



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Análisis de la resistencia a eritromicina en cepas clínicas de
*Streptococcus pyogenes***

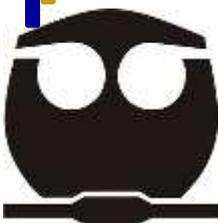
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

Santiago Cruz Nayeli



CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D.F.

AÑO 2015



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: PROF. PASTELIN PALACIOS RODOLFO

VOCAL: PROF. HERNÁNDEZ GÓMEZ LUCIANO

SECRETARIO: PROF. PEREA MEJÍA LUIS MANUEL

1ER SUPLENTE: PROF. HERAS CHAVARRIA MONICA BERENICE

2DO SUPLENTE: PROF. RUIZ VILLAFAN BEATRIZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina. UNAM. Con el apoyo de los proyectos DGAPA-PAPIIT IN221511 y FM 066-2012.

ASESOR

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en C. Luis Manuel Perea Mejía

M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel

SUSTENTANTE

SANTIAGO CRUZ NAYELI

Este trabajo fue posible gracias al apoyo incondicional de mis profesores y amigos, la Dra. Alma y el Dr. Luis Manuel; gracias por su paciencia, consejos y enseñanzas que me permitieron crecer como estudiante y como persona.

Gracias:

A mis padres, Lorenzo Santiago Cruz y Elvira Cruz Hernández, por darme la vida, sus cuidados, su ejemplo y los maravillosos momentos familiares que me brindaron, por creer en mí, porque les debo lo que soy aquí está el fruto de nuestro esfuerzo, del camino que me ayudaron a forjar.

A mi hermana Nancy, porque esto fue un trabajo en equipo gracias a tu apoyo y cariño.

A mis amiga Esperanza, Pera, que fuiste un ángel aquí en la tierra y hoy estas en el cielo no tengo palabras para agradecerte todo el apoyo y el amor que me brindaste, esa sonrisa que me consolaba, esos días de largas jornadas en el laboratorio que nunca voy a olvidar.

A mis amigas, Sarita Mayen, Jazmín, Susi, Ceci, Marianita, Chabelita, Zeltzin y a quien me falte por mencionar, gracias por su apoyo incondicional en los peores y mejores momentos de mi vida, esta carrera en la que compartimos desvelos, lágrimas y risas.

A mi familia, mi tía Minerva y su familia, mi tía Ma. Santos y su familia, mi tía Lucha y su familia, a mis primas y mis primos que me apoyaron en los momentos difíciles con quienes he pasado momentos inolvidables, los quiero.

Al Grupo Fierro, al señor Guillermo Fierro y todos sus trabajadores, a la Señora Blanca y hermana, porque ser voceadora fue toda una aventura que sin su ayuda no hubiera sido posible.

Al colegio Columbia, a sus trabajadores, al Prof. Edgar Cabrera y en especial a las profesoras del área de Ciencias gracias por la amistad que me han brindado.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Estreptococos	2
2.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	5
2.2.1. Epidemiología.....	5
2.2.2. Asociación del tipo M con el cuadro clínico presentado	6
2.2.3. Enfermedades asociadas a <i>Streptococcus pyogenes</i>	6
2.2.4. Patogénesis.....	10
2.3 Tratamiento de infecciones por <i>Streptococcus pyogenes</i>	15
2.4 Macrólidos	16
2.4.1. Eritromicina	16
2.5 Resistencia a macrólidos en <i>Streptococcus pyogenes</i>	17
2.5.1. Aspectos bioquímicos de la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS) en <i>Streptococcus pyogenes</i>	18
2.5.2. Importancia clínica de la resistencia a eritromicina en <i>Streptococcus pyogenes</i> ...	18
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVO	20
5. METODOLOGÍA	21
5.1 Origen de las cepas.....	21
5.2 Pruebas de identificación.....	22
5.3 Prueba de susceptibilidad a diversos antibióticos	23
5.4 Determinación del fenotipo de resistencia	24
5.5 Extracción de DNA de cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> resistentes a eritromicina. ...	25
5.5.1. Evaluación del DNA extraído	25
5.6 Amplificación del gen <i>emm</i>	26

5.7 Amplificación de los genes <i>sic</i> y <i>sof</i>	27
5.8 Digestión enzimática de los productos de PCR del gen <i>emm</i> de cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina.....	29
5.9 Amplificación de los genes <i>speA</i> y <i>speC</i>	30
5.10 Amplificación de los genes asociados a la resistencia a macrólidos: <i>ermA</i> , <i>ermB</i> y <i>mefA</i>	31
5.11 Asociación del fenotipo y genotipo de resistencia con el tipo M.....	34
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	35
6.1 Origen de las cepas.....	35
6.2 Susceptibilidad antimicrobiana	35
6.3 Aislamiento de DNA y amplificación del gen <i>emm</i>	35
6.4 Amplificación de los genes <i>sic</i> y <i>sof</i>	36
6.5 Análisis de la digestión de los productos de PCR del gen <i>emm</i>	37
6.6 Amplificación de los genes asociados a la resistencia a macrólidos	38
6.7 Determinación de fenotipo de resistencia a macrólidos	39
6.8 Relación entre fenotipos y genotipos de resistencia a eritromicina en cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i>	41
6.9 Comparación entre fenotipos y genotipos de resistencia con el tipo M de las cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> resistentes a eritromicina.....	41
6.10 Comportamiento de la resistencia a eritromicina en cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> aislados en México del 2001-20013.	45
7. CONCLUSIONES	49
8. BIBLIOGRAFIA.....	50
9. ANEXO I Caracterización de cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> resistentes a eritromicina: fenotipo, genotipo, tipo M, gen <i>sic</i> y gen <i>sof</i> , y exotoxinas <i>speA</i> y <i>speC</i>	60

Índice de tablas

Tabla 1. Aminoglúcidos presentes en el “carbohidrato C” de cada grupo serológico	4
Tabla 2. Principales características y tipos M de <i>S. pyogenes</i> asociados a enfermedades superficiales.....	7
Tabla 3. Principales características y tipos M de <i>S. pyogenes</i> asociados a enfermedades invasivas.....	8
Tabla 4. Principales características y tipos M de <i>S. pyogenes</i> asociados a secuelas inmunes	10
Tabla 5. Estructuras de adhesión de <i>Streptococcus pyogenes</i>	11
Tabla 6. Factores de virulencia de <i>S. pyogenes</i> para evasión del sistema inmune del hospedero.....	13
Tabla 7. Clasificación de los macrólidos de acuerdo al número de carbonos que componen el anillo lactónico.	16
Tabla 8. Frecuencia de la resistencia a macrólidos en aislamientos de <i>Streptococcus pyogenes</i> en diferentes regiones del mundo.	17
Tabla 9. Instituciones de salud donde se aislaron las cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina.	21
Tabla 10. Clave asignada por el laboratorio de las cepas control donadas por el laboratorio de Mount Sinai Hospital.	22
Tabla 11. Concentración y criterios para determinar la susceptibilidad (CLSI) de los antibióticos utilizados para el antibiograma de las cepas de <i>S. pyogenes</i>	24
Tabla 12. Secuencia de los primers utilizados en la PCR para determinar el gen <i>emm</i> asociado a la proteína M.....	26
Tabla 13. Composición de la mezcla de reacción para la PCR del gen <i>emm</i>	27
Tabla 14. Secuencia de los primers utilizados en la PCR dual para determinar los genes <i>sic</i> y <i>sof</i>	28
Tabla 15. Composición de la mezcla de reacción para la PCR dual de los genes <i>sic</i> y <i>sof</i> ...28	
Tabla 16. Composición de la mezcla de reacción para la digestión de los amplificadores del gen <i>emm</i>	29
Tabla 17. Secuencia de los primers utilizados en la PCR dual para la amplificación de los genes <i>speA</i> y <i>speC</i>	30

Tabla 18. Composición de la mezcla de reacción para la PCR dual de los genes <i>speA</i> y <i>speC</i>	31
Tabla 19. Cepas de referencia de <i>S. pyogenes</i> para los genes asociados a la resistencia a macrólidos	32
Tabla 20. Secuencia de los primers utilizados en la PCR para determinar los genes <i>mefA</i> , <i>ermB</i> y <i>ermA</i>	32
Tabla 21. Composición de la mezcla de reacción para la PCR de los genes <i>mefA/ermB</i>	33
Tabla 22. Composición de la mezcla de reacción para la PCR del gen <i>ermA</i>	33
Tabla 23. Frecuencia de tipos M de cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina.	38
Tabla 24. Genes de resistencia a eritromicina en cepas de <i>S. pyogenes</i>	39
Tabla 25. Fenotipo de resistencia a eritromicina en cepas de <i>S. pyogenes</i>	41
Tabla 26. Relación entre fenotipos y genotipos de resistencia a eritromicina en cepas de <i>S. pyogenes</i>	41
Tabla 27. Asociación entre el fenotipo y genotipo de resistencia a macrólidos y el tipo M determinado en cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina utilizadas en el estudio.....	42
Tabla 28. Distribución de los tipos M de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina y su asociación con el genotipo y el fenotipo de resistencia observado.....	44
Tabla 29. Distribución de cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina durante el periodo 2001-2013 en México.	45
Tabla 30. Distribución y porcentaje de los tipos M1, M12 y M75 de <i>S. pyogenes</i> determinados durante el periodo 2001-2013 en México.	47

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la proteína M6 de <i>S. pyogenes</i>	15
Figura 2. Estructura química de la eritromicina.....	17
Figura 3. Prueba de la bacitracina para la identificación de <i>Streptococcus pyogenes</i>	22
Figura 4. Prueba positiva de coagulación para el grupo serológico A en cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i>	23
Figura 5. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% de la extracción de DNA en cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina.....	35
Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR del gen <i>emm</i> de <i>S. pyogenes</i> en gel de agarosa al 1.5%.....	36
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% para los genes <i>sic/sof</i> en cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina.	37
Figura 8. Gel de agarosa al 2.5% donde se muestran algunos RFLP's del gen <i>emm</i>	38
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los productos de PCR individual del gen <i>ermA</i> y el PCR dual <i>mefA/ermB</i>	39
Figura 10. Determinación del fenotipo de resistencia a eritromicina en Agar Mueller-Hinton con 5% de sangre para la determinación del fenotipo de resistencia	40
Figura 11. Porcentaje de cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina durante el periodo 2001-2013.....	46
Figura 12. Porcentaje de frecuencia de cepas de <i>S. pyogenes</i> de los tipos M1, M12 y M75 durante el periodo 2001-2013.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA (ADN)	Ácido Desoxirribonucleico
tRNA	Ácido Ribonucleico de transferencia
AE	Buffer de Elusión
AW1	Buffer de lavado 1
AW2	Buffer de lavado 2
AL	Buffer de Lisis
TBE	Buffer de Tris-Boratos-EDTA
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Grados Celsius
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
MLS	Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligramo

mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PM	Peso Molecular, Marcador de Peso Molecular
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
cMLS	Resistencia constitutiva a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
iMLS	Resistencia inducible a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
rpm	Revoluciones por minuto
SS	Secretaria de Salud
UFC	Unidad Formadora de Colonia
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

El género *Streptococcus* está conformado por un grupo muy numeroso y heterogéneo de bacterias que se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza. En él encontramos algunas especies que son patógenos para el ser humano, siendo la mayoría comensales, miembros de la microbiota de piel y mucosa. *Streptococcus pyogenes* es la especie más importante del género debido al gran número de infecciones atribuibles a esta bacteria que incluye enfermedades comunes como faringitis, impétigo, celulitis, y fiebre escarlatina. Además de que puede producir fiebre puerperal, fiebre reumática, glomerulonefritis, fascitis necrotizante, meningitis y síndrome de choque tóxico estreptocócico (SSTE). La eritromicina (macrólido) es el tratamiento de segunda elección cuando el paciente es alérgico a la penicilina, fármaco de primera elección para el tratamiento de infecciones por estreptococos.

Actualmente se conocen tres genes asociados con la resistencia a macrólidos en *S. pyogenes*, denominados como *mefA*, *ermA* y *ermB*. Cada uno de ellos expresa un mecanismo específico de resistencia, mientras que el gen *mefA* se relaciona con el mecanismo de resistencia basado en la expulsión selectiva de macrólidos con anillos de 14 y 15 miembros, la familia de los genes *erm* participan en el mecanismo de modificación del sitio blanco a través de una RNA metilasa.

Por otro lado, la proteína M es el factor de virulencia más importante de *S. pyogenes*, responsable de varios mecanismos antifagocíticos. Se ha observado que es más probable que la infección con un tipo M específico lleve a un resultado clínico específico. Por ejemplo, los tipos M de *S. pyogenes* asociados epidemiológicamente a enfermedades invasivas son los tipos M1, M3, M11, M12 y M28 siendo los M1 y M3 los más comunes.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina seleccionadas de más de 2800 aislamientos clínicos provenientes de distintas instituciones de salud, durante el año 2001-2013. Se determinó el fenotipo de resistencia y genotipo (genes *mefA*, *ermA* y *ermB*) y se correlacionó con el tipo M. Encontramos que el 92.1% de las cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina está asociada al gen *mefA* y que 34 de las 38 cepas presentan el tipo M75. La reducción en el número de cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina se observa relacionada con la disminución de las cepas de *S. pyogenes* tipo M75 en el periodo de estudio.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estreptococos

Los estreptococos fueron descritos por primera vez en 1879 por Louis Pasteur como una “cadena de cuencas” en una muestra vista al microscopio proveniente de un paciente que murió por sepsis puerperal; En 1903 fueron denominados genéricamente por Schottmüller como *Streptococcus haemolyticus* ⁽²⁵⁾.

El nombre del género *Streptococcus* proviene del latín *Strep*=cadena y *coccus*=cocos y comprende un grupo heterólogo de bacterias grampositivas. Varios estreptococos tienen importancia como parte de la microbiota normal en animales y humanos; algunos pueden causar un amplio espectro de enfermedades desde subagudas a agudas o crónicas ⁽⁵⁸⁾.

Asimismo los estreptococos han sido descritos en el Manual *Bergey* de Bacteriología Sistemática como bacterias de forma ovoide o esférica, de menos de 2 µm de diámetro, no esporuladas, grampositivas, catalasa negativas, anaerobias facultativas, con tendencia a formar cadenas o pareja. Son bacterias inmóviles que fermentan la glucosa produciendo ácido láctico. El contenido de guanina y citosina (G + C) del ADN genómico está entre 34 a 46 mol%. Las distintas especies del género *Streptococcus*, excepto *S. thermophilus*, crecen bien en medios enriquecidos con sangre de carnero, suero o carbohidratos, a 35-37°C, especialmente si son incubados en una atmósfera con dióxido de carbono (CO₂) al 5-7% ⁽³¹⁾. Algunas especies, incluso necesitan CO₂ para crecer, como *S. pneumoniae* y ciertos estreptococos de grupo *viridans*. En general, en agar sangre las colonias de los estreptococos no son pigmentadas. Algunas especies forman colonias grandes, mientras que otras forman colonias pequeñas (colonias puntiformes, menores de 0.5 mm de diámetro) ⁽⁵⁰⁾.

Clasificación

Tradicionalmente los estreptococos son clasificados por su morfología colonial, tipo de hemólisis, reacciones bioquímicas y por la especificidad serológica de los carbohidratos de su pared celular ⁽⁵⁹⁾. Con el desarrollo de la biología molecular se ha desarrollado una clasificación basada en la secuencia del gen *16SrRNA* de los estreptococos.

Clasificación por hemólisis

Una característica relevante utilizada para la clasificación de los estreptococos está basada en su comportamiento hemolítico observado alrededor de las colonias cuando estos son crecidos en placas de agar sangre. Esta clasificación propuesta por Brown en 1919 establece la denominación de “ β -hemólisis” cuando se observa una lisis completa de los eritrocitos alrededor de la colonia bacteriana, mientras que de “ α -hemólisis” se refiere a una hemólisis parcial que confiere una apariencia verdosa alrededor del crecimiento bacteriano (asociado con la reducción de la hemoglobina eritrocitaria), mientras que otros estreptococos no muestran reacción hemolítica denominándose no hemolíticos ⁽⁵⁹⁾.

Clasificación por pruebas bioquímicas

Una vez identificada la hemólisis, la reactividad negativa de la catalasa y su morfología microscópica ⁽⁵⁹⁾. Los estreptococos pueden clasificarse por especie mediante el uso de pruebas bioquímicas. Las siguientes pruebas resultan ser específicas para las especies de mayor importancia clínica.

- ❖ Susceptibilidad a la bacitracina 0.04 U: sólo *Streptococcus pyogenes* es incapaz de desarrollar a esta concentración del antibiótico ⁽⁴⁴⁾.
- ❖ Sensibilidad a la optoquina: útil para la identificación de *Streptococcus pneumoniae* pues en presencia de esta quinina el microorganismo no desarrolla ⁽⁴⁴⁾.
- ❖ Solubilidad en bilis: sólo *Streptococcus pneumoniae* presenta una ectoenzima autolítica (L-alanina muramilamidasas) que se activa en presencia de soluciones de sales biliares al 10%, causando la destrucción de las células neumocócicas, y la pérdida de turbidez de los cultivos líquidos puros de este microorganismo ⁽⁴⁴⁾.
- ❖ Prueba de CAMP: sólo *Streptococcus agalactiae* produce una proteína extracelular (factor de CAMP) que actúa sinérgicamente con la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* acentuando la zona de hemólisis producida por esta enzima ⁽⁴⁴⁾.
- ❖ Hidrólisis de hipurato de sodio: prueba que determina la actividad de la enzima hipuricasa producida sólo por *Streptococcus agalactiae* entre los estreptococos ⁽⁴⁴⁾.

