



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Identificación de genes asociados a la  
resistencia a macrólidos en cepas de  
*Streptococcus pyogenes* de origen clínico

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARÍA DEL CARMEN RIVAS LÓPEZ



MÉXICO, D.F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

m341942



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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. MA. DEL CARMEN CORTES DECUIR
Vocal	Prof. FELIPE CRUZ GARCÍA
Secretario	Prof. LUIS MANUEL PEREA MEJÍA
1er. Suplente	Prof. NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHAVEZ
2º. Suplente	Prof. ANTONIO CASTILLO DURAN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM y forma parte del proyecto "Análisis molecular de los genes asociados a la virulencia de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico y una colección de referencia" financiado por el PAPIIT con clave IN218103.

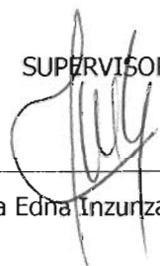
ASESOR



---

Luis Manuel Perea Mejía

SUPERVISOR



---

Alma Edna Inzurza Montiel

SUSTENTANTE



---

María del Carmen Rivas López

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **A Manuel González G.:**

Definitivamente eres el cimiento de este logro. Siempre me ayudaste a salir a flote cuando me hundía. Gracias por tu paciencia, tu confianza y tu tiempo. Me diste más que un apoyo, luchaste conmigo durante estos cinco años y eso nunca lo olvidaré.

### **A mi mamá:**

Sólo puedo decirte que me has dado todo para ser un buen ser humano y una persona exitosa en esta vida; no tengo palabras para agradecerte el apoyo que me has brindado. Simplemente que te quede la satisfacción y el orgullo de haber hecho un buen trabajo con ésta hija que te adora y que nunca te defraudará.

### **A mis hermanos y hermanas:**

Les agradezco todo su apoyo tanto moral como económico. Tal vez sin saberlo, me motivaban a seguir a delante. Espero nunca decepcionarlos.

### **A mis sobrinitos:**

Gorditos (as): Son una fuente importante de mi inspiración y motivación, de la misma manera en la que yo quiero ser para ustedes. Incondicionalmente cuentan conmigo para apoyarlos en todo.

*Cariñosamente,*

*Mary*

**A Rosa Laura Hernández C. :**

Aunque desafortunadamente sólo pasamos el cincuenta por ciento de la carrera juntas, quiero que sepas que fuiste una gran amiga y que nunca olvidare tu apoyo.

**A L. M. Perea :**

Quiero agradecer a la parte gentil de mi asesor de Tesis el Dc. Luis Manuel, por su paciencia, consejos y la oportunidad brindada.

**A mis amigos (as) de la Facultad:**

J. Manuel, Quike, Armando, Andrea, Rosy, Paty, Alex, Carlos, Salomón, Tere, Jesús, etc. A todos ustedes gracias por esos buenos momentos. Y los que vendrán.

*Sinceramente,*

*Mary Carmen Rivas*

# ÍNDICE.

1. Introducción.....	1
2. Lista de abreviaturas.....	2
3. Índice de cuadros, figuras y tablas.....	3
4. Antecedentes.....	5
4.1 Generalidades sobre <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	5
4.2 Generalidades sobre antibióticos.....	12
4.3 Macrólidos.....	15
4.3.1 Definición.....	15
4.3.2 Características químicas.....	15
4.3.3 Clasificación.....	16
4.3.4 Mecanismo de acción de la eritromicina.....	18
4.4 Generalidades sobre resistencia MLS y el fenotipo asociado.....	19
4.4.1 Mecanismos bioquímicos de resistencia MLS.....	22
4.5 Importancia clínica de la resistencia a eritromicina en <i>S. pyogenes</i> ..	25
4.5.1 Casos reportados de resistencia a eritromicina.....	25
4.5.2 Características de los genes <i>mefA</i> , <i>ermTR</i> y <i>ermB</i> .....	26
4.5.3 Relación del genotipo de resistencia con el serotipo.....	27
5. Hipótesis.....	30
6. Objetivo General.....	30
7. Objetivos Particulares. ....	30
8. Materiales y Equipo. ....	31
9. Metodología.....	34
10. Resultados.....	38
11. Discusión de Resultados.....	46
12. Conclusiones.....	52
13. Referencias.....	53

## 1. INTRODUCCIÓN.

*Streptococcus pyogenes* (Estreptococo del Grupo A de Lancefield) es una de las bacterias patógenas más comunes, adquiere importancia por el amplio espectro de enfermedades subagudas, agudas o crónicas que puede llegar a producir. La penicilina se ha mantenido como el antibiótico de primera elección para infecciones por Estreptococo del Grupo A, y en el caso de pacientes alérgicos, los macrólidos son la alternativa de segunda elección. Sin embargo, en 1959 se describió el primer caso de resistencia a eritromicina, y desde entonces se han incrementado los casos de resistencia en diferentes partes del mundo. Actualmente se conocen tres genes asociados con la resistencia a macrólidos en *Streptococcus pyogenes*, denominados como *mefA*, *ermTR* y *ermB*. Cada uno de ellos expresa un mecanismo particular de resistencia, mientras que el gen *mefA* esta relacionado con la expulsión selectiva de macrólidos con anillos de 14 y 15 miembros, la familia de genes *erm* participan en la modificación del sitio blanco a través de una RNA metilasa. El presente trabajo tiene como objetivo identificar los genes asociados a la resistencia a macrólidos (eritromicina) en 391 aislamientos de *Streptococcus pyogenes* provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de México, colectados durante el periodo del 2001-2004. De la misma manera correlacionar el fenotipo y genotipo de resistencia con el serotipo M. Se llevó acabo la siguiente metodología: pruebas de susceptibilidad a eritromicina (15 µg) con base a los lineamientos de los Estándares para las Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos; fenotipificación de la resistencia a eritromicina mediante pruebas de doble disco y búsqueda por PCR de genes asociados a la resistencia a macrólidos. Con base a nuestros resultados, consideramos que la resistencia a eritromicina, hasta el momento, no se considera de riesgo en nuestro país. Sin embargo, el monitoreo debe continuar llevándose a cabo debido a la alta incidencia de casos reportados en otros países. De la misma manera la serotipificación para contar con un control epidemiológico.

## 2. LISTA DE ABREVIATURAS.

(AMH)	Agar Mueller Hinton
(BHI)	Infusion Cerebro Corazón
(CAMP)	Christie Atkins Muench-Peterson
(DNA)	Ácido Desoxiribonucleico
(dNTP's)	Desoxirribonucleótidos tri-fosfato
(EGA)	Estreptococo del Grupo A
(HECM)	Hospital de Especialidades Centro Médico
(HGCG)	Hospital General Gonzalo Castañeda
(HGM)	Hospital Gabriel Mancera
(HLM)	Hospital López Mateos
(HMS)	Hospital Médica Sur
(IL-1)	Interleucina 1
(IL-6)	Interleucina 6
(iMLS)	Resistencia inducible a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
(INER)	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
(INP)	Instituto Nacional de Pediatría
(MLS)	Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
(NCCLS)	Estándares para las Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos
(PYR)	Pirrolidonil Arilamidasa
(rRNA)	Ácido Ribonucleico ribosomal.
(SpeA)	Exotoxina A de <i>Streptococcus pyogenes</i>
(Tm)	Temperatura de fusión
(TNF- $\alpha$ )	Factor de necrosis tumoral alfa
(VP)	Voges-Proskauer

### 3. ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y TABLAS.

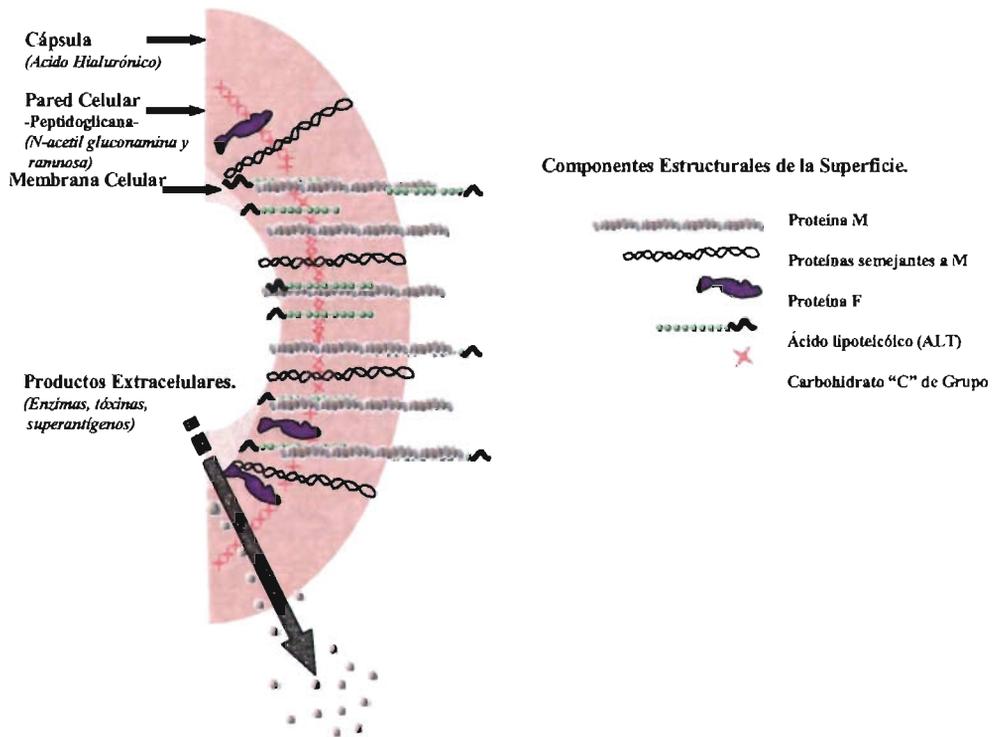
<b>Cuadro 1.</b> Factores de virulencia de los Estreptococo del Grupo A.....	7
<b>Cuadro 2.</b> Lista de hospitales.....	31
<b>Cuadro 3.</b> Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR.....	36
<b>Figura 1.</b> Superficie de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Antibióticos de la Familia MLS (Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B).....	14
<b>Figura 3.</b> Estructura química del macrólido picromicina.....	15
<b>Figura 4.</b> Estructura química de las eritromicinas.....	18
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de la eritromicina.....	19
<b>Figura 6.</b> Representación de la región peptidiltransferasa en el 23S rRNA.....	23
<b>Figura 7.</b> Fenotipos de resistencia a eritromicina.....	38
<b>Figura 8.</b> Amplificación de los genes <i>mefA</i> , <i>ermTR</i> y <i>ermB</i> durante la estandarización.....	40
<b>Figura 9.</b> Productos de PCR de las cepas que poseen genes asociados a la resistencia a macrólidos.....	44
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las enfermedades causadas por <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	9
<b>Tabla 2.</b> Asociación de serotipos M de <i>Streptococcus pyogenes</i> con enfermedades específicas.....	10
<b>Tabla 3.</b> Características diferenciables entre Estreptococos $\beta$ -hemolíticos.....	11
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de antibióticos con base a su mecanismo de acción.....	13
<b>Tabla 5.</b> Clasificación tradicional de los macrólidos.....	16
<b>Tabla 6.</b> Subagrupación de la resistencia inducible a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B (iMLS) en <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	21
<b>Tabla 7.</b> Prevalencia del fenotipo M asociado a la resistencia a eritromicina en <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	21
<b>Tabla 8.</b> Diferentes tipos de Transportadores Efflux.....	24

<b>Tabla 9.</b> Variaciones en el porcentaje de resistencia a eritromicina entre países.....	26
<b>Tabla 10.</b> Características de los genes de resistencia a macrólidos en <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	26
<b>Tabla 11.</b> Asociación de serotipo M con el fenotipo-genotipo de resistencia a macrólidos en <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	28
<b>Tabla 12.</b> Casos reportados de resistencia a eritromicina en México para <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	29
<b>Tabla 13.</b> Estándares para interpretación del diámetro de zona.....	34
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje de resistencia a eritromicina (15 µg) en <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	38
<b>Tabla 15.</b> Temperaturas trabajadas en la PCR.....	39
<b>Tabla 16.</b> Mezcla de reacción Vol. Final=50µ L.....	39
<b>Tabla 17.</b> Mezcla de reacción Vol. Final=30µ L.....	39
<b>Tabla 18.</b> Genes de resistencia a macrólidos identificados entre las cepas eritromicina resistentes de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	41
<b>Tabla 19.</b> Identificación de los genes asociados a la resistencia a macrólidos entre cepas sensibles a eritromicina.....	41
<b>Tabla 20.</b> Recopilación de las 30 cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> resistentes a eritromicina y las cepas con genotipo de resistencia a macrólidos.....	42
<b>Tabla 21.</b> Asociación de las cepas eritromicina-resistentes con su fenotipo, serotipo y genotipo.....	43
<b>Tabla 22.</b> Cepas PCR positivas en asociación con su serotipo y genotipo.....	43
<b>Tabla 23.</b> Porcentaje de resistencia a eritromicina por Hospital.....	45

