

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA**

**Determinación "in vitro" de la resistencia a tetraciclina
e identificación de los genes *tet(M)* y *tet(O)*
en aislamientos clínicos
de *Streptococos* beta hemolíticos.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SERGIO DE ALBA CAMACHO



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).

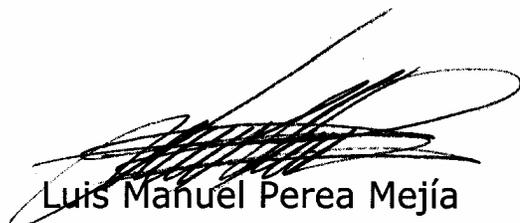
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. MA. DEL CARMEN CORTÉS DEQUIR
Vocal	Prof. RODOLFO PASTELIN PALACIOS
Secretario	Prof. LUIS MANUEL PEREA MEJIA
1er. Suplente	Prof. MA. BENITA FERNANDEZ SALGADO
2º. Suplente	Prof. AURORA LARA NUÑEZ

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 IN218103-3.

ASESOR



Luis Manuel Perea Mejía

SUSTENTANTE



Sergio de Alba Camacho

A mi familia

Sergio, Amelia, Leticia, Celia y Yolanda

Por haberme apoyado incondicionalmente en todo momento durante mi
carrera.

A mis amigos y compañeros

Por haber compartido conmigo muchos momentos felices y tristes
en la Facultad de Química.

A Edith Alcántara Cerón

Por haberme permitido ser parte de tu vida

Al M. en C. Luis Manuel Perea Mejía

Por su tiempo, por su gran apoyo y sobre todo por la confianza que me
brindo en el desarrollo de este trabajo

1. RESUMEN	1
2. INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y TABLAS	3
3. LISTA DE ABREVIATURAS	5
4. ANTECEDENTES	7
4.1. Generalidades sobre Estreptococos	7
4.1.1 Generalidades sobre Estreptococos del Grupo A (EGA)	10
4.1.2 Generalidades sobre Estreptococos del Grupo B (EGB)	16
4.1.3 Generalidades sobre Estreptococos del Grupo C (EGC) y Grupo G (EGG)	19
4.2 Generalidades sobre antibióticos	23
4.3 Generalidades sobre la tetraciclina	25
4.3.1 Uso terapéutico de la tetraciclina	27
4.4 Resistencia antimicrobiana	28
4.4.1 Transferencia de resistencia	33
4.4.2 Mecanismo de resistencia antimicrobiana	36
4.4.2.1 Resistencia debida a mutaciones	37
4.4.3 Importancia clínica de la resistencia	38
4.4.3.1 Relación de la resistencia con el tipo M	41
4.4.3.2 Relación de la resistencia con los genes <i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i>	42
5. HIPÓTESIS	44
6. OBJETIVOS GENERALES	44
7. OBJETIVOS PARTICULARES	45
8. MATERIAL Y EQUIPO	46

9. METODOLOGÍA	50
10. RESULTADOS	55
11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	75
12. CONCLUSIONES	84
13. BIBLIOGRAFÍA	86

2. ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y TABLAS	Pag
Cuadro 1.- Factores de virulencia de EGA.....	11
Figura 1.- Estructura química de la tetraciclina.....	26
Figura 2.- Cepas positiva en la prueba de resistencia a tetraciclina por la técnica de difusión en disco.....	56
Figura 3.- Cepa positiva en la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria.....	56
Figura 4.- Productos de PCR a diferentes temperaturas durante la estandarización.....	58
Figura 5.- Productos de PCR de las cepas que poseen genes asociados a la resistencia a tetraciclina.....	60
Figura 6. Alineamiento de la secuencia del gen <i>tet(M)</i> de <i>E. faecalis</i> con una secuencia obtenida a partir de una cepa de EBH detectada con el gen <i>tet(M)</i> .	73
Gráfica 1.- Distribución de los valores de CMI de las cepa resistentes.....	57
Gráfica 2.- Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria por grupos de EBH...	76
Tabla 1.- Enfermedades causadas por EGB.....	18
Tabla 2.- Clasificación de los Grupos C y G.....	21
Tabla 3.- Mecanismos de acción de los antibióticos en bacterias.....	24
Tabla 4.- Uso actual de las tetraciclinas.....	27
Tabla 5.- Nomenclatura para las determinantes de resistencia a tetraciclina.....	30
Tabla 6.- Porcentajes de resistencia a tetraciclina reportados en diferentes países para EGA.....	39
Tabla 7.- Porcentajes de resistencia a tetraciclina en diferentes países para EGB.....	40
Tabla 8.- Porcentajes de resistencia a tetraciclina en diferentes países para EGC y EGG.....	40

Tabla 9.- Relación entre tipo M y resistencia a tetraciclina.....	41
Tabla 10.- Genes de resistencia encontrados en diferentes países.....	42
Tabla 11.- Lista de hospitales que donaron cepas.....	46
Tabla 12.- Criterios de interpretación de la CLSI para la prueba de difusión en disco (30µg).....	50
Tabla 13.- Criterios de interpretación de la CLSI para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (µg /ml).....	51
Tabla 14.- Secuencias de los primer utilizados.....	53
Tabla 15.- Porcentajes de resistencia a tetraciclina en EBH.....	55
Tabla 16.- Mezcla de reacción para amplificar el gen <i>tet(M)</i>	59
Tabla 17.- Número de cepas positivas por PCR y el gen detectado.....	60
Tabla 18.- Cepas de EGA resistentes a tetraciclina.....	62
Tabla 19.- Cepas de EGB resistentes a tetraciclina.....	63
Tabla 20.- Cepas de EGC resistentes a tetraciclina.....	64
Tabla 21.- Cepas de EGG resistentes a tetraciclina.....	65
Tabla 22.- Porcentaje de cada tipo de muestra de los EBH resistentes a tetraciclina.....	66
Tabla 23.- Distribución de alelos <i>emm</i> de aislamientos de EGA.....	67
Tabla 24.- Distribución de alelos <i>emm</i> de aislamientos de EGG.....	68
Tabla 25.- Porcentaje de resistencia a tetraciclina por hospital.....	69
Tabla 26.- Porcentaje de resistencia por hospital para el Grupo A.....	70
Tabla 27.- Porcentaje de resistencia por hospital para el Grupo B.....	70
Tabla 28.- Porcentaje de resistencia por hospital para el Grupo C.....	71
Tabla 29.- Porcentaje de resistencia por hospital para el Grupo G.....	71

3. LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
dNTP	diNucleótido Trifosfato
EBH	Estreptococo Beta Hemolítico
EGA	Estreptococo del Grupo A
EGB	Estreptococo del Grupo B
EGC	Estreptococo del Grupo C
EGG	Estreptococo del Grupo G
EF-G	Factor de Elongación G
Ef-Tu	Factor de Elongación Tu
ELO	Estreptolisina O
ELS	Estreptolisina S
Fc	Fracción constante
GS	Gelosa Sangre
mARN	Ácido Ribonucleico mensajero
MH	Mueller Hinton
NT	No Tipificables
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPR	Proteína de Protección Ribosomal

PYR	Pirrolidonil Arilamidasa
RA	Resistencia Antimicrobiana
rARN	Ácido Ribonucleico ribosomal
SCTE	Síndrome de Choque Tóxico Estreptocócico
SD	Sin Dato
SR	Sin Resultado
tARN	Ácido Ribonucleico de transferencia
Tc ^r	Resistente a tetraciclina
TSP	Toxinas Superantigénicas Pirogénicas

1. RESUMEN

Los Estreptococos Beta Hemolíticos (EBH) se dividen en grupos de acuerdo a las características del carbohidrato C de la pared celular. Los más representativos dentro de la patología humana son el grupo A (*Streptococcus pyogenes*) y el grupo B (*Streptococcus agalactiae*), ya que causan infecciones en humanos, los grupos C y G son comensales y pueden ocasionar infecciones oportunistas. Las tetraciclinas son una familia de antibióticos que bloquean la síntesis de proteínas bacterianas impidiendo el acoplamiento del aminoacil-tARN al sitio A del aceptor ribosomal. Las bacterias que adquieren resistencia al antibiótico (Tc^r) muestran la adquisición de los genes *tet*, los cuales están implicados en varios mecanismos de resistencia.

En el género *Streptococcus* se han identificado 6 diferentes determinantes de resistencia a tetraciclina; de ellos, los genes *tet(O)* y *tet(M)* son los mejor estudiados y el mecanismo de resistencia es debido a protección ribosomal. El gen *tet(M)* se encuentra distribuido en 42 diferentes géneros bacterianos y se adquiere mediante transposones conjugativos, el gen *tet(O)* se encuentra en 11 géneros diferentes y es adquirido por plásmidos. Además, el uso prolongado de la tetraciclina selecciona, no solo bacterias resistentes a tetraciclina, sino también puede seleccionar bacterias resistentes a múltiples antibióticos.

Las propiedades favorables de este antimicrobiano y la ausencia de efectos adversos mayores, lo ha hecho tener un extenso uso en la terapia de infecciones. Aunque las tetraciclinas siguen teniendo un papel importante en la medicina humana y veterinaria, la aparición de resistencia ha limitado su uso, ya que ha venido incrementándose en los últimos años.

El objetivo del presente trabajo fue conocer datos de la resistencia a tetraciclina en nuestro país y compararlos con los de otras partes del mundo, ya que en México se conocen pocos datos que puedan asociar la resistencia a tetraciclina con el tipo de *Estreptococo* involucrado.

También se determinará la relación existente entre la resistencia a tetraciclina con los genes *tet(O)* y *tet(M)*, y su asociación con los tipos M (proteína M) en las cepas del grupo A y G, ya que se conocen muy pocos estudios al respecto.

4. ANTECEDENTES

4.1. Generalidades sobre Estreptococos

Las bacterias son una parte integral de la naturaleza, se encuentran en todas partes, en el medio ambiente, cubren la piel, las mucosas, y el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Algunas bacterias son benéficas para sus huéspedes y proveen nutrientes o protección contra patógenos limitando la habilidad de bacterias peligrosas para colonizar.

Debido a que tienen un tiempo de generación corto (de minutos a horas) pueden responder rápidamente a cambios en el medio ambiente ⁽¹⁾.

Como especies, los Estreptococos son un grupo diverso, que van desde organismos comensales, los cuales ocupan varios lugares del cuerpo, hasta patógenos que tienen la capacidad de infectar una variedad de sitios tisulares. También son diversos en sus resistencias a terapias con antibióticos ⁽⁶⁾.

El género *Streptococcus* proviene del latín *Strep* = cadena y *coccus* = cocos y comprende un grupo heterólogo de bacterias Gram Positivas, no móviles, no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos y sus células son esféricas u ovoides, agrupados en cadenas o pares menores a 2 micrómetros de diámetro. Las colonias de Estreptococos varían de grises a blanquecinas, formando colonias de más de 0.5 mm de diámetro después de 24 horas de incubación. La formación de las cadenas largas es observada en medios líquidos o muestras clínicas.

Aunque los Estreptococos crecen en presencia de oxígeno, son incapaces de sintetizar compuestos heme y son por lo tanto incapaces de realizar metabolismo respiratorio.

Los medios de crecimiento no selectivos utilizados usualmente en el laboratorio permiten el crecimiento de los Estreptococos, sin embargo, los medios complejos enriquecidos con sangre son deseables, ya que la reacción hemolítica del aislamiento estreptocócico puede ser detectada temprano en el proceso de identificación. Los cultivos para el aislamiento de los Estreptococos se deben incubar de 35 a 37 °C y una atmósfera que contenga 5% de CO₂ o una jarra con vela incrementará el crecimiento bacteriano.

Una de las características relevantes utilizada para la clasificación de los Estreptococos está basada en la reacción de hemólisis observada alrededor de las colonias cuando éstos son crecidos en placas de agar sangre. Esta clasificación fue propuesta por Brown en 1919 y establece la denominación de beta hemólisis cuando se observa una lisis completa de los eritrocitos alrededor de la colonia bacteriana, esta hemólisis es debida a la acción de las exotoxinas llamadas estreptolisinas.

La nomenclatura de los Estreptococos, en especial la de uso médico, está basada en la identificación y tipificación serológica de componentes de la pared celular (carbohidrato "C") más que en la identificación de la especie. Lancefield estableció ésta clasificación en 1938, contándose actualmente con al menos 18 grupos (del grupo A al V); de manera comercial se cuenta con reactivos que permiten la serotipificación de los principales grupos de Estreptococos de interés clínico como son el A, B, C, D, y G ^(42,54).

Para ser patógenos efectivos, los Estreptococos se deben de adherir, colonizar, e invadir al tejido blanco. Para una colonización eficaz e infección, las bacterias necesitan unir sus adhesinas a los receptores localizados en las células blanco.

Se ha observado que los Estreptococos interactúan con receptores celulares del huésped y regulan las vías de señalización intracelular para inducir su propia adherencia, colonización, e internalización usando sus proteínas de superficie.

La unión de la fibronectina se cree que tiene una función primaria en la adherencia inicial, colonización, y la subsecuente invasión de las células epiteliales invasoras.

Los Estreptococos tienen varios determinantes antigénicos en la superficie de la pared celular. Un determinante antigénico importante es la proteína M, la cual es una proteína fibrilar compuesta de 3 segmentos de secuencias repetidas en tandem de 60nm de largo a partir de pared celular. Así, la proteína M es considerada como la determinante de mayor virulencia por su habilidad de prevenir la fagocitosis.

La antigenicidad de la proteína M ha servido en la realización de un esquema de serotipificación basada en esta proteína, gracias a las técnicas moleculares han sido identificadas actualmente más de 200 variantes de esta proteína ^(6,42).

El diagnóstico de las infecciones estreptocócicas está basado en el cultivo, por lo general las muestras provienen de exudados faríngeos, hemocultivos o secreciones purulentas en piel. Las muestras son sembradas en placas de agar con sangre de carnero al 5%, lo que favorece la observación de la hemólisis. A diferencia de los Estafilococos, los Estreptococos son catalasa negativos ⁽⁴²⁾.

4.1.1 Generalidades sobre Estreptococos del Grupo A (EGA)

Los Estreptococos del Grupo A son organismos que viven en el medio ambiente, sin embargo su único reservorio natural es el humano. Los sitios primarios de colonización de *Streptococcus pyogenes* (EGA) se localizan en la mucosa nasal y orofaríngea del tracto respiratorio superior y las capas superficiales de la dermis. Durante su colonización, el microorganismo puede causar faringitis sintomática, la cual puede desaparecer en 2 semanas por la presencia de anticuerpos producidos como respuesta del hospedero a la infección.

Alternativamente, una infección sin síntomas clínicos puede suceder, aunque se manifieste una respuesta inmune. Una tercera posibilidad es ser portador asintomático. Donde hay carencia de respuesta por parte del hospedero. El estado de portador puede durar por meses y el organismo permanece capaz de transmitirse a un nuevo hospedero.

Los Estreptococos del Grupo A tienen varios factores superficiales y extracelulares que impiden la fagocitosis bacteriana. Muchos factores se han identificado como determinantes potenciales de virulencia de las enfermedades que provoca. Estos factores incluyen proteínas, enzimas o toxinas, entre ellas podemos mencionar las siguientes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Factores de Virulencia de <i>Streptococcus pyogenes</i> (EGA)	
Antifagocíticos: <ul style="list-style-type: none"> • Proteína M • Ácido hialurónico • C5a peptidasa 	Invasión: <ul style="list-style-type: none"> • Proteína M • Ácido hialurónico
Adherencia a células epiteliales: <ul style="list-style-type: none"> • Ácido lipoteicoico • Proteína M • Fibronectinas 	Invasión tisular: <ul style="list-style-type: none"> • Hialuronidasa • DNAsas A-D
	Toxicidad Sistémica: <ul style="list-style-type: none"> • Estreptolisinas O y S • Exotoxinas superantigénicas
Internalización: <ul style="list-style-type: none"> • Proteína M 	

Algunas características de estos factores se presentan a continuación:

Proteína M: Representa el principal factor de virulencia, es antigénica y está localizada en la superficie bacteriana. Tiene diversas funciones, como resistencia a la fagocitosis, adherencia, e invasión intracelular.

Cápsula de polisacáridos: está compuesta de ácido hialurónico y un polímero de D-ácido glucurónico y de N-acetilglucosamina. La producción de esta cápsula varía no solo entre cepas sino también entre bacterias de esa misma cepa bajo diferentes condiciones. La cápsula confiere resistencia a la fagocitosis por la inhibición de la activación del complemento.

