observaron también una menor cantidad de PBP 2X en las cepas con baja susceptibilidad, comparada con la cantidad en las cepas control, de lo que se infiere que la sustitución de aminoácidos provoca la inestabilidad de PBP 2X, la cual se desintegra. Ellos concluyen que las alteraciones tipo V405A y Q557E en los genes *pbp2x* son la causa mas importante de la baja susceptibilidad a penicilina en cepas de *Streptococcus agalactiae*⁽³⁵⁾.

Nagano y cols., de un total de 442 cepas de *Streptococcus agalactiae*, encontraron 8 con baja susceptibilidad a penicilina; éstas fueron separadas en dos grupos: cepas con CMI de 0.25 – 0.5 µg/mL (grupo 1) y cepas con CMI de 1 µg/mL (grupo 2). Las cepas del grupo 2 presentaron mayor proporción de sustitución de aminoácidos, distribuida en un mayor tipo de PBPs de peso molecular elevado (PBP 1A, PBP 2A, PBP 2B, y PBP 2X) que las cepas del grupo 1; estas presentaron sustituciones de aminoácidos sólo en PBP 2B y PBP 2X. En las PBP 2X, las sustituciones fueron de tipo V405A y Q557E. También encontraron una menor cantidad de PBPs en las cepas con baja susceptibilidad a penicilina con respecto a las cepas susceptibles⁽⁵³⁾.

Kimura y cols. sugieren llevar a cabo el análisis de cada caso clínico del que se aislen cepas de *Streptococcus agalactiae* con baja susceptibilidad a penicilina, para así confirmar o descartar que la principal causa de las fallas en el tratamiento de infecciones por esta bacteria tenga que ver con la existencia de estas cepas⁽³⁶⁾.

Betriu y cols. encontraron 17 de 100 cepas (17%) tolerantes a penicilina en España, utilizando para ello curvas de tiempo-muerte bacteriana. Otros investigadores han demostrado la existencia de este tipo de cepas y algunos incluso han demostrado que esto contribuye a las fallas en el tratamiento con penicilina⁽⁵⁾.

Tabla No. 6. Resultados de estudios realizados por diferentes investigadores quienes han encontrado cepas de *Streptococcus agalactiae* con baja susceptibilidad a penicilina.

Autor	No. de cepas en el estudio	Año(s) de aislamiento de las cepas	País de estudio	No. cepas con baja suscept.	CMI* [µg/mL] de cepas con baja suscept.	Información adicional
Betriu y cols. ⁽⁵⁾	100	1992	España	2 (2%)	0.5	Método de microdilución en caldo
De Azevedo y cols. ⁽¹⁵⁾	279	1995 - 1999	Canadá	1 (0.4%)	0.25	Aislada de un caso de sepsis neonatal. Método de microdilución en caldo.
Vermillion y cols. ^{(69)***}	574	1998	EUA	10 (1.8%)	-	Aisladas de exudados vaginales de mujeres en el 3 ^{er} . trimestre de embarazo. Método de E-test.
Hsueh y cols. ⁽²⁹⁾	266	1998 - 2000	Taiwán	15 (5.6%)	0.25 (11 cepas), 0.5 (3), 2 (1)	6 cepas del tipo capsular V, 6 NT, 1 II, 1 III, 1 III-IV. Método de dilución en agar.
Morikawa y cols. ^{(49)***}	117	2001	Japón	21 (18%), y 1 cepa resistente (0.9%)**	-	Método de Walk-Away

*Algunas publicaciones no reportaron el valor de CMI de las cepas con baja susceptibilidad a penicilina.

**El grupo de investigación determinó los criterios para considerar una cepa resistente.

***Sólo estos autores especificaron la utilización de penicilina G.

METODOLOGÍA

1. Origen de las cepas

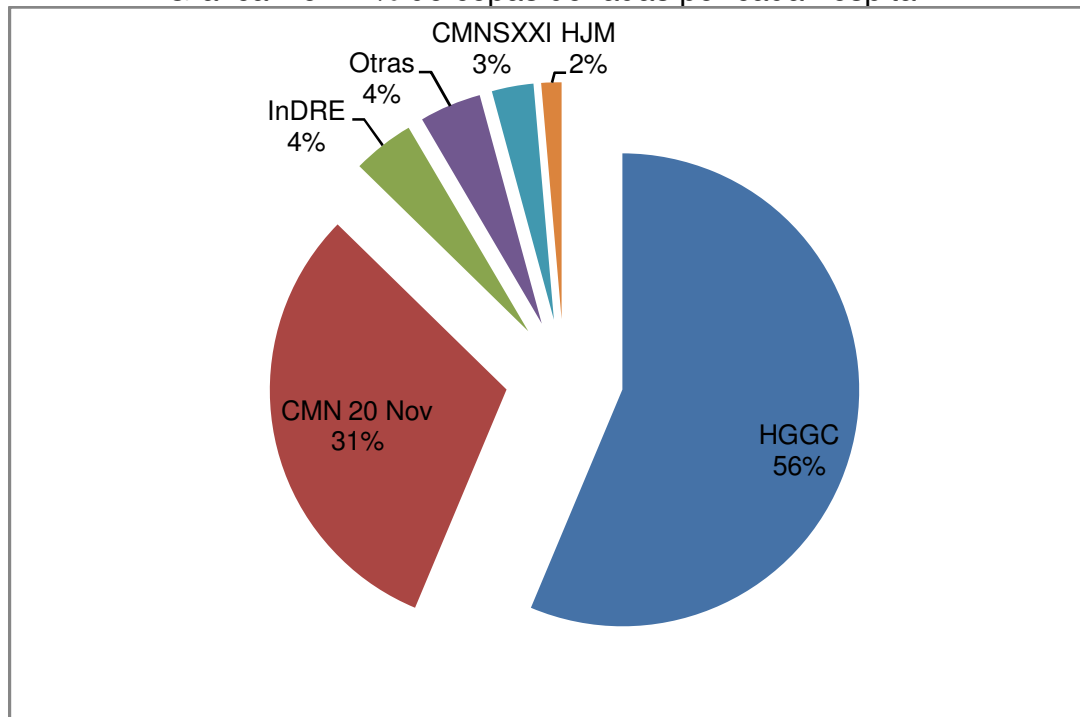
Se analizaron 293 cepas de Estreptococos β -hemolíticos aisladas de exudados faríngeos de diferentes hospitales; de estas, 222 fueron *Streptococcus pyogenes* y 71 *Streptococcus agalactiae*. El tipo M de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y el tipo capsular de las cepas de *Streptococcus agalactiae*, fue determinado previamente por la técnica de PCR en el laboratorio de Biología Molecular.

Las cepas de *Streptococcus pyogenes* fueron donadas por el Hospital General Doctor Gonzalo Castañeda (ISSSTE) de la Ciudad de México entre los años 2001 a 2006. Las cepas de *Streptococcus agalactiae* fueron donadas por diferentes hospitales de la Ciudad de México entre los años 2001 a 2009 (Tabla No. 7 y Gráfica No. 1).

Tabla No. 7. Hospitales que donaron cepas de *Streptococcus agalactiae*.

Hospital	No. de cepas
Hospital General Doctor Gonzalo Castañeda, ISSSTE (HGGC)	40
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE (CMN 20 Nov)	22
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (InDRE)	3
Otras instituciones	3
Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (CMNSXXI)	2
Hospital Juárez de México (HJM)	1

Gráfica No. 1. % de cepas donadas por cada hospital.

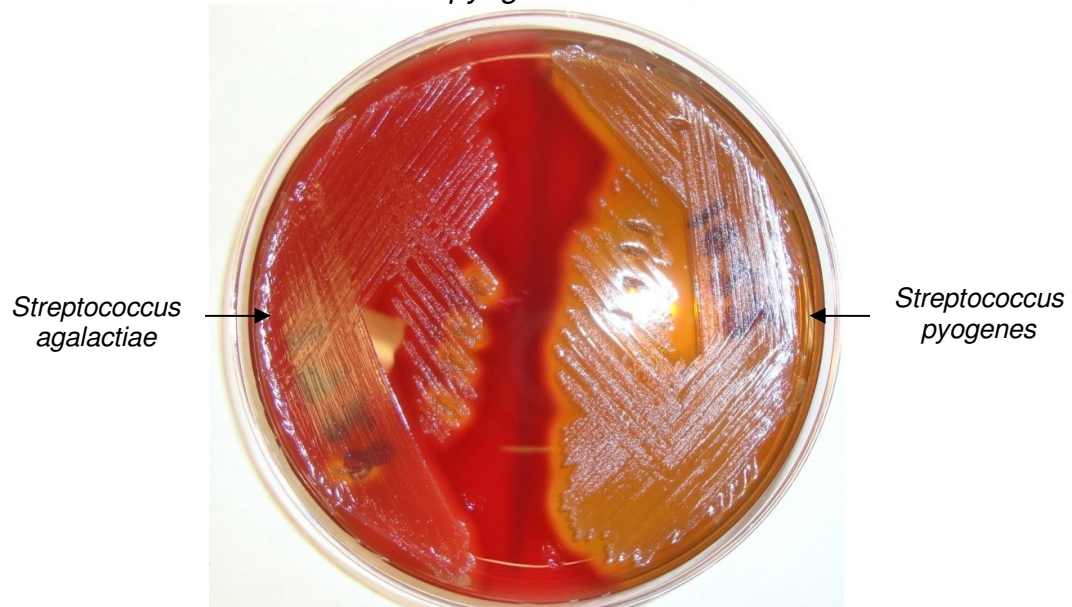


2. Obtención de los cultivos de las cepas analizadas

Todas las cepas se mantenían conservadas en un vial con 2 mL de caldo BHI con Glicerol al 15%, en un ultracongelador (Marca Revco) a -70 °C.

Cada cepa se descongeló colocándola en un recipiente con hielo. Posteriormente, se sembró una asada en 2 mL de caldo Todd Hewitt y se incubó de 18 a 24 horas, a 37 °C y a 100 rpm en la incubadora de agitación UNIMAX 1010 (Heidolph). Después, el caldo bacteriano se sembró en placas de gelosa sangre de carnero al 5% por estría de agotamiento y se incubó de 18 a 24 horas a 37 °C en la incubadora Isotemp 750D (Fisher Scientific) y en un ambiente con CO₂ (velobiosis). Transcurrido el tiempo de incubación, se observó la pureza de cada cepa, así como el tipo de hemólisis, α , β o no hemolítica para proseguir con las pruebas de reidentificación (Figura No. 10).

Figura No.10. Observación de la β -hemólisis. A la izquierda una cepa de *Streptococcus agalactiae* y a la derecha una cepa de *Streptococcus pyogenes*.

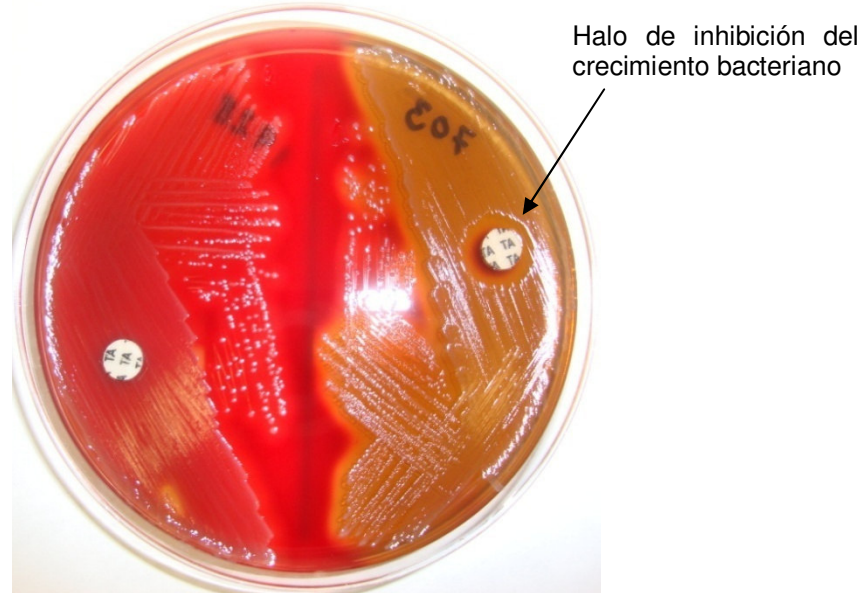


3. Pruebas de reidentificación

3.1. Prueba de Bacitracina

Confirmada la pureza de las cepas, se realizó la prueba de bacitracina con cultivos puros de 24 horas. Se sembró en placas de gelosa sangre cada una de ellas por estría de agotamiento y se colocó un disco de 0.04 U de bacitracina TIPIBACT A[®] (BIO-RAD[®]). Posteriormente, se incubó de 18 a 24 horas a 37 °C en un ambiente con CO₂. La prueba se consideró positiva en los casos en que se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano de cualquier diámetro alrededor del disco de bacitracina (Figura No. 11).

Figura No. 11. Prueba de bacitracina. A la izquierda se muestra una cepa de *Streptococcus agalactiae* (bacitracina negativo) y a la derecha se muestra una cepa de *Streptococcus pyogenes* (bacitracina positivo).

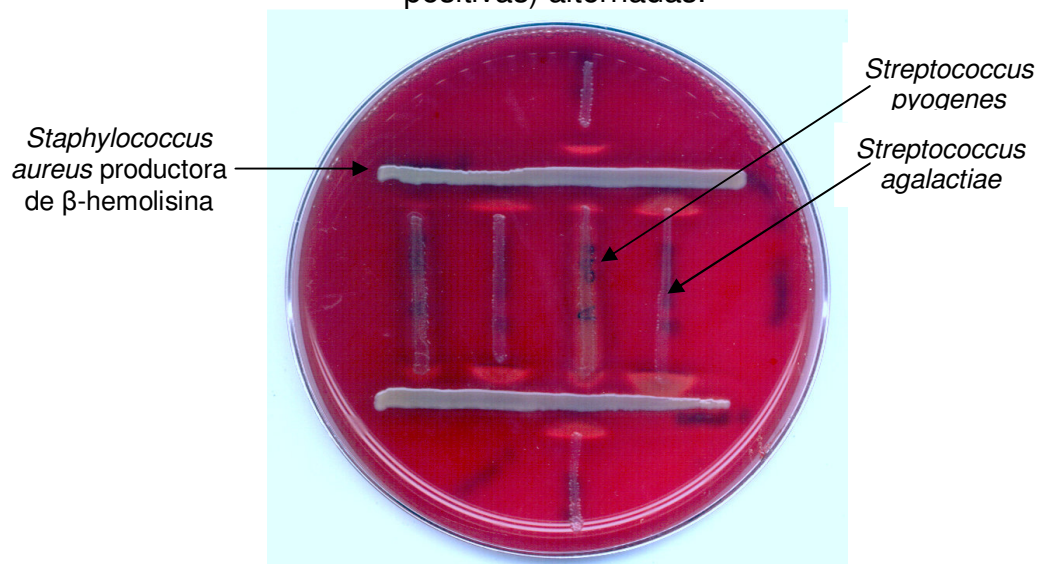


3.2. Prueba de CAMP

Junto con la prueba de Bacitracina, se realizó la prueba de CAMP en placas de gelosa sangre, sembrando por estría recta una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de β -hemolisina, y de manera perpendicular a esta, previa esterilización del asa y a una distancia aproximadamente de 7 mm, se sembró la cepa control positivo de *Streptococcus agalactiae* (productora del factor de CAMP) así como cada una de las 293 cepas de estreptococos (máximo 5 cepas por placa). Posteriormente, se incubó de 18 a 24 horas a 37 °C y transcurrido el tiempo de incubación se leyó la prueba. La prueba se consideró positiva, en los casos en que se observó una zona de mayor

hemólisis en forma de punta de flecha, apuntando a la estría de *Staphylococcus aureus*, en el lugar donde confluyeron ésta y la cepa problema (Figura No. 12).