Clasificación serológica

Asimismo los estreptococos son agrupados serológicamente con base a las diferencias antigénicas expresadas en el “carbohidrato C” de grupo (localizado en la pared celular), Lancefield estableció esta clasificación en 1938, actualmente se cuenta con al menos 18 grupos (del grupo A al V). La especificidad serológica del carbohidrato está determinada por un aminoglúcido ⁽⁵⁹⁾ (Tabla 1).

Tabla 1. Aminoglúcidos presentes en el “carbohidrato C” de cada grupo serológico ⁽⁷²⁾.

Grupo	Aminoglúcido
A	Ramnosa – N – acetilglucosamina
B	Polisacárido de ramnosa – glucosamina
C	Ramnosa – N- acetilgalactosamina
D	Ácido teicoico del glicerol (contiene D – alanina y glucosa)
F	Glucopiranosil – N – acetilgalactosamina
G	Ramnosa

Clasificación por secuencia del gen 16S rRNA

Con base a la secuencia del gen 16SrRNA, los estreptococos se clasifican en 5 grandes grupos ⁽⁵⁰⁾:

- 1) **Grupo piogénico.** Formado principalmente por especies β -hemolíticas, de colonias grandes, y que incluye especies que son patógenos importantes para el ser humano: *S. pyogenes* y *S. agalactiae*.
- 2) **Grupos mitis.** Incluye al patógeno neumococo (*S. pneumoniae*) y a otros estreptococos habituales de la cavidad oral, que producen α -hemólisis en agar sangre.
- 3) **Grupo anginosus o milleri.** Formado por especies que se encuentran en la cavidad oral humana, en el tracto genital y gastrointestinal, forman colonias de tamaño pequeño y característico olor a caramelo: *S. anginosus* y *S. constellatus*

- 4) **Grupo salivarius.** Incluye 3 especies de estreptococos genotípicamente relacionados, que normalmente se encuentran en la cavidad oral humana: *S. vestibularis*, *S. salivarius* y *S. thermophilus*. El último de ellos se relaciona con productos lácteos. Todos los miembros del grupo son Voges-Proskauer positivos y no fermentan la arginina, el manitol ni el sorbitol.
- 5) **Grupo bovis.** Formado por especies que principalmente habitan en el canal intestinal de los animales y que en ocasiones, infectan al humano. Pertenecen al grupo D de Lancefield: *S. equinus* y *S. alactolyticus*.

Además de estos cinco grupos, existe otro denominado “Grupo *mutans*” que engloba 8 especies que no están incluidas en los grupos mencionados anteriormente, y que son genéticamente diversas, aunque fenotípicamente similares. En este grupo hay especies relacionadas con la producción de caries dental. También existen estreptococos no incluidos en las denominaciones anteriores y poco conocidos por su escasa participación en infecciones en humanos como *S. hyovaginalis* ⁽⁵⁰⁾.

2.2 Streptococcus pyogenes

Streptococcus pyogenes también conocido como estreptococo del grupo A (EGA) causa infecciones en el humano que van desde leves, como faringitis e impétigo, hasta infecciones graves que comprometen la salud del paciente como fascitis necrotizante y síndrome de choque tóxico estreptocócico. Además infecciones recurrentes de este microorganismo pueden desencadenar enfermedades autoinmunes como: glomerulonefritis aguda post-estreptocócica, fiebre reumática aguda y cardiopatía reumática. En conjunto estas enfermedades representan más de medio millón de muertes por año a nivel mundial ⁽⁸²⁾.

2.2.1. Epidemiología

Streptococcus pyogenes coloniza superficies epiteliales, principalmente en garganta y piel, pero también coloniza otras superficies, como la vagina y el recto, desde donde puede causar una amplia gama de enfermedades superficiales, invasivas y autoinmunes ⁽⁸²⁾.

Las enfermedades más severas como síndrome de shock tóxico estreptocócico (SSTE) y fascitis necrotizante, cada una equivale del 6 al 7% de casos por *S. pyogenes*; en el mundo se calcula que causan aproximadamente 500, 000 muertes cada año ⁽²³⁾.

Con fines epidemiológicos las cepas de *S. pyogenes* son ahora comúnmente tipificadas mediante el análisis de la secuencia de la región variable del gen *emm* que codifica la proteína M, de la que hay más de 200 tipos *emm*. Estudios epidemiológicos a gran escala han demostrado una marcada diferencia geográfica y socioeconómica en la distribución de los tipos *emm*. En las sociedades industrializadas, un porcentaje significativo de aislamientos están restringidos a pocos tipos *emm*, los tipos *emm* 1, 3, 12 y 28 representan aproximadamente el 40% de los aislamientos clínicos; del mismo modo estos tipos *emm* son comúnmente aislados en portadores asintomáticos. Dichos tipos se aíslan con menos frecuencia en casos de enfermedad en África y rara vez se aíslan de las poblaciones indígenas en la región del Pacífico y en la India ⁽⁸²⁾. En México los tipos M predominantes son el M12 (19.7%), M1 (18.5 %) y M75 (13.9 %) según estudios realizados previamente en el Laboratorio de Epidemiología Molecular en el 2006 ⁽⁶⁰⁾.

2.2.2. Asociación del tipo M con el cuadro clínico presentado

Para la tipificación de la proteína M, se utiliza como auxiliares la amplificación del gen *sic* (factor de estreptococos que inhibe la lisis mediada por complemento) y del gen *sof* (factor de opacidad) ⁽⁷⁷⁾. La presencia del gen *sic* indica que la cepa presenta tipo M1 ⁽¹⁾, mientras que el gen *sof* ha sido asociado a tipos M específicos (entre otros M2, M4, M11, M12, M22, M28, M44, M48, M49, M75, M89, M90 y stG6) ^(21, 32, 67). Esta tipificación ha permitido hacer asociaciones significativas entre la frecuencia de aislamiento de cepas de *S. pyogenes* de ciertos tipos M (*emm*) con diferentes enfermedades causadas por *S. pyogenes* ⁽⁴¹⁾. Por ejemplo la asociación de los tipo M 1, 3, y 49 con enfermedades invasivas y los tipo M 2, 4, 6, 12, y 44/61 con enfermedades superficiales. Además algunos tipos M, como 1, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 24, 27, 29, 30, 32, y 41, han sido asociados con fiebre reumática aguda; los tipos M 1, 4, 12, 49, 55, 57, y 60 con glomerulonefritis aguda post-estreptocócica y el tipo M 28 a casos de sepsis puerperal ⁽⁴¹⁾.

2.2.3. Enfermedades asociadas a *Streptococcus pyogenes*.

Enfermedades superficiales asociadas a *Streptococcus pyogenes*. La gran mayoría de las enfermedades de *S. pyogenes* son infecciones superficiales de garganta y piel, estas son faringitis, fiebre escarlatina, impétigo y erisipela (Tabla 2). Las infecciones cutáneas por estreptococos del grupo A suelen ser atribuibles a los tipos M 49, 57 y del 59 al 61 y pueden anteceder a la glomerulonefritis y a veces a la fiebre reumática. ⁽¹¹⁾

Tabla 2. Principales características y tipos M de *S. pyogenes* asociados a enfermedades superficiales.

Enfermedades superficiales causadas por <i>Streptococcus pyogenes</i>			
Características	Epidemiología	Sintomatología y cuadro clínico asociado	Tipos M asociados
Faringitis			
Síndrome inflamatorio que involucra a la faringe y/o amígdalas ⁽⁵³⁾ .	Afecta a pacientes de todas las edades ⁽⁴²⁾ . A nivel mundial hay 600 millones de casos de faringitis por <i>S. pyogenes</i> ⁽⁸²⁾ .	Desarrollo de 48 a 96 horas después del contacto con <i>S. pyogenes</i> ⁽⁵⁹⁾ . Dolor de garganta, fiebre ⁽⁸¹⁾ , presencia de exudado purulento ⁽⁴²⁾ .	M1, M3, M5, M6, M12, M14, M17, M19, M24 ⁽⁸²⁾ .
Fiebre escarlatina			
Enfermedad infecciosa aguda, contagiosa ⁽⁵³⁾ .	Recientemente en Hong Kong y China ha habido brotes de fiebre escarlatina ⁽⁸²⁾ .	Erupción de color rojo, "lengua de fresa", con faringitis exudativa ⁽⁸²⁾ .	M2 ⁽⁶⁰⁾
Impétigo			
Dermatosis causada principalmente por <i>S. pyogenes</i> y, en ocasiones, por otros estreptococos o por <i>Staphylococcus aureus</i> ⁽⁵³⁾ .	Afecta principalmente a los niños, durante los meses cálidos. Más común en los países semitropicales o tropicales ⁽⁴²⁾ . 111 millones de casos Cada año ⁽⁸²⁾ .	Infección que afecta principalmente a cara, brazos y piernas ⁽⁵⁹⁾ . Aparecen pústulas cutáneas que maduran en costras de color miel ⁽⁸²⁾ .	M33, M41, M42, M52, M53, M70 ⁽⁸²⁾
Erisipela			
Infección dermoepidérmica de rápido avance ⁽⁵³⁾ .	Se observa en cualquier edad y sexo ⁽⁵³⁾ .	Eritema en cara, piel cabelluda y extremidades ⁽⁵³⁾ . Lesiones de bordes rosa y rojo con inflamación de nódulos linfoides ⁽⁵⁹⁾ .	No hay tipos M asociados

Enfermedades invasivas asociadas a *Streptococcus pyogenes*. Las enfermedades invasivas se derivan de la capacidad de *Streptococcus pyogenes* para migrar a sitios normalmente estériles, tales como el torrente sanguíneo y tejidos profundos. La interacción entre la respuesta inmune del huésped y el patógeno coordina la expresión de múltiples factores de virulencia de *S. pyogenes* que conduce a la destrucción del tejido, diseminación bacteriana e hiperinflamación. Las enfermedades invasivas van desde la forma menos grave (ejemplo celulitis) hasta enfermedades con altas tasas de mortalidad (fascitis necrotizante o síndrome de choque tóxico estreptocócico) (Tabla 3) ⁽⁸²⁾. Los serotipos de *S. pyogenes* asociados epidemiológicamente a enfermedades invasivas son los tipos M1, 3, 11, 12 y 28, siendo los tipos M1 y M3 los más comunes. Son características las cepas muy mucoides con la producción de algunas exotoxinas pirogénicas (particularmente la A) ⁽⁵⁹⁾.

Tabla 3. Principales características y tipos M de *S. pyogenes* asociados a enfermedades invasivas.

Enfermedades invasivas causadas por <i>Streptococcus pyogenes</i>			
Características	Epidemiología	Sintomatología y cuadro clínico asociado	Tipos M asociados
Bacteremia			
Es la presencia de <i>S. pyogenes</i> en el torrente sanguíneo ⁽⁸²⁾ .	Representa del 20 a 40% de los casos de enfermedad invasora ⁽⁸²⁾ .	Fiebre alta, náuseas, vómitos ⁽⁸²⁾ . Pacientes con fascitis necrotizante o SCTE desarrollan bacteriemia, ⁽⁵⁹⁾ .	No hay tipos M asociados
Celulitis			
Infección aguda de piel y tejido celular subcutáneo originada por <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>S. pyogenes</i> . ⁽⁵³⁾ .	Representa del 20 a 40% de los casos de enfermedad invasora ⁽⁸²⁾ . Se caracteriza por enrojecimiento y la inflamación de la piel ⁽⁸²⁾ .	Se presenta dolor, hipersensibilidad, edema y eritema. La lesión no está elevada y no está bien definida la línea entre el tejido afectado y el tejido sano ⁽¹¹⁾ .	No hay tipos M asociados

Tabla 4. Principales características y tipos M de *S. pyogenes* asociados a enfermedades invasivas. (Continuación)

Enfermedades invasivas causadas por <i>Streptococcus pyogenes</i>			
Características	Epidemiología	Sintomatología y cuadro clínico asociado	Tipos M asociados
Fascitis necrotizante			
Infección de fascias superficiales o profundas que recubren los músculos de una extremidad o del tronco ⁽⁴²⁾ .	Debido a la naturaleza rápidamente progresiva las tasas de mortalidad son altas ⁽⁸²⁾ . Excede al 50% ⁽⁵⁹⁾ .	Destrucción masiva del músculo y grasa a lo largo de los planos faciales ⁽⁵⁹⁾ . Provoca toxicidad sistémica, falla multi-orgánica y muerte ⁽⁵⁹⁾ .	M1, M3, M28 ⁽⁸²⁾ .
Síndrome de choque tóxico estreptocócico (SCTE)			
Semejante al causado por <i>Staphylococcus aureus</i> . En el SCTE se presenta bacteremia y la mayoría de los pacientes desarrolla fascitis necrotizante ⁽⁵⁹⁾ .	Tasa de mortalidad mayor al 30%, la mayor parte de los fallecimientos son secundarios a choque e insuficiencia respiratoria ⁽⁴²⁾ .	Fiebre alta, hipotensión de inicio rápido ⁽⁸³⁾ . La enfermedad progresa a choque y falla multi-orgánica (riñón, pulmones, hígado, corazón) ⁽⁸²⁾ .	M1, M3 ⁽⁸¹⁾ .

Enfermedades como secuelas inmunes por infecciones de *Streptococcus pyogenes*

La infección por *S. pyogenes* se asocia con varias afecciones inmunológicas que afectan a un conjunto diverso de órganos y tejidos, incluyendo el corazón, los riñones, las articulaciones, el cerebro, los ojos y la piel (Tabla 4) ⁽⁸²⁾.

Tabla 5. Principales características y tipos M de *S. pyogenes* asociados a secuelas inmunes.

Enfermedades inmunes como secuelas por infecciones de <i>Streptococcus pyogenes</i>			
Características	Epidemiología	Sintomatología y cuadro clínico asociado	Tipos M asociados
Fiebre reumática			
Enfermedad inflamatoria, no supurativa, es una complicación infecciones faríngeas ⁽⁵³⁾ .	Afecta principalmente a niños en países en desarrollo ⁽⁵⁴⁾ .	Se puede manifestar como una inflamación de las articulaciones, corazón, sistema nerviosos central, piel y/o nódulos subcutáneos ⁽⁸²⁾ .	M1, M3, M5, M6, M11, M12, M14, M17, M18, M19, M24, M27, M29, M30, M32, M41 ⁽⁸²⁾
Glomerulonefritis aguda post estreptocócica			
Lesiones proliferativas difusas de los glomérulos ⁽³⁶⁾ . La severidad varía desde la forma asintomática a falla renal aguda ⁽⁵⁹⁾ .	Se presenta en la infancia comienza 1 a 4 semanas de una faringitis o de 3 a 6 semanas de una infección cutánea ⁽⁵⁹⁾ .	Edema, hipertensión, alteraciones del sedimento urinario, deficiencia del complemento. Lesiones proliferativas difusas de los glomérulos ⁽³⁶⁾ .	M1, M4, M12, M49, M55, M57, M60 ⁽⁸²⁾ .

2.2.4. Patogénesis

Características de la superficie celular de *Streptococcus pyogenes*

La superficie celular de *S. pyogenes* es muy compleja. La pared celular está compuesta de unidades de repetición de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmúramico, que componen el peptidoglicano; ácido lipoteicoico; el carbohidrato C de grupo (N-acetil-β-D-glucosamina unido a ramnosa) y una variedad de proteínas de superficie, que incluyen a la proteína M; proteínas semejantes a M. Algunas cepas poseen una cápsula de ácido hialurónico. Algunos de los componentes superficiales como el carbohidrato C y la proteína M sirven para la identificación clínica y epidemiológica de la bacteria. Los diferentes serotipos M de *S. pyogenes* se basan en las diferencias antigénicas de la proteína M, sirviendo como un marcador epidemiológico de las infecciones ⁽⁷⁹⁾.

Adhesión: Para poder actuar como patógenos los estreptococos se deben adherir, colonizar e invadir tejido blanco. Para lograr una colonización eficaz, las bacterias unen sus adhesinas a los receptores localizados sobre las células blanco (hospedero), seguido de la estimulación de las vías de señalización intracelular para inducir la adherencia, colonización e invasión de las células epiteliales. La adhesión de los microorganismos al huésped representa la fase inicial en el desarrollo de una infección, regularmente comienza con la unión de la bacteria a componentes de la matriz extracelular de las células del tejido blanco ^(15, 56). Así pues entre los factores de virulencia que utiliza la bacteria se encuentran: estructuras de adhesión que inician el proceso de infección (Tabla 5), antifagocíticos que ayudan a la bacteria a evadir el sistema inmune del hospedero, aquellos que están implicados en la diseminación de la bacteria a través de los tejidos y los que se unen específicamente a componentes del huésped para degradarlo o dañarlo ⁽¹⁶⁾.