## 4. ANTECEDENTES.

### 4.1. Generalidades sobre *Streptococcus pyogenes*.

El manual de Bacteriología sistemática de Bergey's describe a los Estreptococos como cocos grampositivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos que presentan forma circular u ovoide cuyo diámetro es menor a  $2\mu$ <sup>(38)</sup>. De forma adicional se conoce que son inmóviles, no esporulados y que algunos son anaerobios estrictos. Su agrupación característica es en cadena, pero ésta sólo es observable en preparaciones de muestras biológicas recientes o provenientes de cultivos líquidos<sup>(34)</sup>. El término *Streptococcus* proviene del latín *Strep*=cadena y *coccus*=cocos. Los Estreptococos requieren medios complejos adicionados con sangre o suero para su crecimiento. Su metabolismo es fermentativo basado en glucosa y otros carbohidratos<sup>(38)</sup>. *Streptococcus pyogenes* está clasificado en el grupo A de Lancefield y es considerado entre los patógenos humanos más comunes y versátiles. Es responsable de un amplio espectro de enfermedades humanas que van de agudas a crónicas. Las estructuras de superficie de los Estreptococos del Grupo A (Figura 1) incluyen una familia de proteínas M, el ácido hialurónico de la cápsula y fibrolectinas de enlace, que le permiten adherirse, colonizar e invadir piel y mucosas humanas. Tóxicos extracelulares, incluyendo las exotoxinas pirogénicas estreptococcicas, que contribuyen a la invasión tisular y al inicio de la cascada de citocinas responsables de los padecimientos como la fascitis necrosante y el síndrome del choque tóxico<sup>(6)</sup>.



**Figura 1.** Superficie de *Streptococcus pyogenes*. Observe la ubicación del carbohidrato C en la pared celular<sup>(34)</sup>.

Los Estreptococos del Grupo A producen una amplia variedad de factores de virulencia (Cuadro 1) entre los cuales podemos describir las siguientes<sup>(34)</sup>:

---

---

**Cuadro 1. Factores de virulencia de los *Streptococos* del Grupo A<sup>(6)</sup>.**

---

Antifagocíticos:	Invasión:
Proteína M	Proteína M
Proteína Mrp	Ácido hialurónico
Ácido hialurónico	Invasión tisular:
C5a peptidasa	Hialuronidasa
Adherencia a células epiteliales:	Estreptocinasas
Ácido lipoteicoico	Cisteina proteasa (Spe B)
Fibronectinas	DNasas A-D
Proteína M	Toxicidad Sistémica:
Ácido hialurónico	Estreptolisina O
Internalización:	Estreptolisina S
Proteína M y F1	Exotoxinas superantigénicas

---

---

Proteína M: Representa el principal factor de virulencia localizado en la superficie bacteriana, es antigénica y esta relacionada a la especificidad de serotipo M. Entre sus funciones están proteger a la bacteria de la fagocitosis y favorecer la degradación del factor C3b del complemento. La proteína M ha sido utilizada para clasificar a *Streptococcus pyogenes* en serotipos. Más de 120 serotipos M han sido identificados.

Proteína T: La proteína T antigénica esta presente en la superficie de los *Streptococos* del Grupo A junto con las proteínas antigénicas R y M (Figura 1). El ensayo de tipificación por proteína T consiste en una prueba de aglutinación. Es importante en los estudios epidemiológicos de las enfermedades causadas por el Grupo A, ya que se han registrado brotes para los cuales el serotipo M no se puede identificar<sup>(11)</sup>.

Cápsula: Formada por un polímero de ácido hialurónico que protege a la bacteria de la fagocitosis.

Proteínas semejantes a M: Tienen actividad antifagocitaria y capacidad de unirse a inmunoglobulinas.

Proteína F: Participa en la adhesión a células epiteliales de la faringe y piel en seres humanos.

Estreptolisinas O y S: Hemolisinas localizadas en la superficie celular, lisan eritrocitos, plaquetas y leucocitos; son responsables de la hemólisis observada en placas de gelosa sangre.

Estreptocinasa: Promueve la degradación de los coágulos al convertir el plasminógeno a plasmina.

Desoxirribonucleasas (DNasa): Se han identificado cuatro variantes inmunogénicas (A-D). No son enzimas citolíticas pero pueden degradar DNA libre presente en el pus reduciendo con ello la viscosidad del material y facilitando la diseminación de la bacteriana.

C5a Peptidasa: Enzima proteolítica (endopeptidasa), representa una potente serin proteasa que corta al factor de complemento C5a.

Proteína estreptocócica inhibitoria de la lisis mediada por el complemento (sic): Bloquea el MAC (complejo de ataque a la membrana).

Exotoxinas pirogénicas: Tres exotoxinas pirogénicas A, B y C (SpeA-C) han sido ampliamente estudiadas por su participación como pirógenos, incremento del choque endotóxico y efectos en el sistema inmune. Son inmunologicamente distintas y son reconocidas como potentes superantígenos que estimulan de forma directa e inespecífica alrededor del 20% de células T, originando la liberación excesiva de citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, Interferón $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). La exotoxina A de *Streptococcus pyogenes* (SpeA) o toxina eritrogénica ha sido detectada en más del 85% de las cepas responsables de procesos invasivos. Los anticuerpos

producidos contra la exotoxina B de *Streptococcus pyogenes* (SpeB) son protectores por lo que ha sido considerada un candidato para el desarrollo de una vacuna<sup>(34)</sup>.

*Streptococcus pyogenes* tiene la capacidad de colonizar garganta y piel así como de desarrollar infecciones supurativas y no supurativas (Tabla 1). Son la causa más común de faringitis bacteriana, provoca fiebre escarlatina e impétigo. Estudios epidemiológicos han mostrado que algunos serotipos M tienen una fuerte tendencia a causar infecciones de garganta y de manera similar hay otros serotipos asociados con el impétigo (Tabla 2). También los Estreptococos del Grupo A han sido ampliamente estudiados por el papel que desempeñan en el desarrollo de infecciones post-estreptocócicas como la fiebre reumática y la glomerulonefritis<sup>(11)</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de las enfermedades causadas por *Streptococcus pyogenes*<sup>(34)</sup>.

Enfermedades supurativas	Enfermedades no supurativas
Faringitis	Fiebre Reumática
Impétigo (pioderma)	Glomerulonefritis
Celulitis	
Fascitis Necrosante	
Fiebre Escarlatina	
Erisipela	
Síndrome de Choque Tóxico	

**Tabla 2.** Asociación de serotipos M de *Streptococcus pyogenes* con enfermedades específicas<sup>(11)</sup>.

<b>Enfermedad</b>	<b>Serotipo M asociado</b>
Faringitis	M1, 3, 5, 6, 14, 18, 19 y 24
Impétigo (pioderma)	M50, 61, 506, 507
Fiebre Reumática	M1, 3, 5, 6, 14, 18, 19 y 24
Glomerulonefritis	M1, 4, 12, 49, 55, 57 y 60

Durante el siglo XVIII *Streptococcus pyogenes* fué la principal causa de muerte por fiebre puerperal. En 1874 Billroth los describe en casos de erisipela y de infecciones de heridas<sup>(28)</sup>. En 1879, Pasteur aísla Estreptococo de la sangre de una paciente con sepsis puerperal<sup>(39)</sup>.

Las observaciones microscópicas realizadas en 1919 por J. H. Brown a placas de gelosa sangre de carnero en crecimiento, lo llevaron a proponer la agrupación de los Estreptococos con base al tipo de hemólisis que producen en este medio<sup>(12)</sup>. Se conocen tres tipos de hemólisis denominadas como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  las cuales generan una hemólisis parcial, total y nula respectivamente. Las estreptolisinas (S y O) son las causantes de dicha hemólisis. De esta manera se reconoce a *Streptococcus pyogenes* como Estreptococo beta hemolítico<sup>(14)</sup>.

Los Estreptococos son identificados por su morfología colonial y por pruebas bioquímicas. Cabe mencionar que *Streptococcus pyogenes* no es el único Estreptococo beta hemolítico del Grupo A, también existen algunas cepas del Grupo denominado "Anginosus" (conocido también como *Streptococcus milleri*), sin

embargo estos pueden ser diferenciados en base al tamaño de su colonia y al de las pruebas bioquímicas [Bacitracina, Pirrolidonil Arilamidasa (PYR), Voges-Proskauer (VP)]<sup>(38)</sup> (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características diferenciables entre *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos<sup>(38)</sup>.

Grupo de Lancefield	Tamaño colonia	Especie	Pruebas Bioquímicas		
			Bacitracina (0.04U)	PYR	VP
A	Grande	<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	-
A	Pequeña	Grupo Anginosus	-	-	+

La agrupación serológica de Rebeca Lancefield, propuesta en 1933, para la identificación de *Streptococcus* esta basada en las diferencias inmunológicas de los polisacáridos de su pared celular (Grupos A, B, C y G) o sus ácidos lipoteicoicos (Grupo D). *Streptococcus pyogenes* se agrupo dentro del Grupo A por las características de su carbohidrato C (Figura 1), que esta compuesto por una N-acetilglucosamina asociada a un polímero de ramnosa <sup>(11, 28)</sup>.

El procedimiento que generalmente se realiza para identificar a *Streptococcus pyogenes* es el siguiente:

- a) Observar tipo de hemólisis en placas de Gelosa Sangre, ( $\beta$ -hemólisis).
- b) Observar las características coloniales, (colonias >0.5 mm de diámetro después de 24 h de incubación, grises y ocasionalmente mucoides).

- c) Susceptibilidad a 0.04U de Bacitracina, (positiva).
- d) Prueba serológica, (Grupo A de Lancefield).

Si es requerido se pueden adicionar una o más de las siguientes pruebas:

- e) Prueba de Pirrolidonil Arilamidasa, (positiva).
- f) Prueba de Voges-Proskauer, (negativa).

## **4.2 Generalidades sobre antibióticos.**

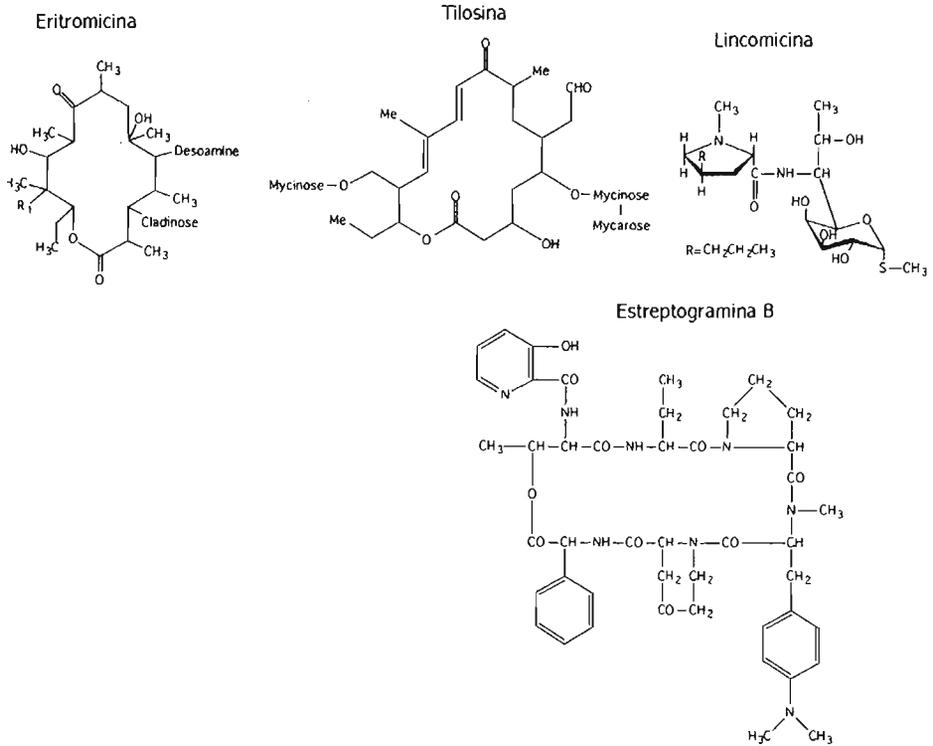
Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos), algunos con función bacteriostática (que inhiben el crecimiento de bacterias) o bactericida (que matan bacterias)<sup>(26)</sup>. El efecto bactericida o bacteriostático de un antibiótico depende de su concentración y estabilidad así como del tipo de microorganismo, del inóculo y de la fase de proliferación en que se encuentre<sup>(18)</sup>.