Toxinas Superantígenas Pirogénicas (TSPs): Entre las TSPs producidas por EGA se encuentran la toxina de la fiebre escarlatina o mitógenos linfocíticos, llamadas Exotoxinas Pirogénicas Estreptocócicas. (SPEs). Las características del sarpullido vistas en la fiebre escarlatina y en el SCTE son debidas a una reacción de hipersensibilidad amplificada resultada de la superantigenicidad.

Estreptolisinas O y S: Son exoenzimas que se unen a las membranas eucarióticas formando poros transmembranales multiméricos que provocan la lisis de células susceptibles. La Estreptolisina O es inmunogénica, cardiotóxica y es inactivada en presencia de oxígeno. La Estreptolisina S no es inmunogénica. Ambas estreptolisinas son responsables de las zonas de hemólisis beta usadas rutinariamente en la identificación de los EGA.

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

La invasión intracelular de las células epiteliales por *Streptococcus pyogenes* (EGA) puede contribuir a la persistencia de la infección y ser un prerrequisito para acceder al torrente sanguíneo, donde puede causar enfermedades invasivas ⁽⁴²⁾. Aunque la infección más común de *Streptococcus pyogenes* es la faringitis, en la pasada década ha habido un incremento en las enfermedades sistémicas en varias partes del mundo como la fascitis necrozante y el Síndrome de choque tóxico estreptocócico (SCTE).__Históricamente, *Streptococcus pyogenes* ha sido asociado con sepsis y con infecciones sistémicas. El descubrimiento de que *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* se pueden

internalizar en células epiteliales ofrece una explicación para los cambios epidemiológicos y la habilidad de estas especies para romper esas barreras y resistir algunos tratamientos antimicrobianos ⁽⁹⁾.

Enfermedades supurativas

Faringitis: La faringitis se desarrolla de 48 a 96 horas después del contacto con *Streptococcus pyogenes* originando fiebre, malestar, dolor de faringe y cefalea. La parte posterior de la faringe puede estar eritematosa y presentar exudados.

Fiebre escarlatina: La Fiebre Escarlatina representa una complicación de la faringitis estreptocócica, ocasionada por la liberación de la exotoxina pirogénica. A los primeros síntomas comienzan con la erupción de puntos rojos en la piel (“rash”) en el cuello, parte superior del tórax diseminándose posteriormente a las extremidades.

Piodermas: Conocido también como impétigo, el pioderma representa una infección confinada en la superficie de la piel que afecta principalmente a la cara, brazos y piernas. La infección ocurre cuando el Estreptococos del Grupo A es introducido al tejido subcutáneo en una zona de la piel rasgada por rasguños o picadura de insectos.

Erisipela: La erisipela es una infección aguda en la piel manifestada por dolor e inflamación local (eritema) en piel, cara, piel cabelluda y extremidades que comprende lesiones tipo dermatitis, de bordes rosa y rojos, acompañada de nódulos linfoides y signos sistémicos como escalofríos, fiebre y leucocitosis.

Celulitis: En la celulitis, a diferencia de la erisipela, se involucran tejidos subcutáneos profundos y no hay diferencia entre la zona de la piel infectada y la sana. Como en la erisipela la inflamación es local y los signos sistémicos son observados.

Fascitis necrozante: Es una infección que ocurre en el tejido subcutáneo profundo la cual es caracterizada por una destrucción masiva del músculo y grasa a lo largo de los planos faciales. El microorganismo es introducido al tejido a través de la piel dañada (cortaduras menores, traumas o cirugía). Comienza con una evidencia de celulitis, que posteriormente desencadena una gangrena con síntomas sistémicos. La toxicidad sistémica, la falla multiorgánica y la muerte son características de la enfermedad.

Síndrome de choque tóxico estreptocócico (SCTE): Entre 1987 y 1989 se realizaron los primeros reportes de un síndrome de choque tóxico causado por *Streptococcus pyogenes* semejante al desarrollado a la fecha por *Staphylococcus aureus*. Este síndrome generalmente inicia con dolor e inflamación de tejido blando en el sitio de la infección aunado a sintomatología no específica como: fiebre, escalofríos, malestar, náuseas, vómito y diarrea. Posteriormente el dolor se intensifica y la enfermedad progresa a choque y falla multiorgánica (riñón, pulmones, hígado, corazón).

Bacteremia: Por lo general, los pacientes con infecciones localizadas como faringitis, pioderma y erisipela no desarrollan bacteremia, en cambio los pacientes con fascitis necrotizante o síndrome de choque tóxico estreptocócico desarrollan bacteremia.

Enfermedades no supurativas

Fiebre reumática: La Fiebre Reumática (FR) es una complicación retardada de las infecciones faríngeas por EGA. El periodo de latencia entre la faringitis estreptocócica y el desarrollo de FR puede variar de una a cinco semanas. La enfermedad tiene una naturaleza autoinmune relacionada a la producción de anticuerpos autorreactivos y células T que muestran una reactividad cruzada entre componentes del EGA y tejidos huésped.

Glomerulonefritis aguda (GNA): La GNA ocasionada por EGA es caracterizada por una inflamación aguda del glomérulo renal con edema, hipertensión, hematuria y proteinuria. La severidad varía de la forma asintomática (detectada solo por uroanálisis) a una falla renal aguda. La GNA puede ocasionarse a partir de faringitis, impétigo y probablemente otras infecciones por EGA.

Una vez identificados el tipo de hemólisis, la morfología colonial, la prueba de la catalasa y su morfología microscópica, la prueba clave para la identificación de *S. pyogenes* representa su sensibilidad a discos de bacitracina con 0.04U, lo que puede ser confirmado por reacciones serológicas del grupo y/o prueba de PYR (pirrolidonil aminopeptidasa), la cual evalúa la actividad de la enzima denominada pirrolidonil aminopeptidasa producida por *Streptococcus pyogenes* ⁽⁴²⁾.

4.1.2 Generalidades sobre Estreptococos del Grupo B (EGB)

El Estreptococo del grupo B (EGB) o *Streptococcus agalactiae* fue originalmente reconocido como la causa de la sepsis puerperal. Se encuentra colonizando la vagina de más del 20% de las mujeres sanas. En medios de cultivo, el *Streptococcus agalactiae* (EGB) se presenta en general como beta hemolítico (de halo pequeño y con menor intensidad de hemólisis), las colonias suelen ser más grandes que las del grupo A ⁽⁴²⁾.

Los EGB son bacterias bien adaptadas a la colonización asintomática de adultos, pero son patógenos potenciales para ciertos grupos susceptibles de niños, como los recién nacidos, quienes presentan deficiencias cualitativas y cuantitativas en sus defensas, incluyendo fagocitos, complemento y anticuerpos ^(27,54).

Los EGB asociados a enfermedades en humanas son casi invariablemente capsulados, y corresponden a uno de 9 serotipos capsulares conocidos: Ia, Ib, y II hasta VIII. Con pocas excepciones, los antígenos capsulares están compuestos de 4 componentes monosacáridos: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico. Sin embargo, la serotipificación se basa en diferencias entre los arreglos de los azúcares. Se debe considerar el hecho de que la cápsula de polisacáridos confiere una ventaja de supervivencia importante, ya que inhibe la fagocitosis de macrófagos y de neutrófilos. La interferencia de la unión de C3 por la cápsula de polisacáridos es un mecanismo importante de virulencia para EGB. Además produce la enzima C5a peptidasa que parte e inactiva específicamente a C5, junto con lo anterior el EGB secreta la enzima hialuronidasa la cual degrada el ácido hialurónico, un componente importante de la matriz extracelular en humanos.

Como con otros patógenos, EGB parece unirse a las proteínas de la matriz extracelular del hospedero como fibronectina, fibrinógeno, y laminina.

El primer paso para la patogénesis por EGB es la colonización asintomática del tracto genital femenino. En comparación con otros microorganismos, los EGB se unen eficientemente a las células vaginales, con una máxima adherencia a pH ácido, característica de la mucosa vaginal. Los EGB también se adhieren a una variedad de tejidos fetales, de niños y de adultos, incluyendo la placenta, mucosa faríngea y bucal, epitelio alveolar y endotelial.

Después de la penetración de EGB en el pulmón o en el torrente sanguíneo del recién nacido, una respuesta inmunológica es montada para eliminar al organismo. Los elementos centrales de esta respuesta son los neutrófilos y la línea monocito/macrófago ⁽³⁹⁾.

Se ha visto que los EGB entran y sobreviven dentro de varios tipos celulares humanos, un fenómeno que se ha denominado invasión celular. Esta propiedad les permite atravesar un número de obstáculos celulares del hospedero, incluyendo membrana placentaria, alvéolos pulmonares en los niños, y la membrana hematoencefálica en neonatos. La consecuencia patogénica del pasaje bacteriano a través de las barreras puede ser significativa, ocasionando amnionitis y una exposición al feto muy importante, bacteremias y diseminación sistémica, entrada al sistema nervioso central y meningitis ⁽²⁷⁾. Otra cuestión importante es la infección congénita, que se lleva a cabo durante el nacimiento cuando el producto es colonizado a su paso por el canal del parto, generalmente la madre y el niño no cuentan con anticuerpos contra la bacteria. Representa la principal causa de sepsis neonatal y meningitis. En la sepsis neonatal por EGB del 10 – 20% de los niños mueren, mientras

que de un tercio a la mitad de los sobrevivientes desarrollan daños permanentes en cerebro⁽⁴²⁾.

Si falla la función de la barrera epitelial y la eliminación inmunológica, el EGB puede establecerse y causar bacteremia en el neonato, desarrollo de sepsis, y en muchos casos la consecuencia un shock séptico profundo, incluyendo hipotensión sistémica, hipertensión pulmonar persistente, hipoxemia tisular, acidosis, inestabilidad en la temperatura, coagulación intravascular diseminada, neutropenia y finalmente falla de los órganos.

Tabla 1. Enfermedades causadas por EGB ⁽²⁾

Enfermedades en recién nacidos	Enfermedades en adultos	Enfermedades en mujeres embarazadas
Septicemia	Celulitis	Endometritis
Neumonía	Artritis	Amnionitis
Meningitis	Endometritis	Pielonefritis

Una característica importante de los Estreptococos del grupo B es la producción de una proteína difusible extracelular de 23.5 kDa, denominada factor de CAMP (Christie, Atkins, Muench y Petersen), la cual actúa sinérgicamente con la beta lisina estafilocócica para desestabilizar y lisar la membrana eritrocítica.

Una vez identificada la hemólisis beta, morfología colonial, la reactividad negativa hacia la catalasa y su morfología microscópica, se lleva a cabo la prueba de CAMP para la identificación de *Streptococcus agalactiae*, para la prueba se siembra en agar sangre una estría de la colonia sospecha con beta hemólisis a tratar y perpendicularmente, de 3 a 4 mm de separación, una estría de *Staphylococcus aureus* productor de la beta lisina. Después de una incubación de 24 horas a 35°C, una prueba positiva es caracterizada por una zona de hemólisis completa en forma de punta de flecha en el área en la cual tanto la beta lisina como el factor de CAMP difundieron^(33,54).

4.1.3 Generalidades sobre Estreptococos del Grupo C (EGC) y Grupo G (EGG)

Los Estreptococos del grupo C y G constituyen un complejo heterogéneo de especies estreptocócicas que pueden residir como comensales no patógenos en humanos y animales o actuar como agentes causales de infecciones severas asociados con altos grados de mortalidad. Los Estreptococos clasificados como del grupos G y C tienen residuos inmunodeterminantes de N-acetilglucosamina y ramnosa, respectivamente, en los carbohidratos de sus paredes celulares. Son aislados como comensales oportunistas de la piel, nariz, garganta, vagina, y el tracto gastrointestinal. También pueden causar infecciones serias como septicemia, faringitis, otitis media, artritis séptica, meningitis, endocarditis y abscesos.

Las relaciones genéticas de EGC y de EGG son complicadas y resueltas incompletamente, habiendo una diversidad de especies en los serogrupos. La clasificación actual está basada en hospederos, propiedades patogénicas, características fisiológicas, y la relación entre la

información de macromoléculas con los grupos serológicos. Esto es útil para diferenciar biotipos intra-específicos.

Taxonomía del grupo C y G

Los Estreptococos del grupo C incluyen varias especies. Estas especies pueden ser divididas inicialmente por su morfología colonial. Los que forman colonias grandes (> 0.5mm) se han dividido como *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus equi*. Los Estreptococos del grupo C que forman colonias pequeñas (<0.5mm) son usualmente designadas como miembros del grupo “*Streptococcus milleri*” (*Streptococcus anginosus*). Cepas de este grupo pueden dar reacción positiva a los grupos de Lancefield A, C, G o F.

El fenotipo de colonias pequeñas es expresado por el grupo “*Streptococcus milleri*”, éste ha sido clasificado taxonómicamente a nivel molecular y ha sido dividido en 3 especies *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*. Los miembros de estas especies son reconocidos como comensales de la cavidad oral, del tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario. Taxonómicamente el Estreptococo del grupo G es parte del complejo *Streptococcus dysgalactiae*. Este patógeno es comúnmente aislado de la garganta, lesiones en la piel, y del torrente sanguíneo asociándose a faringitis, meningitis, sepsis puerperal, peritonitis, artritis infecciones en heridas, septicemia, endocarditis infectiva y glomerulonefritis.

Algunos autores usan el término *Streptococcus canis* para referirse solo a las cepas de origen animal del grupo G que forman colonias grandes. Se han usado técnicas de hibridación molecular y reacciones bioquímicas para mostrar que las cepas formadoras de

colonias grandes están altamente relacionadas a *S. dysgalactiae* del grupo C, sugiriendo que son la misma especie.

Estudios genéticos anteriores de hibridación ADN – ADN de los grupos C y G, exhiben altos niveles de identidad en sus secuencias de ADN y, con base a los niveles comunes aceptados de hibridación (mayor o igual del 70%), combinados con pruebas bioquímicas indican que, los aislamientos humanos clasificados tradicionalmente como *Streptococcus equisimilis* del grupo C, son suficientemente similares genéticamente a *Streptococcus dysgalactiae* del grupo G. Un estudio subsecuente de estos microorganismos propuso la división de *S. dysgalactiae* en dos subespecies, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* para acomodar a las cepas beta hemolíticas formadoras de colonias grandes de los grupos C y G aislados de humanos y *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* a las cepas aisladas de animales. Bioquímicamente *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* es trealosa positivo y sorbitol negativo, además exhiben actividad proteolítica en fibrina humana y actividad de estreptocinasa en plasminógeno humano. Ambas actividades las carecen las cepas aisladas de animales ^(33,54). Tomando juntos los resultados obtenidos con técnicas moleculares, la clasificación de especies está dada en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los Estreptococos del grupo C y G

Taxón	Grupo de Lancefield	Huésped	Reacciones específicas
<i>S. dysgalactiae</i> subs. <i>equisimilis</i>	C, G	Humanos	Producción de C5a peptidasa
<i>S. dysgalactiae</i> subs. <i>dysgalactiae</i>	C, L	Varios animales	Sin actividad de estreptocinasa en plasminógeno humano.

La proteína M o la proteína parecida a la M se encuentra codificada y expresada también en EGC y EGG. La clonación y secuenciación de los correspondientes genes dieron evidencia para soportar esa teoría. El primer gen de proteína M, que se aisló de una cepa EGG de origen humano fue el *emmG1*, y codificó un producto con características estructurales parecidas a la clase I de proteínas M de EGA.

Es interesante que ningún ADN aislado de cepas EGG originario de animales hibridaron el gen *emm*, mientras todos los ADN aislados de cepas EGG de humanos si hibridaron.

La única explicación que parece viable para la alta homología de ciertos genes *emm* de los 2 serogrupos es un intercambio horizontal de genes seguido por eventos de recombinación.

Los genes que codifican para ELO de los grupos G y C son prácticamente idénticos a los presentes en el grupo A con una identidad de la proteína arriba del 98%.

La proteína de superficie más ampliamente estudiada en EGG y en EGC es la proteína G, la cual se une a la porción Fc de las cadenas pesadas de IgG con una afinidad comparable a la unión con sus respectivos antígenos. Se podría suponer que contribuye a la adherencia, inhibe fagocitosis y tienen un papel en la patogenicidad, sin embargo, falta evidencia fuerte de que lo anterior ocurre.

Lo que si se sabe es que la proteína G es bifuncional ya que se une tanto a IgG como a la albúmina sérica.

La fibronectina es un blanco importante del EGC y EGG, por si misma es responsable de la adhesión entre células eucarióticas vía factores específicos de superficie de la familia de las integrinas. Estando presente en la matriz extracelular de muchos tejidos, así como en

plasma y en otros fluidos biológicos en su forma soluble, la fibronectina representa el blanco propicio para que las bacterias aprovechen sus propiedades de unión, y así, poder unirse a células blanco específicas.