Tabla 6. Estructuras de adhesión de *Streptococcus pyogenes*.

Estructura	Función
Ácido lipoteicoico	Adhesión a la superficie celular del hospedero. Establece interacciones hidrofóbicas entre la bacteria y el hospedero ⁽⁸²⁾ .
Pili	Estructura proteica adhesión a epitelio de las amígdalas y queratinocitos, formación de microcolonias y biopelículas ⁽⁸²⁾ .
Proteína M	Unión a fibronectina, adhesión a queratinocitos y células epiteliales ⁽⁸¹⁾ .
Proteína F	Unión a fibronectina, principal adhesina que se une a células epiteliales de la faringe y la piel ⁽⁵⁹⁾ .

La unión a componentes de la matriz extracelular es una estrategia común utilizada por numerosos agentes patógenos para la colonización. Las adhesinas de la superficie celular pueden interactuar directamente con la fibronectina, colágeno y laminina ⁽⁸²⁾. La fibronectina es uno de los componentes de la matriz extracelular que es blanco común para los cocos Gram positivos, por si misma es responsable de la adhesión de sustratos en células eucariontes mediante factores específicos de superficie que forman parte de la familia de las integrinas. Interacciona con otros componentes de la matriz extracelular como colágeno y fibrina ⁽¹⁶⁾.

Factores de virulencia de *S. pyogenes* para diseminación de la bacteria.

La desoxirribonucleasas (DNAsa) de estreptococo han sido identificadas en cuatro variantes inmunogénicas (A-D) no son enzimas citolíticas, pero pueden despolimerizar DNA libre presente en el pus reduciendo la viscosidad del material en el absceso y facilitando su diseminación ⁽⁵⁹⁾.

La estreptocinasa o fibrolisina: promueve la degradación de los coágulos al convertir plasminógeno a plasmina ⁽⁵⁹⁾.

Tropismo tisular de *Streptococcus pyogenes*

La producción de adhesinas por *S. pyogenes* con funciones similares puede considerarse como un mecanismo de adaptación en diferentes entornos que permite a las bacterias colonizar con éxito diversos tejidos y sobrevivir durante el proceso de infección ⁽⁸²⁾. Numerosos estudios epidemiológicos apoyan la existencia de cepas de *S. pyogenes* que son trópicas de la garganta o de la piel, es decir ciertos serotipos M tienen una fuerte tendencia a causar infección de la garganta pero no infección superficial de la piel, mientras que otros serotipos M que a menudo se aíslan de casos de impétigo, rara vez se aíslan de casos de faringitis ⁽⁸²⁾.

Resistencia a los sistemas de defensa inmune del hospedero

Como un patógeno adaptado al humano, *S. pyogenes* es protegido por una variedad de factores de virulencia que se encuentran en su superficie celular o son secretados por la bacteria alterando las defensas del hospedero. Estos factores incrementan la resistencia a la fagocitosis, la deposición del complemento, opsonización de anticuerpos y a los mecanismos fagocíticos de los neutrófilos ⁽⁸²⁾. Con el fin de facilitar la invasión local y la diseminación sistémica *S. pyogenes* debe resistir los ataques opsonofagocíticos de los neutrófilos, que representan el principal mecanismo de defensa contra patógenos extracelulares. Este patógeno posee un amplio repertorio de factores de virulencia que juegan un papel crucial en la resistencia a la opsonofagocitosis, incluyendo: inhibidores del complemento (proteína M, cápsula de ácido hialurónico, y la proteína SIC), toxinas leucocidinas (estreptolisina O y S), enzimas que degradan inmunoglobulinas (IdeS, EndoS, y SpeB) ⁽⁸²⁾; Neutralización de los mecanismos de los neutrófilos, C5a peptidasa; y factores extracelulares como estreptolisinas y exotoxinas (Tabla 6).

Tabla 7. Factores de virulencia de *S. pyogenes* para evasión del sistema inmune del hospedero.

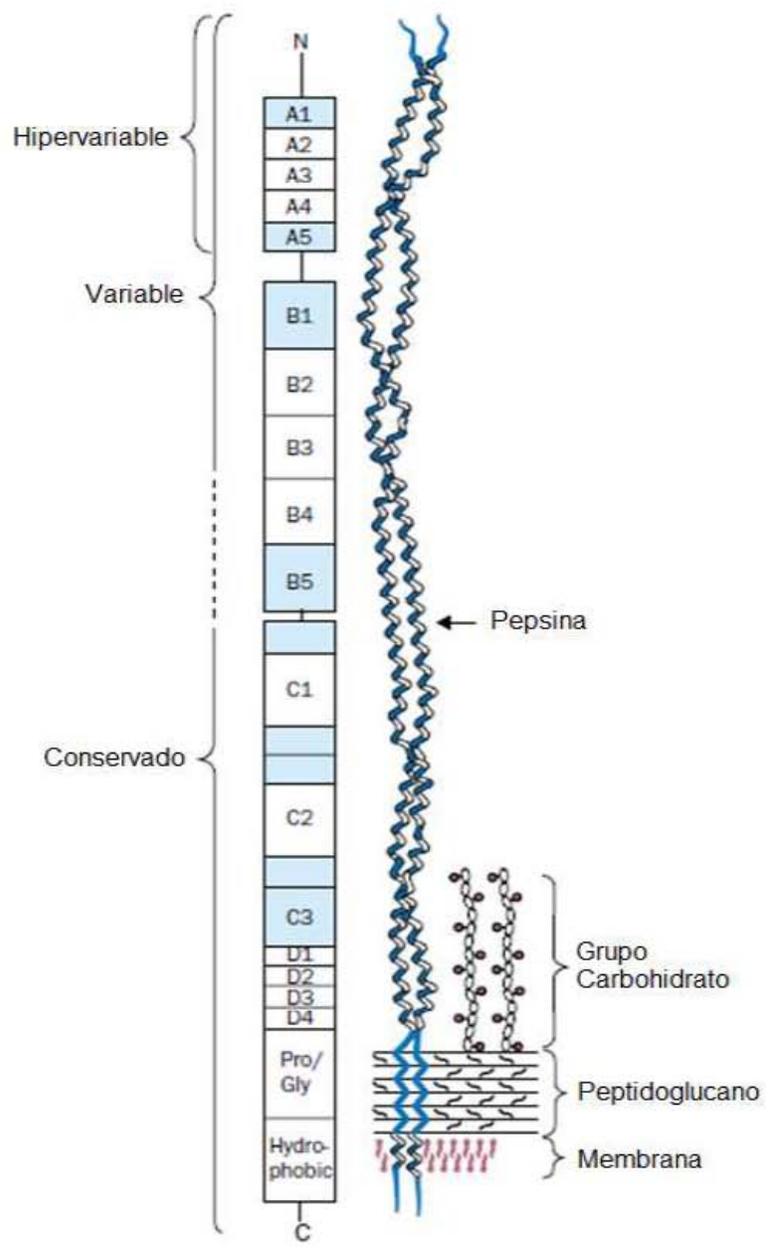
RESISTENCIA A LA DEFENSA DEL SISTEMA INMUNE		
Clasificación por función	Proteínas	Funciones
Resistencia a la opsonofagocitosis		
Inhibidores de la activación del complemento	Cápsula	Recubre a la bacteria bloquea el acceso de anticuerpos ⁽⁸¹⁾ .
	Proteína M	Impide la deposición de C3b ⁽⁸¹⁾ .
	Proteína SIC	Inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento ⁽⁸¹⁾ .
Leucocidinas	Estreptolisina O	Lisis de eritrocitos, plaquetas y leucocitos ⁽⁸¹⁾ .
	Estreptolisina S	
Enzimas que degradan a la inmunoglobulinas	Proteína IdeS	Se une al receptor CD16 de los neutrófilos, rompe la porción Fc de la inmunoglobulina G ⁽⁸¹⁾ .
	EndoS	Hidroliza inmunoglobulina G ⁽⁸¹⁾ .
	SpeB	Degrada inmunoglobulinas A y G ⁽⁸¹⁾ .
Neutralización de los mecanismos de los neutrófilos		
Degradación de quimioatrayentes	C5a peptidasa	Serin-proteasa que rompe del factor del complemento C5a, quimiotrayente de polimorfonucleares.
Factores extracelulares		
Exotoxinas	Estreptolisina O	Exotoxinas pirogénicas
	Estreptolisina S	Inactivación de péptidos antimicrobianos
Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas	SpeA	Actúan como superantígenos. Causan estados hiperinflamatorios en el hospedero.
	SpeC	
	SpeG	
	SpeM	

Proteína M

La proteína M localizada en la superficie celular es considerada el principal factor de virulencia *S. pyogenes* ⁽⁵⁴⁾. La proteína M está compuesta de dos cadenas polipeptídicas con configuración alfa-hélice, anclada en la membrana celular, atravesando la pared celular y apareciendo como fibras en la superficie celular (Figura 1) ⁽¹⁰⁾. Las cadenas están conformadas de bloques repetitivos de aminoácidos (nombrados A-D), cada uno difiere en tamaño y en la secuencia de los mismos. Esta periodicidad es característica de las proteínas con estructura secundaria tipo alfa-hélice como la tropomiosina de los mamíferos ⁽¹⁰⁾. La estructura del extremo carboxilo terminal (COOH-) de la proteína, está localizada entre la pared y la membrana celular, este extremo se encuentra altamente conservado entre las cepas de *S. pyogenes*. La porción amino terminal (-NH₂) de la proteína se extiende al ambiente terminando en aproximadamente 11 aminoácidos, dicha secuencia varía entre los diferentes aislamientos clínicos. Esta porción junto con el segmento de la región adyacente A, constituye la región hipervariable de la proteína M ⁽¹⁰⁾. Así la región amino terminal, es la más lejana a la célula y la más propensa a la unión de los anticuerpos, este dominio hipervariable se encuentra asociado con la identificación del serotipo M ⁽⁴⁸⁾. La principal defensa que tiene el humano en contra de una infección invasiva por *S. pyogenes* es la fagocitosis mediada por leucocitos polimorfonucleares (PMN), es por esto que la proteína M representa un factor de virulencia importante de *S. pyogenes*, ya que es un constituyente antifagocítico que impide la acción de los fagocitos y los PMN ⁽⁸⁴⁾.

La proteína M impide la opsonización, mediante su interferencia con la vía alterna del complemento ⁽¹⁰⁾. La proteína M se une al factor H, un componente regulatorio del sistema de control del complemento. Esta interacción puede favorecer la degradación del factor C3b impidiendo la unión del fragmento opsónico a la superficie bacteriana ⁽²⁷⁾. Los anticuerpos opsónicos dirigidos en contra de la porción hipervariable de la proteína M anula el mecanismo protector de la proteína, activando la vía clásica del complemento. Tales anticuerpos confieren inmunidad específica contra el tipo M bacteriano. Así un individuo que produce anticuerpos contra la proteína M tipo 1, puede permanecer susceptible a otros tipos M de *S. pyogenes*. Así la proteína M ofrece protección a la bacteria a través de la diversidad antigénica, ya que provee de superficies inmunológicamente diferentes para cada tipo M, evitando que *S. pyogenes* sea reconocido por anticuerpos generados contra un tipo M específico ⁽⁴⁸⁾.

Figura 1. Estructura de la proteína M6 de *S. pyogenes*. Los bloques A, B, C, y D señalan el lugar de secuencias repetitivas. Los bloques sombreados indican aquellos en los cuales la secuencia diverge de la secuencia consenso. Pro/Gly denota las regiones ricas en prolina y glicina probablemente localizadas en el peptidoglicano. La prolina en la posición 288 identifica la posición del sitio sensible a pepsina ⁽¹⁰⁾.



2. 3 Tratamiento de infecciones por *Streptococcus pyogenes*

La penicilina es el fármaco de primera elección para el tratamiento de infecciones por *S. pyogenes* y como segunda elección está la eritromicina y otros macrólidos para pacientes que

son alérgicos a los β -lactámicos ⁽³⁸⁾. La clindamicina, es la lincosamida más utilizada para el tratamiento en pacientes con infecciones en tejidos blandos ⁽³⁸⁾.

2. 4 Macrólidos

El termino macrólido incluye a los antibióticos que tienen un anillo lactónico multisustituído ⁽³⁰⁾. Su denominación como macrólidos proviene de su estructura, un anillo de lactosa macrocíclico, al que se van a unir uno o más desoxiazúcares. Podemos distinguir dos estructuras químicas comunes en ellos:

- ❖ Un anillo lactónico multisustituído, que posee generalmente un número par de átomos de carbono (12, 14, 16) cuyo sustituyentes son grupos metilos o hidroxilo.
- ❖ La presencia de uno a tres azúcares.

Comúnmente son utilizados contra especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Legionella* y algunas especies de *Corynebacterium* ⁽⁷⁸⁾. Se clasifican de acuerdo al número de carbonos que componen el anillo lactónico (Tabla 7) ⁽⁷⁸⁾.

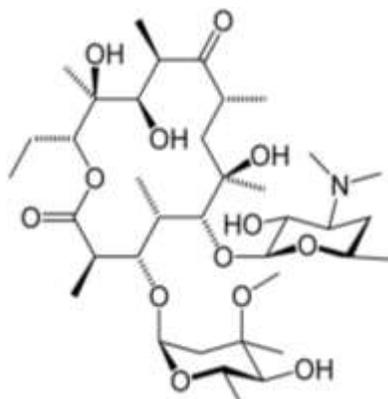
Tabla 8. Clasificación de los macrólidos de acuerdo al número de carbonos que componen el anillo lactónico.

14 carbonos	15 carbonos	16 carbonos
Eritromicina	Azitromicina	Espiramicina
Oleandomicina		Josamicina
Roxitromicina		Rokitamicina
Fluritromicina		Tiosina

2. 4. 1. Eritromicina

La eritromicina fue descubierta en 1952 por McGuire, en los productos metabólicos de una cepa bacteriana de *Streptomyces erythreus*. La claritromicina y la azitromicina son nuevos derivados semisintéticos de la eritromicina (Figura 2). La eritromicina es el antibiótico representativo del grupo de los macrólidos ⁽¹²⁾.

Figura 2. Estructura química de la eritromicina



Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas al unirse de manera reversible a las subunidades ribosómicas 50S de los microorganismos. La eritromicina inhibe el paso de la translocación en el que una molécula nueva de peptidil tRNA se desplaza del sitio aceptor del ribosoma al sitio donador en el ribosoma. Por lo tanto el proceso de elongación del péptido es interrumpido, deteniendo de forma reversible la síntesis de proteínas ⁽¹²⁾.

2.5 Resistencia a macrólidos en *Streptococcus pyogenes*

La susceptibilidad a la penicilina de *S. pyogenes* prácticamente se ha conservado por más de 50 años de su uso como tratamiento para la infección por *S. pyogenes* ⁽⁸²⁾. Sin embargo la resistencia a macrólidos ha ido incrementando en el mundo ⁽⁶⁹⁾. Este aumento que ha sido documentado en varios países, cuya incidencia varía ampliamente desde un 5% hasta un 60% de acuerdo con el país ⁽⁶¹⁾ (Tabla 8).

Tabla 9. Frecuencia de la resistencia a macrólidos en aislamientos de *Streptococcus pyogenes* en diferentes regiones del mundo ⁽⁸¹⁾.

ALTA		BAJA		AUSENTE
Polonia	42 %	Estados Unidos	6.9%	Indonesia
Hong Kong	28 %	Australia	4 %	Austria
Italia	25%	Suecia	4 %	Bélgica
Portugal	24%	Suiza	2.6 %	Reino Unido

2.5.1. Aspectos bioquímicos de la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS) en *Streptococcus pyogenes*.

En cocos Gram positivos, la expresión de la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS) puede ser constitutiva o inducible. Cuando es constitutiva, la cepa es resistente a todos los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (cMLS); si es inducible, la cepa es resistente solo a macrólidos de 14 y 15 miembros (iMLS) ⁽⁴⁰⁾.

Para la resistencia a macrólidos MLS, se han identificado tres mecanismos:

- 1) Modificación enzimática del antibiótico codificada por genes *ere*, *mph*, *lin* y *sat*.
- 2) Modificación del sitio blanco codificada por genes *erm*.
- 3) Activación de un sistema de expulsión de macrólidos codificada por el gen *mefA*.

En *S. pyogenes* las modificaciones enzimáticas del antibiótico no se han reportado como un mecanismo de resistencia en esta bacteria ⁽³⁴⁾. Mientras que los otros dos mecanismos de resistencia si se han descrito para *S. pyogenes* son: 1) Modificación del sitio blanco mediado por una metilasa resistente a la eritromicina (genes *erm*) que reduce la unión de los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS) a la subunidad ribosomal 50S ⁽⁴⁰⁾. Los genes *erm* frecuentemente confieren resistencia constitutiva (fenotipo de resistencia cMLS) pero también pueden codificar para resistencia inducible (fenotipo iMLS) ⁽⁶¹⁾ y 2) El segundo mecanismo es una bomba de expulsión selectiva de antibióticos conocidas también como transportadores *Efflux* (codificada por el gen *mefA*), el transportador *Efflux M* consiste en la formación de una proteína integral hidrofóbica de 44.2 KDa, cuya función es transportar y expulsar selectivamente macrólidos de 14 y 15 miembros ⁽⁸⁰⁾. Asimismo este genotipo es asociado con el fenotipo de resistencia M ⁽⁶¹⁾.