Figura No. 12. Prueba de CAMP. Se muestran dos cepas de *Streptococcus pyogenes* (CAMP negativas) y dos cepas de *Streptococcus agalactiae* (CAMP positivas) alternadas.



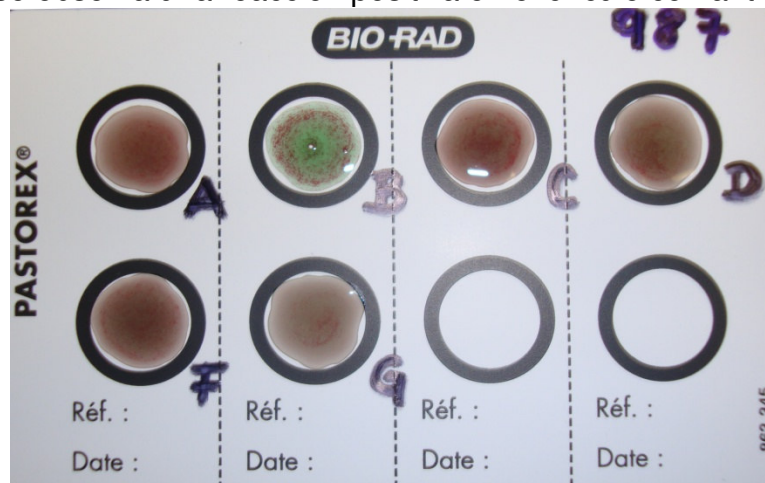
3.3. Prueba serológica para determinar el grupo de Lancefield

Para esta prueba se utilizó un kit de aglutinación rápida PASTOREX[®] STREP (BIO-RAD[®]).

Se colocaron 150 μ L de la solución de enzima de extracción en un tubo eppendorf de 200 μ L y se suspendieron de 5 a 10 colonias de cada cepa. Se

incubó 30 minutos a temperatura ambiente o 15 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, la suspensión se homogeneizó de manera manual. Se depositó una gota de cada antisuero de los grupos A, B, C, D, F y G en una tarjeta de aglutinación. Posteriormente, con ayuda de una micropipeta, se añadió una gota de la suspensión de extracción de igual tamaño que la gota de látex (aproximadamente 5 µL) en cada círculo de la tarjeta, cuidando de no tocar la gota de látex. Con ayuda de aplicadores de plástico, se homogeneizó el contenido de cada círculo (un aplicador por círculo) y, con movimiento orbital, se agitó la tarjeta de aglutinación por un minuto. Una reacción positiva se consideró por la aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde (Figura No. 13).

Figura No. 13. Prueba serológica realizada a una cepa de *Streptococcus agalactiae*, se observa una reacción positiva en el círculo con antisuero Anti B.



4. Determinación de la susceptibilidad a penicilina G por el método de difusión en placa (Kirby – Bauer)

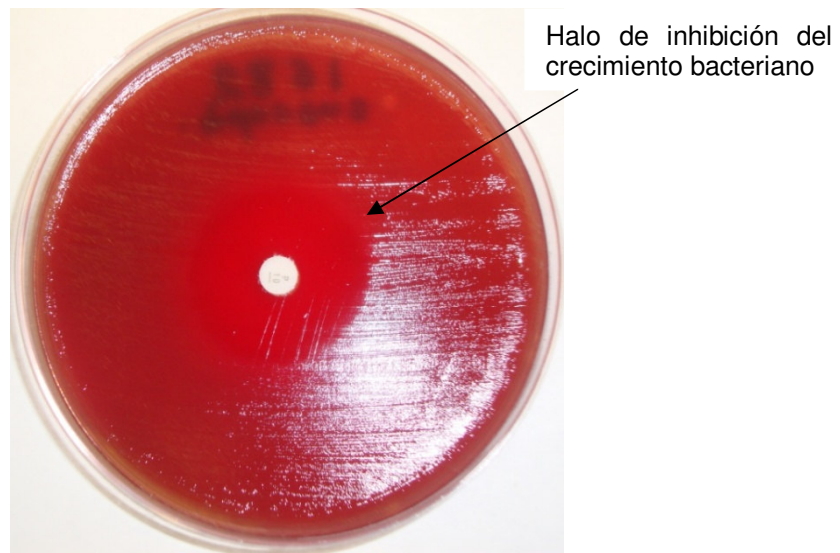
Una vez reidentificadas las cepas, se determinó su susceptibilidad a penicilina G por el método de difusión en placa, bajo las condiciones que recomienda el CLSI⁽¹⁹⁾.

Se suspendieron colonias de los cultivos puros de 24 horas en solución salina 0.9% estéril contenida en tubos de 13 X 100 mm, para ajustar una suspensión a 0.5 de la escala de McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL), utilizando para ello un nefelómetro DENSIMAT (bioMérieux) y un vórtex GENIE-2 (Scientific Industries). Posteriormente, se sumergió un hisopo de rayón estéril en cada una de las suspensiones realizadas; una vez impregnado y eliminado el exceso de líquido en las paredes del tubo, se sembró en placas de agar Mueller Hinton al 5% de sangre de carnero, de manera completa y uniforme en tres direcciones. Se colocó un disco de 10 U de penicilina G (OXOID) con ayuda de una pinza previamente esterilizada. Se incubó de 18 a 24 horas a 37° C. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de penicilina G con ayuda de un vernier. La interpretación se realizó de acuerdo al criterio del CLSI (Tabla No. 8, Figura No. 14).

Tabla No. 8. Criterio de susceptibilidad a penicilina G 10 U para *Streptococcus* β -hemolíticos de acuerdo al CLSI.

	Susceptible
Diámetro de inhibición (mm)	≥ 24

Figura No. 14. Prueba de susceptibilidad a penicilina G (Método de Kirby – Bauer) realizada a una cepa de *Streptococcus agalactiae*.



5. Determinación de la susceptibilidad a penicilina G por el Método de E-test.

El procedimiento seguido fue el mismo que el utilizado en el Método de Kirby - Bauer. En este caso, en vez de colocar un disco de 10 U de penicilina G, se colocó una tira E-test calibrada con una escala de concentración de 0.002 a

32 µg/mL de penicilina G (bioMérieux, Catálogo No. 2014-10-08) (Figura No. 15). La interpretación de la prueba se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante y al criterio establecido por el CLSI (Tabla No. 9, Figura No. 16).

Figura No. 15. Escala de concentración de las tiras E-test de penicilina G calibradas 0.002 – 32 µg/mL (bioMérieux).

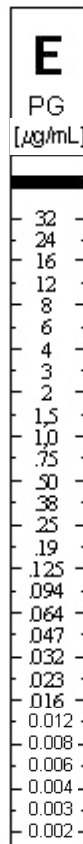
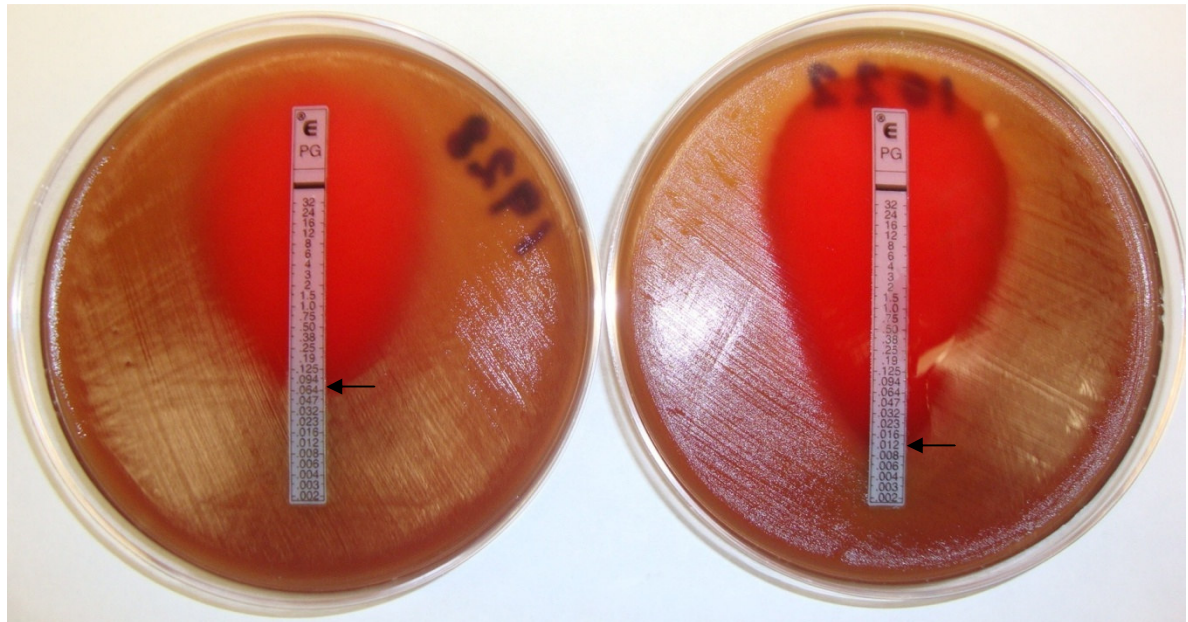


Tabla No. 9. Criterio de susceptibilidad a penicilina G, según el valor de CMI, para *Streptococcus* β-hemolíticos de acuerdo al CLSI.

	Susceptible
Concentración [µg/mL]	≤ 0.12

Figura No. 16. Determinación de la CMI de penicilina G. A la izquierda una cepa de *Streptococcus agalactiae* (CMI 0.094 μ g/mL), a la derecha una cepa de *Streptococcus pyogenes* (CMI 0.012 μ g/mL). Las flechas indican la lectura de la CMI.

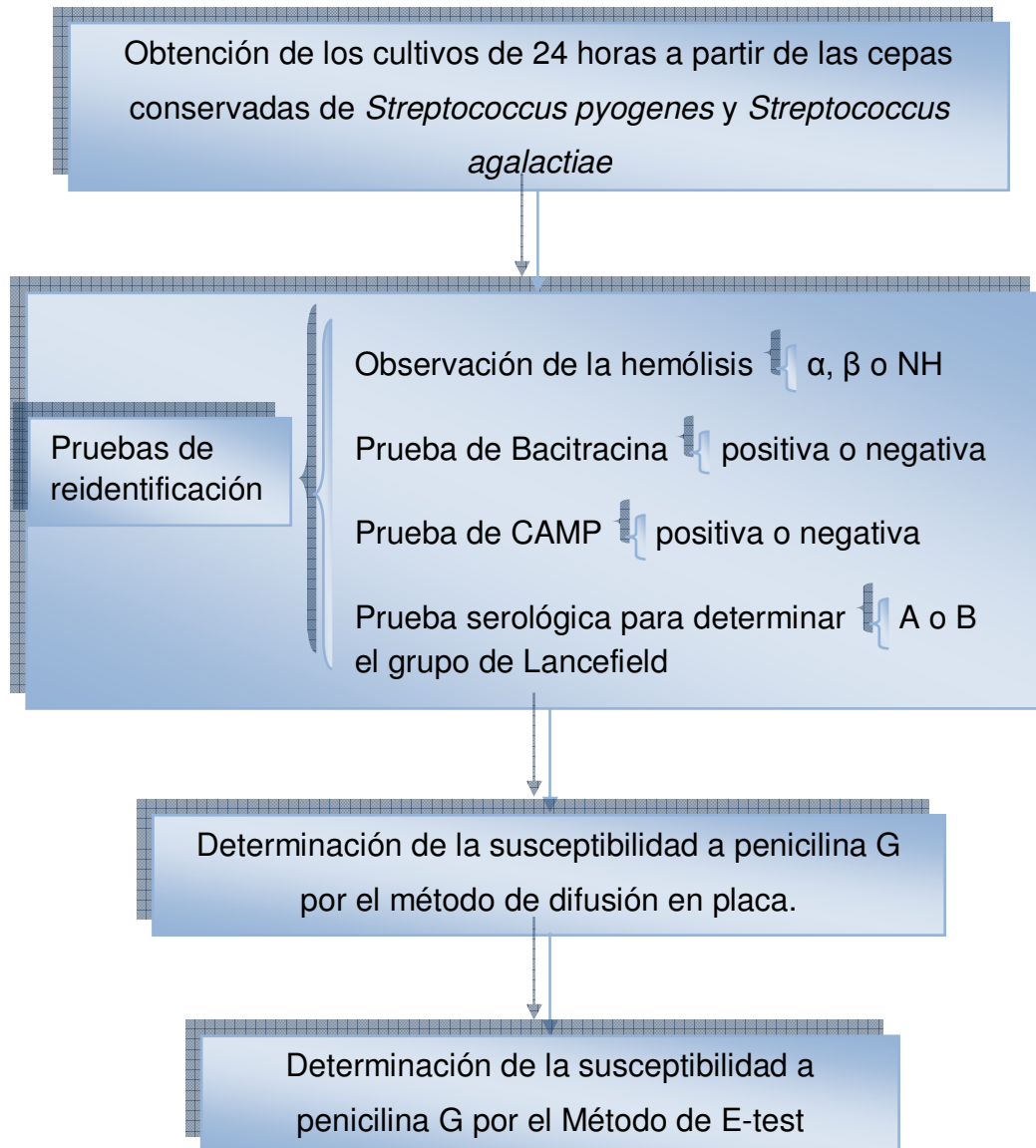


Streptococcus agalactiae

Streptococcus pyogenes

Los pasos seguidos en la metodología se resumen en la Figura No. 17.

Figura No. 17. Diagrama de flujo de la metodología.



RESULTADOS

1. Observación de la hemólisis

Todas las cepas analizadas de *Streptococcus pyogenes* fueron β -hemolíticas, mientras que el 90.2% de las cepas de *Streptococcus agalactiae* presentaron esta característica, observándose también algunas cepas α -hemolíticas y no hemolíticas (NH) (Tabla No. 10).

Tabla No. 10. Resultados de la observación de la hemólisis de las cepas de *Streptococcus agalactiae*. No. cepas (% de cepas).