En los años recientes, se han identificado y caracterizados diversos genes que codifican para proteínas son de superficie ancladas a la membrana que favorecen la unión a la fibronectina en los *Estreptococos* de los grupos G y C.

La unión mediada por fibronectina no se restringe a la mucosa sino que también se encuentra en heridas tisulares. Cualquier herida tisular provocará exposición de la fibronectina del hospedero. Las bacterias logran el acceso a las células así como el tejido subyacente vía la fibronectina.

Las bacteremias causadas por los *Estreptococos* del grupo C formadores de colonias grandes se caracterizan por un alto índice de mortalidad (arriba del 25%), aunque son menos frecuentes que las causadas por los grupos A y B ^(4,7,33).

4.2 Generalidades sobre antibióticos

El control de los microorganismos es crucial para la prevención y el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Los fármacos de mayor éxito son aquellos que interfieren con los procesos biológicos en el patógeno, pero no con los del huésped, logrando lesionar gravemente al microorganismo blanco, haciendo al huésped el menor daño posible.

Los fármacos antibacterianos destruyen microorganismos patógenos o frenan su crecimiento a concentraciones lo suficientemente bajas como para evitar un daño indeseable en el huésped.

Estos fármacos se pueden dividir en dos grupos: los quimioterápicos, de origen sintéticos (imidazoles, quinolonas, sulfonamidas) y los antibióticos, de origen natural (betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas) ⁽⁴⁵⁾.

La estreptomicina y las tetraciclinas fueron desarrolladas en los años 40s, seguidas rápidamente por el desarrollo de aminoglucósidos, penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, quinolonas y otros antibióticos. Todos estos agentes antibacterianos incrementaron en gran medida el número de enfermedades infecciones que podían ser prevenidas o curadas.

Existen varios mecanismos por los cuales se puede inhibir el crecimiento microbiano, algunos ejemplos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Mecanismos de acción de los antibióticos en bacterias ⁽³⁶⁾.

Mecanismo de acción	Ejemplo
Inhibición de síntesis de la pared celular	Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicina
Inhiben síntesis proteica	Tetraciclinas, Aminoglucósidos, Macrólidos
Inhiben síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas, Imidazoles.
Antimetabolitos	Sulfas, Trimetoprim

El espectro de eficacia varía considerablemente según los fármacos. Muchos son fármacos de espectro reducido, es decir, que sólo son eficaces contra una gama pequeña de patógenos. Otros son fármacos de amplio espectro y atacan a muchas clases diferentes de patógenos.

Una de las técnicas más utilizadas para estudiar la susceptibilidad de un microorganismo patógeno es la técnica de difusión en disco. Ésta consiste en la utilización de un disco impregnado de antibiótico colocado sobre el agar en el que previamente se ha inoculado la bacteria objeto de la prueba, el disco capta humedad y el antibiótico difunde radialmente a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio será incapaz de inhibir el crecimiento de la bacteria en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de susceptible, intermedio o resistente de acuerdo a las tablas publicadas por el CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). Para determinar la concentración más baja de un fármaco que impide el crecimiento de un determinado patógeno se realiza la prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se calcula que más del 50% de las prescripciones de antibióticos de los hospitales se realizan sin pruebas claras de infección o una indicación médica adecuada ⁽⁴⁵⁾.

4.3 Generalidades sobre la Tetraciclina

Las tetraciclinas fueron descubiertas en los años cuarentas, son una familia de antibióticos que inhiben la síntesis proteica impidiendo la unión del aminoacil-tARN al sitio (A) aceptor

del ribosoma. Son antibióticos considerados de amplio espectro, teniendo actividad contra una gran cantidad de bacterias Gram Positivas y Gram Negativas. Las propiedades antimicrobianas y la ausencia de efectos adversos las ha llevado a tener un extenso uso en infecciones animales y humanas. Además, en algunos países como los Estados Unidos, las tetraciclinas son administradas a niveles subterapéuticos a animales como alimento para actuar como promotores de crecimiento. La tetraciclina es un antibiótico natural producido por *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus*, y *Streptomyces viridofaciens*. Su estructura se presenta en la figura 1.

La molécula de tetraciclina está compuesta de 4 anillos fusionados linealmente.

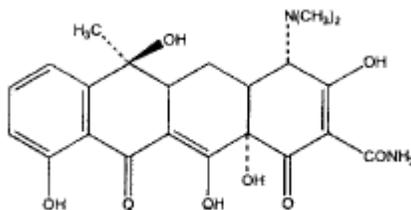


Figura 1. Estructura química de la tetraciclina

Para que la tetraciclina pueda inhibir la síntesis proteica, debe de entrar a la célula bacteriana y unirse a los ribosomas, aunque esta asociación de la tetraciclina al ribosoma es reversible. La forma protonada de la tetraciclina difunde a través de la membrana citoplasmática de Gram Positivos o Gram Negativos ^(8,57). Los microorganismos Gram Positivos son generalmente más susceptibles a las tetraciclinas que los Gram Negativos, atribuido tradicionalmente a la ausencia de una membrana externa ⁽³⁰⁾.

4.3.1 Uso terapéutico de la tetraciclina

La tetraciclina interactúa débilmente con el ribosoma 80S de las células eucarióticas, creando una inhibición relativamente pequeña de la síntesis proteica, lo cual se cree que es la razón por las propiedades selectivas antimicrobianas de las tetraciclinas, con efectos limitados en humanos. Algunos parásitos pueden ser tratados, ya que tienen mitocondrias sensibles a la tetraciclina ⁽⁵¹⁾.

Las tetraciclinas se han usado desde los años 50 para el tratamiento de una amplia variedad de bacterias infecciosas Gram Positivas y Gram Negativas. En la tabla 4 se presentan ejemplos del uso actual que tienen las tetraciclinas en la terapéutica.

Tabla 4. Uso actual de las tetraciclinas ^(51,30).

Primera Elección	Elección Alternativa
Infecciones periodontales	<i>Vibrio cholerae</i>
Acne vulgaris	<i>Leptospira sp</i>
<i>Yersinia pesti</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Brucella sp</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Rickettsia sp</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Burkholderia sp</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>

Los antibióticos se pueden usar en animales tanto terapéuticamente para el tratamiento de enfermedades, como subterapéuticamente, para mejorar el nivel de crecimiento y la eficacia de los alimentos, esto es conocido como promoción del crecimiento. El uso de las tetraciclinas y otros antibióticos como promotores de crecimiento se ha vuelto controversial debido a que esta práctica puede estar contribuyendo en la selección de organismos resistentes ⁽⁸⁾.

4.4 Resistencia Antimicrobiana

Descubierta en los años 40s, las tetraciclinas formaron parte de una segunda oleada de antibióticos, después de la penicilina, ellas y sus derivados semisintéticos tuvieron un rápido uso debido a su amplio espectro de actividad, baja toxicidad y su relativo bajo costo. En los años 50, la mayoría de las bacterias comensales y patógenas eran susceptibles a la tetraciclina.

En 1971 las tetraciclinas representaban el 30% de todos los antibióticos consumidos para el uso humano. La aparición de resistencia a la tetraciclina a mediados de los 50s, inicialmente en Gram Negativos y luego en Gram Positivos, resultó en un decremento de su utilidad. La resistencia a la tetraciclina es la más común encontrada en la naturaleza. Aunque puede ser el resultado de mutaciones cromosómicas que afecten la permeabilidad de la membrana, más comúnmente es el resultado de la adquisición de ADN exógeno que codifica para proteínas involucradas en expulsión selectiva o en protección del ribosoma ^(46,30).

El uso de las tetraciclinas y otros antibióticos como promotores de crecimiento se ha vuelto controversial debido a que esta práctica puede estar contribuyendo a la resistencia bacteriana de bacterias patógenas ⁽⁸⁾.

La aparición y diseminación de resistencia a antibióticos entre bacterias patógenas es uno de los ejemplos más reveladores de evolución que se ha visto en bacterias desde hace mucho tiempo.

La multiresistencia no fue anticipada, debido a que la coaparición de múltiples mutaciones que confirieran resistencia no fue considerada como viable. Sin embargo, solo 6 meses después de su introducción (y producción masiva) de estreptomina, tetraciclina y cloramfenicol, fueron identificados diversos aislamientos de *Shigella dysenteriae* como resistentes a cada uno de esos antibióticos. Para entonces, se volvió claro que la aparición de multiresistencia no se podía atribuir solo a mutaciones. En la década de los 70's, la multiresistencia fue asociada en muchos casos con plásmidos transmisibles ⁽³⁵⁾.

La resistencia antimicrobiana se desarrolla como una respuesta natural de la bacteria para adaptarse al ambiente, como consecuencia de la presión selectiva provocada por la diseminación de los antibióticos en medicina, veterinaria, alimentación animal y agricultura, de manera que aumentaron las oportunidades para que las bacterias pudieran adquirir genes de resistencia.

La rápida diseminación de genes de resistencia puede ocurrir en alguna población bacteriana en particular y de un ecosistema a otro, sugiriendo que las poblaciones bacterianas pueden compartir e intercambiar esos genes.

Las bacterias patógenas han desarrollado numerosas estrategias para resistir la acción de los antibióticos entre las que se encuentran la modificación e inactivación del fármaco, expulsión selectiva y modificación del sitio blanco.

El origen de los genes de resistencia en bacterias patógenas no está totalmente claro. Sin embargo, todos los mecanismos de resistencia que han sido identificados en bacterias patógenas, incluyendo ARN metilasas, beta-lactamasas o proteínas de protección ribosomal, ya existen en los respectivos organismos productores de los antimicrobianos (21,29).

El determinante de resistencia a tetraciclina es una unidad genética de origen natural, el cual incluye los genes estructurales y reguladores involucrados en la resistencia a tetraciclina. Dos determinantes son consideradas diferentes entre si cuando existe una variación de más del 20% entre las secuencias proteicas de ambos determinantes. La nomenclatura de los genes de resistencia a tetraciclina se presenta en la tabla 5 (28,29, 30).

Tabla 5. Nomenclatura para las determinantes de resistencia a tetraciclina.

Clase	Determinante	Gen	Proteína
M	Tet M	<i>tet(M)</i>	Tet(M)
O	Tet O	<i>tet(O)</i>	Tet(O)

La protección ribosomal representa una táctica importante para promover resistencia a tetraciclina tanto en Gram Positivos como en Gram Negativos. Los genes *tet(O)* y *tet(M)* son los determinantes mejor estudiados, tienen un 75% de similitud en sus secuencias. Las Proteínas de Protección Ribosomal (PPR) son polipéptidos de aproximadamente 650

aminoácidos y 72.5 kDa. Tet(M) y Tet(O) están ampliamente distribuidos. Aunque, estas dos proteínas son las mejor estudiadas, existen otros 11 miembros de la clase de proteínas de protección ribosomal entre los que se encuentran Tet(S), Tet(T), Tet(Q) y Tet(W).

Hay otros mecanismos de resistencia a tetraciclina como son:

- i) Expulsión selectiva en Gram Positivos y Gram Negativos
- ii) Degradación enzimática encontrada en Bacteroides
- iii) Mutaciones en el tARN encontradas en *Propionibacterium acnes* y en *Helicobacter pylori* ^(12,59).

El modelo de la acción de la tetraciclina se basa en la hipótesis de que bajo condiciones normales los ribosomas están en una configuración estándar y funcionan normalmente. La tetraciclina se une al ribosoma cambiando su estado conformacional, lo cual interfiere con el ciclo de elongación y la síntesis proteica es detenida. Se cree que las proteínas de protección ribosomal interactúan con la hélice h34, en el ribosoma, causando un efecto alostérico en los sitios primarios de unión de la tetraciclina, y así, las moléculas de tetraciclina son desprendidas del ribosoma.

El número de géneros bacterianos portadores del gen *tet(M)* se ha incrementado de 24 en el 2001 a 42 en el 2005. La razón de este incremento puede ser debida, en parte, por su asociación con transposones conjugativos los cuales también se pueden diseminar a un número amplio de bacterias. El gen *tet(O)* actualmente se encuentra en 11 géneros. Este número se puede deber a que este gen originalmente no se asociaba a transposones conjugativos, los cuales tienen menos restricciones que los plásmidos conjugativos ⁽⁵²⁾.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de Tet(M) y Tet(O) ha mostrado que su región N-terminal es altamente homóloga a las GTPasas que participan en la síntesis proteica, llamadas EF-Tu y EF-G, especialmente el factor de elongación G (EF-G), con 25% de similitud de secuencia entre Tet(M) y EF-G ^(5,59).

La presencia de los genes *tet* con mecanismos similares de protección ribosomal en diferentes microorganismos, es consistente con la hipótesis de la transferencia lateral de genes de resistencia de *Streptomyces* productores de tetraciclina a otras bacterias.

La expresión tanto de Tet(M) como de Tet(O) es regulada. La cantidad de la proteína Tet(M) se incrementa cuando algún Estreptococo, que tiene algún determinante de resistencia, es expuesto a tetraciclina. Además la exposición de alguna bacteria, con el gen *tet(M)*, a concentraciones subinibitorias de tetraciclina, resulta en un incremento de resistencia y en un incremento en los niveles de mRNA transcritos de *tet(M)* ⁽⁸⁾.

Trabajos previos han encontrado que el uso prolongado de tetraciclina selecciona no solo bacterias resistentes a tetraciclina, si no también especies resistentes a múltiples antibióticos. Los organismos comensales tienen, al igual que sus contrapartes patógenas y oportunistas, los mismos genes *tet* adquiridos a partir de elementos móviles ⁽⁸⁾.

Los estudios de resistencia antimicrobiana (RA) han sido limitados a bacterias patógenas, pero ahora es bien reconocido que la RA está mucho más diseminada en las bacterias comunes, incluyendo las bacterias comensales del intestino. La RA de las bacterias comensales puede también ser una amenaza a la salud humana, ya que, algunas bacterias comensales son también patógenos oportunistas. Además, debido a su gran abundancia, las

bacterias comensales pueden servir como reservorio para los genes de RA y contribuir a la transferencia de genes de resistencia entre las bacterias, incluyendo bacterias patógenas (61,63).

4.4.1 Transferencia de resistencia

Un elemento clave de cualquier sistema genético, incluye la participación de algunos sistemas de intercambio de genes entre diferentes bacterias, que puedan permitir la construcción de un genoma cambiante y adaptable en el huésped ⁽⁶⁾.

Los genes *tet(M)* y *tet(O)* generalmente se asocian con elementos cromosomales conjugativos como plásmidos y transposones, los cuales codifican para su propia transferencia.

Estas unidades móviles han habilitado a los genes *tet* para moverse de especie a especie dentro de un amplio intervalo de géneros mediante conjugación ^(8,52).

El intercambio de ADN entre bacterias es crítica para la diseminación de resistencia.

La conjugación bacteriana es un proceso altamente específico que involucra la transferencia de ADN de una bacteria a otra, por un complejo multiproteico especializado. Un prerequisite importante para la transferencia conjugativa es la asociación entre las superficies celulares del donador y del receptor. En todos los sistemas conjugativos de transferencia estudiados hasta el momento, una sola cadena de ADN se cree que es transferida entre la célula del donador y la del receptor ^(21,31).

La transferencia de resistencia en bacterias Gram Positivas está frecuentemente atribuida al movimiento de plásmidos siendo un ejemplo de transferencia horizontal de genes. Muchos

de estos plásmidos se transfieren entre bacterias gracias a la actividad de enzimas codificadas en esos plásmidos, y así, son considerados transferibles por si mismos ⁽⁴⁷⁾.

Algunos transposones son transmisibles directamente entre bacterias, particularmente entre bacterias Gram Positivas. Además del mecanismo de conjugación bacteriana, los genes de resistencia también pueden ser transferidos por bacteriófagos lisogénicos (transducción) y menos frecuentemente por transformación (transferencia de ADN del ambiente y su recombinación con el cromosoma del huésped). La transferencia subsecuente de genes puede haber diseminado los determinantes de resistencia a diferentes bacterias ^(21,31,40).

Los transposones conjugativos son elementos genéticos móviles grandes (de 16 a 60 kb) que se pueden transferir del cromosoma del donador al cromosoma del receptor en ausencia de un plásmido intermediario. Codifican para todas las funciones necesarias para su transposición intracelular y la conjugación intercelular.

Los transposones están presentes en una gran variedad de bacterias tanto Gram Positivas como Gram Negativas y son importantes para la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos.

El uso de antibióticos como la tetraciclina puede estimular la transferencia de determinantes de resistencia adicionales a las determinantes de tetraciclina codificadas por los transposones ^(21,40,47).