2.5.2. Importancia clínica de la resistencia a eritromicina en *Streptococcus pyogenes*

La resistencia a macrólidos en el mundo y su relación con el tipo M de *S. pyogenes*

Un programa de vigilancia a nivel mundial llevado a cabo de 1999 al 2000 reveló la heterogeneidad geográfica en la resistencia a los macrólidos ⁽⁸²⁾. Estudios realizados en Finlandia, España e Italia han mostrado una fuerte correlación entre el uso de macrólidos y la resistencia de *S. pyogenes*. Un rápido aumento en el porcentaje de cepas resistentes a macrólidos también puede deberse a la expansión clonal de una única cepa resistente. Muchos

países han instituido un uso más restrictivo de los macrólidos en respuesta a datos alarmantes de la alta resistencia a los macrólidos entre cepas de *S. pyogenes* ⁽⁸²⁾.

Estudios de resistencia en algunos países muestran una proporción alta de aislamientos que son positivos al gen *mefA* mientras que en otros países, los genes *erm* predominan, lo que lleva a los niveles más altos de resistencia a clindamicina. También hay variaciones temporales en la distribución de los fenotipos M, codificados por *mefA*, y los fenotipos codificados por los genes *erm* (iMLS y cMLS) dentro de la misma región geográfica ⁽⁸²⁾, situación que se ha presentado en China ⁽⁴¹⁾, España ⁽⁶⁴⁾ y Portugal ⁽⁶⁶⁾.

Asimismo estudios sobre la resistencia han mostrado que a pesar de que los elementos de resistencia a antibióticos en *S. pyogenes* son de origen diverso y de alta movilidad, (muchos son transferidos de cepa a cepa y a veces de otras especies diferentes de *S. pyogenes* por medio de recombinación de fagos), se ha observado relación entre el tipo M de las cepas y su resistencia a determinados antibióticos, como la resistencia a los macrólidos ⁽⁷⁶⁾.

Un ejemplo es la gran asociación entre la resistencia a eritromicina (y otros macrólidos) y los tipos M4, M5, M6 y M12, ya que estos serotipos son responsables de la alta incidencia en resistencia a macrólidos observada en EUA ^(34, 45, 47).

También estudios que se hacen a través del tiempo han mostrado que la disminución de la resistencia va correlacionada con la disminución de la prevalencia de un serotipo M en particular. En Korea se observó que en el año 2002 la resistencia a eritromicina era de 51 % y disminuyó a 9.8% en el 2004, paralelamente en estos mismos años la presencia del serotipo M12 bajo del 34.4% al 6.4%, siendo el 81% de los aislamientos de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina del tipo M12, mostrando una relación directa del tipo M con la resistencia a los macrólidos ⁽³⁸⁾. Otro estudio de la resistencia a macrólidos en Korea indica que está era del 44.8% en el 2002 disminuyendo posteriormente a 4.6% en el 2009, observando también un cambio en la distribución del serotipo M12, el cual disminuyó en esos mismos períodos del 28% al 3.4% ⁽³⁹⁾, relacionando así la disminución en la resistencia a eritromicina con la disminución de prevalencia del serotipo M en esa región. En México se ha reportado al genotipo *emm* 75 (M75) asociado a la resistencia a eritromicina en un 55% de aislamientos de este tipo M ⁽⁶¹⁾.

3. HIPÓTESIS

En cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* se espera que la incidencia de la resistencia a eritromicina se encuentre mayoritariamente asociada a la presencia del gen *mefA* y asociada al tipo M75. La disminución del número de cepas resistentes a eritromicina está relacionada directamente con la disminución en el número de cepas de *S. pyogenes* tipo M75.

4. OBJETIVO

Analizar el comportamiento de la resistencia a eritromicina en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico en México.

Objetivos particulares

- ❖ Evaluar la susceptibilidad antimicrobiana en 38 cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina a 9 antibióticos mediante la técnica de Kirby-Bauer.
- ❖ Determinar el alelo del gen *emm* mediante el análisis del RFLP en cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina.
- ❖ Determinar por PCR la presencia de los genes *speA* y *speC* en las cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina.
- ❖ Identificar los fenotipos de resistencia a eritromicina asociados a las cepas de *S. pyogenes*.
- ❖ Identificar los genes de resistencia a macrólidos que prevalecen en cepas clínicas de *S. pyogenes*.
- ❖ Asociación del fenotipo y genotipo de resistencia a eritromicina con el tipo M de *S. pyogenes*.
- ❖ Analizar los cambios en la resistencia a eritromicina en cuanto a su distribución de los genes de resistencia y el tipo M en cepas clínicas de *S. pyogenes* en el periodo de 2001-2013.

5. METODOLOGÍA

5.1 Origen de las cepas

A partir de una colección de más 2800 aislamientos clínicos de estreptococos β -hemolíticos provenientes de diferentes Hospitales e Instituciones de Salud Pública, se seleccionaron 38 cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina (Tabla 9).

Tabla 10. Instituciones de salud donde se aislaron las cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina.

INSTITUCION	Número de cepas
Hospital General de México, SS	1
Hospital General Gonzalo Castañeda, ISSSTE	15
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) hoy CENAVECE	3
Centro Médico Nacional 20 Noviembre, ISSSTE	1
Centro de Apoyo Diagnóstico San Rafael, ISSSTE	1
Instituto Nacional de Pediatría	5
Hospital Médica Sur	1
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, SS	1
Hospital Gabriel Mancera, IMSS	7
Hospital Adolfo López Mateos, ISSSTE	3

Adicionalmente se utilizaron como controles positivos 3 cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina, donadas por el Laboratorio de Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadá cada una con el correspondiente gen de resistencia (Tabla 10).

Tabla 11. Clave asignada por el laboratorio de las cepas control donadas por el laboratorio de Mount Sinai Hospital.

Clave origen	Gen de resistencia	Clave de la cepa
TIBDN 1005	<i>mefA</i>	502
TIBDN 3025	<i>ermA</i>	503
TIBDN 3328	<i>ermB</i>	504

Todas las cepas se mantienen conservadas en viales con 2 mL de caldo BHI y glicerol al 15% en ultracongelador (Revco®) a -70 °C. Las cepas seleccionadas se descongelaron y se sembraron en placas de gelosa sangre de carnero al 5% por estría de agotamiento, posteriormente se incubó de 18 a 24 horas a 37°C en un ambiente de velobiosis. Transcurrido el tiempo de incubación, se verificó la pureza de cada cepa, así como la beta-hemólisis para continuar con las pruebas de identificación.

5.2 Pruebas de identificación

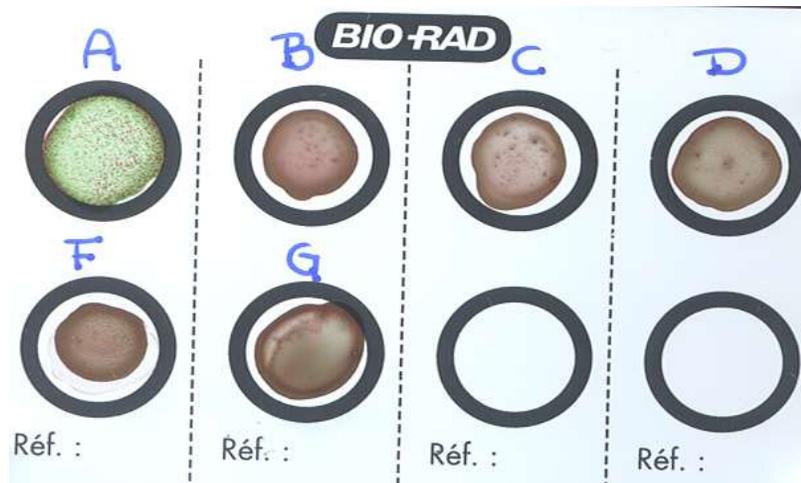
Confirmada la pureza de las cepas, se realizó la prueba de la bacitracina con cultivos puros de 24 horas. Sembrándose en placas de gelosa sangre colocando un disco de 0.04 U de bacitracina TIPIBACT A® (BIO-RAD®), se incubó de 18 a 24 horas a 37°C en un ambiente de velobiosis. La prueba se consideró positiva al observar un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de bacitracina ya que *S. pyogenes* es el único estreptococo β -hemolítico sensible a dicha concentración de bacitracina (Figura 3).

Figura 3. Prueba de la bacitracina para la identificación de *Streptococcus pyogenes*



La determinación del grupo de Lancefield se realizó mediante una prueba comercial de coaglutinación con partículas de látex (PASTOREX® STREP de BIO-RAD®). Un resultado positivo se manifiesta por la aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde después de un minuto de incubación (Figura 4).

Figura 4. Prueba positiva de coaglutinación para el grupo serológico A en cepas de *Streptococcus pyogenes*.



5.3 Prueba de susceptibilidad a diversos antibióticos

Cada una de las cepas de *S. pyogenes* se sembró en placas de agar sangre de carnero al 5% y se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C en un ambiente de velobiosis. Posteriormente se realizó una suspensión bacteriana en tubos con solución salina al 0.9% a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml equivalente al 0.5 en la escala de McFarland ajustada en un nefelómetro (BioMerieux®). La suspensión bacteriana fue sembrada en forma masiva con un hisopo estéril en placas de agar Mueller Hinton suplementado con sangre de carnero al 5%. Después se colocó el disco comercial (Oxoid®) impregnado con el antibiótico a probar siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinicas and Laboratory Standars Institute*, CLSI). Las placas se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C en un ambiente de velobiosis. La lectura del antibiograma se realizó midiendo con un vernier el diámetro del halo de inhibición (en milímetros) de crecimiento bacteriano alrededor del disco con antibiótico, clasificándolas como resistente o sensible de acuerdo a la especificación para cada antibiótico (Tabla 11).

Tabla 12. Concentración y criterios para determinar la susceptibilidad (CLSI) de los antibióticos utilizados para el antibiograma de las cepas de *S. pyogenes*.

Antibiótico	Concentración	Resistente	Intermedio	Susceptible
Ceftibuteno	30 µg			≥20*
Ceftizoxima	30 µg			≥29*
Cloranfenicol	30 µg	≤17	18-20	≥21
Eritromicina	15 µg	≤15	16-20	≥21
Levofloxacina	5 µg	≤13	14-16	≥17
Oxacilina	1 µg			≥17*
Penicilina	10 U			≥24
Quinupristina/dalfopristina	15 µg	≤15	16-18	≥19
Tetraciclina	30 µg	≤18	19-22	≥23
Vancomicina	30 µg			≥17

*Valores arbitrarios ⁽³⁷⁾.

5.4 Determinación del fenotipo de resistencia

Para la determinación del fenotipo de resistencia a eritromicina de las cepas de *S. pyogenes* se utilizó el método de difusión en agar establecido por el CLSI. Se realizó el mismo procedimiento del antibiograma con la diferencia de que sólo se utilizaron discos de clindamicina de 2µg (OXOID®) y de eritromicina de 15µg (OXOID®) separados a una distancia de 15 a 20 mm de borde a borde. Se buscaron los tres fenotipos de resistencia a eritromicina establecidos (M, iMLS y cMLS).

El fenotipo de resistencia tipo M muestra sensibilidad a clindamicina y su halo de inhibición no se ve interrumpido por la presencia de la eritromicina. En el fenotipo de resistencia inducible (iMLS) se observó un corte en el halo de inhibición de la clindamicina en la parte cercana al disco de la eritromicina (fenómeno en “D”). El fenotipo de resistencia constitutivo (cMLS) mostró resistencia a ambos antibióticos ^(68,73).

5.5 Extracción de DNA de cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina.

Para la extracción del DNA bacteriano se utilizó el kit comercial DNeasy® Tissue (QIAGEN®) con la siguiente metodología:

A partir de cultivos en Agar Sangre de 24 horas de las cepas de *S. pyogenes*, se inoculó de 2 a 3 colonias en caldo Todd-Hewitt incubando de 18 a 24 horas a 37°C en agitación. La suspensión bacteriana fue ajustada a una concentración de 2×10^9 células/mL.

De la suspensión bacteriana se transfirió 1mL a tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales se centrifugaron a 7,500 rpm durante 10 minutos en la microcentrifuga (SIGMA®), descartando el sobrenadante y obteniendo un concentrado celular para la extracción de DNA cromosomal.

El concentrado bacteriano se resuspendió en 180 µL de buffer de lisis con 20mg/mL de lisozima (Research Organics®) agitando vigorosamente y se incubó 30 minutos a 37°C. Se adicionó 25 µL de proteínasa K (20 mg/mL) y 200 µL de buffer AL se mezcló y se incubó en un baño seco (Multi-block Heater) a 70°C 30 minutos. Posteriormente se agregó 200 µL de etanol absoluto frío y se mezcló en un vórtex GENIE-2 (Scientific Industries). El contenido del tubo se transfirió a una columna de extracción y se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto, eliminando el sobrenadante del tubo de colecta. Se adicionó a la columna 500 µL de buffer de lavado AW1, y se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto, eliminando el líquido del tubo de colecta. Para un segundo lavado se le agregó a la columna 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó a 13,500 rpm durante 3 minutos, eliminando el líquido del tubo de colecta. Finalmente la mini columna se puso sobre un tubo eppendorf nuevo adicionando 200 µL de buffer de elución, incubando 1 minuto aproximadamente, y se centrifugó a 8000rpm durante 1 minuto para eluir el DNA; el DNA obtenido se almacenó en refrigeración para su posterior evaluación.

5.5.1. Evaluación del DNA extraído

Para evaluar la calidad del ADN extraído se realizó una electroforesis, preparando un gel de agarosa al 1.0% (Research Organics®) usando como revelador bromuro de etidio 10 mg/mL (Research Organics®). Se cargó 4 µL de muestra con 4 µL colorante en el gel de agarosa al 1% sumergido en buffer 0.5X de Tris-Boratos-EDTA (TBE). El gel se corrió en una cámara de electroforesis (Bio-Rad®) usando una fuente de poder (Bio-Rad® Power 300). Para visualizar las bandas de ADN se utilizó un transluminador de luz ultravioleta MacroVue UVis-20, capturando la imagen con una cámara digital DC290 Kodak y un Software Kodak 1D 3.5V.

5.6 Amplificación del gen *emm*

La amplificación del gen *emm* se llevó a cabo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando como blanco el ADN extraído de cada cepa en estudio.

❖ Primers:

Tabla 13. Secuencia de los primers utilizados en la PCR para determinar el gen *emm* asociado a la proteína M.

Gen	Primer	Secuencia	referencia	pb
<i>emm</i>	<i>emm1A*</i> (forward)	5'-GGA ATT CTA TTS GCT TAG AAA ATTA-3'	Whatmore, 1995. Beall. 1996	700 hasta 1600
	<i>emm1B</i> (reverse)	5'- GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT-3'		

pb = tamaño esperado del gen en pares de bases

Nota: *emm1A** es un primer degenerado, (S es un 50% de C y 50% de G)

❖ Reactivos

Las condiciones, volúmenes, concentraciones de reactivos y las temperaturas utilizadas en la PCR para el gen *emm* se tomaron de estandarizaciones previas realizadas en el laboratorio ⁽²⁸⁾. Para la mezcla de reacción se utilizaron los siguientes reactivos:

- Buffer 10X (Roche®) (Tris-HCl 100 mM, pH= 8.3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM)
- Desoxinucleótidos trifosfato 1.25 mM (dNTP's, Roche®)
- H₂O ultrapura estéril
- Taq DNA polimerasa 5 U/μL (Roche®)
- Dimetilsulfoxido (DMSO Pharmacia Biotech®)
- Iniciadores 10 mM (*emm1A**, *emm1B*)

Tabla 14. Composición de la mezcla de reacción para la PCR del gen *emm*
volumen_{FINAL}=50 µL

Reactivo	Volumen
Buffer 10X (Roche®)	5 µL
dNTP's 1.25 mM (Roche®)	8 µL
Primer <i>emm1A</i> * 10 mM	1 µL
Primer <i>emmB</i> 10 mM	1 µL
Taq polimerasa 5 U/µL (Roche®)	0.2 µL
DMSO (Pharmacia Biotech®)	0.2 µL
Agua Ultrapura	33.6 µL
DNA _{muestra}	1 µL

La PCR consta de 30 ciclos de reacción, un ciclo de denaturalización a 94°C por 5 minutos, con tres etapas: desnaturalización, alineamiento y elongación, y un ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos. La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®). Los 30 ciclos de reacción fue la etapa de desnaturalización, a 94°C por un minuto; alineamiento a 47°C por un minuto y finalmente en la etapa de elongación se usó una temperatura a 72°C por 1:20 minutos. Una vez completado los ciclos de reacción, la temperatura se bajó a 4°C para detener la reacción. El producto de la amplificación se evaluó mediante una electroforesis.