Existe una gran variedad de antibióticos que han sido agrupados con base a su naturaleza química, tipo de bacteria que inhiben, de acuerdo a la magnitud de su efecto y mecanismo de acción<sup>(26)</sup> (Tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de antibióticos con base a su mecanismo de acción<sup>(26)</sup>.

<b>Mecanismo</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Ejemplo</b>
<b>Inhiben la Síntesis de la Pared Celular</b>	Cicloserina Vancomicina Bacitracina Penicilina Cefalosporinas Carbacepinas	<b>Alteran la estructura de la membrana citoplasmática</b>	Polimixinas
<b>Inhiben la Síntesis Proteica</b>	<b>Inhiben 50S:</b> Eritromicina Cloranfenicol Clindamicina Lincomicina  <b>Inhiben 30S:</b> Tetraciclina Espectromicina Estreptomina Gentamicina Kanamicina Amikacina Nitrofuranos	<b>Inhiben la Síntesis Proteica a nivel de tRNA</b>	Mupirocina  Puramicina
<b>Alteran metabolismo del Ácido Fólico</b>	Trimetroprina Sulfonamidas	<b>Inhiben la RNA Polimerasa dependiente de DNA</b>	Rifampina

Los antibióticos del grupo Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B constituyen la superfamilia MLS (Figura 2). Como grupo, se caracterizan por inhibir la síntesis proteica en bacterias debido a su acción sobre la subunidad ribosomal 50S<sup>(50)</sup>.



**Figura 2.** Antibióticos de la Familia MLS (Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B) <sup>(50)</sup>.

## 4.3 Macrólidos.

### 4.3.1 Definición.

El término macrólido incluye a los antibióticos que tienen un anillo lactónico multisustituído. Son producidos por diferentes especies de *Streptomyces*<sup>(20)</sup>.

Los macrólidos fueron descubiertos por Gardner y Chain en 1942, cuando describieron la picromicina (Figura 3), primer antibiótico de este grupo. Sin embargo, no es hasta el descubrimiento de la eritromicina en 1952, por McGuire y colaboradores, que se da mayor auge al uso de esta nueva familia de antibióticos<sup>(15, 18, 20)</sup>.

Los macrólidos son comúnmente usados contra especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Haemophilus* y algunas especies de *Corynebacterium*<sup>(36)</sup>.

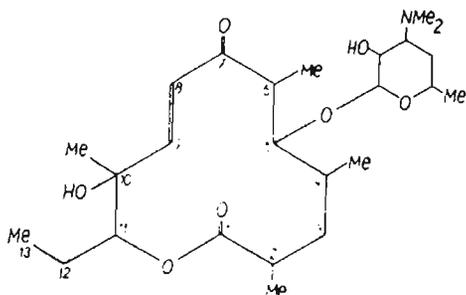


Figura 3. Estructura química del primer macrólido: picromicina<sup>(20)</sup>.

### 4.3.2 Características Químicas.

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<sup>(20)</sup>:

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

Los macrólidos se caracterizan por su poca solubilidad en agua (se presentan en forma de sales o ésteres), tienen aspecto cristalino color blanco y son bases débiles que se inactivan en medio ácido<sup>(18)</sup>.

### 4.3.3 Clasificación.

Una característica que permite diferenciar entre los compuestos de esta familia de antibióticos es el número de átomos de carbono que componen al anillo lactónico. Se pueden clasificar en macrólidos de 14, 15 y 16 átomos de carbono<sup>(15)</sup> como lo muestra la Tabla 5.

**Tabla 5.** Clasificación tradicional de los macrólidos<sup>(15)</sup>.

14 carbonos	15 carbonos	16 carbonos
<i>Eritromicina</i>		Espiramicina
Oleandomicina		Josamicina
Roxitromicina*	Azitromicina*	Miocamicina
Fluritromicina		Rokitamicina
Claritromicina*		Tilosina
Diritromicina*		

\* semisintéticos

Desde el surgimiento de la eritromicina (la cual ha sido químicamente modificada para generar más antibióticos de este tipo), los macrólidos han evolucionado en

cuatro generaciones químicas y por lo tanto se pueden clasificar también con base a este criterio. Estos cambios tienen como propósito mejorar las propiedades químicas, farmacocinéticas y terapéuticas de los macrólidos<sup>(50)</sup>.

**1° GENERACIÓN :** Incluye a los macrólidos con anillo de 14 miembros. Se genera la megalomicina y la oleandomicina. Sin embargo, estos no llegaron a ser tan efectivos como la eritromicina. Poco después de la introducción de la eritromicina a la práctica clínica se reportaron casos de resistencia denominada iMLS (resistencia inducible<sup>1</sup> a **Macrólidos, Lincosamidas, Estreptogramina B**), en cepas de *Staphylococcus aureus*.

**2° GENERACIÓN :** Incluye a los macrólidos con anillo de 16 miembros y el surgimiento de la resistencia denominada cMLS (resistencia constitutiva a **Macrólidos, Lincomicina, Estreptogramina-B**). Aparentemente las cepas inducibles de *Staphylococcus aureus* generaron una alta resistencia a macrólidos de 14 y 16 miembros así como a lincosamidas y Estreptogramina B.

**3° GENERACIÓN :** Incluye macrólidos de amplio espectro con anillo de 14 y 15 miembros (uso clínico de los macrólidos para *Mycobacterium spp.* y *Helicobacter pylori*), semisintéticos y ácido-estables. Sin embargo, no tienen ninguna ventaja sobre la eritromicina contra cepas resistentes.

El final de esta generación inicia con el surgimiento de resistencia inducible en cepas de *Mycobacterium spp.* y *Helicobacter pylori*.

**4° GENERACIÓN :** Incluye a los cetólidos, los cuales son macrólidos con anillo de 14 miembros que no inducen resistencia MLS (Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B). Los cetólidos con anillo de 14 miembros es el desarrollo más reciente. Estos son efectivos contra cepas que presentan resistencia inducible y constitutiva. Son efectivos tanto para el género *Staphylococcus* como *Streptococcus* y *Enterococcus*.

---

<sup>1</sup> Los términos inducible y constitutivo se explican en la página 19.

Ahora bien, es de particular interés explicar el mecanismo de acción de la eritromicina para poder entender uno de los mecanismos de resistencia asociados a los genes *ermTR*, *ermB*.

#### 4.3.4 Mecanismo De Acción De La Eritromicina.

La eritromicina es el antibiótico representativo del grupo de los macrólidos, es producida por *Streptomyces erythreus*<sup>(20)</sup>. Se conocen tres tipos de eritromicina: A, B y C (Figura 4). Sin embargo, la eritromicina A es la que posee las características farmacocinéticas de importancia terapéutica.

La eritromicina, como macrólido, presenta una estructura química particular. El aminoazúcar de todas las eritromicinas es la dextrosamina; sus azúcares neutros son la cladinosa en el caso de la eritromicina A y B, y la micarosa para la eritromicina C<sup>(20)</sup>.

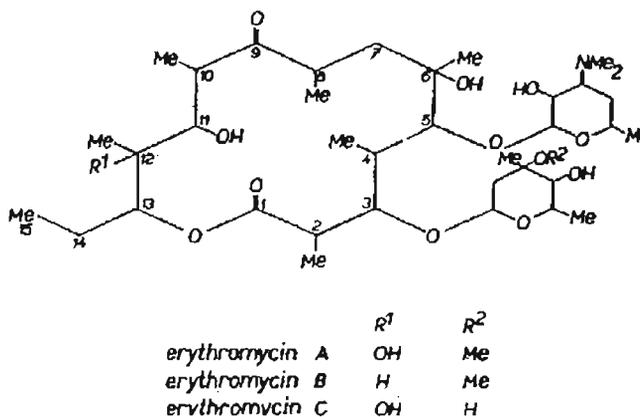
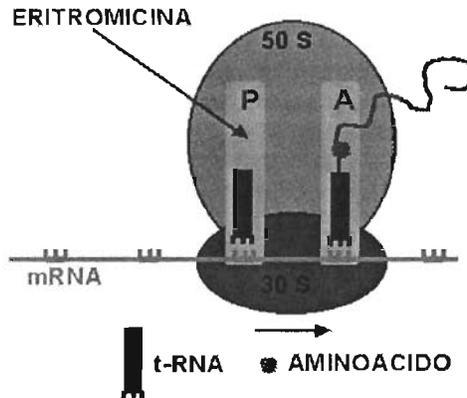


Figura 4. Estructura química de las eritromicinas<sup>(20)</sup>.

Los macrólidos ejercen su actividad bacteriostática al inhibir la síntesis de proteínas bacterianas a nivel ribosómico, se fijan de forma reversible a la subunidad 50S de microorganismos sensibles. En el caso particular de la eritromicina, se impide la reacción de translocación, en la cual una molécula de peptidil tRNA recién sintetizada se desplaza de un sitio aceptor (sitio A) a un sitio donador (sitio P) en

el ribosoma (Figura 5). Por lo tanto el proceso de elongación del péptido es interrumpido, deteniendo de forma reversible la síntesis de proteínas<sup>(18, 19, 36)</sup>.



**Figura 5.** Mecanismo de acción de la eritromicina. El macrólido eritromicina impide la reacción de translocación, con ello la cadena péptido recién formada, que temporalmente esta e el sitio A no se desplaza al sitio P<sup>(19)</sup>.

#### **4.4 Generalidades sobre la resistencia a Macrólidos, Lincosamidas, Estreptogramina B y el fenotipo asociado.**

Se han descrito tres fenotipos de resistencia a eritromicina, originalmente designados como NR (Nueva Resistencia), IR (Resistencia Inducible) y CR (Resistencia Constitutiva)<sup>(42)</sup>. Recientemente a estos fenotipos se les conoce como M, iMLS y cMLS respectivamente<sup>(16)</sup>.

La expresión de la resistencia Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B en cocos grampositivos, específicamente en el género *Staphylococcus*, puede ser constitutiva o inducible. Cuando la expresión es constitutiva la cepa es resistente a todos los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B. Mientras que si es inducible, la cepa es resistente únicamente a macrólidos de 14 y 15 miembros<sup>(24)</sup>. También se ha descrito que la resistencia MLS (Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B) es constitutiva cuando la metilasa (codificada por los genes *erm*) es producida continuamente e inducible cuando se requiere de la presencia del antibiótico (inductor) para producir la enzima<sup>(43)</sup>.

Las cepas inducibles predominaron de 1960 a 1970. Sin embargo, actualmente en diferentes zonas geográficas, es más común encontrar cepas con resistencia constitutiva<sup>(36)</sup>.

Otro estudio importante es el hallazgo de los genes de resistencia a macrólidos en *Streptococcus pyogenes* y su asociación a los diferentes fenotipos de resistencia. Se ha encontrado que el fenotipo de resistencia M está asociado al gen *mefA*<sup>(16, 23, 47)</sup> en tanto que el fenotipo de resistencia constitutivo (cMLS) se asocia principalmente al gen *ermB*<sup>(16, 22, 23)</sup> y finalmente el fenotipo de resistencia inducible (iMLS) se ha encontrado asociado a la presencia de un gen (*ermTR*)<sup>(22, 23)</sup>; dos genes (*ermTR, ermB*)<sup>(23)</sup>, (*ermTR, mefA*)<sup>(16, 23)</sup>, (*mefA, ermB*)<sup>(16)</sup> y los tres genes de resistencia a macrólidos (*ermTR, ermB y mefA*)<sup>(23)</sup>. Cabe mencionar que recientemente el fenotipo de resistencia inducible (iMLS) se ha subdividido en tres subtipos<sup>(16)</sup> de resistencia a macrólidos y nuevos macrólidos (cetólidos), que se distinguen por presentar diferentes patrones de resistencia (Tabla 6).

**Tabla 6.** Subagrupación de la resistencia inducible a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B (iMLS) en *Streptococcus pyogenes* <sup>(16)</sup>.

Fenotipo	Descripción de la resistencia	Genes asociados
iMLS-A	Alta a Macrólidos de 14, 15 y 16 miembros Baja al cetólido HRM3004	<i>ermB</i> y <i>mefA</i>
iMLS-B	Alta a Macrólidos de 14 y 15 miembros	<i>ermTR</i> y <i>mefA</i>
iMLS-C	Baja a Macrólidos de 14 y 15	<i>ermTR</i> y <i>mefA</i>

El porcentaje de resistencia a eritromicina, encontrado en diferentes partes del mundo, esta ligado en mayor proporción al fenotipo de resistencia M (Tabla 7)<sup>(16, 22, 23)</sup>. Sin embargo, es interesante mencionar que algunas regiones como en Finlandia el 60% de la cepas resistentes presentaron el fenotipo inducible<sup>(42)</sup> o bien en Francia donde el mayor porcentaje de resistencia esta asociado al fenotipo constitutivo<sup>(5)</sup>.