Los dos transposones conjugativos más extensamente estudiados son Tn916 y Tn1545. Tn916 se encuentra en una amplia variedad de bacterias, se encuentra de manera natural en diferentes especies representando un vehículo importante para la diseminación de genes de resistencia ^(16,34,48). Ellos median su transferencia entre diferentes especies bacterianas y al

parecer no tienen barreras restrictivas. Muchos transposones conjugativos codifican determinantes de resistencia, incluyendo *tet(M)*, por esta razón, ellos pueden ser importantes en la diseminación de la resistencia entre las bacterias patógenas.

Los genes *tet(M)* de los dos transposones exhiben una identidad del 94.5%, una diferencia que probablemente refleja la evolución divergente del determinante *tet(M)* entre varios géneros ^(34,48). En muchas bacterias Gram Positivas, el gen *tet(M)* se encuentra en el cromosoma, pero más frecuentemente en elementos conjugativos. El gen *tet(O)* no está asociado a elementos conjugativos, es móvil solo cuando se encuentra en plásmidos conjugativos ⁽³⁰⁾.

En bacterias Gram Positivas como los Estreptococos, los transposones que se encuentran en el cromosoma pueden capturar varios elementos de resistencia para formar transposones compuestos. Dichos transposones usualmente envuelven al elemento Tn916 y el gen de resistencia a tetraciclina *tet(M)* ⁽¹⁶⁾.

En algunas bacterias han sido descritos transposones conjugativos múltiples, los cuales tienen un transposón completo insertado en otros transposones. Estos, pueden transferir una unidad simple, o el transposón insertado puede ser transferido separadamente, dando flexibilidad para la transferencia de genes de resistencia a antibióticos.

Los elementos compuestos de la familia de elementos Tn916 pueden traer genes de resistencia a antibióticos los cuales confieren resistencia a cloramfenicol, eritromicina, y kanamicina, además del gen *tet(M)* ⁽⁴⁷⁾.

4.4.2 Mecanismo de resistencia antimicrobiana

El efecto inhibitorio de la tetraciclina ocurre en el sitio A de la subunidad ribosomal 30S, este sitio es el que normalmente ocupa en la traducción la estructura aa-tARN. Por lo tanto el sitio de unión de la tetraciclina está localizado en el sitio A ribosomal, donde la tetraciclina se une en la hélice 34 (h34) y a la asa de la hélice 31 (h31) del rARN 16S. En esta posición se cree que la tetraciclina interfiere estereoquímicamente con la unión del complejo aa-tARN. Además, en el sitio A, la tetraciclina hace interacciones casi exclusivamente con el azúcar fosfato del ARN. En este sentido, la carencia de interacciones base-específicas puede explicar el amplio espectro de acción de las tetraciclinas.

Se ha propuesto que con la tetraciclina unida al sitio primario, el complejo ternario puede iniciar la decodificación, así, la formación del complejo aa-tARN-EF-Tu no se ve afectada por la presencia de la tetraciclina. El paso subsecuente que envuelve la liberación del aa-tARN de EF-Tu y su acomodo en el sitio A puede ser inhibido por la tetraciclina, así, cuando el aa-tARN se mueve hacia el sitio A choca con la tetraciclina.

La unión de la tetraciclina presumiblemente no interfiere con la actividad de EF-Tu dependiente de GTPasa, pero si previene una ocupación estable del aa-tARN en el sitio A. Esto puede bloquear al ribosoma en un ciclo no productivo de complejo ternario de unión y liberación.

El sitio de unión de las PPRs en el ribosoma se localizó dentro del sitio de unión del factor de elongación EF-G. En presencia de una PPR el ciclo no productivo puede ser interrumpido, ya que la PPR se puede unir al ribosoma bloqueado por la tetraciclina, liberar a la tetraciclina, y retornar al ribosoma al ciclo de elongación. En este sentido, cuando la PPR se une al ribosoma, ésta no se sobrepone directamente al sitio primario de unión de la tetraciclina, sino que provoca la liberación de la tetraciclina a través de un mecanismo alostérico.

Después de la liberación de la tetraciclina del ribosoma, la PPR se debe de separar del ribosoma de manera que el complejo ternario (EF-Tu-aa-tARN-GTP) se pueda unir y continuar la síntesis proteica ⁽¹²⁾.

4.4.2.1 Resistencia debida a mutaciones

Las mutaciones también representan un mecanismo por el cual las bacterias pueden presentar resistencia a tetraciclina. Por ejemplo, en un estudio hecho se observó un cambio de Guanina por Citosina en aislamientos resistentes de *Escherichia coli* en la posición equivalente a la del nucleótido 1058, en la hélice 34 de la subunidad 16 S rARN. Este cambio no se observó en ninguna cepa sensible. Esta mutación se encuentra muy cercana al residuo que interactúa con el codón de mRNA en el sitio aceptor ribosomal ^(30,53).

Así, una mutación en la hélice 34 podría debilitar la unión de la tetraciclina al ribosoma o permitir el acceso del tARN en presencia de la tetraciclina. Las mutaciones puntuales en el rARN se ha visto que pueden conferir resistencia a macrólidos y a lincosamidas.

Igualmente una mutación en la proteína S12 puede reducir la efectividad de Tet(M) y Tet(O) ^(30,53).

Recientemente, se encontró que en 15 aislamientos clínicos de propionibacterias cutáneas resistentes a tetraciclina, había un cambio de Citosina en lugar de Guanina en la posición 1058 en el rARN 16S. Este cambio se asoció con el incremento de resistencia a tetraciclina⁽⁸⁾.

4.4.3 Importancia clínica de la resistencia

Los datos acerca de la resistencia a tetraciclina han variado con el paso del tiempo. En 1954, de 433 diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, solo 2% eran resistentes. Hoy en día la resistencia ha emergido en comensales y patógenos debido a la adquisición de los genes *tet* ⁽⁸⁾. Todas las clases de genes de protección ribosomal también confieren resistencia a la minociclina (la tetraciclina más simple usada en terapeuta) ⁽⁴⁶⁾.

En 1953, fue aislada la primer bacteria resistente a tetraciclina, *Shigella dysenteriae*. La primera cepa de *Shigella* multiresistente fue asilada en 1955. Esta cepa fue resistente a tetraciclina, estreptomicina y cloramfenicol, y representó el 0.02% de los aislamientos examinados. El primer reporte de un EGA resistente a tetraciclina se presentó en Japón en el año de 1959 ⁽²⁶⁾. En 1960, las cepas multiresistentes de *Shigella* comprendían el 10% de los asilamientos probados en Japón ⁽⁸⁾.

En la actualidad, existen pocos datos sobre resistencia a tetraciclina en la literatura. Los datos existentes muestran que los porcentajes de resistencia varían dependiendo del serogrupo del Estreptococo, del país y de los años de estudio. En Portugal y en Brasil, por

ejemplo, la resistencia en los últimos años se ha visto disminuida en EGA, mientras que en Japón ha aumentado, algunos datos sobre resistencia a tetraciclina en EGA se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Porcentajes de resistencia a tetraciclina reportados en diferentes países para *Streptococcus pyogenes* (EGA).

Año	País	Porcentaje de Tc ^r	Referencia
1978-1983	Brasil	36/53 (67.9%)	14
1984-1989	Brasil	39/77 (50.6%)	14
1990-1997	Brasil	30/81 (37%)	14
1994-1999	Brasil	154/357 (43.1%)	15
1998	Portugal	130/153 (84.9%)	56
1999	Portugal	169/249 (70.2%)	56
2000	Portugal	61/213 (28.8%)	56
2001	Portugal	67/216 (30.9%)	56
2002	Portugal	34/270 (12.5%)	56
2003	Portugal	29/229 (12.8%)	56
2000-2002	Portugal	39/511 (7.6%)	43
1990	Etiopia	148/217 (68.2%)	60
1990-1999	Dinamarca	31/92 (33.7%)	22
1994-2001	España	14/107 (13.1%)	3
1995-1997	Irán	560/1335 (42%)	24
1995-1998	Hong Kong	57/107 (53.3%)	23
1996 - 2002	Polonia	351/816 (43%)	58
1991	Japón	23/61 (37.7%)	55
2001-2002	Japón	32/62 (41.6%)	55

En cuanto a la resistencia en *Streptococcus agalactiae* (EGB), en la tabla 7 se muestra que se ha mantenido constante, con porcentajes de alrededor del 80%.

Tabla 7. Porcentajes de resistencia a tetraciclina en diferentes países para *Streptococcus agalactiae* (EGB).

Año	País	Porcentaje de Tc ^r	Referencia
1995-2000	Brasil	189/189 (100%)	19
2000-2002	EU	114/135 (84.6%)	17
1998-1999	Francia	94/113 (83.2%)	44
1994-2001	España	88/98 (89.8%)	3
1995-1998	Canadá	239/279 (85%)	13
1993-2004	Australasia	450/512 (88.5%)	62
1999-2002	Portugal	190/252 (75.4%)	20
2001	Zimbawe	113/113 (100%)	38
2006	Italia	40/52 (77%)	37

En cuanto a los Estreptococos de los grupos G y C hay muy pocos datos de resistencia a tetraciclina disponibles hasta el momento, estos estudios se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentajes de resistencia a tetraciclina en diferentes países para EGG y EGC

Año	País	Porcentaje de Tc ^r	Referencia
1998-1999	Argentina	2/10 (20%)	25
1998-1999	Argentina	9/23 (39.1%)	25

4.4.3.1 Relación de la resistencia con el tipo M

Los estudios epidemiológicos acerca de la importancia de los tipos M en lo Estreptococos han mostrado que algunos tipos M se pueden asociar con un grupo de enfermedades en particular. Por ejemplo, estudios recientes muestran que los serotipos de EGA asociados a enfermedades invasivas son los tipos M1, 3,11, 12 y 28. Así, adicionalmente es importante identificar los tipos M de los Estreptococos que presentan genes de resistencia ⁽⁴²⁾.

En la tabla 9 se muestran algunos datos de la asociación encontrada entre la resistencia a tetraciclina y el número de tipos M encontrados junto con los más representativos dentro del estudio.

Tabla 9. Relación entre tipo M de EGA y resistencia a tetraciclina.

País	% de Resistencia	Tipos M
Irán ⁽²⁴⁾	42%	20 (M12, M13, M1)
Etiopía ⁽⁶⁰⁾	68%	59 (M74, st463, M25)
Hong Kong ⁽²³⁾	53.3%	25

Los datos mostrados reflejan que la resistencia a tetraciclina está distribuida homogéneamente entre los diferentes tipo M de los Estreptococos de grupo A.

En Portugal de 1998 al 2003 se recolectaron 1321 cepas de EGA, 126 (38.7%) fueron resistentes a tetraciclina, 113 de las resistentes *emm22*. De 1998 a 2003 la resistencia a tetraciclina disminuyó, habiendo disminuido también el número de aislamientos de *emm22*.

Mostrando así, una elevada asociación entre el tipo *emm* y la resistencia a tetraciclina ⁽⁵⁶⁾.

4.4.3.2 Relación de la resistencia con los genes *tet(M)* y *tet(O)*

Como se mencionó anteriormente, los genes predominantes en la resistencia a tetraciclina son los genes *tet(M)* y *tet(O)*, estos datos se presentan en la tabla 10, junto con otros genes encontrados en los diferentes estudios.

Tabla 10. Genes de resistencia encontrados en cepas de EGA en diferentes países

Año	País	Cepas con el gen <i>tet(M)</i>	Cepas con el gen <i>tet(O)</i>	Otros genes encontrados
1998-1999	Francia	82	10	2 con los genes <i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i> y una con <i>tet(T)</i> ⁽⁴⁴⁾ .
1990-1999	Dinamarca	23	1	7 con el gen <i>tet(S)</i> . La cepa con el gen <i>tet(O)</i> también fue resistente a Eritromicina ⁽²²⁾
1994-2001	España	78	19	En 5 cepas no se encontró gen ⁽³⁾
1995-2000	Brasil	155	48	16 cepas también fueron resistentes a Eritromicina. 17 <i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i> , 4 <i>tet(L)</i> , 1 <i>tet(L)</i> y <i>tet(M)</i> , y 2 <i>tet(L)</i> y <i>tet(O)</i> ⁽¹⁹⁾ .
1998-1999	Argentina	11	0	⁽²⁵⁾
2000-2002	EU	114	0	De 6 cepas con resistencia intermedia 2 tuvieron <i>tet(M)</i> y 4 ningún gen ⁽¹⁷⁾

En Australasia se detectó la presencia de 442 cepas resistentes de EGB con el gen *tet(M)*, 25 cepas *tet(O)*, 4 cepas con los dos genes y en 8 cepas ninguno de los 2 genes fue encontrado. Cuatro cepas con el gen *tet(M)* fueron susceptibles a tetraciclina y trece cepas con el gen *tet(O)* también tuvieron el gen *erm(B)* asociado a resistencia a eritromicina⁽⁶²⁾.

En Portugal, en 42 de las 43 cepas resistentes a tetraciclina se identificó el gen *tet(M)*. Diez de estas cepas también fueron resistentes a clindamicina y eritrocimicina⁽⁴³⁾.

De 68 cepas de EGA aisladas en Argentina de 1998 a 1999 hubo 5 cepas resistentes (7.3%) con el gen *tet(M)* pertenecientes a 4 diferentes tipos *emm*. De 20 EGG aisladas, 8 (40%) fueron resistentes a tetraciclina y de 6 EGC aisladas, 2 (33.3%) fueron resistentes a tetraciclina. Las cepas resistentes de EGG y EGC se distribuyeron entre 5 diferentes tipos *emm*⁽³²⁾. En Francia, en el 88% de las cepas de EGB con *tet(M)* se detectó la integrasa del transposón Tn916. Este resultado sugiere que la resistencia a tetraciclina en EGB es debida a la adquisición del transposón Tn916. La razón por la cual la resistencia a tetraciclina en EGB se encuentra tan diseminada en EGB comparado con otros grupos de Estreptococos o Enterococos no está definida⁽⁴⁴⁾.

En el contexto anterior, nuestro entendimiento de cómo los genes de resistencia a antibióticos son mantenidos y diseminados a través de poblaciones bacterianas no está completamente claro. En todos los estudios presentados hasta el momento, existen diferencias en cuanto a la presencia de genes de resistencia a antibióticos entre diferentes grupos de edades y entre diferentes áreas del mundo. Por esto, es necesario mantener una vigilancia en el comportamiento de la resistencia bacteriana a antibióticos para este grupo de bacterias.

5. HIPÓTESIS

La resistencia a tetraciclina en aislamientos clínicos de *Estreptococos* beta hemolíticos es debida a la presencia de los genes *tet(M)* y/o *tet(O)*, puede existir una relación entre la resistencia a tetraciclina y los serotipos M de los *Estreptococos*.

El porcentaje de resistencia a tetraciclina dependerá del grupo de *Estreptococo* beta hemolítico estudiado.

6. OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la ocurrencia de resistencia a tetraciclina *in vitro* y su relación con los genes *tet(M)* y *tet(O)* en 750 aislamientos clínicos de *Estreptococos* beta hemolíticos
- Determinar la asociación entre los genes *tet(M)* y *tet(O)* con los tipos M (proteína M) en las cepas del grupo A y grupo G.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los porcentajes de resistencia a tetraciclina *in vitro* en aislamientos clínicos.
- Estandarizar las condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de los genes *tet(M)* y *tet(O)*.
- Identificar la presencia de los genes *tet(M)* y *tet(O)* en las cepas resistentes mediante PCR.
- Relacionar el gen de resistencia con el serotipo M de las cepas.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas resistentes e intermedias a tetraciclina.
- Identificar cual de los grupos de Estreptococos beta hemolíticos presenta el porcentaje mayor de resistencia a tetraciclina.
- Analizar la resistencia de acuerdo al origen de la cepa.

8. MATERIAL Y EQUIPO

Cepas bacterianas. Se identificaron un total de 750 cepas de *Streptococcus* beta hemolíticos de origen clínico (640 cepas del grupo A, 28 del grupo B, 26 del grupo C y 58 del grupo G) provenientes de diferentes hospitales de la Ciudad de México.

Tabla 11. Lista de hospitales que donaron cepas utilizadas en el estudio

Hospital	Cepas analizadas
H. Gonzalo Castañeda (ISSSTE)	358
Instituto Nacional de Pediatría (INP)	82
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE)	50
H. Medica Sur	38
H. de Cardiología CMN Siglo XXI (IMSS)	23
H. López Mateos (ISSSTE)	19
H. Gabriel Mancera (IMSS)	16
H. 20 de Noviembre (ISSSTE)	14
H. de Especialidades CMN Siglo XXI (IMSS)	10
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)	10
H. General de México	5
Origen diverso	125

Controles de resistencia: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Reactivos

Pruebas de susceptibilidad y determinación de la CMI:

Placas de Gelosa Sangre (GS) y Agar Mueller Hinton BD DBL (MH) al 5% de sangre de carnero.