Tipo de hemólisis	Total
α	5 (7%)*
β	64 (90.2%)
NH	2 (2.8%)**
	71 (100%)

*3 cepas pertenecen al tipo capsular **la**, 1 cepa al tipo **lb** y 1 cepa es **NT** (no tipificable)

Pertenecen al tipo capsular **V y **NT**.

2. Pruebas de Bacitracina y CAMP

De las 222 cepas de *Streptococcus pyogenes*, 218 dieron positiva la prueba de sensibilidad a bacitracina y 4 (1.8%) fueron bacitracina negativa. Todas ellas dieron positiva la prueba de CAMP (Tabla No. 11).

Tabla No. 11. Resultados de las pruebas de Bacitracina y CAMP de las cepas de *Streptococcus pyogenes*. No. de cepas (% de cepas).

Prueba	Positivas	Negativas	Total
Bacitracina	218 (98.2%)	4 (1.8%)*	222 (100%)
CAMP	-	222 (100%)	222 (100%)

*Corresponden a tipos M1, M2, M3 y M12

De las 71 cepas de *Streptococcus agalactiae*, 66 dieron negativa la prueba de Bacitracina y 5 (7%) fueron bacitracina positiva; 65 cepas dieron la prueba de CAMP positiva y 6 (8.4%) la dieron negativa (Tabla No. 12).

Tabla No. 12. Resultados de las pruebas de Bacitracina y CAMP de las cepas de *Streptococcus agalactiae*.

Prueba	Positivas	Negativas	Total
Bacitracina	5 (7%)*	66 (93%)	71 (100%)
CAMP	65 (91.6%)	6 (8.4%)**	71 (100%)

*Una cepa pertenece al tipo capsular **Ia**, 2 al **Ib**, 1 al tipo capsular **II** y 1 al **V**.

Dos cepas pertenecen al tipo capsular **Ia, 2 al **Ib**, 1 al **V** y 1 es **NT**.

3. Prevalencia de los aislamientos de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* por sexo de los pacientes

La prevalencia de los aislamientos de *Streptococcus pyogenes* fue similar en pacientes de ambos sexos. Los aislamientos de *Streptococcus agalactiae*

fueron más prevalentes en pacientes del sexo femenino, encontrándose el doble de aislamientos en este, con un 66.2% (Tabla No. 13).

Tabla No. 13. Prevalencia de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*, distribuidas por sexo de los pacientes. No. de cepas (% de cepas).

	Femenino	Masculino	Total
<i>Streptococcus pyogenes</i>	109 (49.1%)	113 (50.9%)	222 (100%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	47 (66.2%)	24 (33.8%)	71 (100%)

4. Prevalencia de los tipos M de *Streptococcus pyogenes* y los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae*

Las cepas de *Streptococcus pyogenes* fueron ordenadas de acuerdo a la prevalencia de los tipos M (Tabla No. 14, Gráfica No. 2). Los tipos M12, M1, M6 y M75 comprendieron más del 60% de todos los aislamientos. Esta misma prevalencia se observó en las cepas aisladas de pacientes del sexo femenino, mientras que en las cepas aisladas de pacientes del sexo masculino, disminuyó a 54.9% (estos valores se calcularon considerando como 100%, las 109 cepas de pacientes femeninos o las 113 de masculinos). El tipo M12 fue el más común con el 28.4%.

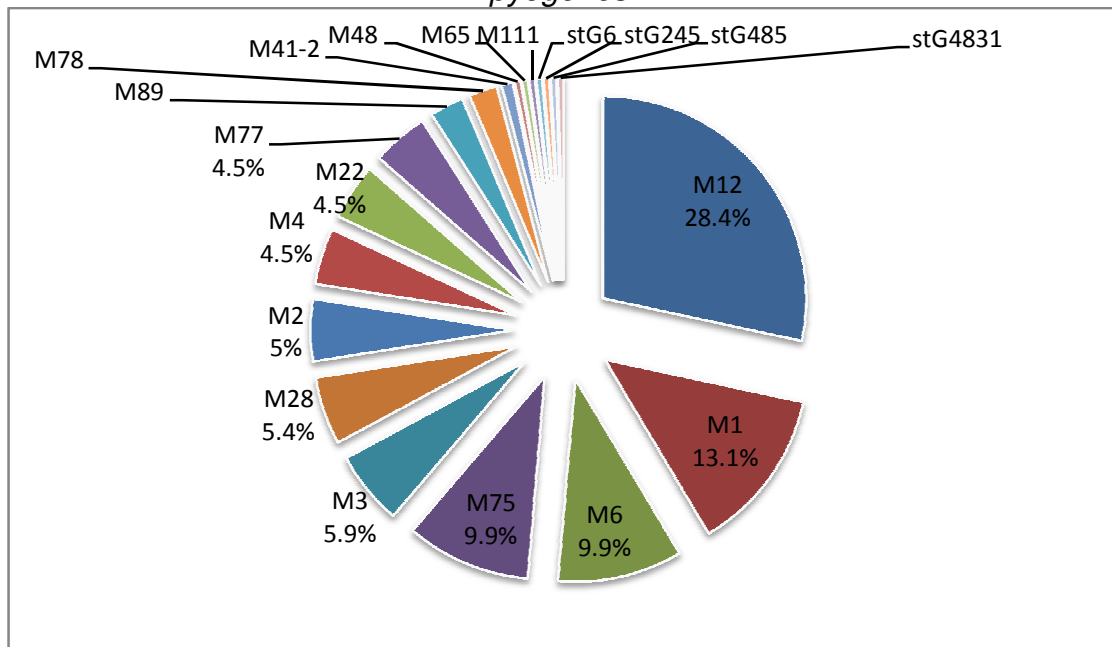
Las cepas de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1 fueron más prevalentes en pacientes femeninos, casi el doble comparado con la prevalencia en pacientes masculinos; mientras que las cepas de los tipos M22 y M89, lo fueron en pacientes masculinos (Tabla No. 14).

Tabla No. 14. Prevalencia de los tipos M de las cepas de *Streptococcus pyogenes*, distribuidas por sexo de los pacientes.

Tipo M	Femenino	Masculino	Total	%
M12	33	30	63	28.4
M1	19	10	29	13.1
M6	10	12	22	9.9
M75	12	10	22	9.9
M3	6	7	13	5.9
M28	5	7	12	5.4
M2	4	7	11	5.0
M4	5	5	10	4.5
M22	2	8	10	4.5
M77	6	4	10	4.5
M89	1	5	6	2.7
M78	2	3	5	2.3
M41-2	-	2	2	0.9
M48	-	1	1	0.5
M65	1	-	1	0.5
M111	-	1	1	0.5
stG6	1	-	1	0.5
stG245	-	1	1	0.5
stG485	1	-	1	0.5
stG4831	1	-	1	0.5
Total	109	113	222	100

61.3%

Gráfica No. 2. Prevalencia de los tipos M de las cepas de *Streptococcus pyogenes*.



Las cepas de *Streptococcus agalactiae* se ordenaron de acuerdo a la prevalencia de los tipos capsulares (Tabla No. 15, Gráfica No. 3). Los tipos capsulares **la** y **V** comprendieron más del 70% de todos los aislamientos, se observó la misma prevalencia en las cepas de pacientes del sexo masculino y disminuyó a 68% en las cepas de pacientes del sexo femenino. El tipo capsular más prevalente fue el **la**, con más del 50% de las cepas siendo de ese tipo capsular.

Tomando en cuenta que casi el doble de los aislamientos de *Streptococcus agalactiae* provinieron del sexo femenino, la prevalencia de los tipos

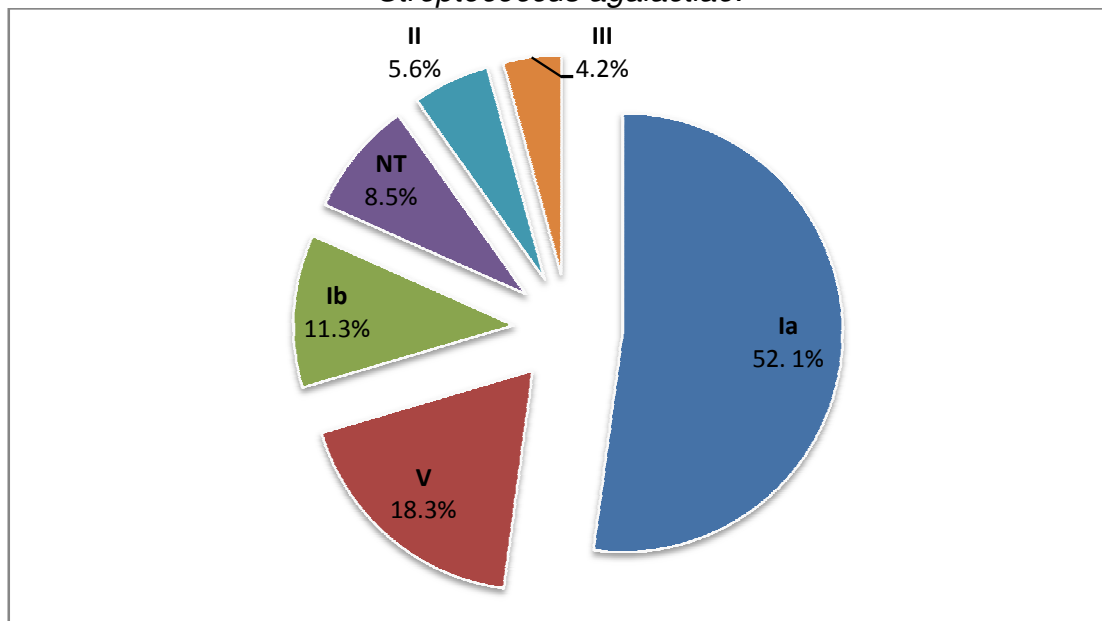
capsulares fue proporcional entre los pacientes del sexo masculino y femenino (Tabla No. 15).

Tabla No. 15. Prevalencia de los tipos capsulares de las cepas de *Streptococcus agalactiae*, distribuidas por sexo de los pacientes

Tipo capsular	Femenino	Masculino	Total	%
la	24	13	37	52.1
V	8	5	13	18.3
lb	6	2	8	11.3
NT*	4	2	6	8.5
II	3	1	4	5.6
III	2	1	3	4.2
Total	47	24	71	100

*NT – No tipificable

Gráfica No. 3. Prevalencia de los tipos capsulares de las cepas de *Streptococcus agalactiae*.



5. Susceptibilidad a penicilina G por el Método de Kirby-Bauer y el Método de E-test

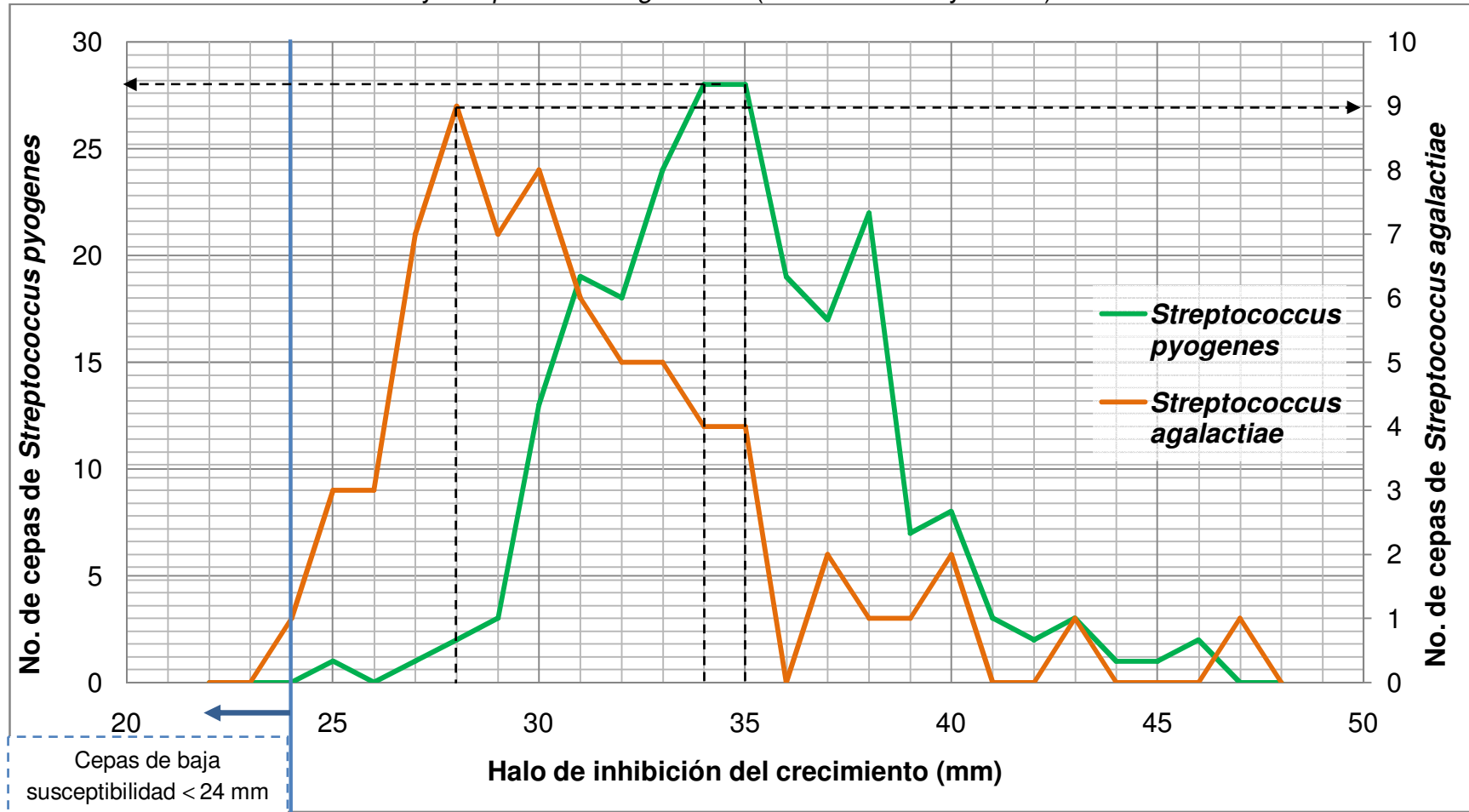
5.1. Susceptibilidad a penicilina G (Método de Kirby – Bauer)

Los resultados de la susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*, obtenidos por el Método de Kirby-Bauer (Tabla No. 16), se graficaron para poder hacer un comparativo de los valores entre ambos grupos; se observó así una distribución gaussiana en los dos casos (Gráfica No. 4).

Tabla No. 16. Resultados de la susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Método de Kirby-Bauer).