**Tabla 7.** Prevalencia del fenotipo M asociado a la resistencia a eritromicina en *Streptococcus pyogenes*.

País	% Resistencia	% Asociado al fenotipo M	Referencia
México	16	100	37
Argentina	8.3	96	47
Madrid	14.3	90	33
Italia	38.3	62	2

#### **4.4.1 Mecanismos Bioquímicos de Resistencia a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B (MLS).**

Se conocen tres mecanismos para explicar la resistencia MLS (Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B)<sup>(50)</sup>:

- I. Modificación enzimática del antibiótico codificada por los genes: *ere*, *mph*, *lin* y *sat*.
- II. Modificación del sitio blanco codificada por los genes *erm*.
- III. Activación de un sistema de expulsión de macrólidos codificada por el gen *mefA*.

Para *Streptococcus pyogenes* no se han descrito casos que involucren el mecanismo I, ni la presencia de los genes *ere*, *mph*, *lin* y *sat*<sup>(36, 45)</sup>. Por lo tanto nos enfocaremos al estudio detallado de los mecanismos II y III.

#### **II. Modificación del sitio blanco: 23S rRNA.**

Para poder entender este mecanismo necesitamos recordar que la subunidad 50S del ribosoma de una célula procariota está constituido por alrededor de 34 proteínas y un ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) de 2900 bases y otro de 120 bases que se denominan 23S y 5S, respectivamente. Además el 23S rRNA se encuentra dividido en seis dominios (I-VI). Así, la modificación enzimática del sitio blanco 23S rRNA puede estar dada por las siguientes causas<sup>(50)</sup>:

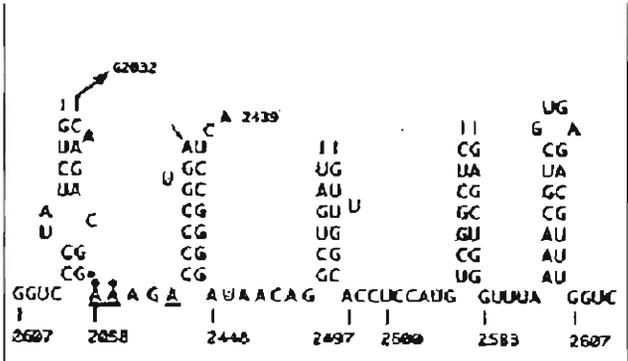
- i. Metilación postranscripcional del dominio V.
- ii. Mutaciones en el dominio II.
- iii. Mutaciones en el dominio V.

La resistencia de *Streptococcus pyogenes* a macrólidos se fundamenta en el primer caso, ya que a la fecha no se cuenta con información sobre mutaciones en el dominio II y V para esta bacteria<sup>(22)</sup>.

En los últimos 34 años un amplio número de genes de rRNA metilasas (*erm*) han sido detectados de una gran variedad de bacterias gramnegativas, entre ellas *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae*; en grampositivas *Streptococcus pneumoniae* y *Corynebacterium spp.* En adición, algunas espiroquetas como *Borrelia burgdorferi* y *Treponema denticola* han mostrado tener los genes *erm*.

En *Streptococcus* la resistencia a macrólidos por modificación al sitio blanco 23S rRNA, se debe a una dimetilación postranscripcional del dominio V, catalizada por una familia de enzimas denominadas Erm (Erythromycin resistance methylase) <sup>(50)</sup>. Todas las enzimas Erm metilan el mismo residuo de adenina. Este residuo de adenina (A2058) o uno de los residuos adyacentes (A2057 o A2059), en la región peptidiltransferasa (Figura 6), es cambiado por otro nucleótido en las especies de *Mycobacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Helicobacter pylori* <sup>(36)</sup>. En estas mismas regiones es donde se lleva a cabo la metilación en *Streptococcus pyogenes* <sup>(50)</sup>.

En *Streptococcus pyogenes* la enzima adenina-N<sup>6</sup>-metiltransferasa (*23S rRNA metilasa*) está codificada por los genes *ermTR* y *ermB* <sup>(24, 44, 45)</sup>. Estos genes adicionan dos metilos a residuos de adenina altamente conservados en el dominio V (región peptidiltransferasa). Dicha modificación da resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B <sup>(24, 44, 49)</sup>.



**Figura 6.** Representación de la región peptidiltransferasa en el 23S rRNA; las posiciones subrayadas son los sitios susceptibles a la metilasa <sup>(49)</sup>.

### III. Activación de un sistema de expulsión para macrólidos.

Se conocen diferentes tipos de Transportadores Efflux (Transportadores de Vaciamiento) de antibióticos. Cada uno de ellos tiene la particularidad de generar resistencia a un tipo específico de antibiótico (Tabla 6) <sup>(50)</sup>.

**Tabla 8.** Diferentes tipos de Transportadores Efflux<sup>(50)</sup>.

<b>Transportador Efflux</b>	<b>Confiere resistencia a:</b>
Tipo M	Macrólidos de 14 y 15 miembros
Tipo L	Lincomicina y Clindamicina
Tipo S	Estreptogramina A
Tipo MS	Macrólidos de 14 miembros y Estreptogramina B
Tipo Actinomicetos	Macrólidos de 16 miembros
Tipo MDR	Resistencia a múltiples fármacos.

El sistema de expulsión para macrólidos en *Streptococcus pyogenes*, vía Transportador M, consiste en la formación de una proteína integral hidrofóbica de 44.2 kDa<sup>(1, 5, 22)</sup>, que sirve como transportadora del macrólido, expulsando selectivamente macrólidos de 14 y 15 miembros, pero no de 16 ni lincosamidas y análogos de estreptogramina B<sup>(44, 45)</sup>. Se sabe que esta proteína transportadora, codificada por el gen *mefA* en *Streptococcus pyogenes*, es 90% idéntica a la codificada por el gen *mefE* de *Streptococcus pneumoniae*. Se trata de un polipéptido con 12 dominios transmembranales que se conduce por una fuerza protón motriz<sup>(50)</sup>.

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

### **4.5.1 Casos Reportados de Resistencia a Eritromicina.**

La penicilina es el antibiótico de primera elección para el tratamiento de las infecciones por Estreptococos del Grupo A y la eritromicina, o alguno de los nuevos macrólidos, (claritromicina, roxitromicina, azitromicina) es la elección de segunda línea y de preferencia en pacientes con hipersensibilidad a la penicilina<sup>(37)</sup>.

Después de los  $\beta$ -lactámicos los macrólidos son los antimicrobianos que más se prescriben. En los últimos años, en muchos países se ha incrementado el uso de eritromicina y más aún el de los nuevos macrólidos para tratamiento empírico de ciertas enfermedades. Esto ha traído como consecuencia un aumento alarmante en la resistencia de *Streptococcus pyogenes* a los macrólidos<sup>(37)</sup>.

El primer reporte de resistencia a macrólidos (eritromicina) se describió en Inglaterra en 1959<sup>(25, 47)</sup>. Apartir de éste un sin número de investigadores realizan diferentes estudios relacionados a la determinación del índice de resistencia que prevalece en cierta región o país. Es interesante mencionar el caso de Italia y Japón (Tabla 9) en el que las tendencias de la resistencia son opuestas, llevándonos a considerar que en la determinación de la resistencia influyen diferentes factores como la región, el tipo de población, el origen clínico de la muestra, entre otros<sup>(40)</sup>.

**Tabla 9.** Variaciones en el porcentaje de resistencia a eritromicina entre países para *Streptococcus pyogenes*.

País	% Resistencia a Eritromicina	Año de publicación	Referencia
Italia	5.1	1993	10
Italia	30.0	1997	9
Italia	38.3	2000	2
Japón	60.0	1979	27
Japón	22.2	1994	30

#### 4.5.2 Características de los Genes *mefA*, *ermTR* y *ermB*.

Como se indicó antes, la resistencia de *Streptococcus pyogenes* a macrólidos (eritromicina) se debe a la presencia de los siguientes genes: *mefA*, *ermTR*, *ermB*<sup>(36)</sup> (Tabla 10).

**Tabla 10.** Características de los genes de resistencia a macrólidos en *Streptococcus pyogenes*.

Gen	Significado	Tamaño (pb)	Año*
<i>mefA</i> <sup>a</sup>	macrolide efflux A <sup>c</sup>	1650	1996 <sup>(8)</sup>
<i>ermTR</i> <sup>b</sup>	erithromycin ribosome methylation TR <sup>c</sup>	731	1998 <sup>(43)</sup>
<i>ermB</i> <sup>a</sup>	erithromycin ribosome methylation B <sup>c</sup>	737	1991 <sup>(10)</sup>

a) Se reportaron por primera vez en *Staphylococcus aureus*<sup>(36)</sup>.

b) Variante del gen *ermA* de *Staphylococcus aureus* (83% de identidad)<sup>(36)</sup>.

c) Agrupación basada en la homología DNA-aminoácidos con letras A-Z<sup>(36)</sup>.

\*Año en que se reportó para *Streptococcus pyogenes* el gen de resistencia.

Muchos de los genes *erm* están asociados con transposones conjugativos o no conjugativos los cuales tienden a permanecer en el cromosoma, aunque algunos también se pueden encontrar en plásmidos. Estos genes están asociados con otros genes de resistencia a antibióticos, especialmente genes de resistencia a tetraciclinas. Los transposones conjugativos pueden tener un amplio número de hospederos lo cual puede explicar porque diferentes especies de bacterias pueden poseer estos genes *erm*.

Los genes *mef* han sido encontrados en una diversidad de géneros grampositivos, incluyendo *Corynebacter*, *Enterococcus*, *Micrococcus* y una variedad de especies de *Streptococcus*, sugiriendo una amplia distribución de estos genes. Muchos de ellos están asociados a elementos conjugativos localizados en el cromosoma y son transferidos por conjugación entre especies y géneros<sup>(36)</sup>.

#### **4.5.3 Relación del Genotipo de Resistencia con el Serotipo M.**

En Francia se han encontrado 10 serotipos M de *Streptococcus pyogenes* relacionados con los genes de resistencia a macrólidos: M1, M2, M4, M6, M11, M12, M22, M28 y M77<sup>(5)</sup>. De los cuales M1, M6 y M4 están asociados mayoritariamente al gen *mefA*; la mitad del serotipo M12 se encontró asociada al gen *mefA* y la otra mitad al *ermB*; los serotipos M2, M11, M22, M28 y M77 se encuentran asociados en su mayoría al gen *ermB*; el serotipo M28 estuvo asociado tanto al gen *ermB* como al gen *ermTR*<sup>(5)</sup> (Tabla 11). En otros países como Finlandia el serotipo M4 esta asociado al *mefA*, en Canadá se ha reportado asociación del gen *ermTR* con el serotipo M28<sup>(5)</sup>. Finalmente en la Tabla 11 se presenta una recopilación de las últimas publicaciones que refieren el serotipo M de *Streptococcus pyogenes* asociado al fenotipo o al genotipo de resistencia en diferentes partes del mundo.

**Tabla 11.** Asociación de serotipo M con el fenotipo-genotipo de resistencia a macrólidos en *Streptococcus pyogenes*. Los serotipos M subrayados son los que tienen el mayor número de cepas analizadas con este serotipo y de las cuales más del 90% de ellas se asocian a éste gen. n.e.=no específica.

Fenotipo	Genotipo	Serotipo	País-Año publicación	Referencia
n.e.	<i>mefA</i>	M9 ó M75-1	Japón-2004	3
n.e.	<i>mefA</i>	M1, <u>M12</u> , <u>M4</u> , <u>M75</u>	Francia-2004	4
n.e.	<i>ermB</i>	M22, <u>M28</u> , <u>M11</u>		
M	n.e.	M22, M84	Grecia-2003	51
iMLS	n.e.	M22, M84		
n.e.	n.e.	M2	México-2002	17
n.e.	<i>mefA</i>	M1, M6, <u>M4</u> , M12	Francia-2000	5
n.e.	<i>ermB</i>	M2, <u>M11</u> , <u>M22</u> , M77, <u>M28</u>		
n.e.	<i>ermTR</i>	M28		
M	<i>mefA</i>	M4, M75	España-1999	35
M	<i>mefA</i>	M4	Finlandia-1998	21

Nuestro país cuenta con pocos reportes sobre la resistencia a macrólidos (eritromicina) de *Streptococcus pyogenes* (Tabla 12), la determinación de los genes asociados así como la correlación del genotipo de resistencia con el serotipo M del Estreptococo. En el año 2000 el porcentaje de resistencia a eritromicina reportado fue del 16%, cuando es comparado con los países Italia y Japón (Tabla 9), no parece ser un porcentaje alto; contrariamente a la situación de Italia, la tendencia en México, de la resistencia a eritromicina, va en disminución (Tabla 12). A pesar de ello se pretende realizar un estudio continuo sobre la incidencia de la resistencia a eritromicina para contar con un registro epidemiológico que permita monitorear el comportamiento real de dicha resistencia.