Sangre de carnero estéril

Solución salina isotónica estéril

Discos de tetraciclina de 30 µg BIO-RAD

Tiras de tetraciclina Etest® (AB BIODISK)

Hisopos de rayón estériles

Extracción de ADN:

DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) que incluye:

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

Proteinasa K 20 mg/mL

Etanol 96%

Buffer de lisis (AL)

Buffers de lavado (AW₁, AW₂)

Buffer de elusión (AE)

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

Amplificación por PCR:

Buffer 10X (100 mM Tris-HCl, pH=8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% w/v gelatina)

diNucleótido Trifosfato (dNTP) 1.25 mM

H₂O ultrapura

Taq ADN Polimerasa 5U/ μL (Altaenzymes)

Primers 10 μM (TETMF, TETMR, TETOF, y TETOR)

Detección de los productos de amplificación:

Gel de agarosa al 1.5% Agarosa grado biología molecular (Research Organics)

Marcador de peso molecular (PM) GeneRuler 100 pb (Fermentas)

Revelador: bromuro de etidio 10 mg/mL (Research Organics)

EquipoPruebas de susceptibilidad y determinación de la CMI:

Colorímetro VITEK Special DR200

Vortex GENIE-2 (Scientific Industries)

Incubadora Isotemp 750D (Fisher Scientific)

Extracción del ADN:

Minicolumnas (QIAGEN)

Microcentrífuga SIGMA 1-15 (LAB-LINE)

Parrilla Multi-block Heater (LAB-LINE)

Incubadora Isotemp 750D (Fisher Scientific)

Amplificación por PCR:

Termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems)

Fuente de poder mod. 4000 (Life Technologies Inc.)

Cámara digital DC290 Kodak con software Kodak 1D 3.5v

UV Transiluminador (Lab-Tech)

Cámara de Electroforesis Wide Mini-Sub Cell (BIO-RAD)

Secuenciación:

Secuenciador automatizado ABI 3700 (PE Applied Biosystems)

9. METODOLOGÍA

Evaluación de la Resistencia a tetraciclina por difusión en disco. Las cepas se sembraron en Gelosa Sangre al 5% y se incubaron a 37° C por 24 horas para ser utilizadas en la preparación de una suspensión bacteriana en un tubo con solución salina isotónica. Esta suspensión se ajustó a una densidad equivalente al 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml), después, con un hisopo estéril, la suspensión bacteriana se inoculó en la superficie de placas de Agar Mueller-Hinton. Posteriormente se colocaron unidiscos de tetraciclina de 30 µg (BIO-RAD), en la superficie de la placa. Después de una incubación por 24 horas a 37° C, los diámetros de inhibición se evaluaron de acuerdo a los criterios de la CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute).

Tabla 12. Criterio de interpretación de la CLSI para la prueba de difusión en disco (30 µg) ⁽¹¹⁾.

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Susceptible
Tetraciclina 30 µg	≤ 1.8 cm	1.9 – 2.2 cm	≥ 2.3 cm

En cada lote de pruebas de sensibilidad a tetraciclina se realizó un control con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la cual utilizamos como control de calidad, para esta bacteria los valores límite de los diámetros de inhibición son de 2.4 a 3.0 cm.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI): Todas las cepas de *Streptococo* resistentes a tetraciclina por la prueba de difusión en disco fueron evaluadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual fue realizada mediante

la prueba comercial de Etest® (AB BIODISK), la cual, es una combinación de las pruebas de dilución y difusión, ya que cuenta con un gradiente de concentración del antibiótico predefinido que difunde en el medio, esta técnica ha mostrado ser de fácil elaboración, confiable y reproducible. Usando la misma metodología que en las pruebas de difusión de disco, después de aplicar con el hisopo la suspensión bacteriana, se procedió a colocar una tira de Etest sobre la superficie de la placa que posteriormente se incubó a 37° C por 24 horas.

La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a los criterios de la CLSI indicados por el fabricante.

Tabla 13. Criterios de interpretación de la CLSI utilizadas para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$)⁽¹¹⁾.

Antibiótico	Susceptible	Intermedio	Resistente
Etest tetraciclina	≤ 2 ($\mu\text{g/ml}$)	4 ($\mu\text{g/ml}$)	≥ 8 ($\mu\text{g/ml}$)

Para el control de calidad se utilizó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, con un intervalo de control de CMI de 8 – 32 ($\mu\text{g/ml}$).

Detección de los determinantes de resistencia.

En las 750 cepas de Estreptococos beta hemolíticos analizadas “in vitro” se buscó la presencia de los genes *tet(M)* y *tet(O)* que confieren resistencia a tetraciclina.

Aislamiento de ADN: El ADN se aisló usando el kit QIAGEN, para ello, se ocupó un cultivo de 24 horas en placas de Agar Sangre de la cepa a analizar. En 180 μL de buffer de lisis enzimática (lisozima 20mg/mL) se colocan de 10 a 15 colonias para formar una suspensión, esta suspensión se incubó por 30 minutos a 37°C, después de ese tiempo, se adicionaron 25 μL de proteinasa K y 200 μL de Buffer AL, luego se realizó otra incubación a 70 °C por 30 minutos, pasado ese tiempo se adicionaron 200 μL de etanol absoluto frío para luego agitar con un vortex. Se transfirió a una columna de extracción y se centrifugó por un minuto a 8000 rpm; se llevaron a cabo otras dos centrifugaciones para lavado (8000 rpm por 1 min. y 13000 rpm por 3 min.). El ADN contenido en la columna se eluyó con 200 μL de buffer AE, incubando 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó un minuto a 8000 rpm recolectando el ADN disuelto en tubos eppendorf.

Primers: Las secuencias de los primers para detectar los genes *tet(M)* y *tet(O)* se obtuvieron de otras publicaciones realizadas ^(41,49). Estos primers permiten productos de PCR específicos y óptimos en peso molecular para ser producidos y diferenciados entre sí.

En la tabla 14 se muestran las secuencias de los respectivos primers, la localización en el gen y el tamaño esperado del amplificado.

Tabla 14. Secuencias de los primers utilizados para detectar los genes *tet(M)* y *tet(O)*

Primer	Secuencias	Localización en el gen	Amplificado
TETMF	5' – GTT TAT CAC GGA AGT GCA A – 3'.	654	680 pb
TETMR	5' GGA GCC CAG AAA GGA TTC GG – 3'.	1334	
TETOF	5' - AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC - 3'	219	494 pb
TETOR	5' - TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA - 3'	713	

Estandarización de condiciones de PCR: Se determinaron las condiciones óptimas de concentración y volúmenes de cada reactivo requeridas para realizar la mezcla maestra, además, se realizó un PCR en gradiente de temperatura, de 40°C a 55°C adicionando marcador Low Mass (In Vitrogen) para determinar la cantidad de ADN presente en el producto de la PCR, con el propósito de establecer la temperatura óptima de amplificación. Además, se intentó realizar un PCR múltiple para amplificar, en la misma reacción, los genes *tet(M)* y *tet(O)*. Sin embargo esto no se logró debido a que no se obtuvieron los dos productos de PCR deseados con los controles utilizados. Después de haber realizado la PCR con una sola cepa clínica, se procedió a probar la reacción, colocando 6 ADN's (pool) por tubo, esto permitió optimizar reactivos y tiempo. Finalmente con esta cantidad de ADN por tubo se procedió a realizar la búsqueda de genes de resistencia a tetraciclina en todas las cepas.

Revelado de productos de PCR: Los productos de PCR son revelados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Esperando obtener productos amplificados de 680 pb para *tet(M)* y de 500 pb para *tet(O)*.

Secuenciación del producto de PCR: La secuenciación de los productos de PCR obtenidos es importante, ya que nos sirve para demostrar la especificidad de los primers y poder conocer el tipo de genes *tet(M)* y *tet(O)* existentes en nuestra población bacteriana. Para ello, una vez que se obtuvo el producto de PCR fue necesario purificarlo para la posterior secuenciación. El volumen obtenido de la reacción, se purificó por filtración utilizando los filtros microcon YM-100 (Millipore). La secuenciación fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular con un secuenciador automatizado (ABI 3100).

Relación entre el genotipo de resistencia y el serotipo M

Se buscó una posible relación entre el tipo M y la resistencia a tetraciclina. En las cepas del grupo A, el tipo M de la bacteria (proteína M) fue previamente identificado por biología molecular. Para realizar esta tipificación, primero se amplificó, mediante PCR, el gen *emm* que codifica para la proteína M y posteriormente se realizó un corte enzimático con la enzima DdeI, mediante electroforesis en gel se determinó el patrón de corte enzimático y se comparó con otro patrón ya conocido con el propósito de determinar el tipo M de la bacteria. En cuanto a los grupos C y G el tipo M se pudo determinar solo en algunas de las cepas mediante la misma metodología.

10. RESULTADOS

Determinación “in vitro” de la resistencia a tetraciclina.

De acuerdo con los criterios de interpretación de la CLSI, las cepas se dividieron en resistentes, intermedias y sensibles. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de una cepa resistente “in vitro”. A 9 cepas detectadas inicialmente con resistencia intermedia, cuyos valores variaron de 1.9 cm de diámetro a 2.1 cm de diámetro de inhibición, se les repitió la prueba de difusión en disco dos veces, clasificándose 5 como sensibles y 4 como resistentes.

Ochenta y ocho cepas de *Streptococcus* beta hemolíticos (EBH) de las 750 evaluadas presentaron resistencia “in vitro” dando como resultado un porcentaje de resistencia total del 11.7%. En la tabla 15 se presentan los resultados por grupo de *Streptococcus* probados.

Tabla 15. Porcentajes de resistencia a tetraciclina en las cepas de *Streptococcus* beta hemolíticos de los grupos A, B, C y G.

Tipo de EBH	Resistentes / Evaluadas	% de Resistencia
Estreptococo del Grupo A	24/640	3.7%
Estreptococo del Grupo B	23/26	88.5%
Estreptococo del Grupo C	12/26	46.2%
Estreptococo del Grupo G	29/58	50.0%
Total	88/750	11.7%



Figura 2. Cepa de EBH positiva en la prueba de resistencia a tetraciclina por la técnica de difusión en disco

A las 88 cepas resistentes por la prueba de difusión se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) utilizando la prueba de Etest®. En la Figura 3 se muestra un ejemplo de una cepa de EBH resistente a tetraciclina.

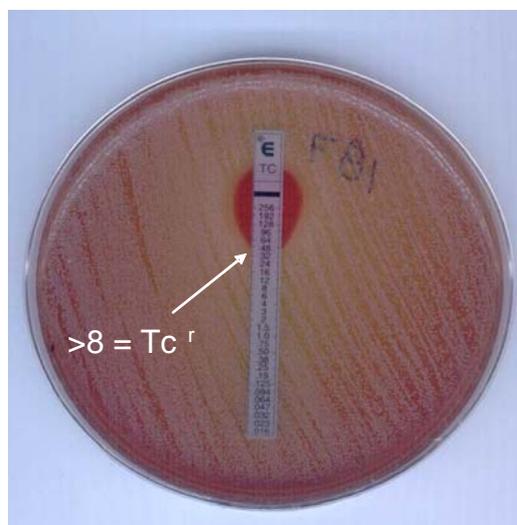
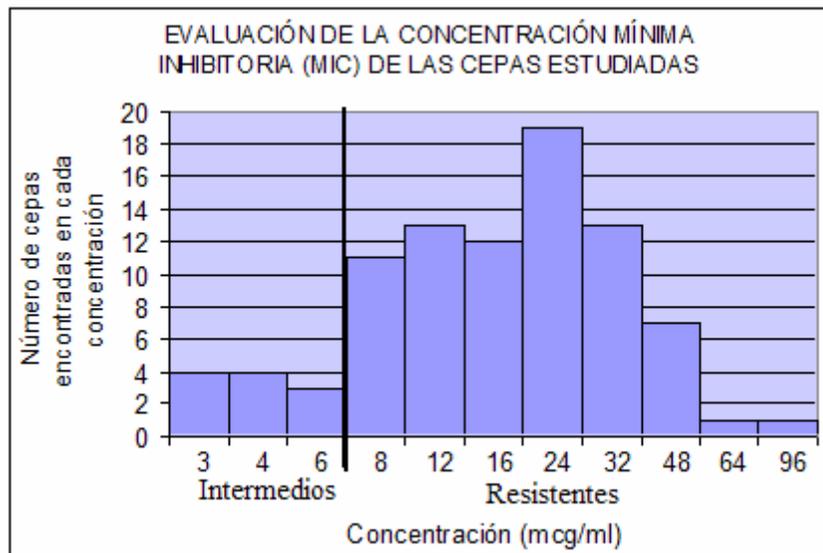


Figura 3. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria en una cepa de EBH resistente a tetraciclina.

Se encontraron 11 cepas con resistencia intermedia con valores de 3 a 6 ($\mu\text{g/ml}$), de ellas, 2 fueron del grupo A, una del grupo B, 2 del grupo C y 6 del grupo G.

La distribución de las cepas a lo largo del intervalo de concentraciones se presenta en la gráfica 1.

Gráfica 1. Distribución de los valores de CMI de las 88 cepas de EBH resistentes a tetraciclina



Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las condiciones de amplificación óptimas encontradas fueron $95^{\circ}\text{C}/30''$ para la desnaturalización, $44^{\circ}\text{C}/30''$ para la hibridación y $72^{\circ}\text{C}/90''$ para la elongación, estas 3 etapas se repitieron por 30 ciclos. La temperatura de 44°C para la alineación de los primers se determinó por una PCR realizada en un gradiente de temperatura. Debido a que las cantidades de producto amplificado a diferentes temperaturas no pusieron de manifiesto alguna con un rendimiento superior al de los demás (Figura 4), se procedió a utilizar la temperatura de 44°C , usada en publicaciones anteriores ^(41,49).

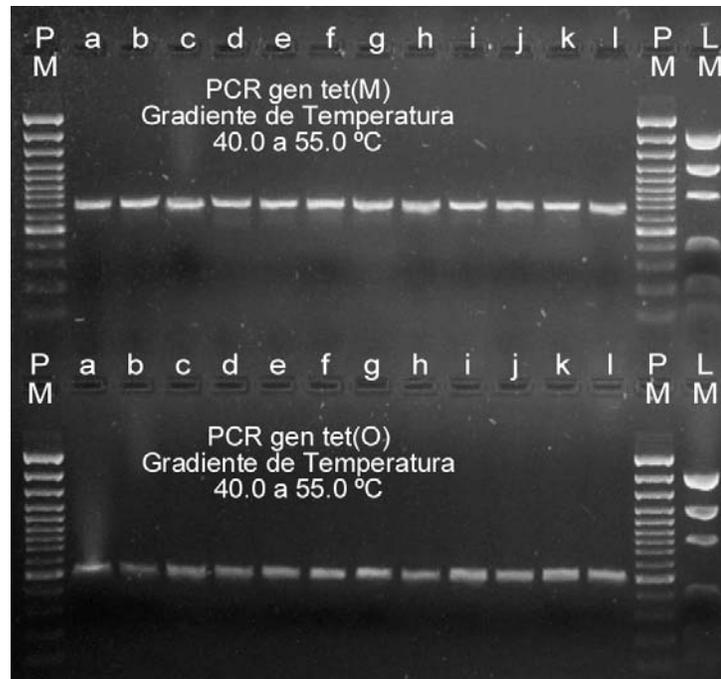


Figura 4. Productos de PCR obtenidos a diferentes temperaturas durante la estandarización de la amplificación de los genes de resistencia

Las cantidades de los reactivos utilizadas por mezcla de reacción de 30 μL de PCR se presentan en la tabla 16.

En la búsqueda de genes de resistencia en todo el lote de cepas, se utilizó un volumen de reacción de 50 μL , con la finalidad de detectar en una misma reacción algún gen de resistencia en 6 ADN's diferentes (pool), esto con el propósito de ahorrar tiempo y reactivos. Cuando un pool de reacción dio positivo para alguno o para los dos genes, se procedió a buscar, individualmente, cual cepa del pool resultó positiva. Para las reacciones individuales la mezcla de reacción ocupada fue de 30 μL . La tabla 16 muestra las cantidades empleadas para la amplificación de los genes *tet(M)* y *tet(O)*.

Tabla 16. Mezcla de reacción utilizada para amplificar los genes *tet(M)* y *tet(O)*.

	Vol. Final = 50 μ L	Vol. Final = 30 μ L
Reactivo	Volumen (μ L)	Volumen (μ L)
H ₂ O	29.6	19.6
dNTP's	8	5
Buffer	5	3
PRIMER1	0.6	0.6
PRIMER2	0.6	0.6
Taq	0.2	0.2
ADN	5	1

Si el gen a amplificar es *tet(M)* se ocupan los primer TETMF y TETMR, si el gen a amplificar es *tet(O)* se ocupan los primers TETOF y TETOR.