Revelado: La amplificación del gen se confirmó mediante un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 0.5X. Se corrieron las muestras usando 4 µL de cada una, así como 0.5 µg de marcador de Peso Molecular 100 pb (Gene Ruler® 100bp Ladder Plus, Fermentas®) a 90 volts durante 40 minutos, en cámara de electroforesis (BioRad®). Como revelador se utilizó bromuro de etidio 10 mg/mL (Research Organics®) utilizando una fuente de poder para electroforesis (Bio-Rad® Power 300) Los amplificados se visualizaron de la misma manera en que se observaron los productos de la extracción de DNA.

5. 7 Amplificación de los genes *sic* y *sof*

Adicional a la amplificación del gen *emm* se realizó una amplificación de los genes *sic* y *sof* con el objetivo de realizar un tamizaje en la identificación del tipo M, agrupando los pesos

moleculares del gen *emm* en orden creciente y considerando la presencia o no de los genotipos *sic* y *sof*.

❖ Primers

Tabla 15. Secuencia de los primers utilizados en la PCR dual para determinar los genes *sic* y *sof*.

Gen	Primer	Secuencia	referencia	pb
<i>sic</i>	<i>sic1</i> (forward)	5'-TAA GGA GAG GTC ACA AAC TA-3'	Perea-Mejía et al. 1997	1200
	<i>sic2</i> (reverse)	5'-TAA CGT TGC TGA TGG TGT AT-3'		
<i>sof</i>	<i>sof1</i> (forward)	5'-GTA TAA ACT TAG AAA GTT ATC TGT AGG-3'	Beall et al. 1996	700
	<i>sof2</i> (reverse)	5'-GGC CAT AAC ATC GGC ACC TTC GTC AAT T-3'		

pb = tamaño esperado del gen en pares de bases

❖ Reactivos

Las condiciones, volúmenes y concentraciones de reactivos además de las temperaturas utilizadas en la PCR dual de los genes *sic* y *sof* se tomaron de estandarizaciones previas realizadas en el laboratorio siendo igual que las utilizadas en la PCR del gen *emm* ⁽⁶³⁾.

Tabla 16. Composición de la mezcla de reacción para la PCR dual de los genes *sic* y *sof* volumen_{FINAL}=15 µL

Reactivo	Volumen
Buffer 10X (Vivantis®)	1.5 µL
dNTP's 1.25 mM (Roche®)	3 µL
Primer <i>sic</i> 1 10µM	0.4 µL
Primer <i>sic</i> 2 10µM	0.4 µL
Primer <i>sof</i> 1 10µM	0.4 µL
Primer <i>sof</i> 2 10µM	0.4 µL
Taq 5 U/µL Vivantis®	0.07 µL
MgCl ₂ 50 mM Vivantis®	1.0 µL
Agua Ultrapura	7.03 µL
DNA _{muestra}	0.8 µL

❖ Revelado

La amplificación de los genes se confirmó mediante un gel de agarosa al 1.7% en buffer TBE 0.5X utilizando el mismo procedimiento de revelado que para el PCR del gen *emm*.

5.8 Digestión enzimática de los productos de PCR del gen *emm* de cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina.

❖ Clasificación preliminar de las cepas

Para llevar a cabo la digestión enzimática del gen *emm* se clasificaron de acuerdo al resultado de la amplificación de los genes *sic* y *sof*.

Las cepas *sic* (+) se agruparon para confirmar el tipo M. Asimismo las *sic* (-) se agruparon con los siguientes criterios:

- a) De acuerdo a su genotipo si presentan el gen *sof* o no.
- b) Por orden creciente de peso molecular del gen *emm*.

Para obtener los pesos moleculares del gen *emm* de las cepas se utilizó el software Kodak® 1D 3.5v, con el que se analizó la fotografía digital de los amplificadores del gen *emm*.

❖ Digestión de los amplificadores del gen *emm*

Para la caracterización del gen *emm* se utilizó la enzima *Ddel* (Fermentas®), enzima de restricción que corta el DNA cuando reconoce la secuencia 5'GATNAG-3' (donde N puede ser cualquiera de los cuatro nucleótidos A, C, G, o T).

Tabla 17. Composición de la mezcla de reacción para la digestión de los amplificadores del gen *emm* volumen_{FINAL} = 40 µL

Reactivo	Volumen
Buffer Tango 10X (Fermentas®)	4.0 µL
Enzima <i>Ddel</i> 10 U/µL (Fermentas®)	0.2 µL
Amplificado del gen <i>emm</i>	35.8 µL

Los tubos con la mezcla de reacción (Tabla 16) para el corte enzimático se incubaron 37 °C toda la noche. El producto del corte de cada muestra se corrió en geles al 2% de agarosa 1000 (Ultra-pure, Invitrogen®) a 90 volts por 70 minutos, utilizando la misma fuente de poder,

marcador de peso molecular y revelador para los productos de PCR. Se utilizó la cámara de electroforesis (Bio-rad®), la cámara digital y el software utilizado para la visualización de los amplificados del gen *emm*.

❖ Clasificación de los patrones de restricción

Una vez obtenido el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen *emm*, o patrón de restricción resultante de la digestión enzimática se tomó una fotografía digital clasificando los patrones de restricción obtenidos comparando con los patrones realizados en el laboratorio de cepas de referencia proporcionadas por los CDC y de cepas clínicas tipificadas con anterioridad (28, 71).

5.9 Amplificación de los genes *speA* y *speC*

Para la caracterización de las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina se realizó la búsqueda de los genes que codifican para las toxinas pirogénicas SpeA y SpeC para ello se utilizó una PCR dual para la amplificación de estos genes con condiciones ya estandarizadas previamente en el laboratorio (62). Los primers utilizados para la reacción se muestran a continuación:

Tabla 18. Secuencia de los primers utilizados en la PCR dual para la amplificación de los genes *speA* y *speC*.

Gen	Primer	Secuencia	referencia	pb
<i>speA</i>	<i>speA</i> 1 (forward)	5'-ATG GAA AAC AAT AAA GTA TTG-3'	Musser 1993	700
	<i>speA</i> 2 (reverse)	5'-TTA CTT GGT GTT AGG TAG CTT C-3'		
<i>speC</i>	<i>speC</i> 1 (forward)	5'-ACC TAT CAT CAA AGT GAC TAT AAG AAA GAC -3'	Benssen 1999	550
	<i>speC</i> 2 (reverse)	5'-CCC TTC ATT TGG TGA GTC AAA TAA GTC TAT TTG A-3'		

pb = tamaño esperado del gen en pares de bases

Tabla 19. Composición de la mezcla de reacción para la PCR dual de los genes *speA* y *speC* volumen_{FINAL}=15 µL

Reactivo	Volumen
Buffer 10X (Vivantis®)	1.5 µL
dNTP's 1.25 mM (Roche®)	3.0 µL
Primer <i>speA</i> 1 10µM	0.15 µL
Primer <i>speA</i> 2 10µM	0.15 µL
Primer <i>speC</i> 1 10µM	0.15 µL
Primer <i>speC</i> 2 10µM	0.15 µL
Taq 5 U/µL (Vivantis®)	0.06µL
MgCl ₂ 50 mM (Vivantis®)	1.0 µL
Agua Ultrapura	8.14 µL
DNA _{muestra}	0.7 µL

❖ Revelado

La amplificación de los genes se confirmó mediante un gel de agarosa al 1.7% en buffer TBE 0.5X con el mismo procedimiento de revelado utilizado para el PCR del gen *emm*.

5.10 Amplificación de los genes asociados a la resistencia a macrólidos: *ermA*, *ermB* y *mefA*.

La presencia de los genes *ermA*, *ermB* y *mefA* asociados a resistencia a macrólidos fue evaluada en las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina mediante la técnica de PCR. Para ello se utilizaron volúmenes, concentraciones y temperaturas en la PCR que fueron estandarizadas previamente en el laboratorio, en las cuales se encontró que no había interferencias entre los productos de los genes *mefA* y *ermB* por lo que se realizó una PCR dual y una PCR individual para el gen *ermA* ^(68, 86).

Se utilizaron cepas de referencia de cada uno de los genes asociados a la resistencia que fueron donadas por el Laboratorio de Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadá (Tabla 19).

Tabla 20. Cepas de referencia de *S. pyogenes* para los genes asociados a la resistencia a macrólidos ^(18, 80).

Clave de la cepa	Gen de resistencia	PM de producto de PCR
502	<i>mefA</i>	1500 pb
503	<i>ermA</i>	208 pb
504	<i>ermB</i>	639 pb

❖ Primers

Tabla 21. Secuencia de los primers utilizados en la PCR para determinar los genes *mefA*, *ermB* y *ermA*.

Gen	Primer	Secuencia	referencia	pb
<i>mefA</i>	<i>mefA_F</i> (forward)	5'-CTA TGA CAG CCT CAA TGC G-3'	Clansy, 1996	1500
	<i>mefA_R</i> (reverse)	5'-ACC GAT TCT ATC AGC AAA G-3'		
<i>ermB</i>	<i>ermB_F</i> (forward)	5'-GAA AAA GRA CTC AAC CAA ATA -3'	Sutcliffe, 1996	639
	<i>ermB_R</i> (reverse)	5'-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC -3'		
<i>ermA</i>	<i>ermA₁</i> (forward)	5'-AGG TTA TAA TGA AAC AGA-3'	Seppälä, 1992	208
	<i>ermA₂</i> (reverse)	5'-GCA TGA CAT AAA CCT TCA -3'		

pb = tamaño esperado del gen en pares de bases

Tabla 22. Composición de la mezcla de reacción para la PCR dual de los genes *mefA/ermB* volumen_{FINAL}=30 µL

Reactivo	Volumen
Buffer 10X (Roche®)	3 µL
dNTP's 1.25 mM (Roche®)	5 µL
Primer <i>mefA_F</i> 10mM	1 µL
Primer <i>mefA_R</i> 10mM	1 µL
Primer <i>ermB_F</i> 10mM	1 µL
Primer <i>ermB_R</i> 10mM	1 µL
Taq 5U/µL (Roche®)	0.15 µL
Agua Ultrapura	16.85 µL
DNA _{muestra}	1 µL

Tabla 23. Composición de la mezcla de reacción para la PCR individual del gen *ermA* volumen_{FINAL}=30 µL

Reactivo	Volumen
Buffer 10X (Roche®)	3 µL
dNTP's 1.25 mM (Roche®)	5 µL
Primer <i>ermA₁</i> 10µM	1 µL
Primer <i>ermA₂</i> 10µM	1 µL
Taq 5U/µL (Roche®)	0.15 µL
Agua Ultrapura	18.85 µL
DNA _{muestra}	1 µL

Para el revelado de los productos se utilizó el mismo equipo y metodología de revelado, para la PCR dual de los genes *mefA/ermB* la concentración de agarosa fue de 1.5% y para la PCR del gen *ermA* fue de 1.7%.

5.11 Asociación del fenotipo y genotipo de resistencia con el tipo M

Finalmente se correlacionaron los resultados de la fenotipificación de la resistencia y la determinación de los genes de resistencia a macrólidos con los tipos M determinados en las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina. Así como se obtuvo información del comportamiento de la resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* del año 2001 al 2013.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Origen de las cepas

Se analizaron 38 cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina provenientes de diferentes fuentes hospitalarias del periodo 2001-2013. El origen clínico predominante de las cepas resistentes fue el exudado faríngeo (81.6%), seguido por el uretral (7.9%), otros aislamientos (10.5%) de los cuales algunos fueron obtenidos de secreciones abdominales y unos cuantos de cuyo origen se desconoce. Una situación similar se presentó en España, donde el 82.1% de las cepas resistentes a eritromicina son exudados faríngeos ⁽⁴⁹⁾.

6.2 Susceptibilidad antimicrobiana

La resistencia evaluada a 10 antibióticos mostro que las cepas *S. pyogenes* resistentes a eritromicina son susceptibles a los antibióticos evaluados a excepción de 3 cepas 7.9 % (3/38) que presentaron resistencia a tetraciclina, las cepas fueron la 185, 1033 y 2847. En *S. pyogenes* la resistencia a tetraciclina es conferida por los genes *tetM* o *tetO* ⁽²⁹⁾. Se ha reportado que los genes *erm* y *mef* asociados a la resistencia a eritromicina son acarreados con los genes *tet* por elementos móviles ⁽²⁹⁾. En nuestro estudio las cepas 185 y 1033 presentan el gen *ermA* mientras que la cepa 2847 presenta el gen *ermB*, todas resistentes a tetraciclina presentan el gen *tetO*, trabajo previo en el laboratorio ⁽²²⁾, se ha visto que el gen de resistencia a eritromicina *ermA* y el gen de resistencia a tetraciclina gen *tetO* frecuentemente se encuentran en aislamientos que presentan resistencia a ambos antibióticos esto ha sido documentado en Italia y Noruega ⁽⁵⁵⁾.

6.3 Aislamiento de DNA y amplificación del gen *emm*.

En la figura 5 se presenta un ejemplo de cómo se observaron los DNA´s extraídos mediante el kit de QIAGEN®.

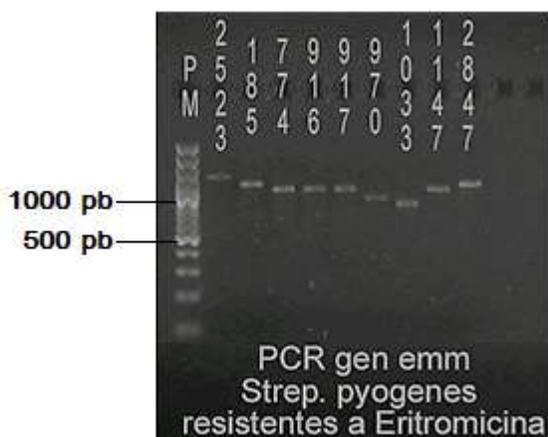
Figura 5. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% de la extracción de DNA en cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina.



En la amplificación del gen *emm* se observaron productos de PCR cuyo tamaño molecular varía de 800 a 1400 pb. Esta variación en el tamaño molecular está relacionada con las diferencias en el número y tamaño de las unidades de repetición en la porción del gen *emm* que codifica para la región A de la proteína M se asocia con el tipo de proteína M.

En la figura 6 se muestra un ejemplo de los amplificados del gen *emm* donde además de determinar el tamaño molecular se evaluó la calidad del amplificado para la realización de la digestión enzimática con la enzima de restricción *Ddel* y determinar por el análisis del alelo del gen *emm* (tipo M) por RFLP.

Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR del gen *emm* de *S. pyogenes* en gel de agarosa al 1.5%.



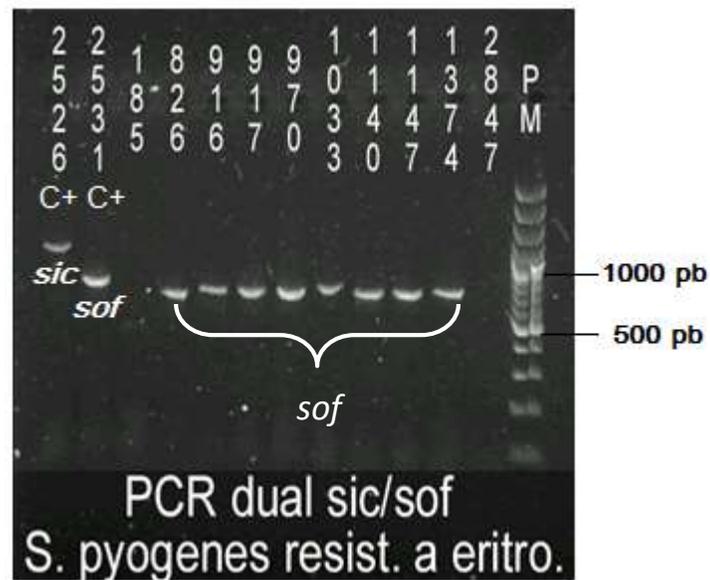
PM= Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Fermentas®). En los carriles del 2 al 9 el número asignado a cada cepa por el laboratorio.

6.4 Amplificación de los genes *sic* y *sof*

Para la identificación del tipo M se realizó una amplificación de los genes *sic* y *sof* con el objetivo de realizar un primer filtro ordenando de forma creciente los tamaños moleculares del gen *emm* y considerado la presencia del gen *sic* las cuales pertenecen al tipo M1 además de la presencia o no del gen *sof*. En la figura 7 se observa un ejemplo de las PCR's realizadas para la identificación de los amplificados de los genes *sic* y *sof* por el peso molecular que presentaban de acuerdo a los controles positivos utilizados en el laboratorio para cada gen. Ninguna cepa dio positivo para el gen *sic*, lo cual se confirmó posteriormente cuando se demostró que ninguna cepa pertenece al tipo M1. Todas las cepas resistentes presentaron el

gen *sof* con excepción de la cepa 2748 que dio negativo para ambos genes y que por medio del RLFP se clasificó como M6.

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% para los genes *sic/sof* en cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina.



En los dos primeros carriles se observan los controles positivos para cada gen y en el último carril se encuentra el marcador de Peso Molecular de 100 pb (Fermentas). Arriba en la imagen el número asignado a cada cepa por el laboratorio.