**Tabla 12.** Casos reportados de resistencia a eritromicina en México  
Para cepas de *Streptococcus pyogenes*.

<b>% de Resistencia</b>	<b>Año publicación</b>	<b>Referencia</b>
16.0	2000	37
12.7	2002	17
12.4	2002	46
11.1	2003	29

Iniciar un estudio en cepas de *Streptococcus pyogenes* sobre la resistencia a macrólidos involucra la evaluación del porcentaje de resistencia en México, la determinación de los genes que confieren resistencia a macrólidos (*mefA*, *ermTR* y *ermB*), así como la asociación con los serotipos M, los fenotipos de resistencia prevalentes y la relación que guardan estos últimos con los genes de resistencia a macrólidos. En el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México se pretende contar con un laboratorio especializado en la caracterización de aislamientos clínicos de *Streptococcus pyogenes*. Uno de los objetivos del proyecto comprende establecer una vigilancia epidemiológica de la resistencia a diversos antimicrobianos. De esta forma, con el presente trabajo, se determinará el porcentaje de resistencia a eritromicina en cepas de *Streptococcus pyogenes* Grupo A de origen clínico, el fenotipo de resistencia asociado, seguido por la búsqueda de los genes de resistencia involucrados (*mefA*, *ermTR*, *ermB*) y finalmente se correlacionará con los datos de serotipo M, con los cuenta el laboratorio por un estudio previo <sup>(13)</sup>.

## 5. HIPÓTESIS:

- o La incidencia de la resistencia a eritromicina, en cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes*, se debe encontrar mayoritariamente asociada a la presencia del gen *mefA* en correlación con el fenotipo de resistencia M y los posibles serotipos: M2, M4, M11, M12, M22, M28 Y M75.

## 6. OBJETIVO GENERAL:

- ⇨ Identificar genes asociados a la resistencia a macrólidos en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico.

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES:

- ⇨ Determinar la resistencia a eritromicina (15µg) en 391 cepas clínicas.
- ⇨ Identificar los fenotipos de resistencia asociados a las cepas de *Streptococcus pyogenes*.
- ⇨ Estandarizar las condiciones adecuadas para la amplificación de los genes de resistencia a macrólidos.
- ⇨ Identificar por PCR los genes de resistencia a macrólidos (*mefA*, *ermTR* y *ermB*) que prevalecen en cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes*.
- ⇨ Correlacionar el fenotipo de resistencia de la cepa con su genotipo.
- ⇨ Correlacionar el serotipo M de las cepas con el genotipo de resistencia.
- ⇨ Evaluar la resistencia en función del número de cepas de *Streptococcus pyogenes* analizadas por hospital.

## 8. MATERIAL Y EQUIPO.

### ***Biológico.***

Se utilizaron 391 cepas clínicas, colectadas durante el periodo del 2001-2004, provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de México (Cuadro 2), conservadas en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol al 15% a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Cuadro 2.** Lista de Hospitales.

<b>HOSPITAL</b>	<b>No. Cepas</b>
Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional IMSS	9
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias	10
Hospital López Mateos ISSSTE	16
Hospital Gabriel Mancera IMSS	16
Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional IMSS	17
Otros*	35
Hospital Médica Sur	37
Instituto Nacional de Pediatría	79
Hospital General Gonzálo Castañeda ISSSTE	172

Extracción del DNA: suspensión bacteriana a  $2 \times 10^9$  células/mL.

Amplificación de los genes por la PCR: Las cepas 502, 503 y 504 de *Streptococcus pyogenes* utilizadas como control para los genes *mefA*, *ermTR* y *ermB* fueron donadas por el Dr. Donald Low de Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadá.

\* Agrupa cepas de Hospitales que proporcionaron menos de cinco muestras clínicas.

## ***Reactivos.***

### Pruebas de susceptibilidad y fenotipos:

Gelosa Sangre (GS) al 5% y Agar Mueller Hinton BD Bioxon

AMH Suplementado con 5% de sangre de carnero

Sangre de carnero estéril

Solución salina isotónica estéril

Discos de eritromicina de 15 µg BD BBL Sensi-Disc

Discos de clindamicina 2 µg BIORAD

### Extracción del DNA:

DNeasy QIAGEN que incluye:

Buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH=8.0, EDTA 2mM, Triton X-100 1.2%, lisozima 20 mg/mL)

Proteinasa K 20mg/mL

Etanol 96%

Buffer de lisis (AL)

Buffers de lavado (AW<sub>1</sub>, AW<sub>2</sub>)

Buffer de elusión (AE)

El DNA obtenido con una elusión está a una concentración aproximada de 0.14µg/µL

### Amplificación por la PCR:

Buffer 10X (100 mM Tris-HCl, pH=8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% w/v gelatina)

Deoxinucleósido trifosfato 1.25mM

H<sub>2</sub>O ultrapura

Taq DNA polimerasa 5U/µL Applied Biosystem

MgCl<sub>2</sub> 25mM

Iniciadores 10µM (*mefA1*, *mefA2*, *ermTR1*, *ermTR2*, *ermB1* y *ermB2*)

### Detección de los productos de amplificación:

Geles de agarosa al 2% (Agarosa grado biología molecular, Research Organics)

Marcador de peso molecular (PM) GeneRuler 100pb Fermentas

Revelador: bromuro de etidio 10mg/mL Research Organics

### ***Equipo.***

#### Pruebas de susceptibilidad y fenotipos:

Colorímetro VITEK Special DR200

Vortex GENIE-2 Scientific Industries

Incubadora Isotemp 750D

#### Extracción del DNA:

Minicolumnas QIAGEN

Microcentrífuga SIGMA 1-15

Parrilla Multi-block Heater

Incubadora Isotemp 750D.

#### Amplificación por la PCR

Termociclador Gene Amp PCR System 9700

Cámara de electroforesis mod. 4000 Life Technologies Inc.

Cámara digital DC290 Kodak con software Kodak 1D 3.5v

UV Transiluminador Lab-Tech

## 9. METODOLOGÍA.

**Pruebas de susceptibilidad a eritromicina (15 $\mu$ g).** Las cepas de origen clínico se sembraron en Gelosa Sangre al 5%, se utilizó el crecimiento de 24 horas para preparar una suspensión bacteriana en solución salina isotónica, equivalente al tubo 0.5 McFarland ( $\sim 1.5 \times 10^8$  UFC/ml) y se inocularon con hisopo estéril en placas de Agar Mueller-Hinton, de acuerdo con los Estándares para las Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos<sup>(31)</sup>. Las lecturas de susceptibilidad se realizaron después de una incubación de 24 h a 37°C.

La resistencia a eritromicina se determinó tomando en cuenta los Estándares para las Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos (NCCLS), Tabla 13.

**Tabla 13.** Estándares para la interpretación del diámetro de inhibición para eritromicina<sup>(31)</sup>.

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Susceptible
Eritromicina sensidisco 15 $\mu$ g	$\leq 15$ mm	16-20mm	$\geq 21$ mm

Para cada lote de pruebas de susceptibilidad a eritromicina realizado se incluyó la cepa control ATCC25923 de *Staphylococcus aureus*, para la cual se reportan de 22-30 mm como límites para los diámetros de inhibición<sup>(31)</sup>. Con las cepas de *Streptococcus pyogenes* eritromicina resistentes se determinó el fenotipo asociado a dicha resistencia por medio de la siguiente técnica.

### **Prueba para la determinación del fenotipo de resistencia (Doble Disco):**

Esta prueba se llevó a cabo siguiendo la misma metodología que se utilizó para la prueba de susceptibilidad a eritromicina; con la diferencia de que las placas de

AMH recién preparadas se suplementaron con un 5% de sangre de carnero y se utilizó discos de clindamicina de 2µg y discos de eritromicina de 15µg, separados a una distancia de 15 a 20mm. Se buscaron los tres fenotipos de resistencia a eritromicina reportados (M, iMLS, cMLS) <sup>(42)</sup>. El fenotipo de resistencia M mostró sensibilidad a clindamicina (2µg) y su halo no se vio interrumpido por la presencia de la eritromicina. El fenotipo de resistencia inducible (iMLS) se caracterizó por un corte en la zona de inhibición de la clindamicina cercano a la zona de la eritromicina. El fenotipo de resistencia constitutivo (cMLS) mostró resistencia tanto a clindamicina como a eritromicina<sup>(20, 42, 47)</sup>.

### ***Reacción en Cadena de la Polimerasa.***

En 391 cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico se buscaron los genes *mefA*, *ermTR* y *ermB* que confieren resistencia a macrólidos, siguiendo la metodología que se describe a continuación.

Aislamiento de DNA: A partir de un cultivo de 24 horas de *Streptococcus pyogenes*, en placas de Agar Sangre, se ajustó la concentración de bacterias aproximadamente a  $2 \times 10^9$  células con agua estéril, se procedió a centrifugar (7500rpm, 10min.) y el paquete bacteriano fue resuspendido en 180µL de buffer de lisis, mezclado e incubado a 37°C 30min. Después se adicionó 25 µL de proteinasa K y 200µL buffer AL, mezclando e incubando a 70°C 30min. Adicionamos 200µL de etanol al 96% y mezclamos perfectamente. Transfiriendo a la minicolumna, que retuvo el DNA, y centrifugando (8000rpm, 1min.); Llevando a cabo dos centrifugaciones posteriores para lavado (8000rpm, 1min. y 13000rpm, 3min. respectivamente). El DNA contenido en la columna finalmente se eluyó con 200µL buffer AE, incubando 1 min. a temperatura ambiente y centrifugando (8000rpm 1min).

Diseño de los iniciadores: La base para la realización de una PCR exitosa esta en el diseño de los iniciadores. En este caso, para la amplificación de los genes que confieren resistencia a macrólidos (*mefA*, *ermTR*, *ermB*), se ha reportado al menos

dos secuencias para cada uno de los iniciadores<sup>(16, 22, 44)</sup>. De esta manera se seleccionó aquellos cuyos productos de PCR fueran de diferentes pesos moleculares para diferenciarlos entre sí (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR <sup>(8, 43, 44)</sup>.

<b>Gen</b>	<b>Secuencias</b>	<b>Localización en el gen</b>	<b>Amplificado</b>
<i>mefA1</i>	5'- CTA TGA CAG CCT CAA TGC G -3'	1 - 19	1.5kb
<i>mefA2</i>	5'- ACC GAT TCT ATC AGC AAA G -3'	1435 - 1417	
<i>ermTR1</i>	5'- AGG TTA TAA TGA AAC AGA -3'	-8 - 10	208pb
<i>ermTR2</i>	5'- GCA TGA CAT AAA CCT TCA -3'	200 - 183	
<i>ermB1</i>	5'- GAA AAA GTA CTC AAC CAA ATA -3'	43 - 63	639pb
<i>ermB2</i>	5'- AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC -3'	681 - 658	

Controles: Para poder estandarizar la PCR se requerían controles positivos de cada uno de los genes, como no se contaba con ellos, se decidió buscarlos en las cepas clínicas resistentes a eritromicina es decir, se sometieron a la PCR bajo las condiciones de reacción que se trabajan en el laboratorio y se logró obtener un producto de amplificación de 1.4Kb que correspondió con el gen *mefA*. Finalmente el laboratorio obtuvo una donación de las cepas control (502, 503, 504), cada una con el correspondiente gen de resistencia a macrólidos (*mefA*, *ermTR*, *ermB*), del Laboratorio de Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadá.

Estandarización de la técnica de PCR: La estandarización implicó la determinación de la concentración y los volúmenes de cada reactivo de la mezcla maestra, así como la optimización de temperatura de alineamiento durante la reacción; la temperatura de hibridación fue la más importante, considerando para ella la temperatura de fusión (Tm) de los iniciadores.