Los controles positivos para el PCR se establecieron a partir de cepas clínicas identificadas como resistentes “in vitro”, y que durante la estandarización dieron positiva la amplificación, pudiendo determinar así su identidad mediante secuenciación.

Para los controles positivos se mezclaron 4 ADN's negativos, uno positivo para *tet(M)* y otro positivo para *tet(O)*, esto con la finalidad de que se pudiera identificar alguna cepa que tuviera los dos genes de resistencia probados, evidenciando así, que la amplificación de un gen no interfiriera con la amplificación del otro gen.

Algunos de los productos de PCR se presentan en la Figura 5, se evidencian las diferencias en tamaño, el gen *tet(M)* con tamaño de 680 pb y *tet(O)* con un tamaño de 500 pb. Los marcadores de Peso Molecular (PM) se colocaron en los extremos del gel.

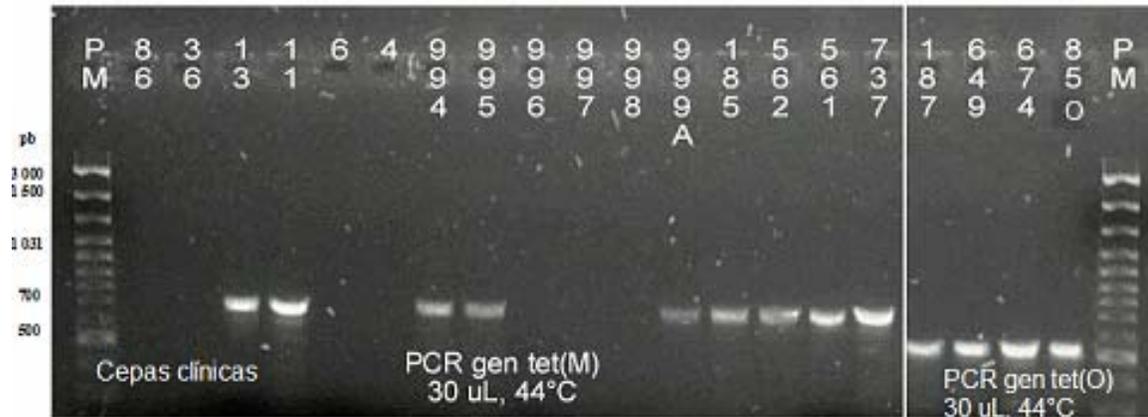


Figura 5. Productos de PCR de las cepas de EBH que poseen genes asociados a la resistencia a tetraciclina.

La distribución de los genes de resistencia *tet(M)* y *tet(O)* detectados se presentan en la tabla 17. Cabe mencionar que algunas cepas resistentes “in vitro” no amplificaron ninguno de los dos genes estudiados. Además en el grupo B solo se encontró la presencia del gen *tet(M)*.

Tabla 17. Detección y distribución de los genes de resistencia *tet(M)* y *tet(O)* en las cepas de EBH resistentes a tetraciclina.

Tipo de EBH	PCR + en Cepas resistentes	Genes <i>tet</i> detectados
Estreptococo del Grupo A	23/24	21- <i>tet(M)</i> 1- <i>tet(O)</i> 1 Ambos (1 Negativa)
Estreptococo del Grupo B	23/23	23- <i>tet(M)</i>
Estreptococo del Grupo C	9/12	5- <i>tet(M)</i> 4- <i>tet(O)</i> (3 Negativas)
Estreptococo del Grupo G	20/29	16- <i>tet(M)</i> 2- <i>tet(O)</i> 2-Ambos (9 Negativas)

En la tabla 17 se observa la presencia del gen *tet(M)* en los cuatro grupos de EBH, el gen *tet(O)* no se detectó en las cepas del grupo B, y en 13 cepas resistentes no se pudo amplificar ninguno de los dos genes explorados.

Dentro del grupo de cepas susceptibles a tetraciclina (662), 8 cepas del grupo A y una cepa del grupo C resultaron ser positivos en PCR para el gen *tet(M)*, aún cuando en la prueba “in vitro” fueron sensibles.

A continuación se presentan los datos experimentales de las 24 cepas de EGA resistentes a tetraciclina, donde se incluye el grupo serológico, el gen de resistencia detectado, la CMI, y el tipo M.

Tabla 18. Cepas de EGA resistentes a tetraciclina.

Clave Cepa	Gpo. Serológico	Tipo M	Genes de Resistencia	CMI (mg/ml)	Origen de la muestra
185	A	4	<i>tet(M)</i>	8	L. cav. Ab.
187	A	stG6	<i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i>	48	Faríngeo
235	A	4	<i>tet(M)</i>	16	Faríngeo
244	A	65	<i>tet(M)</i>	12	D (sec ocular)
258	A	4	<i>tet(M)</i>	16	Faríngeo
276	A	60	<i>tet(M)</i>	32	Hemocultivo
275	A	49-1	<i>tet(M)</i>	12	Hemocultivo
554	A	49-1	<i>tet(M)</i>	24	Hemocultivo
562	A	59	<i>tet(M)</i>	16	Diverso (sec)
561	A	SR	<i>tet(M)</i>	24	Diverso (biop)
566	A	stG485	<i>tet(M)</i>	12	Diverso (asp)
586	A	41-2	<i>tet(M)</i>	12	Faríngeo
675	A	stG6	<i>tet(O)</i>	6	Faríngeo
699	A	41-2	<i>tet(M)</i>	12	Faríngeo
700	A	stG6	SR	6	Faríngeo
702	A	77	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
703	A	77	<i>tet(M)</i>	48	Faríngeo
706	A	41-2	<i>tet(M)</i>	12	Faríngeo
712	A	111	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
744	A	stG245	<i>tet(M)</i>	12	Faríngeo
755	A	65	<i>tet(M)</i>	16	Faríngeo
887	A	65	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
1033	A	SR	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
1045	A	89	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo

En la tabla 19 se presentan los resultados de las 23 cepas resistentes del grupo B, presentado el gen de resistencia detectado, la CMI y el origen de la muestra.

Tabla 19. Cepas de EGB resistentes a tetraciclina.

Clave Cepa	Gpo Serológico	Genes de Resistencia	CMI	Origen de la muestra
11	B	<i>tet(M)</i>	24	SD
581	B	<i>tet(M)</i>	32	Faríngeo
602	B	<i>tet(M)</i>	48	SD
626	B	<i>tet(M)</i>	12	Faríngeo
625	B	<i>tet(M)</i>	16	Faríngeo
628	B	<i>tet(M)</i>	16	Faríngeo
666	B	<i>tet(M)</i>	32	Faríngeo
683	B	<i>tet(M)</i>	3	Vaginal
942	B	<i>tet(M)</i>	96	Vaginal
943	B	<i>tet(M)</i>	32	Vaginal
944	B	<i>tet(M)</i>	48	Vaginal
945	B	<i>tet(M)</i>	16	Vaginal
946	B	<i>tet(M)</i>	24	Vaginal
947	B	<i>tet(M)</i>	32	Vaginal
948	B	<i>tet(M)</i>	48	Urocultivo
949	B	<i>tet(M)</i>	32	Urocultivo
950	B	<i>tet(M)</i>	24	Secreción
971A	B	<i>tet(M)</i>	24	SD
987	B	<i>tet(M)</i>	32	Faríngeo
999A	B	<i>tet(M)</i>	32	Faríngeo
1000	B	<i>tet(M)</i>	48	Faríngeo
1017B	B	<i>tet(M)</i>	32	Narina
1017A	B	<i>tet(M)</i>	32	Narina

En el caso de las 12 cepas resistentes del grupo C, solo en dos casos se pudo determinar el alelo *emm*, los datos de CMI, gen involucrado y origen de la muestra se presentan en la tabla 20.

Tabla 20. Cepas de EGC resistentes a tetraciclina.

Clave cepa	Grupo serológico	Tipo M	Genes de resistencia	CMI	Origen de la muestra
6	C	SR	SR	3	SD
649	C	st3060	<i>tet(O)</i>	16	Faríngeo
661	C	SR	<i>tet(O)</i>	16	Faríngeo
674	C	SR	<i>tet(O)</i>	24	Faríngeo
676	C	SR	<i>tet(O)</i>	12	Faríngeo
717	C	stC839	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
760	C	SR	<i>tet(M)</i>	12	Faríngeo
801	C	SR	<i>tet(M)</i>	8	SD
918	C	SR	SR	4	Meningitis
983	C	SR	SR	8	L. sinovial
989	C	SR	<i>tet(M)</i>	8	Faríngeo
990	C	SR	<i>tet(M)</i>	16	Faríngeo

Finalmente se presentan los datos de alelos *emm*, gen de resistencia, CMI y origen de la muestra de las 29 cepas resistentes de EGG encontradas.

Tabla 21. Cepas de EGG resistentes a tetraciclina.

Clave cepa	Grupo serológico	Tipo M	Genes de resistencia	CMI	Origen de la muestra
35	G	SR	<i>tet(M)</i>	48	SR
148	G	stg6	SR	4	SR
253	G	SR	<i>tet(M)</i>	24	Vaginal
647	G	stG485	SR	3	Faríngeo
659	G	SR	<i>tet(M)</i>	3	Faríngeo
670	G	SR	<i>tet(O)</i>	4	Faríngeo
690	G	SR	<i>tet(M)</i>	24	Vaginal
691	G	stG485	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
692	G	SR	SR	4	Faríngeo
696	G	stG485	<i>tet(M)</i>	12	Faríngeo
698	G	SR	<i>tet(M)</i>	8	Faríngeo
701	G	stG6	SR	8	Faríngeo
709	G	SR	<i>tet(M)</i>	12	Urocultivo
737	G	stG480	<i>tet(M)</i>	16	Vaginal
738	G	stG643	SR	6	Faríngeo
743	G	SR	SR	8	Faríngeo
748	G	stG10	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
771	G	SR	SR	8	Urocultivo
766	G	78	<i>tet(M)</i>	32	Faríngeo
831	G	stG485	<i>tet(M)</i>	32	Urocultivo
834	G	stG840	SR	8	Pie diabético
845	G	SR	<i>tet(M)</i>	8	Faríngeo
850	G	stG485	<i>tet(O)</i>	32	Vaginal
920	G	st 3060	SR	8	Faríngeo
1047	G	stg839	<i>tet(M)</i>	16	Faríngeo
1052	G	stg485	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
1057	G	SS18	<i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i>	12	Faríngeo
1059	G	SR	<i>tet(M)</i>	24	Faríngeo
1061	G	stg485	<i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i>	64	SD

Las tablas anteriores muestran una distribución homogénea entre las cepas resistentes de EGA en cuanto a la CMI y el tipo M de las cepas.

Como ya se mencionó con anterioridad, el gen *tet(M)* prevaleció en los cuatro grupos de EBH estudiados.

Los resultados de las cepas de EBH resistentes, en cuanto al tipo de muestra, se presentan en la tabla 22, evidenciando una prevalencia del origen faríngeo.

Tabla 22. Distribución del origen de la muestra donde fueron aislados los EBH resistentes a tetraciclina

Tipo de muestra	Número de cepas	Porcentaje
Faringeo	50	56.81%
Vaginal	11	12.5%
No Determinado	8	9.09%
Urocultivo	5	5.68%
Hemocultivo	3	3.40%
*Varios	11	12.5%

* Otros con menos de 3 cepas

Al lote de cepas analizado se le determinó el tipo M previamente. Dentro de un total de 28 diferentes tipos *emm*, la resistencia a tetraciclina se presentó distribuida en 12 diferentes tipos M.

En la tabla 23 se presenta la agrupación de las cepas del grupo A considerando su tipo M.

tipo <i>emm</i>	No. de aislamientos				tipo <i>emm</i>	No. de aislamientos			
	Pruebas	Porcentaje	Tc ^r	MIC		Pruebas	Porcentaje	Tc ^r	MIC
<i>emm12</i>	126	20.3%	0		<i>emm78</i>	8	1.3%	0	
<i>emm1</i>	119	19.2%	0		<i>emm11</i>	5	0.8%	0	
<i>emm75</i>	65	10.5%	0		<i>emm41-2</i>	3	0.5%	3	12(3)
<i>emm6</i>	57	9.2%	0		<i>stg6</i>	3	0.5%	3	6(2), 48
<i>emm2</i>	55	8.9%	0		<i>stg485</i>	3	0.5%	1	12
<i>emm3</i>	41	6.6%	0		<i>emm65</i>	3	0.5%	3	24, 16, 12
<i>emm4</i>	41	6.6%	3	16(2), 8	<i>emm49-1</i>	2	0.3%	2	24, 12
<i>emm28</i>	27	4.4%	0		<i>emm60</i>	2	0.3%	1	32
<i>emm22</i>	20	3.2%	0		<i>stg4831</i>	2	0.3%	0	
<i>emm89</i>	16	2.6%	1	24	NT	20	3.1%	2	24(2)
<i>emm77</i>	14	2.3%	2	48,24	* Otros	8	1.3%	3	24, 16, 12

* Otros incluye 8 tipos *emm* con <0.3% (*emm122*, *emm30*, *emm48*, *emm111*, *emm59*, *emm72*, *stg6792*, *stg245*)

En el grupo A se observa que la resistencia a tetraciclina está distribuida homogéneamente entre los tipos M con menor frecuencia. Así, entre los tipos M más comunes, como el *emm12*, *emm1* y *emm75* que representan cerca del 50% de las cepas evaluadas, no se encontró alguna cepa resistente.

En el caso de las cepas del grupo B, no fue posible dicha agrupación, sin embargo, es posible un análisis posterior tomando en cuenta el tipo capsular del EGB.

Los datos de los tipos M de las cepas de EGG se muestran en la tabla 24.

Tabla 24 . Distribución de alelos <i>emm</i> de aislamientos EGG evaluados									
tipo <i>emm</i>	No. de aislamientos				tipo <i>emm</i>	No. de aislamientos			
	Pruebas	Porcentaje	Tc ^r	MIC		Pruebas	Porcentaje	Tc ^r	MIC
<i>NT</i>	34	58.7%	12	**	<i>emm78</i>	1	1.7%	1	32
<i>stg485</i>	7	12.0%	7	*	<i>emm97</i>	1	1.7%	0	
<i>stg6</i>	3	5.2%	2	8, 4	<i>stg5345</i>	1	1.7%	0	
<i>stg4222</i>	2	3.4%	0		<i>stg840</i>	1	1.7%	1	8
<i>st 3060</i>	2	3.4%	1	8	<i>ss18</i>	1	1.7%	1	12
<i>emm1</i>	1	1.7%	0		<i>stg480</i>	1	1.7%	1	16
<i>stg643</i>	1	1.7%	1	6	<i>stc839</i>	1	1.7%	1	16
<i>stg10</i>	1	1.7%	1	24	* = 3, 12, 24(2), 32(2), 64		** MIC de 3 a 48		

Para el grupo G sucede una situación diferente que con el grupo A, ya que la mayoría no fueron tipificables, sin embargo, el tipo *stg485* es el que sobresale con 7 aislamientos, todos resistentes a tetraciclina.

Considerando los datos del hospital de origen en el grupo de cepas de *Streptococo* beta hemolítico estudiados, se realizó la tabla 25, que muestra el porcentaje de resistencia encontrado por hospital para las cepas ocupadas en este estudio.

Tabla 25. Porcentaje de cepas de EBH resistentes a tetraciclina por hospital.

Hospital	Cepas analizadas	Cepas positivas	% de resistencia
H. Gonzalo Castañeda	358	48	13.40%
INP	82	8	9.75%
InDRE	50	8	16%
H. Medica Sur	38	1	2.63%
H. de Cardiología CMN	23	2	8.69%
H. López Mateos	19	0	0%
H. Gabriel Mancera	16	0	0%
H. 20 de Noviembre	14	12	85.71%
HECM	10	1	10%
INER	10	0	0%
H. General	5	2	40%
Origen diverso	125	6	4.8%

Observando esta distribución de la resistencia tan diversa en los hospitales que nos proporcionaron las cepas, se decidió realizar tablas que mostraran la distribución de la resistencia por hospital para los 4 grupos de EBH estudiados.

Estos datos se presentan en las tablas 25, 26, 27 y 28.

Tabla 26. Porcentaje de resistencia a tetraciclina por hospital para cepas del grupo A.