Halo de inhibición de crecimiento (mm)	<i>Streptococcus pyogenes</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i>	
	No. de cepas	%	No. de cepas	%
24	-	-	1	1.4
25	1	0.5	5	5.6
26	-	-	3	4.2
27	1	0.5	7	9.9
28	2	0.9	9	12.7
29	3	1.4	7	9.9
30	13	5.9	8	11.3
31	19	8.6	6	8.5
32	18	8.1	5	7.0
33	24	10.8	5	7.0
34	28	12.6	4	5.6
35	28	12.6	4	5.6
36	19	8.6	-	-
37	17	7.7	2	2.8
38	22	9.9	1	1.4
39	7	3.2	1	1.4
40	8	3.6	2	2.8
41	3	1.4	-	-
42	2	0.9	-	-
43	3	1.4	1	1.4
44	1	0.5	-	-
45	1	0.5	-	-
46	2	0.9	-	-
47	-	-	1	1.4
Total	222	100	71	100

Gráfica No. 4. Comparación de la susceptibilidad a penicilina G de los aislamientos faríngeos de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Método de Kirby-Bauer).



Los dos grupos de bacterias presentaron un intervalo de halos de inhibición así como un valor máximo de la curva, como se aprecia en la gráfica No. 4 (Tabla No. 17).

Tabla No. 17. Intervalo de halos de inhibición y máximo de la curva de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

	Intervalo (mm)	Máximo de la curva (mm)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	25 – 46	34 – 35
<i>Streptococcus agalactiae</i>	24 – 47	27 - 30

Para *Streptococcus agalactiae*, se tomó como máximo de la curva, un intervalo de 27 a 30 mm y no 28 mm de halo de inhibición (como se observa en la gráfica), debido a la similitud en el número de cepas con esos valores.

Los intervalos de halos de inhibición de ambos grupos de bacterias fueron muy parecidos, no así los máximos, donde observamos que las cepas de *Streptococcus pyogenes* dan halos de inhibición más grandes que las cepas de *Streptococcus agalactiae*.

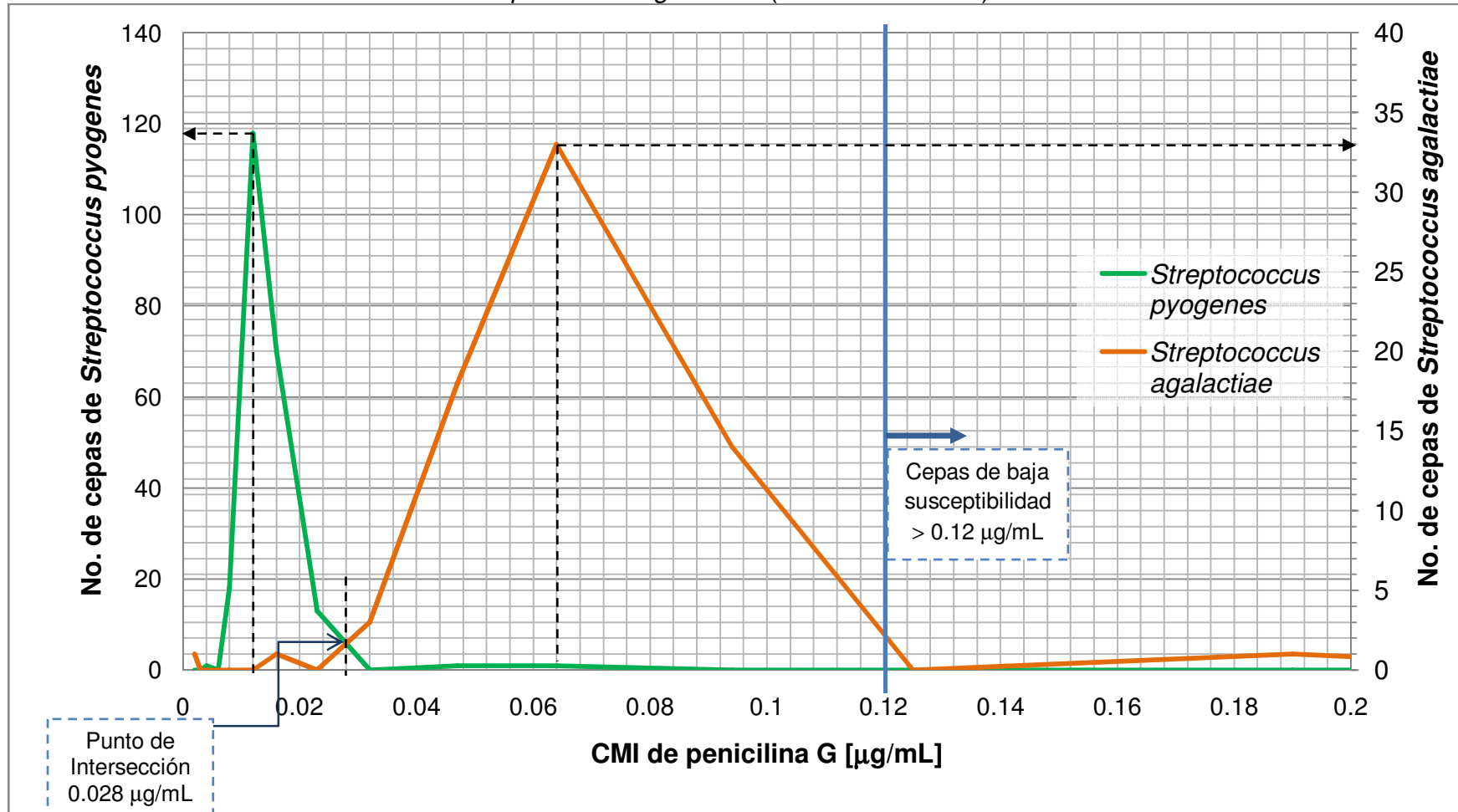
5.2. Susceptibilidad a penicilina G (Método de E-test)

Los resultados de la CMI de penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Tabla No. 18), se graficaron para poder comparar la susceptibilidad de ambos grupos de bacterias a este antibiótico (Gráfica No.5).

Tabla No. 18. Distribución de los resultados de la CMI de penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Método de E-test).

CMI [µg/mL]	<i>Streptococcus pyogenes</i> (n = 222)			<i>Streptococcus agalactiae</i> (n = 71)		
	No. de cepas	%	% acumulado	No. de cepas	%	% acumulado
<0.002	-	-	-	1	1.41	1.41
0.003	-	-	-	-	-	1.41
0.004	1	0.45	0.45	-	-	1.41
0.006	-	-	0.45	-	-	1.41
0.008	18	8.11	8.56	-	-	1.41
0.012	118	53.15	61.71	-	-	1.41
0.016	70	31.53	93.24	1	1.41	2.82
0.023	13	5.86	99.1	-	-	2.82
0.032	-	-	99.1	3	4.23	7.05
0.047	1	0.45	99.55	18	25.35	32.4
0.064	1	0.45	100	33	46.48	78.88
0.094	-	-	-	14	19.72	98.6
0.125	-	-	-	-	-	98.6
0.19	-	-	-	1	1.41	100

Gráfica No. 5. Comparación de la CMI de penicilina G de los aislamientos faríngeos de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Método de E-test).



Por este método, se observó también una distribución gaussiana de los resultados.

Apoyándose en el % acumulado mostrado en la tabla No. 18, se calculó la CMI₅₀ y CMI₉₀ de penicilina G. También se obtuvo el intervalo de CMI para ambos grupos de bacterias (Tabla No. 19).

Tabla No. 19. CMI₅₀, CMI₉₀ e intervalo de CMI de penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Intervalo [µg/mL]	0.004 – 0.064	<0.002 – 0.19
CMI₅₀ [µg/mL]*	0.012	0.064
CMI₉₀ [µg/mL]**	0.016	0.094

*CMI para el 50% de las cepas bacterianas

**CMI para el 90% de las cepas bacterianas

Los valores de la CMI₅₀ y CMI₉₀ de *Streptococcus pyogenes*, son menores que los de *Streptococcus agalactiae*. El intervalo de CMI de *Streptococcus pyogenes* es más estrecho que el de *Streptococcus agalactiae* (Tabla No. 19).

El punto de intersección de las gráficas de la CMI de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Gráfica No. 5), fue en 0.028 µg/mL. Se contó el número de cepas con menos o más de ese valor de

CMI (Tabla No. 20), encontrándose que más del 99% de las cepas de *Streptococcus pyogenes* presentaron una CMI menor al valor de la intersección, mientras que más del 97% de las cepas de *Streptococcus agalactiae* presentaron una CMI mayor a 0.028 µg/mL.

Tabla No. 20. Distribución de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* de acuerdo al punto de intersección de las gráficas de CMI (0.028µg/mL).

CMI	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<0.028 µg/mL	220 cepas (99.1%)	2 (2.8%)**
>0.028 µg/mL	2 (0.9%)*	69 (97.2%)

*Corresponden al tipo M12 y M75.

Ambas cepas corresponden al tipo capsular **lb.

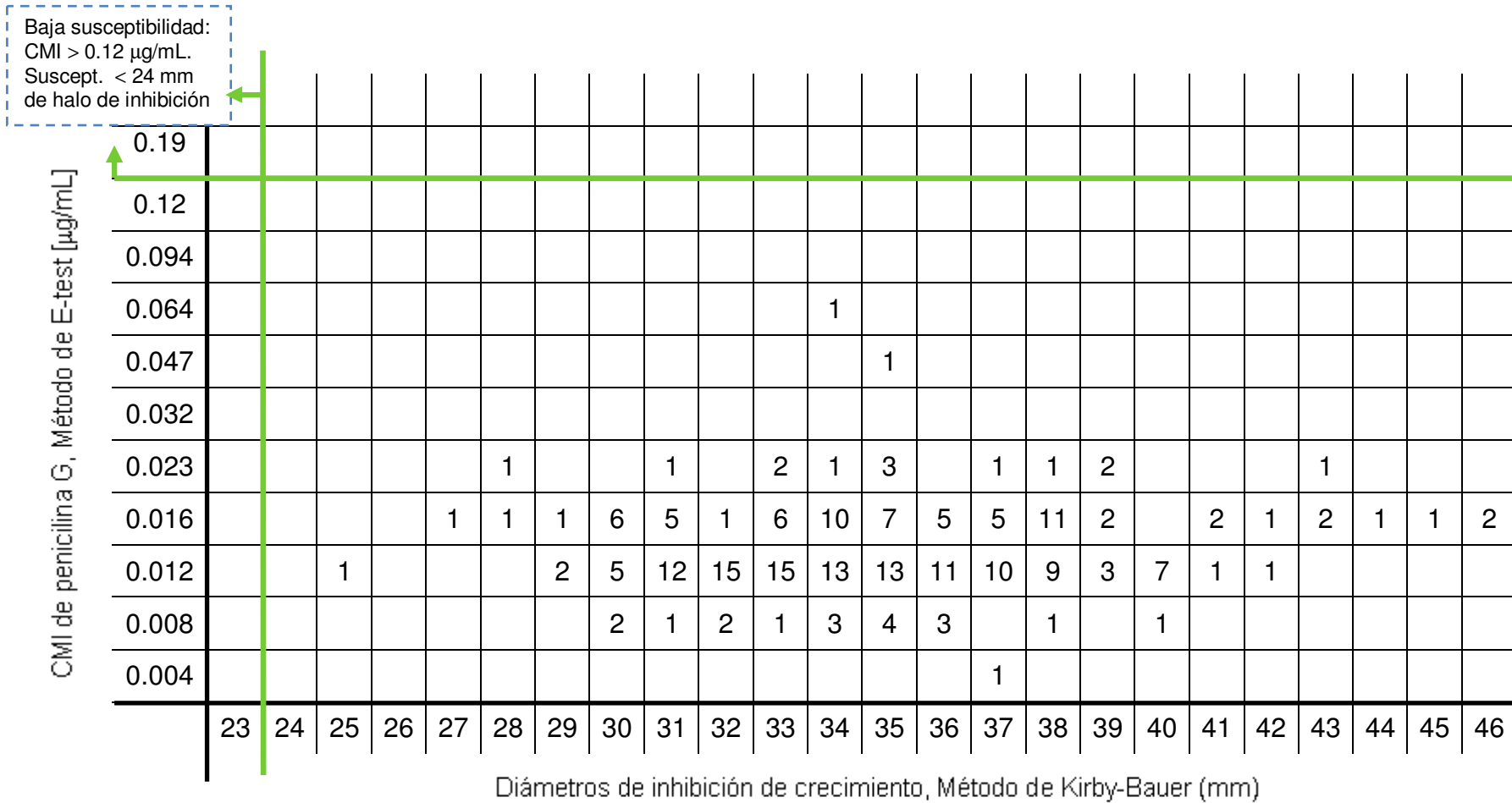
Más del 50% de las cepas de *Streptococcus pyogenes* presentaron una CMI de 0.012 µg/mL, mientras que cerca del 50% de las cepas de *Streptococcus agalactiae* presentaron 0.064 µg/mL de CMI. Por este método se encontró una cepa de *Streptococcus agalactiae* de baja susceptibilidad a penicilina G, cuya CMI fue de 0.19 µg/mL (Tabla No. 18, Gráfica No. 5).

5.3. Comparación de los resultados de la susceptibilidad a penicilina G obtenidos por el Método de Kirby-Bauer con los obtenidos por el Método de E-test

Basándose en los resultados mostrados en las Tablas No. 16 y No. 18, se realizaron las gráficas No. 6 y No. 7, que muestran la dispersión de los resultados obtenidos por los dos métodos utilizados en este estudio, de las cepas de *Streptococcus pyogenes* (Gráfica No. 6) y *Streptococcus agalactiae* (Gráfica No. 7).