Cabe mencionar que se intentó realizar una PCR múltiple (amplificación de los tres genes en una misma mezcla de reacción). Sin embargo, sólo se logró optimizar para identificar el gen *mefA* junto con el gen *ermB*. La probabilidad de encontrar una cepa con los genes de resistencia a macrólidos fue de 1/10, determinada con base al resultado de 100 cepas clínicas sometidas a pruebas de susceptibilidad. De esta manera, entre mayor cantidad de DNA's clínicos por tubo de reacción, mayor probabilidad de encontrar un gen de resistencia a macrólidos, manteniendo la proporción de DNA recomendada para la mezcla de reacción (10-250 ng). Inicialmente se probó el DNA de una sola cepa clínica (DNA clínico) por tubo de reacción. Sin embargo, se optimizó para colocar 5 DNA's por tubo. Con ésta cantidad de DNA la PCR trabajó adecuadamente.

Revelado de productos de PCR : Los productos de la PCR se corrieron en geles de agarosa al 2.0%. Se esperaron amplificados de 1.4 Kb (*mefA*), 208 pb (*ermTR*) y 639 (*ermB*).

### ***Asociación de fenotipo y genotipo de resistencia con serotipo M.***

Finalmente se correlacionaron los resultados de la fenotipificación de la resistencia y la determinación de los genes de resistencia a macrólidos con los datos de serotipo M (determinados por un estudio previo<sup>(13)</sup>) que poseen las cepas analizadas de *Streptococcus pyogenes*.

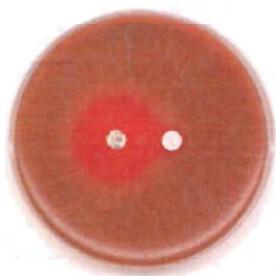
## 10. RESULTADOS.

De 391 cepas de *Streptococcus pyogenes* evaluadas por pruebas de susceptibilidad se obtuvo que 30 (7.8%) cepas fueron resistentes a eritromicina. De éstas, 28 cepas (93%) presentaron el fenotipo de resistencia M, un aislamiento (3%) (cepa con clave 185) presentó el fenotipo de resistencia inducible (iMLS) y la cepa con clave 706 (3%) no presentó ningún fenotipo de resistencia asociado (Tabla 14).

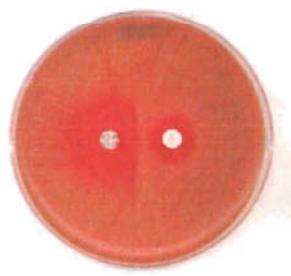
**Tabla 14.** Porcentaje de resistencia a eritromicina (15 µg)  
en *Streptococcus pyogenes*.

No. cepas analizadas	No. cepas resistentes	% Resistencia	Fenotipos encontrados (%)
391	30	7.7	M (93) y iMLS (3)

En la Figura 7 se presentan los fenotipos de resistencia M e iMLS. El disco derecho corresponde a 15 µg de eritromicina y el disco izquierdo a 2µg de clindamicina. El fenotipo de resistencia M mostró sensibilidad a clindamicina y su halo no se vió interrumpido por la presencia de la eritromicina. El fenotipo de resistencia inducible (iMLS) se caracterizó por un corte en la zona de inhibición de la clindamicina cercano a la zona de la eritromicina. Esta descripción de los fenotipos correspondió con los encontrados en otras partes del mundo<sup>(20, 42, 47)</sup>.



Fenotipo de resistencia M



Fenotipo de resistencia iMLS

**Figura 7.** Representación de los fenotipos de resistencia encontrados al evaluar 30 cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina.

Después de varios ensayos probando diferentes temperaturas de alineación así como diferentes mezclas de reacción, se estableció 94°C, 48°C y 72°C para desnaturalización, hibridación y elongación respectivamente en un proceso de 30 ciclos (Tabla 15). Un volumen final de reacción de cincuenta microlitros para la amplificación de los genes *mefA*, *ermB* y un volumen final de reacción de treinta microlitros para amplificar el gen *ermTR* (Tablas 16, Tabla 17).

**Tabla 15.** Temperaturas trabajadas en la PCR.

Etapa	Temperatura (°C)
Desnaturalización	94
Hibridación	48
Elongación	72

**Tablas 16.** Mezcla de reacción para amplificar *mefA* y *ermB*.

Vol. Final=50µ L

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer	5.0
dNTP's	12.0
<i>mefA</i> 1	1.50
<i>mefA</i> 2	1.50
<i>ermB</i> 1	1.50
<i>ermB</i> 2	1.50
Taq	0.40
DNA	0.75*
H <sub>2</sub> O	22.85

**Tablas 17.** Mezcla de reacción para amplificar *ermTR*.

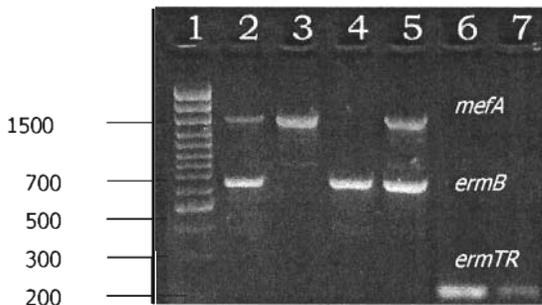
Vol. Final=30µ L

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer	3.0
dNTP's	5.0
<i>ermTR</i> 1	1.0
<i>ermTR</i> 2	1.0
Taq	0.20
DNA	0.75*
H <sub>2</sub> O	16.05

\*Este volumen es por muestra de DNA, con 5 DNA's=3.75 µL y por lo tanto el volumen de agua disminuye.

Se obtuvieron amplificados con un peso molecular de 1.4 kb para *mefA*, 208 pb para *ermTR* y 639 pb para *ermB* (Figura 8). La mezcla de iniciadores para

identificar a los genes *mefA* y *ermB* se probó con 5 DNA's clínicos cuyas pruebas de susceptibilidad a eritromicina fueron negativas (cepas con clave: 700, 702, 703, 711, 776); se adicionaron también los DNA's de las cepas control (502, 504). En total para la estandarización se manejo siete DNA's por reacción y se logró amplificar los DNA's de las cepas control (Pozo 2), lo que sugirió que la cantidad de DNA's clínicos no interfirió su amplificación; el control positivo de esta reacción (ausencia de DNA clínico) se muestra en el Pozo 5. Se amplificó por separado las cepas control para los genes *mefA* y *ermB* (Pozos 3 y 4 respectivamente). La cepa positiva para el gen *ermTR* (cepa 503) se probó con 6 DNA's clínicos de los cuales tres cepas fueron susceptibles a eritromicina y tres fueron resistentes-fenotipo M-probable gen *mefA* asociado (claves 700, 702, 703 y 750, 723, 732 respectivamente); la probable existencia del gen *mefA* no interfirió con la amplificación del gen *ermTR* de igual forma que la cantidad de DNA's clínicos colocados (Pozo 6); el control positivo de esta reacción se colocó en el Pozo 7. (Figura 8).



**Figura 8.** Amplificación de los genes *mefA*, *ermTR* y *ermB* durante la estandarización. Pozo 1: Marcador de peso molecular; Pozo 2: Mezcla de 5 DNA's clínicos, cepas control para genes *mefA* y *ermB*; Pozo 3: Control positivo para *mefA*; Pozo 4: Control positivo para *ermB*; Pozo 5: Control positivo *mefA/ermB*; Pozo 6: Mezcla de 5 DNA's y cepa control para gen *ermTR*; Pozo 7: Control positivo para *ermTR*.

Después de someter a la PCR las 391 cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes*, se agrupó los productos de PCR de las treinta cepas resistentes a eritromicina. De

ellas 28 cepas presentaron el gen *mefA* y una cepa (185) el gen *ermTR*. Sorprendentemente la cepa (706) que no mostró asociación con alguno de los tres fenotipos de resistencia a macrólidos (M, iMLS, cMLS) resultó negativa para la amplificación de alguno de los genes de resistencia a macrólidos buscados (*mefA*, *ermTR*, *ermB*) (Tabla 18).

**Tabla 18.** Genes de resistencia a macrólidos identificados entre las cepas eritromicina resistentes de *Streptococcus pyogenes*.

No. cepas resistentes	PCR( +)	Gene
30	28	<i>mefA</i>
	1	<i>ermTR</i>

Para el resto de los productos de amplificación de la PCR, se encontró tres cepas positivas para los genes de resistencia a macrólidos *mefA* y *ermTR*; de las cuales, dos (574, 587) fueron positivas para el gen *mefA* y una (268) fue positiva para dos genes de resistencia a macrólidos: *mefA* y *ermTR* (Tabla 19). Es interesante mencionar que estas cepas fueron sensibles a 15µg de eritromicina (diámetro de inhibición >30 mm) y no se identificó los fenotipo M, iMLS y cMLS (Tabla 20), por lo que en lo sucesivo las denominamos como PCR positivas.

**Tabla 19.** Identificación de los genes asociados a la resistencia a macrólidos entre cepas sensibles a eritromicina.

No. cepas PCR positivas	Genes encontrados
1	<i>mefA</i> y <i>ermTR</i>
2	<i>mefA</i>

A continuación se presentan los datos experimentales de las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina con los resultados de la PCR (Tabla 20). Se incluyó el tamaño de los halos de inhibición, de las pruebas de susceptibilidad a eritromicina, el fenotipo de resistencia determinado por pruebas

de doble disco y los resultados de la PCR para los genes *mefA*, *ermTR* y *ermB*. De forma adicional el serotipo M<sup>(13)</sup> y el origen clínico de la muestra.

**Tabla 20.** Recopilación de las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina y las cepas con genotipo de resistencia a macrólidos. En donde F=faríngeo, NF=no faríngeo y (-)=negativo.

Clave de la cepa	Serotipo	Origen Clínico	Susceptibilidad (mm de inhibición)	Fenotipo de resistencia	PCR <i>mefA</i>	PCR <i>ermTR</i>	PCR <i>ermB</i>
706	M41-2	F	13	-	-	-	-
185	M4	NF	20	iMLS	-	+	-
268	M75	F	>30	-	+	+	-
574	M28	F	>30	-	+	-	-
587	M28	F	>30	-	+	-	-
151	M75	F	17	M	+	-	-
181	M75	F	16	M	+	-	-
183	M75	F	13	M	+	-	-
199	M75	F	16	M	+	-	-
203	M75	F	15	M	+	-	-
204	M75	F	13	M	+	-	-
222	M75	F	13	M	+	-	-
223	M75	F	15	M	+	-	-
225	M75	F	13	M	+	-	-
227	M75	F	12	M	+	-	-
259	M75	F	13	M	+	-	-
270	M75	F	12	M	+	-	-
289	M75	F	12	M	+	-	-
567	M75	NF	11	M	+	-	-
569	M75	NF	11	M	+	-	-
572	M75	F	11	M	+	-	-
597	M75	F	13	M	+	-	-
603	M75	F	12	M	+	-	-
605	M75	F	12	M	+	-	-
612	M75	F	9	M	+	-	-
633	M75	F	17	M	+	-	-
653	M75	F	15	M	+	-	-
665	M75	F	17	M	+	-	-
723	M75	F	16	M	+	-	-
732	M75	F	14	M	+	-	-
750	M75	F	12	M	+	-	-
774	M75	NF	10	M	+	-	-
793	M75	F	14	M	+	-	-

De los datos generales (Tabla 20) se agrupó a las cepas resistentes a eritromicina considerando su fenotipo de resistencia, serotipo M y genotipo (*mefA*, *ermTR*). Se encontró tres diferentes serotipos M asociados a la resistencia a macrólidos: M75, M4 y M4-2, de los cuales, los dos primeros, tienen asociados los genes *mefA* y *ermTR* correspondientemente (Tabla 21). Finalmente se tuvo un 93% (28/30) de cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina asociadas al fenotipo M75.

**Tabla 21.** Asociación de las cepas eritromicina-resistentes con su fenotipo, serotipo y genotipo de resistencia.

No. de cepas	Fenotipo de Resistencia	Serotipo	Genotipo
28	M	M75	<i>mefA</i>
1	iMLS	M4	<i>ermTR</i>
1	-	M4-2	n.i.