Hospital	Cepas analizadas	Cepas positivas	% de Resistencia
H. Gonzalo Castañeda	297	11	3.7
INP	79	7	8.9
Medica Sur	38	1	2.6
InDRE	37	0	0
Cardiología CMN	20	2	10
H. López Mateos	19	0	0
H. Gabriel Mancera	16	0	0
INER	10	0	0
HECM	8	1	12.5
H. General	4	1	25
20 de Noviembre	1	0	0
origen diverso	111	1	0.9

Tabla 27. Porcentaje de resistencia por hospital para el grupo B

Hospital	Cepas analizadas	Cepas positivas	% de Resistencia
20 de Noviembre	13	11	84.61
H. Gonzalo Castañeda	8	7	85.71
InDRE	5	5	100
Cardiología	1	0	0
Otros	1	0	0

Tabla 28. Porcentaje de resistencia a tetraciclina por hospital para cepas del grupo C.

Hospital	Cepas analizadas	Cepas positivas	% de Resistencia
H. Gonzalo Castañeda	13	6	46.15
InDRE	7	3	42.85
INP	2	0	0
H. General	1	1	100
H. de Cardiología	1	0	0
Otros	2	2	100

Tabla 29. Porcentaje de resistencia a tetraciclina por hospital para cepas del grupo G.

Hospital	Cepas analizadas	Cepas positivas	% de Resistencia
H. Gonzalo Castañeda	40	24	60
Otros	11	3	18
20 de Noviembre	2	1	50
HECM	2	0	0
INP	1	1	100
InDRE	1	0	0
H. Cardiología	1	0	0

La secuenciación de los productos de PCR obtenidos corroboró la especificidad de los primers, pudiendo comprobar de esta manera la identidad de los genes estudiados. Para ello, las secuencias obtenidas fueron introducidas al Gen-Bank para su comparación. Para el gen *tet(M)* el resultado nos mostró una similitud del 98-99% con el gen *tet(M)* de *Enterococcus faecalis* con la clave de acceso M85225. En el caso del *tet(O)* se encontró una similitud del 98%-99% con el gen *tet(O)* de *Streptococcus pneumoniae* con la clave Y07780. Para éste análisis se utilizó el programa Meg Align® (LASTERGENE, Enastar Inc.). El alineamiento realizado entre la secuencia del gen *tet(M)* de *Enterococcus faecalis* con las clave de acceso M85225 y la secuencia obtenida a partir de una cepa clínica de EBH positiva para el gen *tet(M)* se presenta en la Figura 6.

Figura 6. Alineamiento de la secuencia del gen *tet(M)* de *E. faecalis* con una secuencia obtenida a partir de una cepa de EBH detectada con el gen *tet(M)*.

	710	720	730	740	750	
699	TATTACTAATAAATTTTATTTCATCAACACATCGAGGTCGGTCTGAACCTT					M85225
37	GATTACGAATAAATTTTATTTCATCAACACATCGAGGTCGGTCTGAACCTT					587 tet(M)
	760	770	780	790	800	
749	GCGGAAATGTTTTCAAAATTGAATATACAAAAAAGACAACGTCTTGCA					M85225
87	GCGGAAATGTTTTCAAAATTGAATATACAAAAAAGACAACGTCTTGCA					587 tet(M)
	810	820	830	840	850	
799	TATATACGCCTTTATAGTGGAGTACTACATTTACGAGATTCGGTTAGAGT					M85225
137	TATATACGCCTTTATAGTGGAGTACTACATTTACGAGATTCGGTTAGAGT					587 tet(M)
	860	870	880	890	900	
849	ATCAGAAAAAGAAAAATAAAAGTTACAGAAATGTATACTTCAATAAATG					M85225
187	ATCAGAAAAAGAAAAATAAAAGTTACAGAAATGTATACTTCAATAAATG					587 tet(M)
	910	920	930	940	950	
899	GTGAATTATGTAAGATTGATAGAGCTTATTCTGGAGAAATTGTTATTTTG					M85225
237	GTGAATTATGTAAGATTGATAGAGCTTATTCTGGAGAAATTGTTATTTTG					587 tet(M)
	960	970	980	990	1000	
949	CAAATGAGTTTTTGAAGTTAAATAGTGTTCTTGGAGATACAAACTATT					M85225
287	CAAATGAGTTTTTGAAGTTAAATAGTGTTCTTGGAGATACAAACTATT					587 tet(M)
	1010	1020	1030	1040	1050	
999	GCCACAGAGAAAAAGATTGAAAATCCGCACCCTCTACTACAAACAACCTG					M85225
337	GCCACAGAGAAAAAGATTGAAAATCCGCACCCTCTACTACAAACAACCTG					587 tet(M)
	1060	1070	1080	1090	1100	
1049	TTGAACCGAGTAAACCTGAACAGAGAGAAATGTGCTTGATGCCCTTTTG					M85225
387	TTGAACCGAGTAAACCTGAACAGAGAGAAATGTGCTTGATGCCCTTTTG					587 tet(M)
	1110	1120	1130	1140	1150	
1099	GAAATCTCAGATAGTGATCCGCTTCTACGATATTACGTGGATTCTACGAC					M85225
437	GAAATCTCAGATAGTGATCCGCTTCTACGATATTACGTGGATTCTACGAC					587 tet(M)
	1160	1170	1180	1190	1200	
1149	ACATGAAATTATACTTTCTTTCTTAGGGAAAGTACAAATGGAAGTGATTA					M85225
487	ACATGAAATTATACTTTCTTTCTTAGGGAAAGTACAAATGGAAGTGATTA					587 tet(M)
	1210	1220	1230	1240	1250	
1199	GTGCACTGTTGCAAGAAAAGTATCATGTGGAGATAGAACTAAAAGAGCCT					M85225
537	GTGCACTGTTGCAAGAAAAGTATCATGTGGAGATAGAACTAAAAGAGCCT					587 tet(M)
	1260	1270	1280	1290	1300	
1249	ACAGTCATTTATATGGAGAGACCGTTAAAAAATGCAGAATATACCATTCA					M85225
587	ACAGTCATTTATATGGAGAGACCGTTAAAAAATGCAGAATATACCATTCA					587 tet(M)

Analizando las secuencias obtenidas, se observó que existen diferentes alelos de los genes *tet(M)* y *tet(O)* dentro de la población de cepas estudiadas. Al respecto cabe mencionar que no se han reportado alelos de estos genes de resistencia *tet(M)* y *tet(O)* en EBH, por lo que, las variaciones alélicas solo se han determinado en otros géneros bacterianos, pero no en los grupos de EBH estudiados.

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Pruebas “in vitro” de resistencia a tetraciclina

Comparando los resultados de las pruebas “in vitro” de resistencia a tetraciclina, podemos ver que el porcentaje de resistencia es diferente entre los grupos de EBH analizados, siendo del 11.7% para todas las cepas, el menor porcentaje de resistencia lo presenta el grupo A con 3.8% y el mayor porcentaje lo presenta el grupo B con el 82.1% de los aislamientos. En porcentajes intermedios se encontraron el grupo C con 46.2% y para el grupo G con 50%.

Comparando nuestros resultados con los reportados en estudios realizados en otros países, tenemos que en el caso de EGA, el porcentaje de resistencia fue menor con respecto a datos reportados en Hong Kong (53.3%)⁽²³⁾ y Brasil (43.1%)⁽¹⁵⁾. Sin embargo como lo muestra la tabla 6, nuestras cepas muestran un bajo porcentaje de resistencia como en el caso de Portugal⁽⁴³⁾, en donde se reportó un porcentaje del 7.6%.

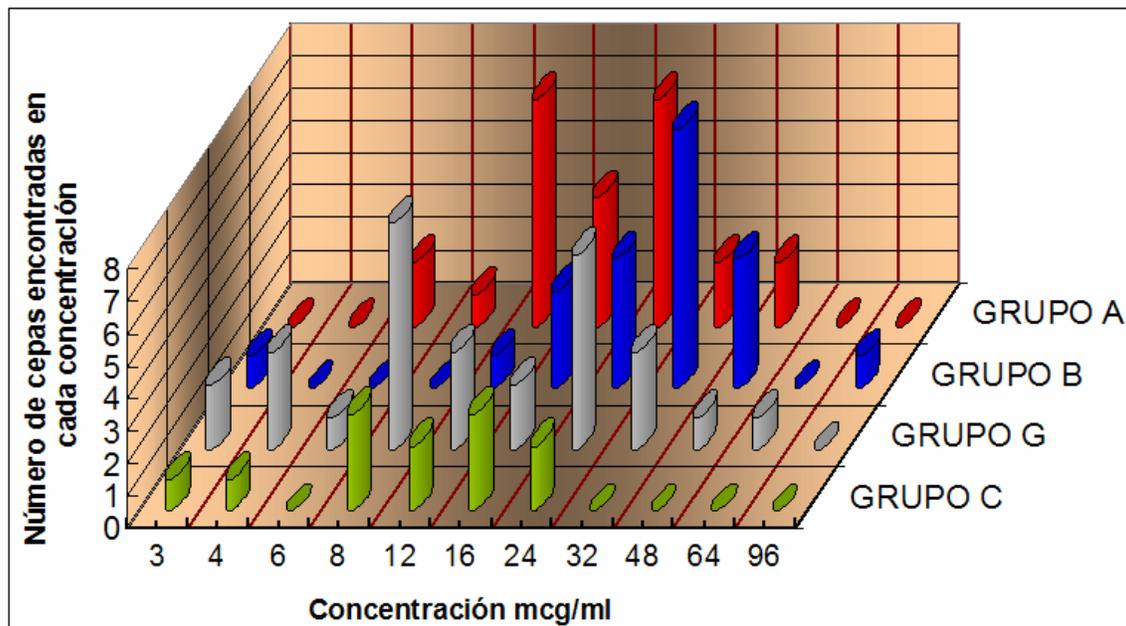
Para el caso del grupo B, el porcentaje de resistencia encontrado (88.5%) es muy similar al de otros estudios, tales como el de EU (84.6%)⁽¹⁷⁾ o al de la región de Australasia (88.5%)⁽⁶²⁾

La tabla 8, muestra que en el caso de los grupos C y G, nuestros datos de porcentajes son altos con respecto al estudio hecho en Argentina, en donde se encontró que para el grupo C el porcentaje de resistencia fue del 20% y para el grupo G del 39.1%⁽²⁵⁾

La razón por la cual el porcentaje de resistencia a tetraciclina es mayor para el grupo B no está claro, ya que, se ha demostrado que la adquisición de la resistencia a tetraciclina es debida a la diseminación del transposón *Tn916*, y las condiciones de presión selectiva por las cuales éste transposón es transferido son muy similares entre los demás EBH⁽⁴⁴⁾.

En cuanto a la prueba de Etest, la cual nos indica la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), el valor de que presentó el mayor número de EBH resistentes fue de 24 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), La distribución del grupo C fue hacia valores de CMI's bajas ($\leq 24\mu\text{g}/\text{ml}$), el grupo B se distribuyo en CMI's medios-altos ($\geq 12\mu\text{g}/\text{ml}$) y en los grupos A y G las cepas resistentes se distribuyeron a lo largo de todo el intervalo de CMI's. Estas distribuciones se presentan en la Gráfica 2.

Gráfica 2. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en los diferentes grupos de EBH resistentes a tetraciclina.



Cabe mencionar que 2 cepas que presentaron los dos genes *tet(M)* y *tet(O)* tuvieron valores de CMI altos, de 48 (EGA) y de 64 (EGG) $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Origen de la muestra

El análisis de la resistencia, en cuanto al origen de la muestra de las cepas resistentes, exhibe una prevalencia de los exudados faríngeos con el 56.81% del total de las cepas resistentes (Tabla 2). Sin embargo, cabe destacar, que este porcentaje de resistencia es debido a que los exudados faríngeos predominan en general como la principal fuente de aislamientos de EBH. Para el caso de las cepas del grupo B la distribución es diferente, ya que los aislamientos de exudados vaginales representaron el 34.4% de los aislamientos, y de ellos, el 100% (7/7) fue resistente, los aislamientos faríngeos representaron el 39.1% de los aislamientos de EGB, y de ellos, el 88.8% (8/9) fue resistente a tetraciclina.

Análisis de los productos de PCR

Se ha reportado previamente la combinación de diferentes determinantes de resistencia a tetraciclina en bacterias Gram Positivas, siendo *tet(M)* la determinante más prevalente⁽⁵⁰⁾.

En nuestro caso, la determinación de los genes de resistencia mediante PCR mostró una correlación entre las pruebas “in vitro” realizadas y la presencia de los genes *tet(M)* y/o *tet(O)*.

Como se observa en la tabla 18, en el caso de los EGA, 21 cepas presentaron el gen *tet(M)* una el gen *tet(O)* y una cepa ambos genes. Esto es similar a lo encontrado en España ⁽³⁾, en donde el 100% de las cepas resistentes de EGA presentaron el gen *tet(M)*. En Dinamarca de 31 cepas resistentes 23 tuvieron el gen *tet(M)*, 1 el gen *tet(O)* y 7 el gen *tet(S)*, lo cual concuerda con la elevada prevalencia del gen *tet(M)* encontrado en nuestro estudio.

Para los EGB, el 100% de las cepas resistentes tuvieron el gen *tet(M)*, lo cual concuerda con el estudio hecho en EU ⁽¹⁷⁾ citado en la tabla 19, en donde todas las cepas resistentes presentaron el gen *tet(M)*, además de que 4 cepas con resistencia intermedia no presentaron ni *tet(M)* ni *tet(O)*. En los casos de Francia ⁽⁴⁴⁾ y España ⁽³⁾ se encontraron ambos genes presentes en los estudios.

Nuestros resultados para los grupos C y G son diferentes a lo encontrado en Argentina ⁽²⁵⁾, presentado en las tablas 20 y 21, ya que todas las cepas que se estudiaron tuvieron el gen *tet(M)* y en nuestro caso tanto el gen *tet(M)* como el gen *tet(O)* se relacionaron con la resistencia a tetraciclina

Así, el gen *tet(M)* se encontró en las cepas resistentes de los 4 grupos de EBH, mientras que *tet(O)* no se identificó en cepas resistentes del B. El gen *tet(M)* estuvo presente en 65 (73.86%) de las cepas resistentes, *tet(O)* en 7 (7.95%) cepas y ambos genes en 3 (3.4%) cepas.

Se encontraron 13 (14.8%) cepas resistentes “in vitro” que no amplificaron para alguno de los genes de resistencia probados. Hay dos motivos por lo que esto pudo haber ocurrido; 1)

La presencia de un gen de resistencia nuevo o que no haya sido probado, 2) Daño en la integridad del DNA utilizado como templado, 3) alguna mutación en el ARN ribosomal, que impida la acción de la tetraciclina. Al respecto, en España ⁽³⁾ se reportó la presencia de 5 cepas en las que no encontraron la presencia de algún gen, ellos buscaron la presencia de 4 genes; *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(K)* y *tet(L)*. Además, en Paris ⁽¹⁰⁾ en el 5.6% de las cepas no se pudo detectar la presencia de ninguno de los genes *tet(M)*, *tet(O)*, *tetB(P)*, *tet(Q)* o *tet(S)*. Se determinó la presencia del gen *tet(T)* en 5 cepas y de las 4 restantes no se pudo identificar el mecanismo responsable de la resistencia.

Para comprobar la integridad del ADN de esas 13 cepas, y por lo tanto, verificar que se pudiera amplificar alguno de los genes probados, se realizó un PCR para amplificar el gen constitutivo de la subunidad ribosomal 16S, el cual resultó positivo para todos los casos. Con ello se eliminó la posibilidad de que el ADN estuviera dañado. Por lo que queda abierta la puerta para investigar posteriormente el mecanismo de resistencia a tetraciclina que presentan esos 13 aislamientos de EBH, siendo la mayoría (9 aislamientos) pertenecientes a *Streptococcus* del grupo G.

En la prueba por PCR realizada a las 750 cepas, se encontraron 9 cepas que fueron positivas en la prueba de PCR, ocho del grupo A y una del grupo C, pero sensibles a tetraciclina, en todos los casos el gen detectado fue *tet(M)*. Algo similar fue encontrado por Zeng⁽⁶²⁾ en donde 4 cepas con el gen *tet(M)* fueron susceptibles a tetraciclina. Esta posible falta de actividad del gen *tet(M)* podría deberse a que alguno de los mecanismos reguladores en la expresión del gen de resistencia estuviera dañado o no funcionara correctamente. Otra posibilidad es que el gen tuviera alguna mutación que disminuyera o eliminara su actividad. Para probar esto último se realizó la secuenciación de los

amplificados por PCR de dichas cepas. El análisis de las secuencias mostró que el amplificado efectivamente era *tet(M)*, y no mostró diferencia alguna en el segmento secuenciado con el gen *tet(M)* de una cepa resistente a tetraciclina, por lo que no se pudo determinar si la sensibilidad de las cepas se debía a una mutación del gen *tet(M)*. Dentro del análisis de las secuencias obtenidas, cabe destacar que no se analizaron los genes completos, sino que, como se muestra en la tabla 14, únicamente se estudió una parte de los genes, o sea, 34.1% del gen *tet(M)* y 24.% del gen *tet(O)*.