6.5 Análisis de la digestión de los productos de PCR del gen *emm*

A partir de la digestión enzimática de los productos de PCR del gen *emm* se llevó a cabo el análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando los patrones obtenidos de cepas de referencia de los diferentes tipos M. El agrupamiento de las cepas resistentes con base al peso molecular del gen *emm* amplificado y el genotipo *sof* facilitó obtener el patrón de restricción, en la figura 8 se observan los diferentes patrones obtenidos. En la tabla 23 se observa que el 89.5% (34/38) de las cepas son M75 así como los otros tipos M encontrados en las cepas resistentes.

Figura 8. Gel de agarosa al 2.5% donde se muestran algunos RFLP's del gen *emm*. Se indican los tipos M identificados. Las cepas 502C, 503C y 504C son cepas controles para los genes de resistencia a eritromicina; PM= marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®)

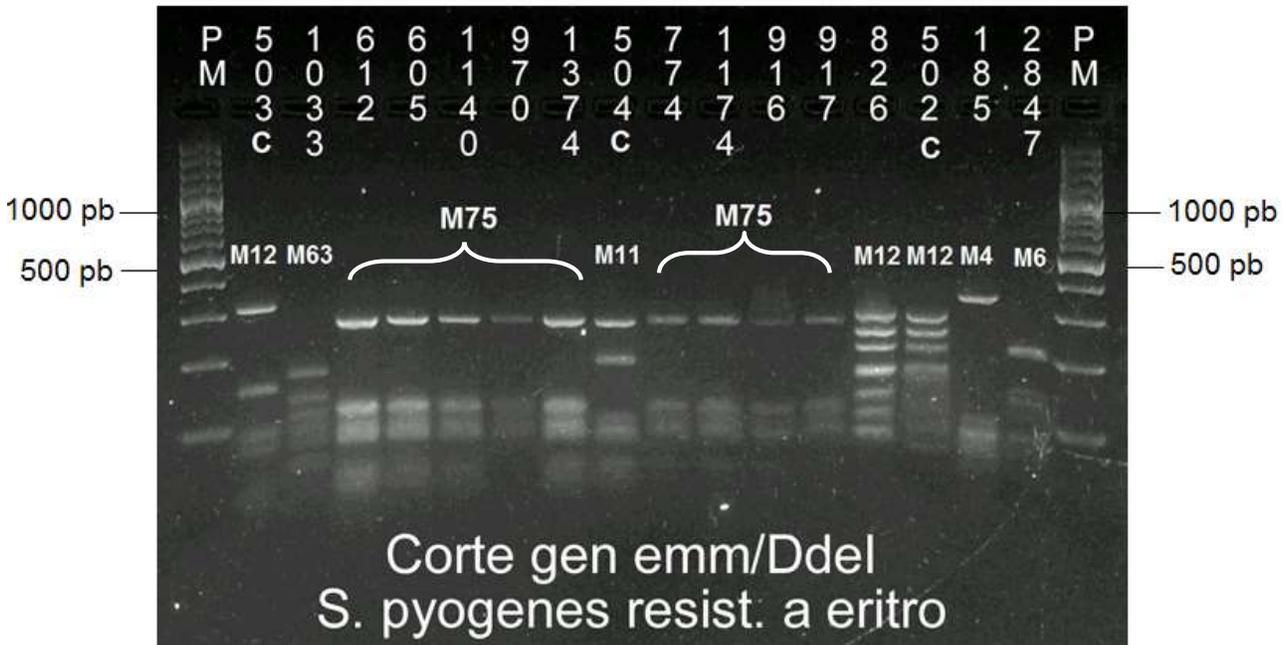


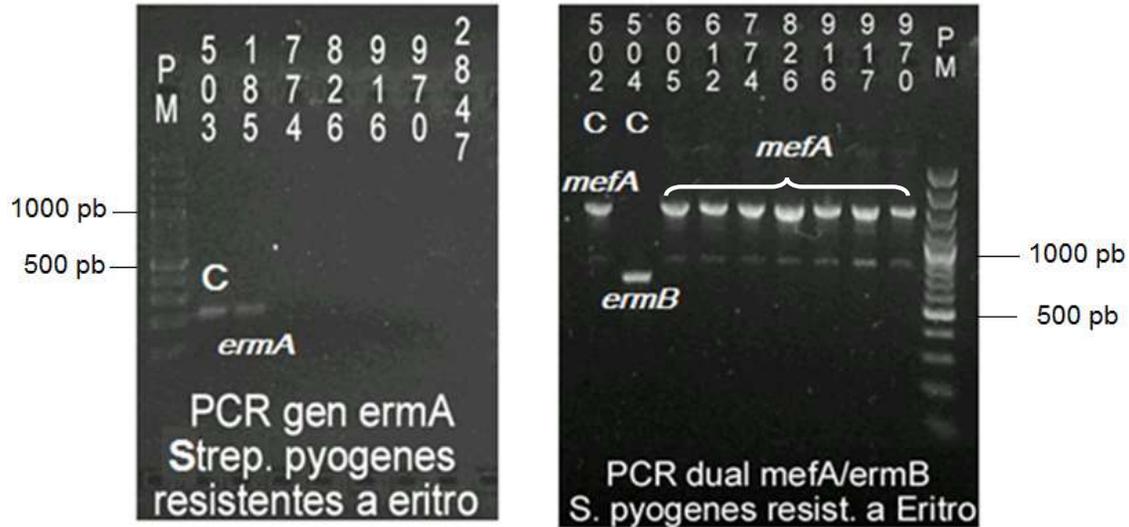
Tabla 24. Frecuencia de tipos M de cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina.

Tipo M	% de cepas resistentes
M75	89.5% (34/38)
M4	2.5% (1/38)
M6	2.5% (1/38)
M12	2.5% (1/38)
M63	2.5% (1/38)

6.6 Amplificación de los genes asociados a la resistencia a macrólidos

Para determinar el mecanismo de resistencia a macrólidos en las cepas de *S. pyogenes* se realizó la PCR en la búsqueda de los genes *mefA*, *ermA* y *ermB*. En la figura 9 se muestra un ejemplo de la amplificación de cada gen.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los productos de PCR individual del gen *ermA* y el PCR dual *mefA/ermB*.



Cepa 502 control del gen *mefA*, cepa 503 control del gen *ermA*, cepa 504 control del gen *ermB*
 PM=marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®). Arriba en la imagen se encuentra el número asionado a cada cepa por el laboratorio.

En la tabla 24 se muestra que 35 de las 38 cepa presentan el gen *mefA* que resultó ser el genotipo de resistencia con mayor presencia con el 92%, otro estudio en México muestra un 95% ⁽⁸¹⁾ para este gen. La predominancia del mecanismo de resistencia a eritromicina de *S. pyogenes* (identificado por el genotipo) varía en diferentes áreas geográficas ⁽¹⁷⁾. Estudios realizados en España y Taiwán encontraron al gen *mefA* asociado en un 90% ⁽⁷²⁾ y 53% ⁽¹⁷⁾ respectivamente. Asimismo en Alemania ningún genotipo es predominante ⁽²⁶⁾.

Tabla 25. Genes de resistencia a eritromicina en cepas de *S. pyogenes*.

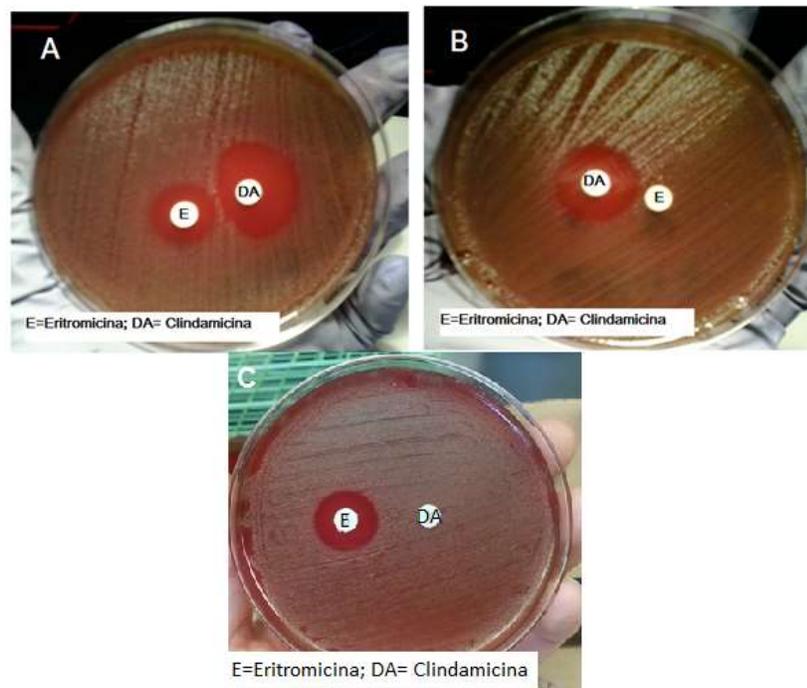
Gen de resistencia	Porcentaje
<i>mefA</i>	92%(35/38)
<i>ermA</i>	5% (2/38)
<i>ermB</i>	3% (1/38)

6.7 Determinación de fenotipo de resistencia a macrólidos

El fenotipo de resistencia a macrólidos (eritromicina-clindamicina) de las cepas de *S. pyogenes* se determinó por el método Kirby-Bauer de acuerdo con el CLSI, en la figura 10 se presentan ejemplos de los fenotipos de resistencia iMLS , M y cMLS, en el fenotipo de resistencia

inducible (iMLS) (Figura 10A) se observa un corte en la zona de inhibición de la clindamicina por la presencia de la eritromicina y en el fenotipo de resistencia M (Figura 10B) muestra sensibilidad a clindamicina y su halo no se vio interrumpido por la presencia de la eritromicina. El fenotipo constitutivo (cMLS) encontrado en la cepa 2847 tiene resistencia a eritromicina y clindamicina (Figura 10C).

Figura 10. Determinación del fenotipo de resistencia a eritromicina en Agar Mueller-Hinton con 5% de sangre para la determinación del fenotipo de resistencia. A) fenotipo inducido (iMLS) , B) fenotipo M y C) fenotipo constitutivo (cMLS).



La tabla 25 muestra la distribución del fenotipos de resistencia en la cual el fenotipo predominante fue el fenotipo M; este predominio también se ha encontrado en algunos países como Chile con 80% ⁽⁷⁰⁾, España con 58.9% ⁽⁶⁴⁾ y en Italia con 63% ⁽⁸⁾ por el contrario en Corea se muestra al fenotipo cMLS con 87.5% ⁽³⁸⁾ mientras que en Alemania los fenotipos son similares ⁽²⁶⁾. La distribución de fenotipos macrólidos de *S. pyogenes* puede está influenciada por la variación geográfica ⁽³⁸⁾.

Tabla 26. Fenotipo de resistencia a eritromicina en cepas de *S. pyogenes*.

Gen de resistencia	Porcentaje
M	92%(35/38)
iMLS	5% (2/38)
cMLS	3% (1/38)

6.8 Relación entre fenotipos y genotipos de resistencia a eritromicina en cepas de *Streptococcus pyogenes*.

La tabla 26 muestra el fenotipo de resistencia encontrado por la prueba de doble disco y el gen asociado determinado por PCR en las 38 cepas resistentes. Todas las cepas poseen el gen de resistencia concordante al fenotipo, ya que el fenotipo de resistencia M está asociado al gen *mefA*, en tanto que el fenotipo cMLS se asocia al gen *ermB* y el fenotipo iMLS está asociado a la presencia del gen *ermA* ⁽³³⁾.

Tabla 27. Relación entre fenotipos y genotipos de resistencia a eritromicina en cepas de *S. pyogenes*.

		GENOTIPO		
		<i>mefA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>
FENOTIPO	M	35		
	iMLS		2	
	cMLS			1

6.9 Comparación entre fenotipos y genotipos de resistencia con el tipo M de las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina.

La importancia de relacionar el tipo M con los resultados del fenotipo y del genotipo de las cepas resistentes a eritromicina está en el establecimiento de un patrón de resistencia dentro de las cepas clínicas de nuestra población, generando criterios sobre el tipo de cepa que se asocia con los genes de resistencia a macrólidos. En la tabla 27 se muestra el fenotipo y genotipo de resistencia a eritromicina asociado a cada cepa de *S. pyogenes* así como el tipo M de la cepa resistente.

Tabla 28. Asociación entre el fenotipo y genotipo de resistencia a macrólidos y el tipo M determinado en cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina utilizadas en el estudio.

Clave	Fenotipo	Gen de resistencia			Tipo M
		<i>mefA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	
502*	M	+	-	-	M12
503*	iMLS	-	+	-	M22
504*	cMLS	-	-	+	M11
151	M	+	-	-	M75
181	M	+	-	-	M75
183	M	+	-	-	M75
185	iMLS	-	+	-	M4
199	M	+	-	-	M75
203	M	+	-	-	M75
204	M	+	-	-	M75
222	M	+	-	-	M75
223	M	+	-	-	M75
225	M	+	-	-	M75
227	M	+	-	-	M75
259	M	+	-	-	M75
270	M	+	-	-	M75
289	M	+	-	-	M75
567	M	+	-	-	M75
569	M	+	-	-	M75
572	M	+	-	-	M75
597	M	+	-	-	M75
603	M	+	-	-	M75
605	M	+	-	-	M75
612	M	+	-	-	M75
633	M	+	-	-	M75

*cepas de referencia para los genes *mefA*, *ermA* y *ermB*

Tabla 27. Asociación entre el fenotipo y genotipo de resistencia a macrólidos y el tipo M determinado en cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina. (Continuación)

Clave	FENOTIPO	Gen de resistencia			Tipo M
		<i>mefA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	
653	M	+	-	-	M75
665	M	+	-	-	M75
723	M	+	-	-	M75
793	M	+	-	-	M75
732	M	+	-	-	M75
750	M	+	-	-	M75
774	M	+	-	-	M75
826	M	+	-	-	M12
916	M	+	-	-	M75
917	M	+	-	-	M75
970	M	+	-	-	M75
1033	iMLS	-	+	-	M63
1140	M	+	-	-	M75
1147	M	+	-	-	M75
1374	M	+	-	-	M4
2847	cMLS	-	-	+	M6

En diversos estudios se ha visto que el genotipo de resistencia a eritromicina y el tipo *emm* están estrechamente relacionados ⁽³⁸⁾; la mayoría de estos estudios han demostrado una distribución de la resistencia asociada a ciertos tipos *emm* de *S. pyogenes* ⁽⁶¹⁾. La tabla 27 muestra que la mayoría de las cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina tienen el tipo M75 (89.5%), los tipos M que también están relacionados con la resistencia a eritromicina son M4, M6, M12 y M63 con 2.5%; la tabla 23 esta ordenada de acuerdo al número asignado por el laboratorio al momento de la recepción de la cepa, por lo cual las últimas dos cepas resistentes son del tipo M4 y M6 que nos da un indicio de que las cepas con el tipo M75 y que son resistentes a eritromicina han disminuido su aparición conforme ha ido transcurriendo los años. Por otra parte la tabla 23 nos muestra que el mecanismo de resistencia a eritromicina

más común en nuestras cepas de *S. pyogenes* es el mecanismo de expulsión a través del transportador *efflux* M, codificado por el gen *mefA* (92.1%), el mecanismo de modificación ribosomal, codificado por los genes *ermA* y *ermB*, solo está en el 7.9% (3/38) de las cepas estudiadas así la cepa más reciente (cepa 2847) presenta este mecanismo.

Igualmente en la tabla 28 se muestra que de las 38 cepas resistentes a eritromicina el 92% (35/38) resultaron positivas el gen *mefA* y de ese grupo 34 de 35 (97%) tienen el tipo M75. En España los tipos M asociados a cepas resistentes a eritromicina son los tipos M4, st1815 y M75 ⁽²⁾.

Tabla 29. Distribución de los tipos M de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina y su asociación con el genotipo y el fenotipo de resistencia observado.

tipo M (# cepas)	<i>mefA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	fenotipo
M75 (34)	+	-	-	M
M12 (1)	+	-	-	M
M4 (1)	-	+	-	iMLS
M63 (1)	-	+	-	iMLS
M6 (1)	-	-	+	cMLS
Total	92.1%	5.2%	2.7%	

A diferencia de nuestro estudio, donde la asociación principal entre la resistencia a macrólidos y el tipo M de *S. pyogenes* está dada por el tipo M75 con el gen *mefA*, en otros países como en Corea las cepas resistentes a eritromicina están principalmente relacionadas con los tipos M12 y M77 con un 81% y 60%, respectivamente, todas con el genotipo *ermB* y fenotipo cMLS ⁽³⁸⁾. En Japón los aislamientos resistentes a eritromicina tiene el tipo M12; estos aislamientos presentan el gen *ermB* ⁽⁵¹⁾. En Francia las cepas de *S. pyogenes* tipo *emm28* y *emm11* resistentes a macrólidos presentan el gen *ermB* ⁽⁸⁾. En Portugal se encontraron los tipos M12 y M28 ligados a la resistencia a la eritromicina ⁽⁷⁶⁾.

6.10 Comportamiento de la resistencia a eritromicina en cepas de *Streptococcus pyogenes* aislados en México del 2001-20013.