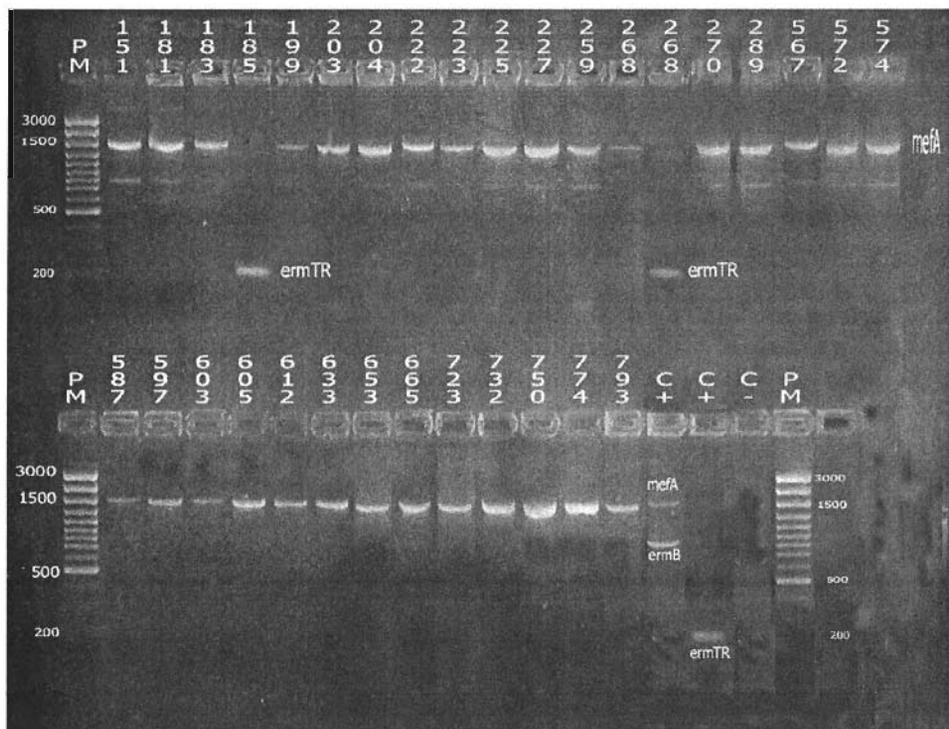
n.i.=no identificado

De igual manera las cepas que se denominaron PCR positivas (268, 574, 587) se relacionaron con su serotipo y genotipo; de éstas surgió un nuevo serotipo M (M28) asociado al gen *mefA*, y un nuevo genotipo (*mefA* + *ermTR*) asociado al serotipo M75 (Tabla 22).

**Tabla 22.** Cepas PCR positivas en asociación con su serotipo y genotipo.

No. cepas	Serotipo	Genotipo
2	M28	<i>mefA</i>
1	M75	<i>mefA</i> , <i>ermTR</i>

De forma adicional se presentan los productos de amplificación de las cepas de *Streptococcus pyogenes* asociadas con los genes de resistencia a macrólidos, obsérvese que el producto amplificado del gen *mefA* fue de 1.4Kb; el gen *ermTR* de 208pb y el *ermB* de 639pb aproximadamente. Los controles positivos (C+) y el negativo (C-) se colocaron al final de las cepas. El marcador de peso molecular (PM) se colocó en los pozos iniciales y al final.



**Figura 9.** Productos de PCR de las cepas que poseen genes asociados a la resistencia a macrólidos.

La presencia de cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina por hospital fue otro factor importante que se tomó en cuenta. Siete hospitales considerados en este estudio poseen cepas asociadas con los genes de resistencia

a macrólidos. El porcentaje de resistencia a eritromicina varía con cada hospital desde un mínimo de 2.7% (Hospital Médica Sur) a un máximo 43.8% (HGGM), esta variación puede estar determinada por la cantidad de cepas analizadas, diferentes para cada hospital. El hospital HGGC tiene un porcentaje de resistencia (7.6%) similar al que se encontró de manera general (7.7%) y la cantidad de cepas que se analizó para este hospital representó el 44% del total de cepas evaluadas, sugiriendo que la interpretación del porcentaje de resistencia a eritromicina (si resultó alto o bajo) depende indiscutiblemente de la cantidad total de cepas que se analizan (Tabla 23).

**Tabla 23.** Porcentaje de resistencia a eritromicina por Hospital.

<b>HOSPITAL</b>	<b>No. cepas analizadas</b>	<b>No. cepas positivas</b>	<b>% RESISTENCIA</b>
HMS	37	1	2.7
INP	79	4	5.1
HECM	17	1	5.9
HGGC	172	13	7.6
INER	10	1	10.0
HLM	16	3	18.8
HGGM	16	7	43.8

## 11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### **Análisis de las pruebas de susceptibilidad.**

La evaluación de la susceptibilidad a 15 µg de eritromicina (Tabla 14) indicó que el porcentaje de resistencia promedio fue del 8%, el cual resultó comparable con lo reportado en Argentina (8.2%)<sup>(47)</sup> o el alcanzado en nuestro país para el año 2003 (8.7%)<sup>(29)</sup>. Se considera como un bajo porcentaje de resistencia a eritromicina comparado con los estudios realizados en Francia (22%)<sup>(4)</sup>, España (27 a 34%)<sup>(5)</sup> e Italia (38%)<sup>(23)</sup>.

De las pruebas de susceptibilidad es importante mencionar la existencia de un 23% de cepas de *Streptococcus pyogenes* que presentaron consistentemente (después de tres repeticiones) resistencia intermedia a eritromicina (16-20mm) pudiendo ser falsos negativos. Por tal motivo fue necesario establecer los milímetros de inhibición que serían considerados para determinar las cepas resistentes, bajo las condiciones experimentales de trabajo, en virtud de que también el control negativo presentó variabilidad en los diámetros de inhibición (desde 23mm hasta 35mm). De esta manera se definió 17 mm como límite máximo para considerar una cepa resistente a eritromicina (Tabla 20).

### **Análisis de las pruebas de Doble Disco para determinación del fenotipo de resistencia.**

El fenotipo M de resistencia a eritromicina, en general, se ha encontrado en mayor proporción que el fenotipo de resistencia inducible (iMLS) y este a su vez en mayor proporción que el fenotipo de resistencia constitutivo (cMLS)<sup>(16, 23, 29)</sup>. Sin embargo, existen excepciones como lo fue el caso del 60% de resistencia a eritromicina asociado al fenotipo de resistencia iMLS<sup>(42)</sup> o bien el 55% que se asoció al fenotipo de resistencia cMLS<sup>(5)</sup>. Cabe destacar que no se detectó el fenotipo de resistencia constitutivo (cMLS) en nuestra población (Figura 7) en contraste con el 2.2% que se reportó recientemente para el Hospital La Raza, Centro Médico, IMSS en el año 2003<sup>(29)</sup>. Por otra parte, una característica particular del fenotipo de

resistencia inducible fue que su expresión se ve manifestada por una susceptibilidad intermedia (20mm, Tabla 20) como se ha reportado para este fenotipo de resistencia<sup>(32, 48)</sup>.

### **Análisis sobre el origen clínico de las cepas de *Streptococcus pyogenes*.**

Al analizar la resistencia a eritromicina de acuerdo al origen faríngeo o no-faríngeo de la muestra (Tabla 20), se encontró resultados muy similares, mientras que en los aislamientos faríngeos se determinó una resistencia del 7.8% (26/334) en los aislamientos no faríngeos fue del 7.0% (4/57), sugiriendo que en nuestra población la resistencia no depende del tipo de muestra clínica, a diferencia del estudio realizado en Finlandia en 1992<sup>(41)</sup>, donde se demostró que de 3087 aislamientos faríngeos el 20% fue resistente a eritromicina, y de 1349 aislamientos no-faríngeos el 31% fue resistente<sup>(41)</sup>. Indicando que las cepas invasivas expresan factores de patogenicidad importantes desde el punto de vista epidemiológico en comparación con cepas no invasivas<sup>(5)</sup>.

### **Análisis de los productos de PCR de las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina.**

La reacción de PCR permitió identificar los genes de resistencia a macrólidos asociados con la resistencia a eritromicina (Tabla 18). El porcentaje de resistencia a eritromicina se asoció en un 93% a la presencia del gen *mefA* y un 3% en asociación con el gen *ermTR*. Dicho porcentaje correlacionó con el reportado en Argentina (96% *mefA* y 2% *ermTR*). Sin embargo, a diferencia del 2% reportado en Argentina en asociación al gen *ermB*, para nuestros resultados no se encontró la existencia de éste gen en la población estudiada.

Adicionalmente se encontró una cepa resistente a 15 µg de eritromicina (706, la misma que no mostró fenotipo de resistencia) para la cual no se logró amplificar ninguno de los tres genes de resistencia a macrólidos (*mefA*, *ermTR*, *ermB*). La existencia de una cepa con estas características se reportó en Finlandia en el año

2000<sup>(23)</sup>. De acuerdo a lo anterior se especuló que este comportamiento podría ser explicado considerando lo siguiente:

- 1) Demostrar que no existen los genes de resistencia a macrólidos mediante secuenciación de la cepa, confirmando que las secuencias nucleotídicas de los genes de resistencia a macrólidos no se encuentran presentes.
- 2) Puede estar involucrada en un reciente caso de resistencia a eritromicina asociada a una mutación en la proteína L4 debida a una previa administración prolongada de miocamicina<sup>(7)</sup>.
- 3) Suponer la existencia de otro mecanismo o gen de resistencia a eritromicina que no se haya descrito aún.

De esta manera contamos con otra alternativa de investigación que nos permita dilucidar los factores involucrados en esta resistencia.

### **Análisis de los genes de resistencia a macrólidos determinados por PCR en cepas de *Streptococcus pyogenes* sensibles a eritromicina.**

El resultado de la PCR nos arrojó datos significativos (Tabla 19).

- 1) La identificación de una cepa (268) que posee dos genes de resistencia a macrólidos (*mefA* y *ermTR*). Hallazgo no reportado hasta el momento en población mexicana, pero sí en otros países como Francia<sup>(5)</sup>, Italia<sup>(16)</sup> y Finlandia<sup>(23)</sup>.
- 2) Dos cepas (574, 587) asociadas al gen *mefA* que no expresaron resistencia a 15µg de eritromicina y no manifestaron fenotipo de resistencia, lo que hace pensar que existen cepas que no expresan el gen de resistencia a macrólidos, ya sea por que la concentración de eritromicina no fue suficiente para estimular la expresión del gen de resistencia, o bien el gen puede estar mutado y no genera el polipéptido de resistencia (enzima o transportador).

Respecto a los productos de la PCR obtenidos (Figura 9), la temperatura de alineamiento de 48°C resultó ser la que generó menos amplificadores inespecíficos

para el gen *mefA*; los genes *erm* no presentaron complicaciones de este tipo. No se detectó la existencia del gen *ermB* en las cepas analizadas, el cual tiene una incidencia menor que el gen *ermTR* en los países que si lo reportan<sup>(23)</sup>.

### **Análisis de asociación del serotipo M con el genotipo de las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a eritromicina.**

La trascendencia de relacionar el serotipo M con los resultados de las pruebas de doble disco (Tabla 21) 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. De acuerdo con esto, se observó en la población de cepas estudiadas, que el serotipo M75 prevalece mayoritariamente relacionado a la presencia del gen *mefA*, en un 93%, ya que 28 de 30 cepas resistentes a eritromicina presentaron este gen. Este patrón coincidió con lo reportado en España (270/293)<sup>(35)</sup> y Francia (5/5)<sup>(8)</sup>. El serotipo M4 se ha reportado asociado con los genes de resistencia a macrólidos siendo uno de los serotipos M predominantes (Tabla 11) asociado con el gen *mefA*. Contrario a estos reportes, en nuestro estudio, una cepa del serotipo M4 se encontró asociado a el fenotipo de resistencia inducible (iMLS) con un genotipo *ermTR* (Tabla 21). El serotipo M41-2 no se ha reportado dentro de los serotipos M asociados con los genes de resistencia a macrólidos, tal vez por que puede estar envuelto en otro proceso, aún no dislucidado, que confiere resistencia a eritromicina.

### **Análisis de asociación del serotipo M con el genotipo de las cepas de *Streptococcus pyogenes* PCR positivas sensibles a eritromicina.**

Un nuevo serotipo M (M28) asociado con los genes que confieren resistencia a macrólidos se identificó de éste estudio. El serotipo M28 esta reportado dentro de los más frecuentemente relacionados con los genes de resistencia a macrólidos, principalmente asociado al gen *ermB* <sup>(4, 5)</sup>; con poca frecuencia asociado al gen *ermTR*<sup>(5)</sup> (Tabla 11). Contrariamente el resultado de nuestra amplificación indicó estar asociado al gen *mefA*. Cabe mencionar que el serotipo M28, en nuestra

población, puede tener la particularidad de no expresar *in vitro* el gen de resistencia macrólidos (Tabla 22).

Finalmente es importante destacar que la serotipificación provee información valiosa de ámbito epidemiológico pero no es suficiente para establecer que determinado serotipo M va ha tener asociado un gen específico de resistencia a macrólidos, debido a que un mismo genotipo puede estar presente en diferentes serotipos y mismos serotipos presentar heterogeneidad genética entre sí<sup>(5)</sup>.