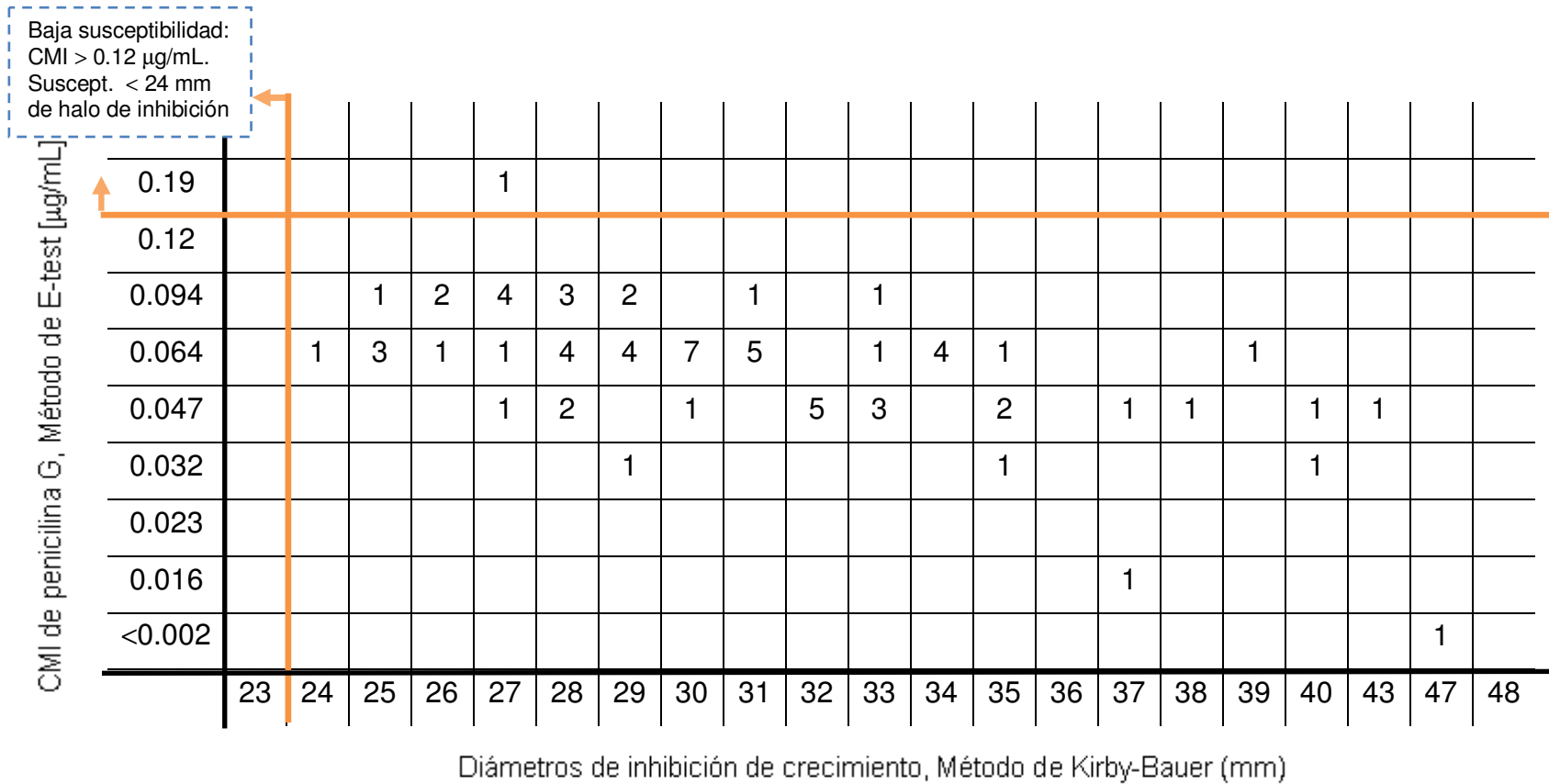
RESULTADOS

Gráfica No. 6. Diagrama de dispersión de las CMI y de los diámetros de inhibición de crecimiento de las cepas de *Streptococcus pyogenes*. Se muestra el número de cepas en cada intersección.



RESULTADOS

Gráfica No. 7. Diagrama de dispersión de las CMI y de los diámetros de inhibición de crecimiento de las cepas de *Streptococcus agalactiae*. Se muestra el número de cepas en cada intersección.



5.4. Susceptibilidad a penicilina G (Métodos de Kirby – Bauer y E-test) de las cepas de *Streptococcus pyogenes* asociados al tipo M

Los resultados de la susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* obtenidos por el Método de Kirby – Bauer, se ordenaron por tipos M con la finalidad de ver alguna tendencia entre ellos (Tabla No. 21). Tomando en cuenta que en la gráfica No. 4 se observó un máximo de la curva en 34 y 35 mm de halo de inhibición, se contó el número de cepas de cada tipo M que cayeron antes y después de esos valores, los cuales se ordenaron por sexo de los pacientes (Tabla No. 22).

RESULTADOS

Tabla No. 21. Resultados de la susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* (Método de Kirby – Bauer) ordenados por tipos M. **No. de cepas** (% de cepas).

Tipo M	Susceptibilidad a penicilina G (mm de halo de inhibición)																				Total (100)		
	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45		46	
M12					4 (6.3)	9(14.3)	8(12.7)	7(11.1)	10(15.9)	6(9.5)	1(1.6)	4(6.3)	6(9.5)	1(1.6)	3(4.8)	2(3.2)	1(1.6)	1(1.6)				63	
M1			1(3.4)		3(10.3)	2(6.9)	1 (3.4)	5(17.2)	3(10.3)	5(17.2)	4(13.8)	3(10.3)	2(6.9)									29	
M6							2(9.1)	3(13.6)	1(4.5)	3(13.6)	3(13.6)	2(9.1)	4(18.2)	1(4.5)	3(13.6)							22	
M75						3(13.6)	1(4.5)		4(18.2)	3(13.6)	1(4.5)	1(4.5)	2(9.1)	2(9.1)	2(9.1)		1(4.5)	1(4.5)	1(4.5)			22	
M3						1(7.7)	2(15.4)	1(7.7)	3(23.1)		4(30.8)	1(7.7)	1(7.7)									13	
M28	1(8.3)			1(8.3)			1(8.3)	1(8.3)		2(16.7)	1(8.3)	1(8.3)	2(16.7)	1(8.3)								1(8.3)	12
M2					1(9.1)		1(9.1)	1(9.1)	1(9.1)		1(9.1)	2(18.2)	3(27.3)	1(9.1)									11
M4				1(10)	2(20)	1(10)	1(10)	1(10)	3(30)													1(10)	10
M22		1(10)			1(10)	2(20)			1(10)	3(30)	2(20)												10
M77								3(30)		3(30)	1(10)	1(10)		1(10)							1(10)		10
M89			1(16.7)	1(16.7)	1(16.7)	1(16.7)		1(16.7)													1(16.7)		6
M78									2(40)	1(20)		1(20)	1(20)										5
M41-2										2(100)													2
M48											1(100)												1
M65							1(100)																1
M111													1(100)										1
stg6											1(100)												1
stg245								1(100)															1
stg485																1(100)							1
stg4831					1(100)																		1
Total	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (0.9)	3 (1.4)	13 (5.9)	19 (8.6)	18 (8.1)	24 (10.8)	28 (12.6)	28 (12.6)	19 (8.6)	17 (7.7)	22 (9.9)	7 (3.2)	8 (3.6)	3 (1.4)	2 (0.9)	3 (1.4)	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (0.9)	222 (100)	

Tabla No. 22. Resultados de la susceptibilidad a penicilina G de *Streptococcus pyogenes* (Método de Kirby – Bauer) agrupados en No. de cepas con menos o más de 34 a 35 mm de halo de inhibición (% cepas).

Tipo M	No. de cepas						
	< 34-35 mm (menos susceptible)			34 - 35 mm	> 34-35 mm (más susceptible)		
	F ♀	M ♂	Total		F	M	Total
M12	12	16	28 (44.5%)		11	8	19 (30.1%)
M1	8	4	12 (41.4)		7	2	9 (31)
M6	3	2	5 (22.7)		6	7	13 (59.1)
M75	2	2	4 (18.2)		5	6	11 (50)
M3	4	0	4 (30.8)		1	5	6 (46.1)
M28	4	0	4 (33.3)		1	5	6 (50)
M2	2	1	3 (27.3)		3	4	7 (63.6)
M4	2	4	6 (60)		0	1	1 (10)
M22	0	4	4 (40)		1	1	2 (40)
M77	1	2	3 (30)		2	2	4 (40)
M89	1	4	5 (83.3)		0	1	1 (16.7)
M78			-		1	1	2 (40)
M41-2			-				-
M48			-			1	1
M65	1		1				-
M111			-			1	1
stg6			-		1		1
stg245		1	1				-
stg485			-		1		1
stg4831	1		1				-
Total	41	40	81 (36.5)		40	45	85 (38.3)

Para determinar los tipos M que tendieron a ser menos o más susceptibles a penicilina G, se tomó en cuenta el número de cepas con menos o más de 34 a 35 mm de halo de inhibición, que fue el máximo observado en la gráfica No. 4, descartándose los tipos M con un número de cepas $\leq 40\%$ del total asociado

al tipo M (Tabla No. 22); después, se tomó en cuenta el intervalo de los valores (Tabla No. 21), descartándose en este caso los tipos M3 y M28, por su intervalo tan pequeño y tan grande respectivamente. De esta manera, se encontró que los tipos M1, M4, M12 y M89 de *Streptococcus pyogenes*, presentaron la tendencia a ser menos susceptibles a la penicilina G que los otros tipos M; mientras que los tipos M2, M6 y M75 tendieron a ser más susceptibles (Tabla No. 26).

La susceptibilidad a penicilina G de las cepas aisladas en ambos sexos no mostró ninguna tendencia (Tabla No. 22).

Los resultados de la CMI de penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes*, se ordenaron de la misma forma que los resultados de susceptibilidad obtenidos por el Método de Kirby – Bauer (Tabla No. 23). En este caso se tomó como punto de referencia 0.012 µg/mL, que fue el valor más observado entre las cepas, para contar el número de cepas con más o menos CMI que este valor (Tabla No. 24). Además, se obtuvo el intervalo así como la CMI₅₀ y CMI₉₀ por tipo M (Tabla No. 25), todo ello para tratar de observar alguna tendencia de susceptibilidad a penicilina G entre los tipos M de *Streptococcus pyogenes*.

Tabla No. 23. Resultados de la CMI de penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* ordenados por tipos M. **No. de cepas** (% de cepas).

Tipo M	CMI [$\mu\text{g/mL}$]							Total (100%)
	0.004	0.008	0.012	0.016	0.023	0.047	0.064	
M12		4 (6.3)	33 (52.4)	20 (31.7)	5 (7.9)		1 (1.6)	63
M1		2 (6.9)	18 (62.1)	7 (24.1)	2 (6.9)			29
M6		3 (13.6)	14 (63.6)	5 (22.7)				22
M75		2 (9.1)	14 (63.6)	5 (22.7)		1 (4.5)		22
M3		6 (46.2)	5 (38.5)	1 (7.7)	1 (7.7)			13
M28			9 (75)	3 (25)				12
M2	1 (9.1)		5 (45.5)	5 (45.5)				11
M4			4 (40)	6 (60)				10
M22		1 (10)	3 (30)	5 (50)	1 (10)			10
M77			3 (30)	5 (50)	2 (20)			10
M89			2 (33.3)	3 (50)	1 (16.7)			6
M78			2 (40)	2 (40)	1 (20)			5
M41-2			2 (100)					2
M48			1 (100)					1
M65			1 (100)					1
M111				1 (100)				1
stg6				1 (100)				1
stg245			1 (100)					1
stg485				1 (100)				1
stg4831			1 (100)					1
Total	1 (0.5)	18 (8.1)	118 (53.2)	70 (31.5)	13 (5.9)	1 (0.5)	1 (0.5)	222 (100)

Tabla No. 24. Resultados de la CMI de penicilina G de *Streptococcus pyogenes*, agrupados en No. de cepas con menos o más de 0.012 µg/mL de CMI (% cepas).

Tipo M	No. de cepas						
	< 0.012 µg/mL (más susceptible)			0.012 µg/mL	> 0.012 µg/mL (menos susceptible)		
	F♀	M♂	Total		F	M	Total
M12	2	2	4 (6.3%)		13	13	26 (41.3%)
M1	2	0	2 (6.9)		6	3	9 (31)
M6	1	2	3 (13.6)		3	2	5 (22.7)
M75	2	0	2 (9.1)		3	3	6 (27.3)
M3	4	2	6 (46.1)		2	0	2 (15.4)
M28			-		1	2	3 (25)
M2	1		1 (9.1)		1	4	5 (45.5)
M4			-		2	4	6 (60)
M22		1	1 (10)		1	5	6 (60)
M77			-		4	3	7 (70)
M89			-		1	3	4 (66.7)
M78			-		1	2	3 (60)
M41-2			-				-
M48			-				-
M65			-				-
M111			-			1	1
stg6			-		1		1
stg245			-				-
stg485			-		1		1
stg4831			-				-
Total	12	7	19 (8.6)		40	45	85 (38.3)

Tabla No. 25. Intervalos de CMI y valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de las cepas de cada tipo M.

Tipo M	Intervalo de CMI [$\mu\text{g/mL}$]	CMI ₅₀ [$\mu\text{g/mL}$]	CMI ₉₀ [$\mu\text{g/mL}$]
M12	0.008 – 0.064	0.012	0.016
M1	0.008 – 0.023	0.012	0.016
M6	0.008 – 0.016	0.012	0.016
M75	0.008 – 0.047	0.012	0.016
M3	0.008 – 0.023	0.012	0.016
M28	0.012 – 0.016	0.012	0.016
M2	0.004 – 0.016	0.012	0.016
M4	0.012 – 0.016	0.016	0.016
M22	0.008 – 0.023	0.016	0.016
M77	0.012 – 0.023	0.016	0.023
M89	0.012 – 0.023	0.016	0.023
M78	0.012 – 0.023	0.016	0.016
M41-2	0.012	-	-
M48	0.012	-	-
M65	0.012	-	-
M111	0.016	-	-
stg6	0.016	-	-
stg245	0.012	-	-
stg485	0.016	-	-
stg4831	0.012	-	-

Para determinar las tendencias de mayor o menor susceptibilidad a penicilina G, en este caso se tomó en cuenta el número de cepas que fueron sensibles a este antibiótico presentando una CMI $<$ ó $>$ a 0.012 $\mu\text{g/mL}$ por tipo M, descartándose los tipos con un número de cepas \leq 40% del total de cada tipo M (Tabla No. 24); después, se tomó en cuenta el intervalo, descartándose los tipos M2, M3 y M4 por su intervalo tan estrecho (Tabla No. 23). Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ (Tabla No. 25) no resultaron útiles para hacer una selección,

pues debido a la poca cantidad de cepas analizadas por tipo M, estos parámetros fueron muy parecidos entre sí. De esta manera, se encontró que los tipos M12, M22, M77, M78 y M89 tendieron a ser menos susceptibles a la penicilina G y ningún tipo tendió a ser más susceptible (Tabla No. 26). Por este método tampoco se observó alguna tendencia de susceptibilidad de las cepas obtenidas de pacientes del sexo masculino o femenino.

Tabla No. 26. Tipos M de *Streptococcus pyogenes* que resultaron ser menos o más susceptibles a penicilina G por los dos métodos realizados en este estudio.

Criterio	Método de Kirby – Bauer	Método de E-test
Menos susceptible a penicilina G	Tipo M1, M4, M12, M89	M12, M22, M77, M78, M89
Más susceptible a penicilina G	M2, M6, M75	-

5.5. Susceptibilidad a penicilina G (Método de Kirby – Bauer y E-test) de las cepas de *Streptococcus agalactiae* asociados al tipo capsular

Los resultados de la susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus agalactiae*, obtenidos por el Método de Kirby – Bauer, se ordenaron por tipos capsulares (Tabla No. 27). De la tabla No. 27, se contó el número de cepas con más o menos de 27 a 30 mm de halo de inhibición y se ordenaron por sexo de los pacientes (Tabla No. 28).