En un trabajo hecho en Australasia ⁽¹⁸⁾ se determinó que la resistencia a tetraciclina puede llegar a ser inducible, dicha inducción fue lograda cultivando la cepa a probar con concentraciones subinhibitorias de doxiciclina, minociclina o tetraciclina. Esta inducibilidad fue observada en cepas sensibles en la prueba “in vitro”, pero portadoras del gen *tet(M)*, puede sugerir que las cepas con el gen *tet(M)* pudieran ser consideradas como resistentes a todas las tetraciclinas utilizando la inducción, sin embargo, la CLSI no considera a la inducibilidad para las pruebas de susceptibilidad a la tetraciclina que se realizan de rutina.

Asociación de la resistencia a tetraciclina con los tipos M

La relación del tipo M con la resistencia a tetraciclina nos puede indicar la presencia de un tipo M mayoritariamente responsable de la resistencia, o si la diseminación de la resistencia a tetraciclina no depende de la abundancia y diseminación de algún tipo M en particular. Lo que encontramos fue que, como se muestra en la tabla 23, se analizaron cepas provenientes de 28 diferentes tipos M, pero en ninguno de los 5 tipos M predominantes (M12, M1, M75, M6, M2 y M3) de EGA se encontró la presencia de resistencia a tetraciclina, por lo que la distribución de la resistencia fue entre las cepas no predominantes de los EGA. Así, aunque 12 diferentes tipos M estuvieron involucrados en la resistencia a tetraciclina, éstos representaron a solo el 15% de las cepas de grupo A estudiadas

En un estudio anterior con varias cepas de EGA de este lote, se encontró una fuerte asociación entre el tipo M75 y la resistencia a Eritromicina, ya que el 90% de las cepas resistentes pertenecen a este serotipo.

En Irán⁽²⁴⁾ se detectó la presencia de 20 diferentes tipos M entre cepas de EGA resistentes a tetraciclina, concluyendo así, que el alto grado de resistencia (42%) fue debida a la diseminación multiclonal de la resistencia dentro de la población de *Streptococos*, y no por la diseminación epidémica de alguna clona en particular. Sin embargo, en nuestro caso, la baja prevalencia de resistencia a tetraciclina en EGA se puede deber a la baja diseminación de los serotipos M en los que las cepas resistentes se han detectado.

En Etiopia ⁽⁶⁰⁾ se encontró que entre las cepas resistentes a tetraciclina, 59 diferentes tipos M fueron responsables, concluyéndose que la adquisición de resistencia es independiente del tipo *emm*, por ello, se evidenció que la resistencia a tetraciclina es de origen policlonal.

Sin embargo en Portugal ⁽⁵⁶⁾ el tipo M22 se relacionó con la resistencia a tetraciclina, ya que, el 89.7% (113/126) de las cepas resistentes a tetraciclina, eran M22.

Para el caso del grupo G, como se muestra en la tabla 24, se detectaron 14 diferentes tipos *emm*, la resistencia a tetraciclina estuvo presente en 10 diferentes tipos *emm*, siendo el tipo *stg485* el que destacó, presentándose en el 24.15 % de las cepas resistentes.

La mayoría de las cepas de EGG evaluadas fueron no tipificables por *emm*, no obstante se observa que en el grupo de cepas tipificables la presencia de cepas resistentes es del 70% (17/24) a diferencia del grupo de cepas no tipificables donde encontramos resistencia a tetraciclina en el 40.8% de ellas (12/34). Dentro de las cepas tipificables sobresalta el tipo *stg485* con 7 aislamientos, todos resistentes a tetraciclina.

La presencia de genes de resistencia en EGG con proteína M puede reforzar la observación de que este tipo de *Streptococo* es más virulento cuando tiene proteína M.

Análisis de la resistencia a tetraciclina por hospitales

Los porcentajes de resistencia a tetraciclina analizados por hospital nos muestran que éstos son diversos, en general los hospitales que presentaron los mayores porcentajes de resistencia fueron el H. 20 de Noviembre, el InDRE, INP y el H. Gonzalo Castañeda Tabla 25). El alto porcentaje de resistencia en el H. 20 de Noviembre se debe a que la mayoría de

nuestras cepas provenientes de este hospital son del grupo B, el cual es el que presenta el mayor porcentaje de resistencia (tabla 27). Para los grupos B, C y G la resistencia a tetraciclina observada en el H. Gonzalo Castañeda es elevada siendo el hospital que apporto el mayor número de aislamientos.

En un estudio previo, éste hospital también fue el que presentó el mayor porcentaje de resistencia a Eritromicina en cepas del grupo A.

Es importante continuar con una vigilancia sobre la resistencia que se observa en los diferentes hospitales para ver que tendencias se tienen en el futuro.

Aún cuando la tetraciclina se ha vuelto obsoleta como antibiótico clínicamente útil, la transferencia de elementos, que confieren resistencia a tetraciclina continuará siendo causa de monitoreo debido a su amplia distribución en varios géneros bacterianos, ya que adicionalmente, esos elementos pueden acarrear genes de resistencia a otros antibióticos como eritromicina o kanamicina. En nuestro caso para los EBH no se encontró alguna relación entre las cepas que presentan resistencia a tetraciclina y eritromicina

Es importante mantener una vigilancia epidemiológica de la resistencia a tetraciclina, el tipo de gen involucrado en los diferentes grupos de EBH, y en especial, monitorear la distribución de la resistencia entre diferentes serotipos M en el caso de EGA y EGG.

12. CONCLUSIONES

- El porcentaje de resistencia a tetraciclina en las cepas de EBH fue del 11.7%.
- El porcentaje de resistencia a tetraciclina varia de acuerdo al grupo de Estreptococo involucrado, siendo del 3.7% para el grupo A, 88.5% para el grupo B, 46.2% en el grupo C y 50% en el grupo G.
- El gen de resistencia *tet(M)* se detectó en un 73.86 % de las cepas resistentes y el gen *tet(O)* se detectó en un 7.95% de las cepas resistentes.
- Se encontraron 13 cepas (14.77%) resistentes a tetraciclina pero sin la presencia de los genes *tet(M)* o *tet(O)*.
- En las cepas resistentes del grupo B solo se detectó la presencia del gen *tet(M)*.
- Se detectaron 9 cepas de Estreptococo sensibles a tetraciclina que tienen el gen *tet(M)*.
- Las cepas resistentes del grupo A, se distribuyeron homogéneamente en 12 diferentes tipos *emm*.
- El bajo número de cepas resistentes a tetraciclina en el grupo A puede explicarse debido a que en los serotipos M con mayor prevalencia no se encuentran cepas resistentes, lo que pudiera estar restringiendo su diseminación.
- En EGG la resistencia se encuentra distribuida homogéneamente entre 10 diferentes tipos *emm*.
- En las cepas de EGG las cepas que presentan un genotipo *emm* muestran una elevada resistencia a tetraciclina (70%), comparada con las cepas no tipificables por *emm* (40%).

- La presencia del gen *tet(O)* no se ha reportado en *Streptococcus* del grupo C y G.
- El 56.81% de las cepas resistentes fueron de origen faríngeo.
- El H. 20 de Noviembre, el H. Gonzalo Castañeda y el H. General fueron los que presentaron una mayor incidencia de resistencia a tetraciclina.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. American Academy of Microbiology. Antimicrobial Resistance (An ecological Perspective). American Society of Microbiology **2003**:5-13
2. Balter S., Schuchat A., Whitney C.G. Epidemiology of Group B Streptococcal infections. p. 154-162. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). Gram-Positive Pathogens. **2000**. ASM Press, Washington, D.C.
3. Betriu C., Culebras E., Rodriguez-Avial I., Gomez M., Sanchez B.A., Picazo J.J. In vitro activities of tigecycline against erythromycin-resistant Streptococcus pyogenes and Streptococcus agalactiae: mechanisms of macrolide and tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(1):323-5.
4. Bisno A.L., Oster H. R. Group C and Group G Streptococcal infections: Epidemiologic and clinical aspects. p. 184-190. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). Gram-Positive Pathogens. **2000**. AMS Press, Washington, D.C.
5. Burdett V. Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *J Bacteriol.* **1996**;178(11):3246-51.
6. Caparon M. Genetics of Group A Streptococci. p. 51-65. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). Gram-Positive Pathogens. **2000**. AMS Press, Washington, D.C.
7. Chhatwal G. S., Talay S.R. Pathogenicity factors in Group C and G Streptococci. p. 177-183. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). Gram-Positive Pathogens. **2000**. AMS Press, Washington, D.C.
8. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2001**;65:232-60.
9. Clearly P.P., Cue D., Dombeck P.E. Intracellular invasion by *Streptococcus pyogenes*: Invasins, host receptors, and relevance to human disease. p. 27-33. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). Gram-Positive Pathogens. **2000**. AMS Press, Washington, D.C.
10. Clermont D., Chesneau O., de Cespedes G., Horaud T. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of

- tet*(T) isolated from Streptococcus pyogenes A498. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**;41:112-6.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. **2005**; 25(1) 66-68 y 130- 2.
 12. Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., Taylor D.E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**;47:3675–81.
 13. de Azavedo J.C., McGavin M., Duncan C., Low D.E., McGeer A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B Streptococcus isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;45(12):3504-8.
 14. de Melo M.C., Sa Figueiredo A.M., Ferreira-Carvalho B.T. Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of Streptococcus pyogenes isolated in 1978-1997 in different Brazilian cities. *J Med Microbiol.* **2003**;52(Pt 3):251-8.
 15. d'Oliveira R.E., Barros R.R., Mendonca C.R., Teixeira L.M., Castro A.C. 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.
 16. Del Grosso M., Scotto d'Abusco A., Iannelli F., Pozzi G., Pantosti A. Tn2009, a Tn916-like element containing *mef*(E) in Streptococcus pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**;48:2037-42.
 17. Dogan B., Schukken Y.H., Santisteban C., Boor K.J. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among Streptococcus agalactiae isolates from bovine and human hosts. *J Clin Microbiol.* **2005**;43(12):5899-906.
 18. Doherty N., Trzcinski K., Pickerill P., Zawadzki P., Dowson C.G. Genetic diversity of the *tet*(M) gene in tetracycline-resistant clonal lineages of Streptococcus pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**;44:2979-84.
 19. Duarte R.S., Bellei B.C., Miranda O.P., Brito M.A., Teixeira L.M. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B Streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49(1):97-103.

20. Figueira-Coelho J., Ramirez M., Salgado M.J., Melo-Cristino J. Streptococcus agalactiae in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and clonal analysis of macrolide-resistant isolates. *Microb Drug Resist.* **2004**;10(1):31-6.
21. Grohmann E., Muth G., Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2003**;67:277-301.
22. Hammerum A.M., Nielsen H.U., Agerso Y., Ekelund K., Frimodt-Moller N. Detection of *tet(M)*, *tet(O)* and *tet(S)* in tetracycline/minocycline-resistant Streptococcus pyogenes bacteraemia isolates. *J Antimicrob Chemother.* **2004**;53(1):118-9.
23. Ho P.L., Johnson D.R., Yue A.W., Tsang D.N., Que T.L., Beall B., Kaplan E.L. Epidemiologic analysis of invasive and noninvasive group a streptococcal isolates in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* **2003**;41(3):937-42.
24. Jasir A., Tanna A., Noorani A., Mirsalehian A., Efstratiou A., Schalen C. High rate of tetracycline resistance in Streptococcus pyogenes in Iran: an epidemiological study. *J Clin Microbiol.* **2000**;38(6):2103-7.
25. JERIC P.E., Lopardo H., Vidal P., Arduino S., Fernandez A., Orman B.E., Sordelli D.O., Centron D. Multicenter study on spreading of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant Streptococcus group G and C isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46(1):239-41.
26. Kashiwagi Y. [A 23-year longitudinal study on the antibiotic sensitivities of group A Streptococci from the scarlet fever patients--1956-1978]1: *Kansenshogaku Zasshi.* **1991**;65(7):820-32.
27. Kasper D.L., Madoff L.C., Paoletti L.C. Surface structures of Group B Streptococcus important in human immunity. p. 137-153. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). Gram-Positive Pathogens. **2000**. AMS Press, Washington, D.C.
28. Levy S.B., McMurry L.M., Barbosa T.M., Burdett V., Courvalin P., Hillen W., Roberts M.C., Rood J.I., Taylor D.E. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**;43(6):1523-4.

29. Levy S.B., McMurry L.M., Burdett V., Courvalin P., Hillen W., Roberts M.C., Taylor D.E. Nomenclature for tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* **1989**;33(8):1373-4.
30. Levy S.B., McMurry L.M. Tetracycline resistance in Gram-positive bacteria. p. 660-677. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). *Gram-Positive Pathogens.* **2000.** AMS Press, Washington, D.C.
31. Livermore D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis.* **2003**.15;36(Suppl 1):S11-23.
32. Lopardo H.A., Vidal P., Sparo M., Jeric P., Centron D., Facklam R.R., Paganini H., Pagniez N.G., Lovgren M., Beall B. Six-month multicenter study on invasive infections due to Streptococcus pyogenes and Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* in Argentina. *J Clin Microbiol.* **2005**;43(2):802-7.
33. Malke H. Genetics and pathogenicity factors of Group C and G Streptococci. p. 163-176. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). *Gram-Positive Pathogens.* **2000.** AMS Press, Washington, D.C.
34. Marra D., Pethel B., Churchward G.G., Scott J.R. The frequency of conjugative transposition of Tn916 is not determined by the frequency of excision. *J Bacteriol.* **1999**;181(17):5414-8.
35. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* **2006**;4(8):608-20.
36. Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. Medical microbiology. 4th ed. **2002.** Mosby. p. 185-194.
37. Mosca A., Russo F., Miragliotta G. In vitro antimicrobial activity of benzalkonium chloride against clinical isolates of Streptococcus agalactiae. *J Antimicrob Chemother.* **2006**;57(3):566-8.
38. Moyo S.R., Maeland J.A., Munemo E.S. Susceptibility of Zimbabwean Streptococcus agalactiae (group B Streptococcus; GBS) isolates to four different antibiotics. *Cent Afr J Med.* **2001**;47(9-10):226-9.
39. Nizet V., Rubens C.E. Pathogenic mechanism and virulence factors of Group B Streptococci. p. 125-136. Fischetti V.A., Novick R.P., Ferreti J.J., Portnoy D.A., Rood J. I. (ed). *Gram-Positive Pathogens.* **2000.** AMS Press, Washington, D.C.

40. Normark B.H., Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med.* **2002**;252(2):91-106.
41. Olsvik B., Olsen I., Tenover F.C. Detection of *tet(M)* and *tet(O)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* **1995**;10(2):87-92.
42. Perea Mejía L.M. *Streptococcus*. p. 75-85. En Tay J., Gutierrez M., López R., Manjarrez M.E. Microbiología y parasitología médicas. 3^{ra} Ed. **2003**. Méndez Editores. México
43. 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. Group A Streptococci from carriage and disease in Portugal: evolution of antimicrobial resistance and T antigenic types during 2000-2002. *Microb Drug Resist.* **2005**;11(4):360-70.
44. Poyart C., Jardy L., Quesne G., Berche P., Trieu-Cuot P. Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**;47(2):794-7.
45. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (ed). Microbiología. 4^{ta} Ed. **1999**. McGraw-Hill. p. 699-719.
46. Quintiliani R., Sahm D.F., Courvalin P. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. p. 1505-25. In Murray P.R., Baron E.J. Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. (ed). Manual of clinical microbiology 7th Ed. **1999**. AMS Press, Washington , D.C.
47. Rice L.B. Bacterial monopolists: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in Gram-positive bacteria. *Clin Infect Dis.* **2000**;31(3):762-9.
48. Rice L.B. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* **1998**;42(8):1871-7.
49. Roberts M.C., Pang Y., Riley D.E., Hillier S.L., Berger R.C., Krieger J.N. Detection of Tet M and Tet O tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* **1993**;7(5):387-93.
50. Roberts M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev.* **1996**;19(1):1-24.

62. Zeng X., Kong F., Wang H., Darbar A., Gilbert G.L. Simultaneous detection of nine antibiotic resistance-related genes in Streptococcus agalactiae using multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**;50(1):204-9.
63. Zhongtang Y., Frederick C. M., Glenn H., Thomas W., Mark M. Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of Genes Encoding Tetracycline Resistance. *Appl Environ Microbiol.* **2005**;71(11): 6926–6933.