### **Análisis de la distribución por hospital de las cepas resistentes a eritromicina.**

Un dato indicador de que el porcentaje de resistencia está relacionado con el número de cepas que se analizan es la variabilidad en los porcentajes de resistencia a eritromicina obtenidos en cada hospital. Es de particular interés el caso presentado por el Hospital General Gonzálo Castañeda (HGGC) de el cual se tuvo el mayor número de muestras y un porcentaje de resistencia similar al obtenido de manera general (Tabla 23).

En el Hospital Gabriel Mancera (HGGM) se tuvo un alto porcentaje de resistencia, del cual habría que investigar si el resultado está influenciado por la minoría de cepas analizadas o bien, es que existe realmente una población con un alto índice de resistencia, que hace suponer un uso desmedido de este tipo de antibióticos y nos obliga a informar sobre la situación prevalente, para evitar que el porcentaje de resistencia siga en aumento y se vuelva un problema epidemiológicamente grave.

Aunque el porcentaje de resistencia a eritromicina no resultó alto debemos continuar con su monitoreo, para identificar cambios en las poblaciones de *Streptococcus* que permitan establecer alternativas terapéuticas (de segunda elección) para las infecciones ocasionadas por dicha bacteria. Es importante remarcar que fuimos el primer laboratorio en México (y en otros países), en realizar un estudio y análisis completo de las cepas de *Streptococcus pyogenes*, ya que la mayoría de los reportes de resistencia a eritromicina incluyeron sólo la

determinación del porcentaje de resistencia, y unas cuantas veces, la serotipificación o bien, fenotipificación y/o genotipificación de las cepas. Esto resultó en información insuficiente para un verdadero análisis epidemiológico que nos permita hacer aportaciones valiosas en el ámbito de la salud.

## 12. CONCLUSIONES.

- ✓ El porcentaje de resistencia a eritromicina en 391 cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* fue del 8%.
- ✓ Los fenotipos de resistencia a eritromicina que presentó la población estudiada fueron M (93%) y el iMLS (3%).
- ✓ Los genes *mefA* y *ermTR* de resistencia a macrólidos se identificaron en las 391 cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* analizadas
- ✓ Los serotipos M75, M28, M4 y M41-2 de *Streptococcus pyogenes* están asociados con la resistencia a macrólidos en la población estudiada.
- ✓ El 93% de las cepas de *Streptococcus pyogenes* eritromicina resistentes son serotipo M75.
- ✓ En la población estudiada el gen *mefA* prevalece mayoritariamente como el gen de resistencia a macrólidos y esta asociado al serotipo M75.
- ✓ Se detectó una cepa de *Streptococcus pyogenes* que tiene dos genes asociados a la resistencia a macrólidos, el gen *ermTR* y el gen *mefA*.
- ✓ El gen *ermB* no se encuentran en la población estudiada.
- ✓ Se detectó una cepa de *Streptococcus pyogenes* resistente a eritromicina y no tiene asociada genes de resistencia a macrólidos conocidos (*mefA*, *ermTR*, *ermB*).
- ✓ El porcentaje de resistencia a eritromicina no presenta un problema prioritario de salud.

### 13. REFERENCIAS.

1. **Banks D., Porcella S., Barbian K., Martin J., Musser J.** *Structure and Distribution of an Unusual Chimeric Genetic Element Encoding Macrolide Resistance in Phylogenetically Diverse clones of Group A Streptococcus.* J Infect Dis. 2003; 188:1898-1908.
2. **Bassetti M., Manno G., Collida A., Ferrando A., Gatti G., Ugolotti E., Cruciani M., Bassetti D.** *Erythromycin resistance in Streptococcus pyogenes in Italy.* Emerg Infect Dis. 2000; 6(2):180-183.
3. **Billal D., Hotomi M., Yamauchi K., Fujihara K., Tamura S., Kuki K., Sugita R., Endou M., Mukaigawa J., Yamanaka N.** *Macrolide-resistant genes of Streptococcus pyogenes isolated from the upper respiratory tract by polymerase chain reaction.* J Infect Chem. 2004; 10(2):115-120
4. **Bingen E., Bidet P., Mihaila-Amrouche L., Doit C, Forcet S., Brahimi N., Bouvet A., Cohen R.** *Emergence of macrolide-resistant Streptococcus pyogenes strains in French children.* Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(9):3559-3562.
5. **Bingen E., Fitoussi F., Doit C., Cohen R., Tanna A., George R., Loukil C., Brahimi N., Le Thomas I., Deforche D.** *Resistance to Macrolides in Streptococcus pyogenes in France in Pediatric Patients.* Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 42(6):1453-1457.
6. **Bisno A., Brito M., Collins C.** *Molecular basis of group A Streptococcal virulence.* L Infec Dis. 2003; 3:191-200.
7. **Bozdogan B., Appelbaum P., Ednie L., Grivea I., Syrogiannopoulos G.** *Development of macrolide resistance by ribosomal protein L4 mutation in Streptococcus pyogenes during miocamycin treatment of an eight-year-old Greek child with tonsillopharyngitis.* Clin Microbiol Infect. 2003; 9(9):966-969.
8. **Clancy J., Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W., Cronan M., Kamath A., Bergeron J., Retsema J.** *Molecular cloning and functional analysis of a*

- novel macrolide-resistance determinant, mefA, from Streptococcus pyogenes*. Mol. Microbiol. 1996; 22(5):867-879.
9. **Cocuzza C., Blandino G., Mattina R., Nicoletti F., Nicoletti G.** *Antibiotic susceptibility of group A streptococci in two Italian cities: Milano and Catania*. Microb Drug Resist. 1997; 3(4):379-384.
  10. **Cornaglia G., Ligozzi M., Mazzariol A., Valentini M., Orefici G., Fontana R.** *Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in Streptococcus pyogenes in Italy, 1993-1995*. Emerg Infect Dis. 1996; 2(4):339-342.
  11. **Cunningham M.** *Patogenesis of Group A Streptococcal Infections*. Clinical Microb Rev. 2000; 13(3):470-511.
  12. **Facklam R.** *Manual de Procedimientos. Aislamiento e Identificación de Estreptococos*. 1ª. U. S. Department of Health, Education and Welfare, 1978.
  13. **Figueroa F.** *Tipificación molecular del gen que codifica para la proteína M (emm) en cepas de Streptococcus pyogenes de origen clínico*. Tesis. Licenciatura, QFB, México, Facultad de Química, UNAM, 2004.
  14. **Garza, V.** *Bacterias Patógenas Parte III*. 1ª.ed. México, UNAM-Facultad de Química, 1999: 33-50.
  15. **Giner A., Canós C., Rodilla C., Ferrer G.** *Nuevos macrólidos, ¿superan a eritromicina?* Farm Hosp. 1995; (5): 259-265.
  16. **Giovanetti E., Montanari M., Mingoia M., Varaldo P.** *Phenotypes and Genotypes of Erythromycin-Resistant Streptococcus pyogenes Strains in Italy and Heterogeneity of Inducibly Resistant Strains*. Antimicrob. Agents Chemother, 1999; 43(8):1935-1940.
  17. **González A., Ortiz C., Mota R., Dickinson M., Dávila R., Fernández M.** *Antimicrobial sensitivity and characterization of Streptococcus pyogenes strains isolated from a scarlatina outbreak*. Salud Publica Mex. 2002; 44(5):437-441.

18. **González P., Barreto P., Rodríguez R., Alonso L., Alonso P., Macrólidos.** Acta Médica. 1998; 8 (1): 71-74.
19. **Goodman & Gilman,** *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* 9ª. ed. México, McGraw-Hill Interamericana, 1996: 1205-1207.
20. **Gottlieb, D., Shaw P.** *Antibiotics, Biosynthesis.* Vol. II, 1ª. Ed. USA, Edit. Springer-Verlag N. Y. Inc, 1967: 155-180.
21. **Kataja J, Huovinen P., Muotiala A, Vuopio-Varkila J, Efstratiou A, Hallas G, Seppala H.** *Clonal spread of group A Streptococcus with the new type of erythromycin resistance. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance.* J Infect Dis. 1998 ; 177(3):786-789.
22. **Kataja J., Huovinen P., Skurnik M., Seppälä H.** *Erythromycin Resistance Genes in Group A Streptococci in Finland.* Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(1): 48-52.
23. **Kataja J., Huovinen P., The Macrolide Seppälä H.** *Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins.* Antimicrob Chemother. 2000; 46 (5): 789-792.
24. **Leclercq R., Courvalin P.** *Bacterial resistance to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin Antibiotics by Targen Modification. Minireviews.* Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(7):1267-1272.
25. **Lowbury E., Hurst L.** *The sensitivity of Staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleandomycin, and spiramycin.* J Clin Pathol. 1959; 12(2):163-169.
26. **Madigan, M.,** Martinko J., Parker J. *Brock Biología de los microorganismos.* 8ª.ed. España, Edit. Prentice Hall Iberia, 1999: 414-419.
27. **Maruyama S., Yoshioka H., Fujita K., Takimoto M., Satake Y.** *Sensitivity of group A Streptococci to antibiotics. Prevalence of resistance to erythromycin in Japan.* Am J Dis Child. 1979 ;133(11):1143-1145.

28. **McCarty M.** *Estreptococos*, 498-511. En: Davis B., Dulbecco R., Eisen H., Ginisberg H. (ed) Tratado de microbiología. 3ª.ed. México, Salvat Editores, 1984.
29. **Mendes C., Marin M., Quiñónez F., Sifuentes-Osornio J., Cuijly C., Castanheira M., et. al** *Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000)*. Braz J Infect Dis. 2003; 7(1):44-61.
30. **Murono K., Yoshikawa M., Murai T., Fujita K.** *Decline of erythromycin resistance of group A Streptococci in Japan*. Pediatr. Infect. Dis. J. 1994; 13(12):1075-1078.
31. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Twelfth Informational Supplement. M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Roche, 2002: 65-75.
32. **Oliveira de R., Barros R., Mendonca C., Teixeira L., Castro A.** *Antimicrobial susceptibility and survey of macrolide resistance mechanisms among Streptococcus pyogenes isolated in Rio de Janeiro, Brazil*. Microb Drug Resist. 2003; 9(1):87-91.
33. **Orden B., Pérez-Trallero E., Montes M., Martínez R.** *Erythromycin resistance of Streptococcus pyogenes in Madrid*. Pediatr Infect Dis J. 1998; 17(6):470-473.
34. **Perea L.** *Streptococcus*, 75-85. En: Tay J. (ed). Microbiología y Parasitología Médicas. 3ª. ed. México, Méndez Editores, 2003.
35. **Pérez-Trallero E., Marimon J., Montes M., Orden B., De Pablos M.** *Clonal differences among erythromycin-resistant Streptococcus pyogenes in Spain*. Emerg Infect Dis. 1999; 5(2):235-240.
36. **Roberts M., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L., Rood J., Seppälä H.** *Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B*



- clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system.* Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(8):1817-1824.
46. **Tinoco, J., Sifuentes-Osornio J., Donís Hernández J., Arredondo J., Cárdenas P., Cornejo P., et.al.** *Resistencia de Streptococcus pyogenes a Antimicrobianos.* Reporte de la red de vigilancia de resistencia bacteriana en México: 1998-2002.
47. **Vay C., Martínez S., Amoroso A., Famiglietti A., Mier C., Gutkind G.** *Genetic and phenotypic characterization of resistance to macrolides in Streptococcus pyogenes from Argentina.* Antimicrob Agents Chemoter. 2004; 23:95-98.
48. **Weber P., Filipeck J., Bingen E., Fitoussi F., Goldfarb G., Chauvin J., Reitz C., Portier H.** *Genetic and phenotypic characterization of macrolide resistance in group A Streptococci isolated from adults with pharyngotonsillitis in France.* Antimicrob Chemother. 2001; 48:291-294.
49. **Weisblum B.** *Erythromycine Resistance by Ribosome Modification.* Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(3):577-585.
50. **Weisblum B.** *Resistance to the Macrolide-Lincosamide-Streptogramin Antibiotics,* 694-710. In: Fischetti V., Novick R., Ferretti J., Portnoy D., Rood J. (ed). Gram-Positive Pathogens. 1a. ed. Washington, D. C., Edit. ASM PRESS, 2000.
51. **Zachariadou L, Papaparaskevas J, Paraskakis I, Efstratiou A, Pangalis A, Legakis NJ, Tassios PT.** *Predominance of two M-types among erythromycin-resistant group A Streptococci from Greek children* Clin Microbiol Infect. 2003; 9(4):310-314.