RESULTADOS

Tabla No. 27. Resultados de la susceptibilidad a penicilina G (Método de Kirby – Bauer) de las cepas de *Streptococcus agalactiae* ordenados por tipo capsular. **No. de cepas** (% de cepas).

Tipo capsular	Susceptibilidad a penicilina G (mm de inhibición)																	Total	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	37	38	39	40	43		47
Ia		1 (2.7)	2 (5.4)	3 (8.1)	3 (8.1)	4 (10.8)	5 (13.5)	2 (5.4)	5 (13.5)	5 (13.5)	1 (2.7)	4 (10.8)	1 (2.7)			1 (2.7)			37 (100)
V	1 (7.7)	3 (23.1)	1 (7.7)	1 (7.7)	2 (15.4)	1 (7.7)	1 (7.7)	1 (7.7)			1 (7.7)				1 (7.7)				13 (100)
Ib				3 (37.5)	1 (12.5)						1 (12.5)		1 (12.5)			1 (12.5)		1 (12.5)	8 (100)
NT						1 (16.7)	2 (33.3)	1 (16.7)			1 (16.7)						1 (16.7)		6 (100)
II					2 (50)			2 (50)											4 (100)
III					1 (33.3)	1 (33.3)								1 (33.3)					3 (100)
Total	1 (1.4)	4 (5.6)	3 (4.2)	7 (9.9)	9 (12.7)	7 (9.9)	8 (11.3)	6 (8.5)	5 (7)	5 (7)	4 (5.6)	4 (5.6)	2 (2.8)	1 (1.4)	1 (1.4)	2 (2.8)	1 (1.4)	1 (1.4)	71 (100)

Tabla No. 28. Resultados de la susceptibilidad a penicilina G de *Streptococcus agalactiae* agrupados en No. de cepas con más o menos de 27 a 30 mm de halo de inhibición (% cepas).

Tipo capsular	No. de cepas						
	Menos de 27-30 mm (menos susceptible)			27 - 30 mm	Más de 27-30 mm (más susceptible)		
	F♀	M♂	Total		F	M	Total
Ia	1	2	3 (8.1%)		12	7	19 (51.3%)
V	4	1	5 (38.5)		1	2	3 (23.1)
Ib			-		3	1	4 (50)
NT			-		2	1	3 (50)
II			-		1	1	2 (50)
III			-		1		1 (33.3)
Total	5	3	8 (10.4)		20	12	32 (41.6)

Para determinar las tendencias de susceptibilidad, se tomó en cuenta el número de cepas con menos o más de 27 a 30 mm de halo de inhibición, se descartaron los tipos que tuvieron un número de cepas $\leq 35\%$ del total por tipo capsular (Tabla No. 28); posteriormente, se tomó en cuenta el intervalo (Tabla No. 27), descartándose el tipo capsular **II** por tener un intervalo pequeño. Así, se encontró que el tipo capsular **V** tendió a ser menos susceptible a la penicilina G, mientras que los tipos capsulares **Ia**, **Ib** y **NT** tendieron a ser más susceptibles (Tabla No. 32).

No se observó ninguna tendencia de susceptibilidad de las cepas de pacientes femeninos o masculinos (Tabla No. 28).

A partir de los resultados de la CMI de penicilina G de *Streptococcus agalactiae*, ordenados por tipo capsular (Tabla No. 29), se contó el número de cepas sensibles a penicilina G con más o menos de 0.064 µg/mL, tomando en cuenta que la mayoría de las cepas de *Streptococcus agalactiae* presentaron ese valor de CMI (Tabla No. 30). También se obtuvo el intervalo, así como el valor de CMI₅₀ y CMI₉₀ para cada tipo capsular (Tabla No. 31).

Tabla No. 29. Resultados de la CMI de penicilina G de las cepas de *Streptococcus agalactiae* ordenados por tipo capsular. **No. de cepas** (% de cepas).

Tipo capsular	<.002	0.016	0.032	0.047	0.064	0.094	0.19	Total
Ia			3 (8.1)	14 (37.8)	15 (40.5)	4 (10.8)	1 (2.7)	37 (100)
V				1 (7.7)	7 (53.8)	5 (38.5)		13 (100)
Ib	1 (12.5)	1 (12.5)		1 (12.5)	3 (37.5)	2 (25)		8 (100)
NT				1 (16.7)	5 (83.3)			6 (100)
II					3 (75)	1 (25)		4 (100)
III				1 (33.3)		2 (66.7)		3 (100)
Total	1 (1.4)	1 (1.4)	3 (4.2)	18 (25.4)	33 (46.5)	14 (19.7)	1 (1.4)	71 (100)

Tabla No. 30. Resultados de la CMI de penicilina G de *Streptococcus agalactiae* agrupados en No. de cepas con más o menos de 0.064 µg/mL (% cepas).

Tipo capsular	No. de cepas						
	Menos de 0.064 µg/mL (mas susceptible)			0.064 µg/mL	Más de 0.064 µg/mL (menos susceptible)		
	F♀	M♂	Total		F	M	Total
Ia	13	4	17 (45.9)		2	3	5 (13.5)
V		1	1 (7.7)	5	0	5 (38.5)	
Ib	2	1	3 (37.5)	2	0	2 (25)	
NT		1	1 (16.7)			-	
II			-	1		1 (25)	
III	1		1 (33.3)	1	1	2 (66.7)	
Total	16	7	23 (29.9)	11	4	15 (19.5)	

Tabla No. 31. Intervalos de CMI de penicilina G, CMI₅₀ y CMI₉₀ de cada tipo capsular.

Tipo capsular	Intervalo de la CMI [µg/mL]	CMI ₅₀ [µg/mL]	CMI ₉₀ [µg/mL]
Ia	0.032 – 0.19	0.064	0.094
V	0.047 – 0.094	0.064	0.094
Ib	<0.002 – 0.094	0.064	0.094
NT	0.047 – 0.064	0.064	0.064
II	0.064 – 0.094	0.064	0.094
III	0.047 – 0.094	0.094	0.094

Para los resultados obtenidos por el Método de E-test, se tomó en cuenta el número de cepas que fueron sensibles a penicilina G presentando una CMI < ó > a 0.064 µg/mL (Tabla No. 30), y el criterio fue el mismo que para el

Método de Kirby – Bauer (número de cepas $\leq 35\%$); no se descartó ningún tipo capsular por intervalo, y por último, se tomó en cuenta la cantidad de cepas por tipo capsular, donde se descartó el tipo **III** por existir sólo 3 cepas de este (Tabla No. 29). En este caso tampoco se pudieron tomar en cuenta los valores de CMI_{50} y CMI_{90} pues, a excepción del tipo capsular **III**, todos los tipos capsulares presentaron los mismos valores (Tabla No. 31). Se encontró así que el tipo capsular **V** tendió a ser menos susceptible a la penicilina G, mientras que los tipos capsulares **la** y **lb** tendieron a ser más susceptibles (Tabla No. 32).

De las 13 cepas de *Streptococcus agalactiae* del tipo capsular **V**, 5 cepas tuvieron una $CMI > 0.064 \mu\text{g/mL}$, esas 5 fueron aisladas de pacientes del sexo femenino.

Tabla No. 32. Tipos capsulares que resultaron ser menos o más susceptibles a penicilina G por los dos métodos realizados en el estudio.

Criterio	Método de Kirby – Bauer	Método de E-test
Menos susceptible a penicilina G	Tipo capsular V	V
Más susceptible a penicilina G	la, lb y NT	la, lb

DISCUSIÓN

La diferencia en el número de cepas de las dos especies de *Streptococcus*, aisladas de exudados faríngeos y analizadas en este estudio, se debe a que, al ser el principal agente causal de faringitis aguda, *Streptococcus pyogenes* es común aislarlo de exudados faríngeos, incluso se puede aislar esta bacteria de personas portadoras; mientras que, *Streptococcus agalactiae* que forma parte de la flora normal del intestino grueso, es más común aislarlo de exudados vaginales por la proximidad que existe entre el ano y el aparato genitourinario.

Observación de la hemólisis

Todas las cepas de *Streptococcus pyogenes* fueron β -hemolíticas, no así las cepas de *Streptococcus agalactiae*, que aunque predominantemente fueron β -hemolíticas, también se observaron cepas α -hemolíticas (5 cepas) y no hemolíticas (2 cepas) (Tabla No. 10), lo cual coincide con la literatura que menciona que la hemólisis de *Streptococcus agalactiae* puede ser variable⁽⁵²⁾.

La existencia de cepas de *Streptococcus agalactiae* no β -hemolíticas, podría interferir en su identificación, lo cual puede ser de importancia en los casos de mujeres embarazadas portadoras. Por ello, es conveniente inocular la muestra de un exudado vaginal en un caldo selectivo que ayude a la mayor

recuperación de *Streptococcus agalactiae*, como el caldo Lim, antes de realizar todas las pruebas de identificación.

Pruebas de Bacitracina y CAMP

De acuerdo a los resultados de las pruebas de bacitracina y CAMP, mostrados en las tablas No. 11 y No. 12, se encontraron cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* que salieron de sus características comunes de sensibilidad a bacitracina y expresión fenotípica del Factor de CAMP. Por ello, se confirmó la presencia de estas bacterias con la determinación de su grupo de Lancefield a través de la prueba de inmunoaglutinación. Esta confirmación se debe realizar de rutina en la identificación de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*, ya que diferentes estudios han reportado los mismos hallazgos. Uno de estos, es el realizado por Facklam y cols. en 1975 con cepas aisladas en Estados Unidos, ellos observaron que el 0.5% de sus cepas de *Streptococcus pyogenes* dieron la prueba de Bacitracina negativa y el 10% fueron CAMP positivo, mientras que el 6% de sus cepas de *Streptococcus agalactiae* fueron Bacitracina positivas y el 2% fue CAMP negativo⁽¹⁸⁾.

La diferencia más notable entre los resultados reportados por Facklam y los reportados en el presente trabajo, son que en este último no se encontraron cepas de *Streptococcus pyogenes* CAMP positivo, mientras que en los estudios de Facklam encontraron un 10% de cepas con esta característica.

El gen *cfb*, que codifica para el Factor de CAMP, había sido amplificado previamente en todas las cepas de *Streptococcus agalactiae* que forman parte de este estudio, por la técnica de PCR; por lo que la existencia de 6 cepas (8.4%) de *Streptococcus agalactiae* CAMP negativo, es indicativo de que ese gen, aunque se encuentra presente en ellas, no se está expresando fenotípicamente.

Prevalencia de los aislamientos de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* por sexo de los pacientes

Los aislamientos de *Streptococcus pyogenes* tuvieron una prevalencia similar en los pacientes de ambos sexos, lo cual no sucedió en los aislamientos de *Streptococcus agalactiae*, que fueron más prevalentes en pacientes del sexo femenino (Tabla No. 13). Esto puede estar relacionado a la alta incidencia de esta bacteria en mujeres gestantes, quienes son portadoras o padecen infecciones genitourinarias entre otras y, por una mala higiene de ellas, *Streptococcus agalactiae* puede llegar a colonizar también la faringe.

El tipo M1 de *Streptococcus pyogenes* fue más prevalente en pacientes del sexo femenino, este tipo M está asociado con enfermedades invasivas severas, como el síndrome del shock tóxico o la fascitis necrosante^(42, 65). Los tipos M22 y M89 fueron más prevalentes en pacientes del sexo masculino, el primero está asociado a brotes de fiebre escarlatina⁽⁶⁵⁾ y el segundo se ha asociado a enfermedades invasivas en Europa^(38, 70) (Tabla No. 14).

Prevalencia de los tipos M de *Streptococcus pyogenes* y los tipos capsulares de *Streptococcus agalactiae*

El tipo M de *Streptococcus pyogenes* más prevalente fue el M12 (28.4%), seguido de los tipos M1 (13.1%), M6 (9.9%) y M75 (9.9%), que juntos comprendieron más del 60% de todos los aislamientos (Tabla No. 14 y Gráfica No. 2). La prevalencia de los primeros dos tipos M coincide con la prevalencia reportada en Canadá y el sur de Taiwán^(65, 68), donde los tipos M1 y M12 son los más frecuentemente aislados en casos de enfermedades no invasivas como la faringitis; aunque en esos dos países, al igual que en Estados Unidos y Europa, los tipos M1 y M12 están también asociados a enfermedades invasivas⁽³⁸⁾. El tipo M6 está asociado a brotes de fiebre escarlatina⁽⁶⁵⁾, y junto con el tipo M75, son aislados con frecuencia en Canadá⁽⁶⁸⁾.

Los tipos M48, M65, M111, stG6, stG245, stG485 y stG4831 fueron los menos prevalentes, encontrándose sólo un aislamiento de cada tipo M. Estos son considerados tipos M de baja prevalencia en el laboratorio de Biología Molecular (Tabla No. 14 y Gráfica No. 2).

El tipo capsular de *Streptococcus agalactiae* más prevalente fue el **la** (52.1%) seguido del **V** (18.3%) y juntos comprendieron más del 70% de los aislamientos (Tabla No. 15, Gráfica No. 3). El tipo capsular **la** ha sido el más recuperado de enfermedades no invasivas en países como Taiwán, Estados Unidos y el oeste de Europa, lo cual coincide con nuestros hallazgos^(29, 60); no

así el tipo capsular **V**, el cual es un tipo muy prevalente en infecciones invasivas en adultos con factores predisponentes como VIH o diabetes^(44, 60), de hecho, estudios realizados con cepas aisladas de pacientes en Hospitales de la Ciudad de México, muestran que el tipo capsular **V** es el más aislado de urocultivos⁽⁴⁷⁾.

En menor medida se encontraron cepas del tipo **Ib**, **II** y **III**, los cuales son tipos capsulares prevalentes en mujeres gestantes en Estados Unidos y el oeste de Europa⁽⁵⁰⁾.

Se encontraron además 6 cepas (8.5%) no tipificables, estas cepas pueden pertenecer al tipo capsular **IX**^(30, 61) o a variantes alélicas del tipo **III** o **VII** que se han reportado en otros países⁽⁶⁰⁾. Dentro de las 6 cepas **NT**, se encuentran las 3 cepas provenientes del InDRE.

No se encontró ninguna cepa de los tipos capsulares **IV**, **VI**, **VII** y **VIII**. Los tipos capsulares **IV** y **VII** se han encontrado raramente causando enfermedades en humanos. Los tipos capsulares **VI** y **VIII** se aíslan con frecuencia de mujeres embarazadas en Japón^(44, 50), en el laboratorio de Biología Molecular se cuenta con una sola cepa del tipo capsular **VI** que fue aislado de un exudado vaginal⁽⁴⁷⁾.

Susceptibilidad a penicilina G

Susceptibilidad a penicilina G (Método de Kirby-Bauer)

De acuerdo a la tabla No. 16 y gráfica No. 4, que muestran los resultados de susceptibilidad a penicilina G por el Método de Kirby-Bauer, *Streptococcus pyogenes* tendió a ser mas susceptible a la penicilina G que *Streptococcus agalactiae*.