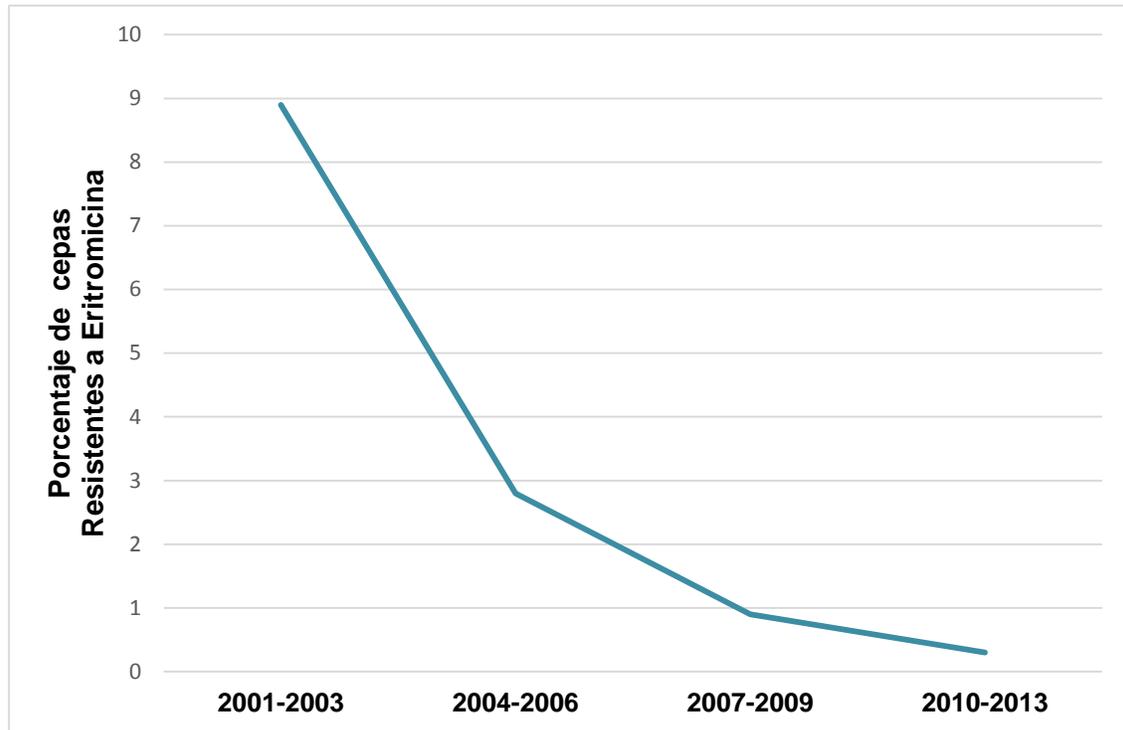
Se realizó un análisis de las cepas recibidas en el laboratorio a lo largo de 13 años para analizar la frecuencia de resistencia a eritromicina, las cepas se agrupan por periodos de dos años para observar mejor el comportamiento. En la tabla 29 se muestra el número de cepas de *S. pyogenes* recibidas en cada periodo y el número de cepas resistentes a eritromicina, observándose una disminución gradual del porcentaje de cepas resistentes a través del periodo 2001-2013.

Tabla 30. Distribución de cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina durante el periodo 2001-2013 en México.

Periodo	# cepas <i>S. pyogenes</i>	# cepas resistentes a eritromicina	Porcentaje
2001-2003	304	27	8.9%
2004-2006	321	9	2.8%
2007-2009	111	1	0.9%
2010-2013	345	1	0.3%

A continuacion en la figura 11 se observa de manera gráfica la disminución de la resistencia a eritromicina en cepas de *S. pyogenes* analizadas desde el año 2001-2013, los tipos M de las cepas resistentes a eritromicina se distribuyen de la siguientes frecuencias: del año 2001- 2006 se aislaron cepas M75, M12 y M63 y en el periodo 2007-2013 solo se aislaron cepas de tipo M4 y M6.

Figura 11. Porcentaje de cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina durante el periodo 2001-2013



En nuestro estudio se observa una disminución de la resistencia a eritromicina, esta tendencia se ha observado en otros países como en Chile con 3.5% ⁽⁷⁰⁾, Corea con 4.6% ⁽³⁷⁾, en los Estados Unidos 6.9% ⁽⁸²⁾, Australia con 4% ⁽⁸²⁾, Turquía con 1.9% ⁽⁸²⁾, Suecia con 4% ⁽⁸²⁾, Suiza con 2,6% ⁽⁸²⁾, en Serbia con 6.8% ⁽⁸²⁾ y Rumania con 5% ⁽⁸²⁾. En contraste con altos niveles de resistencia reportados en China con 96.8% ⁽⁸²⁾, Polonia con un 42%, Portugal con 24% ⁽⁸²⁾, en Hong Kong ⁽⁸²⁾, con 28% e Italia con 25% ⁽¹³⁾.

Estas diferencias pueden deberse a las distintas tendencias en el consumo de antibióticos ⁽⁶⁹⁾, hay estudios que demuestran correlación entre el consumo de antibióticos y los niveles de resistencia ⁽³⁾. Muchos países han instituido un uso más restrictivo de los macrólidos en respuesta a informes alarmantes de las altas tasas de resistencia a los macrólidos entre cepas de *S. pyogenes* ⁽⁸²⁾. En México en el año de 2010 la Secretaria de Salud dispuso la venta y dispensación de antibióticos con receta médica además de que la tendencia en el uso a macrólidos en especial a la eritromicina va a la baja ⁽⁴⁾. En países como España, Francia y Chile se propone que la disminución de la resistencia en *S. pyogenes* a la eritromicina se debe a las restricciones implementadas para su venta ^(24, 49, 70).

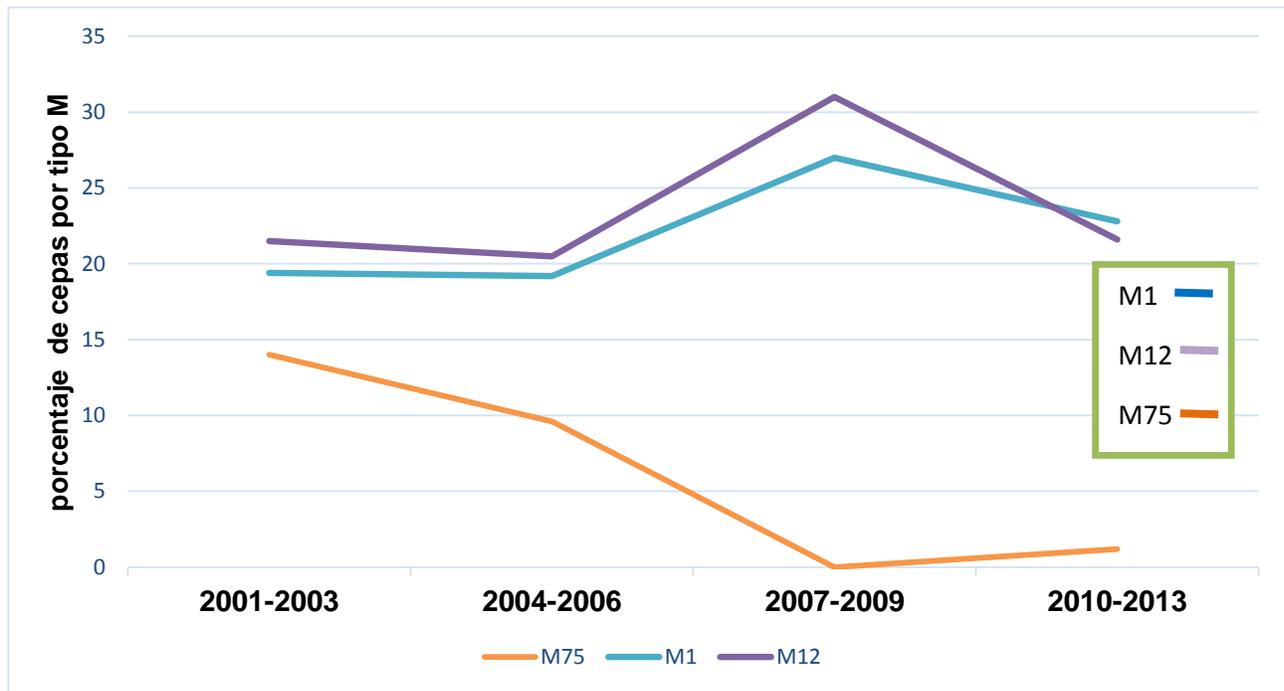
En nuestro caso de estudio la resistencia a eritromicina disminuye de la misma manera que la presencia de cepas tipo M75, similar al reportado en Corea del Sur, donde la prevalencia de cepas de *S. pyogenes* resistentes a macrólidos se redujo de 44.8% en 2002 a sólo 4,6% en 2009, y en donde la disminución fue probablemente por la reducción en la prevalencia de una cepa resistente de *S. pyogenes* tipo M12 y no a la disminución en el uso de macrólidos ⁽⁸²⁾.

Realizamos un análisis de la frecuencia de los 3 principales tipos M reportados en el periodo 2001-2003 que fueron M1, M12 y M75 que juntos suman más del 50% de los aislamientos de *S. pyogenes*. En la tabla 30 y la figura 12 se observa la tendencia de los tres principales tipos M, los tipos M1 y M12 han mantenido una tendencia constante durante el periodo 2001-2013 en contraste con M75 donde se observa una disminución en el número de cepas.

Tabla 31. Distribución y porcentaje de los tipos M1, M12 y M75 de *S. pyogenes* determinados durante el periodo 2001-2013 en México.

Periodo	#cepas tipificadas	#cepas M75	%cepas M75	#cepas M1	%cepas M1	#cepas M12	%cepas M12
2001-2003	278	39	14.0%	54	19.4%	60	21.6%
2004-2006	302	29	9.6%	58	19.2%	62	20.5%
2004-2006	74	0	0.0%	20	27.0%	23	31.1%
2010-2013	249	3	1.2%	57	22.9%	54	21.7%

Figura 12. Porcentaje de frecuencia de cepas de *S. pyogenes* de los tipos M1, M12 y M75 durante el periodo 2001-2013



En nuestro estudio la disminución en el número de cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina puede relacionarse con la disminución en la frecuencia de aislamientos del tipo M75 observada durante el mismo periodo de estudio, en donde los tipos M1 y M12 se mantienen con las frecuencias más elevadas en este periodo, en contraste con M75 que en los años 2001-2003 se encontraba en el tercer lugar de frecuencia (Figura 11). Se ha documentado una asociación entre ciertos tipos M y la resistencia a los macrólidos ⁽⁷³⁾. En España se ha asociado cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina con los tipos M4, st1815, M12 y M75 ⁽²⁾. En Portugal se asocia a los tipos M12, M77 y M4 ⁽⁴⁸⁾. En Italia los tipos M asociados a cepas resistentes a macrólidos son M4, M22 y M89 ⁽⁸³⁾. En Corea del Sur al tipo M12 ⁽⁸²⁾. En nuestro estudio se muestra que la disminución en la resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* está relacionado con la baja frecuencia de aislamiento de cepas del tipo M75 y esta resistencia es asociada con la presencia del gen *mefA* como principal mecanismo de resistencia. Estos datos podrían indicar que la proteína M funciona, directa o indirectamente, como barrera para el intercambio horizontal de genes ⁽²⁰⁾. Una vinculación fenotípica entre la resistencia a la infección por bacteriófagos y la expresión de proteínas de superficie ha sido reconocida por más de 20 años, pero todavía es poco comprendida ⁽²⁰⁾.

7. CONCLUSIONES

- ❖ El mecanismo de expulsión selectiva del antibiótico representa el principal mecanismo de resistencia a eritromicina en las cepas de *Streptococcus pyogenes*.
- ❖ Más del 90 % de las cepas resistentes tienen el gen *mefA*, asociado con el fenotipo de resistencia M.
- ❖ El mecanismo de metilación ribosomal, asociado con los genes *ermA* y *ermB* y los fenotipos MLS inducido y constitutivo, representa el 8% de los aislamientos.
- ❖ El tipo M75 de *S. pyogenes* está asociado a las cepas resistentes a eritromicina y con presencia del gen *mefA*.
- ❖ Otros tipos M presentes en las cepas de *S. pyogenes* resistentes son el M4, M6, M12 y M63.
- ❖ Se observa una disminución en los aislamientos resistentes a eritromicina del 9 al 0.3% en el periodo 2001-2013. Con un porcentaje promedio de resistencia a eritromicina del 4% en el periodo.
- ❖ El decremento en la resistencia a eritromicina está relacionada a la disminución de aislamientos del tipo M75 observada en el mismo periodo de estudio.
- ❖ Los tipos M1 y M12 se han mantenido en frecuencia como los principales tipos M identificados en el laboratorio durante el periodo de estudio.
- ❖ La determinación de los tipos M y los mecanismos de resistencia involucrados contribuyen a mantener una vigilancia en el comportamiento epidemiológico de las cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas en nuestra población.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Akesson P.; Sjolholm A. G; Bjorck L. **1996**. Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. **271**(2):1081-1088.
2. Albertí S.; García-Rey C.; Domínguez M.A.; Aguilar L.; Cercenado E.; Gobernado M.; García-Perea A.; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. **2003**. Survey of *emm* gene sequences from pharyngeal *Streptococcus pyogenes* isolates collected in Spain and their relationship with erythromycin susceptibility. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. **41**(6):2385-2390.
3. Albrich W.; Monnet L, Harbarth S. **2004**. Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. EMERGING INFECTIOUS DISEASES. **10**(3):514-517.
4. Asociación Mexicana de Farmacología. www.amefar.org.mx. Consultado Julio, 2014.
5. Ayer V.; Tewodros W.; Manoharan A.; Skariah S.; Luo F.; Bessen DE. **2007**. Tetracycline resistance in group A streptococci: emergence on a global scale and influence on multiple-drug resistance. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. **51**:1865–1868.
6. Beall B.; Facklam R.; Thompson T. **1996**. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. **34**(4):953-958.
7. Bessen D.E.; Izzo M.W.; Fiorentino T.R.; Caringal R.M.; Hollingshead S.K.; Beall B. **1999**. Genetic linkage of exotoxin alleles and *emm* gene markers for tissue tropism in group A streptococci. JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. **179**(3):627-636.
8. Bingen E, Bidet P, Mihaila-Amrouche L, Doit C, Forcet S, Brahimi N, Bouvet A, Cohen R. **2004**. Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. **48**:3559-3562.
9. Bingen E.; Fitoussi F.; Doit C.; Cohen R.; Tanna A.; George R.; Loukil C.; Brahimi N.; Le Thomas I.; Deforche D. **2000**. Resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* in France in pediatric patients. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. **44**(6):1453-7.
10. Bisno A. L.; Brito M. O.; Collins C.M. **2003**. Molecular basis of Group A streptococcal virulence. THE LANCET INFECTIOUS DISEASES. **3**(4): 91-200.