Los resultados de susceptibilidad mostraron una distribución gaussiana, lo cual permitió observar un máximo de la curva de *Streptococcus pyogenes* en 34 a 35 mm de halo de inhibición y de *Streptococcus agalactiae* en 27 a 30 mm, existiendo una diferencia de susceptibilidad entre ellos de 4 a 8 mm de halo de inhibición.

La curva de *Streptococcus pyogenes* (color verde) muestra una distribución homogénea a ambos lados del máximo, mientras que la curva de *Streptococcus agalactiae* (color naranja) muestra una distribución menos homogénea.

Por este método, ninguna cepa de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* resultó ser de baja susceptibilidad a penicilina G. Se encontró una cepa de *Streptococcus agalactiae* en el límite del criterio de susceptibilidad a

este antibiótico para *Streptococcus* β -hemolíticos, es decir, con 24 mm de halo de inhibición.

Los intervalos de halos de inhibición de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* fueron muy semejantes (Tabla No. 17).

Existen pocos estudios epidemiológicos de susceptibilidad a penicilina G de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* que utilizan el método de Kirby – Bauer^(26, 36, 56), algunos de ellos sólo presentan sus resultados como No. de cepas susceptibles^(26, 56), y no se conocen reportes que muestren cuan susceptible a penicilina G es *Streptococcus pyogenes* en comparación con *Streptococcus agalactiae* por este método, como se reporta en el presente trabajo.

Susceptibilidad a penicilina G (Método de E-test)

De acuerdo a los resultados de las CMI de penicilina G, mostrados en la tabla No. 18 y gráfica No. 5, *Streptococcus pyogenes* es más susceptible a la penicilina G que *Streptococcus agalactiae*. Con la finalidad de mostrar más claramente este hecho, se tomó en cuenta el punto de intersección de las gráficas de ambas bacterias, que fue en 0.028 $\mu\text{g/mL}$. De esta manera, se encontró que más del 99% de las cepas de *Streptococcus pyogenes* presentaron una CMI menor al punto de intersección, mientras que más del

97% de las cepas de *Streptococcus agalactiae* presentaron una CMI mayor a ese valor (Tabla No. 20). Las 2 cepas de *Streptococcus pyogenes* que presentaron una CMI mayor a 0.028 µg/mL, es decir, menos susceptibles a penicilina G que el resto, pertenecieron a los tipos M12 y M75, los cuales son de los tipos M más prevalentes entre las cepas de este estudio. Las 2 cepas de *Streptococcus agalactiae* que presentaron una CMI menor al punto de intersección, fueron del tipo capsular **Ib**, del cual sólo existen 8 cepas en este estudio, por lo que el 25% de las cepas del tipo capsular **Ib** son más sensibles a la penicilina G que el resto de las cepas de *Streptococcus agalactiae*.

Los valores de la CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron más bajos para *Streptococcus pyogenes* (Tabla No. 19). La diferencia en la CMI₅₀ de ambas bacterias fue de 0.052 µg/mL y la diferencia en la CMI₉₀ fue de 0.078 µg/mL, ambas equivalentes a 5 diluciones en el Método de E-test. Con ello se confirma la diferencia de susceptibilidad a la penicilina G, entre las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

Las cepas de *Streptococcus pyogenes* presentaron un intervalo de CMI más estrecho que el de las cepas de *Streptococcus agalactiae* (Tabla No. 19), lo cual quiere decir que la susceptibilidad a penicilina G de las primeras, es más homogénea.

La susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus pyogenes* que forman parte de este estudio epidemiológico, difiere con lo reportado por González y cols. en la Ciudad de México⁽²⁶⁾ y por Rajinder y cols. en la India⁽⁵⁶⁾. Las cepas de este estudio son más sensibles a la penicilina G que las de González y cols., se esperaría que nuestros resultados fueran similares, tomando en cuenta que sus cepas y las del presente estudio fueron aisladas de la población de la Ciudad de México; sin embargo, ellos utilizaron el método de microdilución en caldo, que les permitió determinar la CMI utilizando diluciones más espaciadas que las que presenta el Método de E-test. Nuestras cepas son también más sensibles a la penicilina G que las de Rajinder y cols., quienes incluso encontraron cepas de baja susceptibilidad, este grupo de investigación utilizó el Método de E-test, por lo que la diferencia se puede deber al país donde se aislaron las cepas, la India.

Más de la mitad (53.15%) de las cepas de *Streptococcus pyogenes* presentaron una CMI de 0.012 µg/mL (Tabla No. 18, Gráfica No. 5), lo cual concuerda con los reportes de Chausse y cols. de cepas aisladas en Estados Unidos en 2006⁽¹³⁾. El segundo valor de CMI más observado, fue de 0.016 µg/mL con 31.53% de los aislamientos, este valor fue el más reportado por Kaplan y cols. entre sus cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas en Estados Unidos entre 1994 – 1995⁽³³⁾, y también fue el más observado por Rajinder y cols. en cepas aisladas en la India entre 2002 y 2003⁽⁵⁶⁾.

La susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus agalactiae* que forman parte de este estudio, difiere con lo reportado por dos grupos de investigación diferentes. Las cepas de este estudio son más sensibles a la penicilina G que las de Hsueh y cols. en Taiwán⁽²⁹⁾ y son menos susceptibles a este antibiótico que las de Martínez y cols. en Chile⁽⁴⁴⁾. Esto se puede deber a la diferencia de áreas geográficas donde se aislaron las cepas. El intervalo de CMI obtenido en este estudio es más amplio que el reportado por estos dos autores, lo cual nos habla de que en la Ciudad de México, las cepas de *Streptococcus agalactiae* presentan una susceptibilidad menos homogénea que en Chile y Taiwán.

El valor de CMI más observado entre las cepas de *Streptococcus agalactiae*, fue de 0.064 µg/mL (46.48%) seguido de 0.047 µg/mL (25.35%) (Tabla No. 18, Gráfica No. 5). Esto concuerda con los reportes de Berkowitz y cols. en cepas aisladas en Estados Unidos en 1990⁽⁴⁾, así como los reportes de Nagano y cols. con cepas aisladas en Japón entre 2003 y 2004⁽⁵³⁾, en ambos estudios la CMI más observada fue de 0.06 µg/mL.

Por este método (E-test) se encontró una cepa de baja susceptibilidad a penicilina G, con una CMI de 0.19 µg/mL, que correspondió a un aislamiento de *Streptococcus agalactiae* del tipo capsular **1a**, que es el tipo más prevalente entre las cepas de estudio, más adelante se discutirá al respecto.

Comparación de los resultados de la susceptibilidad a penicilina G obtenidos por el Método de Kirby-Bauer con los obtenidos por el Método de E-test

En la Tabla No. 33 se resumen los hallazgos observados por los dos métodos utilizados en este estudio, para la determinación de la susceptibilidad a penicilina G.

Tabla No. 33. Hallazgos y diferencias encontradas entre los dos métodos de determinación de la susceptibilidad a penicilina G.

Método		<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Kirby – Bauer	Valores más observados	34 – 35 mm	27 – 30 mm
	Diferencia en susceptibilidad	4 – 8 mm	
	Intervalo	25 – 46 mm	24 – 47 mm
	Cepas de baja susceptibilidad	0	0
E-test	Valor más observado	0.012 µg/mL	0.064 µg/mL
	Diferencia en susceptibilidad	5 diluciones	
	Intervalo	0.004 – 0.064 µg/mL	<0.002 – 0.19 µg/mL
	Cepas de baja susceptibilidad	0	1*

*Tipo capsular Ia

Por ambos métodos se pudo determinar la diferencia en la susceptibilidad a penicilina G existente entre las 2 especies de *Streptococcus*, por los dos métodos *Streptococcus pyogenes* resultó ser más sensible a la penicilina G que *Streptococcus agalactiae* y, sólo por el Método de E-test, se identificó una cepas de *Streptococcus agalactiae* con baja susceptibilidad a penicilina G.

Cepas de *Streptococcus pyogenes* con baja susceptibilidad a penicilina, han sido reportadas por Rajinder y cols. en la India⁽⁵⁶⁾ y por Cuevas y cols. en la Ciudad de México⁽¹⁾ (7 cepas con CMI de 0.19 – 0.25 µg/mL y 10 cepas con CMI de 0.25 – 0.75 µg/mL respectivamente). Cepas de *Streptococcus agalactiae* con esta característica, cada vez son más comunes y se han reportado por muchos investigadores de diferentes países^(15, 35, 36, 53, 69, 49, 29).

De acuerdo a las gráficas No. 6 y No. 7, no se observó una relación entre los resultados obtenidos por el Método de Kirby – Bauer y los obtenidos por el Método de E-test; por ejemplo, las cepas de *Streptococcus pyogenes* con una CMI de 0.016 µg/mL, presentaron un halo de inhibición de 27 hasta 46 mm y así para el resto de los resultados. Sólo las cepas de *Streptococcus pyogenes* coincidieron en ser susceptibles a la penicilina G por los dos métodos, no así las cepas de *Streptococcus agalactiae*, donde se observó una cepa (1.4%) susceptible por el Método de Kirby – Bauer (con 27 mm de halo de inhibición) y de baja susceptibilidad por el Método de E-test (con 0.19 µg/mL de CMI).

Hallazgos similares han sido observados por diferentes investigadores, quienes mencionan que los resultados de difusión en disco (Método de Kirby – Bauer), no guardan una relación con los valores de CMI^(36, 56).

Rajinder y cols. utilizaron el Método de Kirby – Bauer y el Método de E-test, para determinar la susceptibilidad a penicilina G de 34 aislamientos de *Streptococcus pyogenes*. Por el Método de Kirby – Bauer, el 100% de las cepas fue sensible al antibiótico, mientras que por el Método de E-test, 7 cepas (20.6%) presentaron baja susceptibilidad al β -lactámico evaluado⁽⁵⁶⁾.

Kimura y cols. determinaron la susceptibilidad a penicilina G de 48 cepas de *Streptococcus agalactiae*, por el Método de dilución en agar (para conocer la CMI) y por el Método de Kirby – Bauer, encontrando por el primer método, 16 cepas de baja susceptibilidad a penicilina G y confirmando genéticamente esta característica; 15 de ellas presentaron mutaciones en el gen *pbp2x* de tipo V405A y Q557E y una cepa presentó múltiples mutaciones en ese gen diferentes a V405A y Q557E; sin embargo, por el Método de Kirby – Bauer, esas 16 cepas cayeron en el criterio de susceptibles según la CLSI, por lo que ellos determinaron la susceptibilidad de esas 16 cepas a otros 3 antibióticos por el Método de Kirby - Bauer, oxacilina (una penicilina), ceftizoxima y ceftibuten (ambas cefalosporinas de 3^a generación), con lo cual pudieron hacer la distinción de todas las cepas de baja susceptibilidad a penicilina⁽³⁶⁾.

Tomando en cuenta la gran variabilidad en los resultados obtenidos por el Método de Kirby – Bauer, con respecto a los resultados obtenidos por el Método de E-test, y también los hallazgos de Rajinder y Kimura, el Método de E-test es más confiable para identificar cepas de baja susceptibilidad a penicilina G.

El haber encontrado una cepa de *Streptococcus agalactiae* que no coincidió en tener baja susceptibilidad a penicilina G por los dos métodos, es grave tomando en cuenta que el método más utilizado, por su bajo costo en los laboratorios de microbiología, es el de Kirby – Bauer⁽⁶⁴⁾ y podrían no estarse identificando algunos aislamientos con baja susceptibilidad a este antibiótico. Por lo anterior, se propone determinar la susceptibilidad a oxacilina, ceftizoxima y ceftibuten (medicamentos utilizados por Kimura) aparte de la penicilina G, para distinguir las cepas de baja susceptibilidad, si es que se va a determinar ello por el Método de Kirby – Bauer.

Como se ha mencionado antes, varios investigadores han aislado cepas de *Streptococcus agalactiae* de baja susceptibilidad a penicilina; sin embargo, no se ha demostrado que estas sean las responsables de los fracasos en los tratamientos con este antibiótico⁽³⁶⁾. Si estas fueran las responsables podrían convertirse en un problema de salud pública, tomando en cuenta que cada vez son más los aislamientos que se reportan.

Susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus pyogenes* asociados al tipo M

Los tipos M12 y M89 de *Streptococcus pyogenes*, coincidieron en ser menos susceptibles a la penicilina G por ambos métodos, ningún tipo M coincidió en ser más susceptible a este antibiótico (Tabla No. 26). Las cepas que mostraron ser menos susceptibles son las más importantes, tomando en cuenta que esos tipos podrían asociarse en un futuro con baja susceptibilidad a este antibiótico. Por lo tanto, es importante seguir monitoreando la susceptibilidad a penicilina G, sobre todo de los tipos M12 y M89, ya que aparte de mostrar el comportamiento de menor susceptibilidad, ambos están asociados a enfermedades invasivas^(70, 73).

Susceptibilidad a penicilina G de las cepas de *Streptococcus agalactiae* asociadas al tipo capsular

Los tipos capsulares que coincidieron en ser más susceptibles a la penicilina G por los dos métodos, fueron el **la** y el **lb**, mientras que el tipo capsular **V** coincidió en ser menos susceptible (Tabla No. 32). Un estudio realizado en Taiwán por Hsueh y cols. con 266 cepas de *Streptococcus agalactiae*, aisladas entre 1998 – 2000, coincide con este hallazgo. Ellos encontraron 15 cepas de baja susceptibilidad a penicilina, perteneciendo 6 de ellas (40%) al tipo capsular **V**⁽²⁹⁾. Este tipo capsular puede estar asociado a baja susceptibilidad a penicilina, lo que resulta ser importante tomando en cuenta

que es un tipo muy prevalente en infecciones invasivas en adultos con factores predisponentes^(44, 60) y que en los hospitales de la Ciudad de México es el más aislado de urocultivos⁽⁴⁷⁾.

Se propone realizar un análisis molecular de las cepas que presenten baja susceptibilidad a penicilina, a través de la amplificación del gen *pbp2x* y posterior secuenciación de este, para la búsqueda de mutaciones asociadas a esta característica, lo cual ya ha sido reportado por Kimura y cols.⁽³⁵⁾ y Nagano y cols.⁽⁵³⁾, llevando a cabo un seguimiento clínico de los pacientes donde se aíslan estas cepas, para así poder demostrar si están involucradas o nó en las fallas en los tratamientos con penicilina.

CONCLUSIONES:

- El tipo M12 de *Streptococcus pyogenes* y el tipo capsular **la** de *Streptococcus agalactiae*, fueron los más prevalentes entre las cepas aisladas de exudados faríngeos. Estos tipos moleculares son aislados mayoritariamente de enfermedades no invasivas en otras partes geográficas.
- Las cepas de *Streptococcus pyogenes* son más susceptibles a la penicilina G que las de *Streptococcus agalactiae*.
- La susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus pyogenes* a la penicilina G, es más homogénea que la susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus agalactiae*, presentando un intervalo de CMI más estrecho.
- El Método de E-test es más adecuado para determinar la susceptibilidad a penicilina G de Estreptococos β -hemolíticos que el Método de Kirby – Bauer, ya que sólo por ese método se pudo detectar una cepa de *Streptococcus agalactiae* con baja susceptibilidad a este antibiótico.

- Los tipos M12 y M89 de *Streptococcus pyogenes* tendieron a ser menos susceptibles a la penicilina G que el resto de los tipos M, el presente trabajo es el primero en reportar estos hallazgos.
- El tipo capsular V de *Streptococcus agalactiae* tendió a ser menos susceptible a la penicilina G que el resto de los tipos capsulares, coincidiendo nuestros hallazgos con los de otros investigadores.
- La susceptibilidad a penicilina G de las cepas, asociadas al sexo de los pacientes, no mostró ninguna tendencia.
- Se propone demostrar genéticamente la característica de baja susceptibilidad a penicilina G de la cepa de *Streptococcus agalactiae* encontrada en este estudio.
- Se requiere continuar con la vigilancia epidemiológica de la susceptibilidad a penicilina G en aislamientos de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amábile C., Herminda C., Vivar R. (2001). Comparative in Vitro Activity of Moxifloxacin by E-test against *Streptococcus pyogenes*. *Clinical Infectious Diseases*. 32:S30 – S32.
2. Aschenbrenner D., Venable S. (2009). *Drug Therapy in Nursing*. 3th ed. Wolters Kluwer Health Lippincott Williams &Wilkins. China. 755 – 764.
3. Barriga G., Alarcón N., Castillo N. (1995). Susceptibilidad Invitro de Bacterias Causantes de Infecciones Respiratorias. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 42:112 – 118.
4. Berkowitz K., Regan J., Greenberg E. (1990). Antibiotic Resistance Patterns of Group B Streptococci in Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology*. 28:5 – 7.
5. Betriu C., Gomez M. Sánchez A., Cruceyra A., Romero J., Picazo J. (1994). Antibiotic Resistance and Penicillin Tolerance in Clinical Isolates of Group B Streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38:2183 – 2186.

6. Bisno A., Gerber M, Gwaltney J., et. al. (2002). Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis. *Clinical Infectious Diseases*. 35:113 – 123.

7. Britania. Suplemento CoNa para Todd Hewitt. Inserto: <http://britannialab.com.ar/esp/productos/b03/suplconacaldotodd.htm>.
Fecha de consulta: 15-IV-2010.

8. Brooks G., Butel J., Morse S. (2008). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 17^a ed. El Manual Moderno. México D.F. 251 – 261.

9. Camps P., Vázquez S., Escolano C., (2005). *Fundamentos de Síntesis de Fármacos*. Universidad de Barcelona. Barcelona. 244 – 251.

10. Carrera J., Mallafré J., Serra B. (2006). *Protocolos de Obstetricia y Medicina Perinatal del Instituto Universitario Dexeus*. 4^a ed. Elsevier. Barcelona. pp. 120.

11. Casey J., Pichichero M. (2004). Meta-analysis of Cephalosporin Versus Penicillin Treatment of Group A Streptococcal Tonsillopharyngitis in Children. *Pediatrics*. 113:866 – 882.

12. Chambers H. Antibióticos β -lactámicos y Otros Inhibidores de la Síntesis de la Pared Celular. En Katzung B. (2005). Farmacología básica y clínica. 9ª ed. El Manual Moderno. México D.F., 731 – 738.
13. Chaussee M., McDowell E., Rieck L., Callegari E., Chaussee M. (2006). Proteomic Analysis of a Penicillin-tolerant *rgg* Mutant Strain of *Streptococcus pyogenes*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 58:752 – 759.
14. Das B., Joshi M., Pant C. (2006). An Overview of Over the Counter Drugs in Pregnancy and Lactation. Kathmandu University Medical Journal. 4:545-551.
15. De Azevedo J., McGavin M., Duncan C., Low Donald, McGeer A. (2001). Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B Streptococcus Isolates from Ontario, Canada. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45:3504 – 3508.
16. De la Rosa M., Prieto J. (2003). Microbiología en Ciencias de la Salud Conceptos y Aplicaciones. 2ª ed. Elsevier. Madrid. pp. 78.
17. Delgado A., Minguillón C., Joglar J. (2003). Introducción a la Química Terapéutica. 2ª ed. Díaz de Santos. Madrid. 427 – 438.

18. Facklam R. (1975). Manual de Procedimientos. Aislamiento e Identificación de Estreptococos. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Atlanta Georgia. 3 – 6, 35 – 38.
19. Ferraro M., Craig W., Dudley M., Eliopoulos G., Hecht D., Hindler J., Reller L., Sheldon A., Senson J., Tenover F., Testa R., Weinstein M., Wikler M. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twelfth Informational Supplement. 22:68 – 69.
20. Fischetti V., Novick R., Ferretti J., et. al. (2006). Gram-positive Pathogens. 2^a ed. ASM Press. Washington D. C. pp. 153.
21. Forbes B., Sahn D., Weissfeld A. (2009). Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico. 12^a ed. Médica panamericana. Buenos Aires. 265 – 278.
22. Frere J. (1995). Beta-lactamases and Bacterial Resistance to Antibiotics. Molecular Microbiology. 16:385 – 395.
23. Garrett R., Grisham C. (1999). Garrett and Grisham, Biochemistry. Part I. 2th ed. Brooks/Cole Cengage Learning. Canada. 279 – 283.
24. Georgopapadakou N.H. (1993). Penicillin-Binding Proteins and Bacterial Resistance to β -Lactams. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 37:2045 – 2053.

25. Gil M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Revista Chilena de Infectología. 17:145 – 152.
26. González A., Ortiz C., Mota R., Dickinson M., Dávila R., Fernández M. (2002). Sensibilidad Antimicrobiana y Caracterización de Cepas de *Streptococcus pyogenes* Aisladas de un Brote de Escarlatina. Salud Pública Mex. 44:437 – 441.
27. Gorbach S., Bartlett J., Blacklow N. (2004). Infectious Diseases. 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. pp. 185.
28. Holgate S., Church M., Lichtenstein L., (2002). Alergia. 2^a ed. Harcourt. Madrid. 155 – 159.
29. Hsueh P., Teng L., Lee L., Ho S., Yang P., Luh K. (2001). High Incidence of Erythromycin Resistance among Clinical Isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45:3205 – 3208.
30. Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G., Baldassarri L., Orefici G, Creti R. (2010). A Multiplex PCR Assay for the Direct Identification of the Capsular Type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. Journal Microbiology Methods. 80:212-214.

-
31. Inzunza A., Perea L. (2005). Fiebre Reumática.
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/fiebre/pato.html>.
Fecha de consulta: 2-IV-2010.
32. Jones A., Needham R., Clancy A. Knoll K., Rubens C. (2003). Penicillin-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*: a Novel Mechanism for Evasion of Immune Clearance. *Molecular Microbiology*. 47:247 – 256.
33. Kaplan E., Johnson D. (2001). Unexplained Reduced Microbiological Efficacy of Intramuscular Benzathine Penicillin G and of Oral Penicilin V in Eradication of Group A Streptococci From Children With Acute Pharyngitis. *Pediatrics*. 108:1180 – 1186.
34. Kenneth J. Ryan. En Champoux J., Drew w., Neidhardt F., Plorde J. (2005). Sherris Microbiología Médica, Una introducción a las Enfermedades Infecciosas. 4ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México D. F. 300 – 302, 306, 307, 310, 311.
35. Kimura K., Suzuki S., Wachino J., Kurokawa H., Yamane K., Shibata N., Nagano N., Kato H., Shibayama K., Arakawa Y. (2008). Molecular Characterization of Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52:2890 – 2897.

-
36. Kimura K., Wachino J., Kurokawa H., Suzuki S., Yamane K., Naohiro S., Arakawa Y. (2009). Practical Disk Diffusion Test for Detecting Group B *Streptococcus* with Reduced Penicillin Susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:4154 – 4157.
37. Koneman E., Washington W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G., (2006). Koneman's. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 72 – 74, 715, 717 – 719.
38. Luca B., Darenberg J., Neal S. Siljander T. Strakova L., Tanna A. Creti R., Ekelund K., Koliou M., Tassios P., Linden M. Straut M., Vuopio J., Bouvet A., Efstratiou A., Schalén C., Henriques B., Jasir A. (2009). Clinical and Microbiological Characteristics of Severe *Streptococcus pyogenes* Disease in Europe. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:1155 – 1165.
39. Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I. (2006). *Inmunología*. 7^a ed. Elsevier Mosby. pp. 198.
40. Mandell G., Bennett J., Dolin R. (2006). *Enfermedades infecciosas, Principios y Práctica*. 6^a ed. Elsevier. Madrid. 2365.
41. Marín M., Gudiol F. (2003). Antibióticos Betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 21:42 – 55.
-

42. Márquez M., Villaseñor A. (2006). Desarrollo de Antisueros para Identificar Serotipos M-1 y M-3 de *Streptococcus pyogenes*. Revista Mexicana de Patología Clínica. 53:93 – 99.
43. Martin M. (2002). Resistencia Bacteriana a β -lactámicos: Evolución y Mecanismos. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 21:107-116.
44. Martínez M., Ovalle A., Durán C., Reid I., Urrijoa G., Garay B., Cifuentes M. (2004). Serotipos y Susceptibilidad Antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae*. Revista Médica Chilena. 132:549 – 555.
45. Mendoza N. (2008). Farmacología Médica. Médica panamericana. México D. F. 598 – 605.
46. Mendoza N. (2006). Penicilina. Revista de la Facultad de Medicina UNAM. México D. F. 49:4.
47. Monroy I. (2008). Aplicación de la Técnica de PCR en la Tipificación de Aislamientos Clínicos de *Streptococcus agalactiae*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM. México D.F. 16 – 27.
48. Montanaro A., Cervera R. (2007). Alergia, Clínicas Médicas de Norteamérica. Vol 90. No. 1. Elsevier Masson. Barcelona. 233 – 241.

49. Morikawa Y., Kitazato M., Katsukawa C., Tamaru A. (2003). Prevalence of Cefotaxime Resistance in Group B Streptococcus Isolates from Osaka, Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 9:131 – 133.
50. Motlová J., Straková L., Urbásková P., Sak P., Sever T. (2004). Vaginal & Rectal Carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: Incidence, Serotypes Distribution & Susceptibility to Antibiotics. *Indian Journal of Medical Research*. 119:84 – 87.
51. Moya B., Dötsch A., Blázquez J., Zamorano L. Haussler S., Oliver A. (2009). β -Lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of Nonessential Penicillin-Binding Protein. *Plos Pathogens*. 5:1 – 10.
52. Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. (2006). *Microbiología médica*. 5ª ed. Elsevier. Barcelona 18 – 21, 233, 235, 237 – 251.
53. Nagano N., Nagano Y., Kimura K., Tamai K., Yanagisawa H., Arakawa Y. (2008). Genetic Heterogeneity in *pbp* Genes among Clinically Isolated Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52:4258 – 4267.
54. Perea L. *Streptococcus*. En: Tay J. (2005). *Microbiología y Parasitología Médicas*. 3ª ed. Méndez Editores. México D.F. 74 – 84.

55. Petri W., Chambers H. Antimicrobianos. En Goodman A., Hardman J., Limbird L. (2003). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10^a ed. Vol. II. McGraw-Hill Interamericana. México D. F. 1162 – 1164, 1207 – 1224.
56. Rajinder M., Nair D., Deb M., Batra K., Aggarwal P. (2006). Resistance to Erythromycin and Rising Penicillin MIC in *Streptococcus pyogenes* in India. Japanese Journal of Infectious Diseases. 59:334 – 336.
57. Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. (2008). Rang y Dale Farmacología. 6^a ed. Elsevier. Barcelona. 647 – 660, 665 – 668.
58. Rice K., Bayles K. (2008). Molecular Control of Bacterial Death and Lysis. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 72:85 – 109.
59. Romero R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3^a ed. Médica panamericana. México D.F. 699 – 705.
60. Sellin M., Olofsson C., Hakansson S., Norgren M. (2000). Genotyping of the Capsule Gene Cluster (*cps*) in Nontypeable Group B Streptococci Reveals Two Major *cps* Allelic Variants of Setotypes III and VII. Journal of Clinical Microbiology. 38:3420 – 3428.

61. Slotved H., Kong F., Lambertsen L., Sauer S., Gilbert G. (2007). Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *Journal of Clinical Microbiology*. 45:2929 – 2936.
62. Stanier R., Ingraham J., Wheelis M., Painter P. (1996). *Microbiología*. 2^a ed. Reverté. Barcelona. 161 – 163.
63. Stevens D., Kaplan E. (2000). *Streptococcal Infections Clinical Aspects, Microbiology and Molecular Pathogenesis*. Oxford University Press, Inc. New York. 188, 201 – 208.
64. Struthers J., Westran R. (2003). *Clinical Bacteriology*. ASM PRESS. Washington D.C. 19 – 31, 39, 49 – 65.
65. Su Y., Wang S., Lin Y., Chuang W., Lin Y., Wu J., Lin M., Liu C. (2009). Changing Epidemiology of *Streptococcus pyogenes emm* Types and Associated Invasive and Noninvasive Infections in Southern Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:2658 – 2661.
66. Torres M., Blanca M. (2003). Reacciones de Hipersensibilidad a Antibióticos Betalactámicos en la Infancia. *Allergology et Immunopathology*. 31:103 – 109.
67. Turner P. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases. *Clinical Infectious Diseases*. 41:S273 – S275.

68. Tyrrell G., Lovgren M., Forwick B., Hoe N., Musser J., Talbot J. (2002). M Types of Group A Streptococcal Isolates Submitted to the National Centre for *Streptococcus* (Canada) from 1993 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:4466 – 4471.
69. Vermillion S., Bland M., Soper D., Austin M. (2000). Antibiotic Resistance Patterns of Group B Streptococcus in late-third-trimester Rectovaginal Cultures. *Obstetrics & Gynecology*. 95:S79 – S80.
70. Vlamincx B., van Pelt W., Schouls L., van Silfhout A., Mascini E., Elzenaar C., Fernández T., Bosman A., Schellekens J. (2005). Long-term Surveillance of Invasive Group A Streptococcal Disease in The Netherlands, 1994 – 2003. *Clinical Microbiology & Infection*. 11:226 – 231.
71. Zhao G., Yeh W., Carnahan R., Flokowitsch J., Meier T., Alborn W., Becker G., Jaskunas R. (1997). Biochemical Characterization of Penicillin-Resistant and -Sensitive Penicillin-Binding Protein 2x Transpeptidase Activities of *Streptococcus pneumoniae* and Mechanistic Implications in Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 179:4901-4908.