11. Brooks G.; Butel J.; Morse S. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 25a ed. El Manual Moderno. México. (2011). pp: 251-261.
12. Bruton L.L.; Lazo J.S.; Parker K.L. Editores. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a. Edición. Mc Graw Hill. **2007**. pp. 1173-1185.
13. Canton R.; Loza E.; Morosini M.I.; Baquero F. **2002**. Antimicrobial resistance amongst isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* in the PROTEKT antimicrobial surveillance programme during 1999–2000. JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. **50**(S1):9-24.
14. Chang H.; Shen X.; Fu Z.; Liu L.; Shen Y.; Liu X.; Yu S.; Yao K.; Zhao C.; Yang Y. **2010**. Antibiotic resistance and molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* isolated from healthy schoolchildren in China. SCANDINAVIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. **42**(2):84-89.
15. Chhatwal G.S.; Blobel H. **1986**. Binding of host plasma proteins to streptococci and their role in streptococcal pathogenicity. IRCS MEDICAL SCIENCE **14**:1-3
16. Chhatwal G.S; Talay S.R. Capítulo 17: Pathogenicity factors in Group C and G Streptococci. En libro: Gram-Positive Pathogens. American Society for Microbiology. Washington D.C. (2000). pp. 177-183.
17. Chuang P.K.; Wang S.M.; Lin H.C.; Cho Y. H.; Ma Y.; Ho T.S.; Shen C.F.; Liu C.C. **2013**. The trend of macrolide resistance and *emm* types of group A streptococci from children at a medical center in southern Taiwan. JOURNAL OF MICROBIOLOGY, IMMUNOLOGY AND INFECTION. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2013.08.015>
18. Clancy J.; Petitpas J.; Dib-Hajj F.; Yuan W.; Cronan M.; Kamath A.V.; Bergeron J.; Retsema J.A. **1996**. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. MOLECULAR MICROBIOLOGY. **22**(5):867-879.
19. Cole J.N.; Barnett T.C.; Nizet V.; Walker M. J. **2011**. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY. **9**:724-736.
20. Creti R.; Gherardi G.; Imperi M.; von Hunolstein C.; Baldassarri L.; Pataracchia M.; Alfaroni G.; Cardona F.; Dicuonzo G.; Orefici G. **2005**. Association of group A streptococcal *emm* types with virulence traits and macrolide-resistance genes is independent of the source of isolation. JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY. **54**:913–917

21. Cunningham M, W. **2000**. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. **13**(3):470-511.
22. De Alba Camacho S. **2007**. Determinación in vitro de la resistencia a tetraciclina e identificación de los genes *tet(M)* y *tet(O)* en aislamientos clínicos de estreptococos beta hemolíticos. Dirigida por L.M. Perea Mejía. Tesis de licenciatura. UNAM.
23. Dhanda V.; Vohra H.; Kumar R. **2011**. Virulence potential of Group A streptococci isolated from throat cultures of children from north India. *INDIAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH*. **133**(6): 674-680.
24. d'Humières C.; Cohen R.; Levy C.; Bidet P.; Thollot F.; Wollner A.; Bingen E. **2012**. Decline in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from French children. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*. **302**(7-8):300-303.
25. Efstratiou A. **2000**. Group A streptococci in the 1990's. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY*; **45**:3-12
26. Facultad de Medicina. UNAM. Patogenesis: *S. pyogenes* <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/.html>. Enero 2015.
27. Farmand S, Henneke P, Hufnagel M, Berner R. **2012**. Significant decline in the erythromycin resistance of group A streptococcus isolates at a German paediatric tertiary care centre. *EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES*. **31**:707–710.
28. Figueroa Martinez, F.J. **2004**. Tipificación molecular del gen que codifica para la proteína M (*emm*) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Dirigida por L.M. Perea Mejía. Tesis de licenciatura UNAM. Facultad de Química.
29. Giovanetti E, Brenciani A, Tiberi E, Bacciaglia A, Varaldo PE. **2012**. ICESp2905, the *erm(TR)-tet(O)* element of *Streptococcus pyogenes*, is formed by two independent integrative and conjugative elements. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. **56**:591–594.
30. Gottlieb D.; Shaw P. *Antibiotics, Biosynthesis*. Springer-Verlag. USA, N.Y. **1967**. Vol. II pp. 155-180.
31. Hardie, J.M; Genus *Streptococcus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacterology*. Sneath, P.H.A; Mair, N. S; Sharpe, M. E; Holt, J.G. Editores. Williams & Wilkins Co: Baltimore; Vol. 2. pp. 1043-1071

32. Johnson D.R.; Kaplan E.L. **1993**. A review of the correlation T-Aglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of Group A streptococci. *JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*. **38**:311-315.
33. Kaplan E.L.; Johnson D.R.; Del Rosario M.C.; Horn D.L. **1999**. Susceptibility of group A beta-hemolytic streptococci to thirteen antibiotics: examination of 301 strains isolated in the United States between 1994 and 1997. *THE PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASES JOURNAL*. **18**(12):1069-72.
34. Kataja J.; Huovinen P.; Skurnik M.; Seppälä H. **2000**. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. The Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. **43**(1):48-52.
35. Kataja J.; Seppälä H.; Skurnik M.; Sarkkinen H. **1998**. Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. **42**(6):1493.
36. Kenneth J. R.; Ray C. G. Editores. Sherris Microbiología Médica. 5ta edición. Mc Graw Hill. 2011. pp. 342-353.
37. Kimura K.; Wachino J.; Kurokawa H.; Suzuki S.; Yamane K.; Shibata N.; Arakawa Y. **2009**. Practical disk diffusion test for detecting group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. **47**(12):4154-4157.
38. Koh E.; Kim S. **2010**. Decline in erythromycin resistance in group A streptococci from acute pharyngitis due to changes in the *emm* genotypes rather than restriction of antibiotic use. *THE KOREAN JOURNAL OF LABORATORY MEDICINE*. **30**:485–490.
39. Koh E.; Kim S.; Lee, N.Y. **2008**. Decrease of erythromycin resistance in Group A streptococci by change of *emm* distribution. *THE KOREAN JOURNAL OF LABORATORY MEDICINE*. **61**(4):261-263.
40. Leclercq R.; Courvalin P. **1991**. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. **35**(7):1267-1272.
41. Liu X.; Shen X.; Chang H.; Huang G.; Fu Z.; Zheng Y.; Wang L.; Li C.; Liu L.; Shen Y.; Yang Y. **2009**. High macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* strains isolated from children with pharyngitis in China. *PEDIATRIC PULMONOLOGY*. **44**:436–441.

42. Longo D. L.; Kasper D.L.; Jameson J. L.; Fauci A. S.; Hauser S. L.; Loscalzo J., Editores. Harrison. Principios de Medicina Interna. 17a edición. McGraw-Hill. 2009. Vol I. pp. 881-886.
43. Luca-Harari B.; Straut M.; Cretoiu S.; Surdeanu M.; Ungureanu V.; Van der Linden M.; Jasir A. **2008**. JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY. **57**:1354-1363.
44. MacFaddin JF. Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3a ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2003. pp. 522-524.
45. Martin J.M.; Green M.; Barbadora K.A.; Wald E.R. **2002**. Erythromycin-resistant Group A streptococci in school-children in Pittsburg. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE; **346**:1200-1206.
46. Mendes C.; Marin M.E.; Quiñones F.; Sifuentes-Osornio J.; Siller C.C.; Castanheira M.; Zoccoli C.M.; López H.; Súcari A.; Rossi F.; Angulo G. B.; Segura A.J.; Starling C.; Mimica I.; Felmingham D. **2003**. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000). BRAZILIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. **7**(1):44-61.
47. Metzgar D.; Baynes D.; Hansen C.J.; McDonough E.A.; Cabrera D.R.; Ellorin M. M.; Blair P. J.; Russell K. L. **2009**. Inference of antibiotic resistance and virulence among diverse Group A Streptococcus strains using *emm* sequencing and multilocus genotyping methods. PLoS ONE. **4**(9): 6897
48. Metzgar D.; Zampolli A. **2011**. The M protein of group A Streptococcus is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. VIRULENCE. **2**(5):402-412.
49. Michos A. G.; Bakoula C. G.; Braoudaki M.; Koutouzi F. I.; Roma E. S.; Pangalis A.; Nikolopoulou G. ; Kirikou E.; Syriopoulou V. P. **2009**. Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance determinants, and *emm* types. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE. **64**:295–299.
50. Montes M.; García-AreNzana J.M. **2007**. Género *Streptococcus*: una revisión practica para el laboratorio de microbiología. ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. **25**(3):14-20.

51. Murase, T.; Suzuki R.; Watanabe Y.; Yamai S. **2000**. Erythromycin resistance genes in *Streptococcus pyogenes* isolates in Kanagawa, Japan. MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY. **44**(10):863-865.
52. Musser J.M.; Kapur V.; Kanjilal S.; Shah U.; Musher D.M.; Barg N. L. ; Johnston K.H.; Schlievert P.M.; Henrichsen J.; Gerlach D.; Rakita R. M.; Tanna A.; Cookson B.D.; Huang C. **1993**. Geographic and temporal distribution and molecular characterization of two highly pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes* expressing allelic variants of pyrogenic exotoxin A (Scarlet fever toxin). JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. **167**(2):337-346.
53. Narro Robles J.; Rivero Serrano O.; Lopez Barcena J. Coord. Diagnóstico y tratamiento en la practica medica. 4ta edicion. Editorial El manual Moderno. UNAM, Facultad de Mexicana. México. 2011. pp 721-725.
54. Organización Mundial de la Salud. Epidemiologia enfermedades por *S. pyogenes*. <http://www.who.int/mediacentre/>. Consultado Agosto 2014
55. Palmieri C.; Vecchi M.; Littauer P.; Sundsfjord A.; Varaldo P.E.; Facinelli B. **2006**. Clonal spread of macrolide- and tetracycline resistant [*erm*(A) *tet*(O)] *emm77 Streptococcus pyogenes* isolates in Italy and Norway. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. **50**:4229–4230.
56. Patti J.M.; Höö M. **1994**. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY. **6**(5):752-758.
57. Pavlovic L.; Grego E.; Sipetic-Grujicic S. **2010**. Prevalence of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* collected in Serbia. JAPANESE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. **63**(4):275-276.
58. Perea Mejía L.M. *Streptococcus*. En Microbiología Bacteriología y Virología. 1a Ed. Tay J.; Manjarrez M.E.; Molina, J. editores. Méndez Editores. México.2010. pp: 173-184.
59. Perea Mejía L.M. *Streptococcus*. En Microbiología y Parasitología médicas. 4ta. Ed. Tay J.; Gutiérrez M.; López R.; Manjarrez M.E.; Molina, J. Editores. Méndez Editores. México. 2012. pp: 81-89.

60. Perea Mejía L.M.; Rivas C.; Inzunza Montiel A.E.; Garza R.; Cravioto A. **2006**. Erythromycin resistance associated to *mefA* gene and *emm75* allele in *Streptococcus pyogenes* from uncomplicated pharyngitis in Mexico. INTERNATIONAL CONGRESS SERIES. **1289**:99-102
61. Perea Mejía L.M.; Rivas C.; Inzunza Montiel A.E.; Cravioto A. **2002**. Molecular characterization of Group A Streptococcus strains isolated during a scarlet fever outbreak. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. **40**(1): 278-280.
62. Perea Mejía L.M.; Stockbauer K. E.; Pan X.; Cravioto A.; Musser JM. **1996**. Characterization of group A *Streptococcus* strains recovered from Mexican children with pharyngitis by automated DNA sequencing of virulence-related genes: unexpectedly large variation in the gene (*sic*) encoding a complement-inhibiting protein. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. **35**(12):3220-3224.
63. Perez Romano L. A. **2003**. Prevalencia de genes asociados a la virulencia en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Dirigida por L.M. Perea Mejía. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química.
64. Perez-Trallero E.; Montes M.; Orden B.; Tamayo E.; Garcia-Arenzana J.M.; Marimon J.M. 2007. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates displaying the MLSB phenotype of macrolide resistance in Spain, 1999 to 2005. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 51:1228–1233.
65. Perez-Trallero E.; Tamayo E.; Montes M.; Garcia-Arenzana J.M.; Iriarte V. **2011**. In vitro activities of retapamulin and 16 other antimicrobial agents against recently obtained *Streptococcus pyogenes* isolates. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. **55**:2406–2408.
66. Pires R.; Rolo D.; Gama-Norton L.; Morais A.; Lito L.; Salgado M.J.; Johansson C.; Mollerberg G.; Henriques-Normark B.; Goncalo-Marques J.; Santos-Sanches I. **2005**. Group A streptococci from carriage and disease in Portugal: evolution of antimicrobial resistance and T antigenic types during 2000-2002. MICROBIAL DRUG RESISTANCE. **11**:360–370
67. Rehder C. D.; Johnson D.R.; Kaplan E.L. **1995**. Comparison of methods for obtaining serum opacity factor from group A streptococci. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. **33**(11): 2963–2967.

68. Rivas López M. C. **2005**. Identificación de genes asociados a la resistencia a macrólidos en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Dirigida por L.M. Perea Mejía. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química.
69. Roche Diagnostics Corporation. **2010**. Group A *Streptococcus*. MEDIACAL AND SCIENTIFIC AFFAIRS CLINICAL REVIEWS.
70. Rodríguez C.; Rojas P.; Wozniak A.; Kalergis A. M.; Cerón I.; Riedel I.; Román J. C.; Villarroel L. A.; Berríos X.; Bavestrello L.; García P. **2011**. Análisis de los fenotipos y genotipos de resistencia a eritromicina y clindamicina en cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas en Chile en un período de 10 años. REVISTA MÉDICA DE CHILE. **139**:1143-1149.
71. Rodríguez Clemente D. **2014**. Tipificación molecular de *Streptococcus pyogenes* de exudados faríngeos. Dirigida por L.M. Perea Mejía. Tesis de especialización en Bioquímica Clínica. UNAM.
72. Rodriguez G. Temas de bacteriología y virología médica. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/StreptococcusyEnterococcus.pdf>. Consultado Agosto 2014.
73. Rubio-López V.; Valdezate S.; Alvarez D.; Villalón P.; Medina M. J.; Salcedo C.; Sáez-Nieto J. A. **2012**. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). BMC MICROBIOLOGY. **12**:215. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/215>.
74. Seppälä H.; Nissinen A.; Järvinen H.; Huovinen S.; Henriksson T.; Herva E.; Holm S.E.; Jahkola M.; Katila M.L.; Klaukka T. **1992**. Resistance to erythromycin in group A streptococci. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. **326**(5):292-297.
75. Seppälä H.; Nissinen A.; Yu Quan; Huovinen P. **1993**. Tree different phenotypes of erythromycin resistance *Streptococcus pyogenes* in Finland. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. **32**:885-891.
76. Silva-Costa C.; Friães A.; Ramirez M.; Melo-Cristino J.; Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections. **2012**. Differences between macrolide-resistant and -susceptible *Streptococcus pyogenes*: importance of clonal properties in addition to antibiotic consumption. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. **56**(11):5661-5666.

77. Sutcliffe J.; Grebe T.; Tait-Kamradt A.; Wondrack L. **1996**. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. **40**(11):2562-2566.
78. Tartof S.; Reis J. N.; Andrade A. N.; Ramos R. T.; Reis M. G.; Riley L. W. **2010**. Factors associated with Group A Streptococcus *emm* type diversification in a large urban setting in Brazil: a cross-sectional study. *BMC INFECTIOUS DISEASES*. **10**:327. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/327>
79. Todar, K. **2002**. Textbook of Bacteriology. Madison Ed. pp 654-681.
80. Van Leer Buter C.C.; Mouton J.W.; Klaassen C.H.; Handgraaf C.M.; Sunnen S.; Melchers W.J.; Sturm P.D. **2010**. Prevalence and molecular mechanism of macrolide resistance in β -haemolytic streptococci in the Netherlands. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS*. **35**(6):590-592.
81. Villaseñor-Sierra A.; Katahira E., Jaramillo-Valdivia A.N.; Barajas-García M. de L.; Bryant A.; Morfín-Otero R.; Márquez-Díaz F.; Tinoco J. C.; Sánchez-Corona J.; Stevens DL. **2012**. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains isolated from invasive and non-invasive infections from Mexico and the USA during 1999-2010. *INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES*. **16**(3): 178-181.
82. Walker M.J.; Barnett T.C.; McArthur J.D.; Cole J.N.; Gillen C.M.; Henningham A.; Sriprakash K.S.; Sanderson-Smith M.L.; Nizet V. **2014**. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. **27**:264-301.
83. Whatmore A. M.; Kapur V.; Musser J.M.; Kehoe M.A. **1995**. Molecular population genetic analysis of the *enn* subdivision of group A streptococcal *emm*-like genes: horizontal gene transfer and restricted variation among *enn* genes. *MOLECULAR MICROBIOLOGY*. **15**(6):1039-1048.
84. Wozniak A.; Rojas P.; Rodríguez C.; Undabarrena A.; Garate C.; Riedel I.; Román J.C.; Kalergis A.M.; García P. **2012**. M-protein gene-type distribution and hyaluronic acid capsule in group A Streptococcus clinical isolates in Chile: association of *emm* gene markers with *csrR* alleles. *EPIDEMIOLOGY & INFECTION*. **140**(7):1286-1295.

85. Zampaloni C.; Cappelletti P.; Prena M.; Vitali L.A.; Ripa S. **2003**. *emm* gene distribution among erythromycin-resistant and -susceptible Italian isolates of *Streptococcus pyogenes*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. **41**:1307–1310.
86. Zavala Maldonado K. **2013**. Identificación de genes asociados a la resistencia a eritromicina y tetraciclina en aislamientos clínicos de *Streptococcus agalactiae* y su asociación con el serotipo capsular. Dirigida por L.M. Perea Mejía. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química.

ANEXO I. Caracterización de cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina: fenotipo, genotipo, tipo M, gen *sic* y gen *sof*, y exotoxinas *speA* y *speC*.

Clave	Fenotipo	Gen de resistencia			Tipo M	<i>sic/sof</i>		exotoxinas	
		<i>mefA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>		<i>sic</i>	<i>sof</i>	<i>speA</i>	<i>speC</i>
502*	M	+	-	-	M12	-	+	-	+
503*	iMLS	-	+	-	M22	-	+	-	-
504*	cMLS	-	-	+	M11	-	+	-	-
151	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
181	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
183	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
185	iMLS	-	+	-	M4	-	-	-	-
199	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
203	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
204	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
222	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
223	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
225	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
227	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
259	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
270	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
289	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
567	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
569	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
572	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
597	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
603	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
605	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
612	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
633	M	+	-	-	M75	-	+	-	+

*cepas de referencia

Clave	FENOTIPO	Gen de resistencia			Tipo M	sic/sof		exotoxinas	
		<i>mefA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>		<i>sic</i>	<i>sof</i>	<i>speA</i>	<i>speC</i>
653	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
665	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
723	M	+	-	-	M75	-	+	-	-
793	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
732	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
750	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
774	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
826	M	+	-	-	M12	-	+	-	+
916	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
917	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
970	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
1033	iMLS	-	+	-	M63	-	+	-	-
1140	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
1147	M	+	-	-	M75	-	+	-	+
1374	M	+	-	-	M4	-	+	-	+
2847	cMLS	-	-	+	M6	-	-	-	-