



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

Identificación de genes asociados a la resistencia a eritromicina y tetraciclina en aislamientos clínicos de *Streptococcus agalactiae* y su asociación con el serotipo capsular.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Karla Zavala Maldonado



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



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: **Profesor: RAÚL GARZA VELASCO**

VOCAL: **Profesor: HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA**

SECRETARIO: **Profesor: LUIS MANUEL PEREA MEJÍA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: GONZALO CASTILLO ROJAS**

2° SUPLENTE: **Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM CON EL FINANCIAMIENTO DE LA DGAPA-UNAM. PROYECTOS PAPIIT IN215608 Y IN221511

ASESOR

SUPERVISOR

Luis Manuel Perea Mejía

Alma Edna Inzunza Montiel

SUSTENTANTE

Karla Zavala Maldonado

Agradecimientos

Esta tesis está dedicada a mis padres, mis hermanos y mi abuelita por su tiempo, cariño y apoyo incondicional que siempre he recibido de ellos en todo momento durante toda mi carrera.

A mi tía Mela y mi tío Jorge, porque siempre se han interesado en mí y mis logros y siempre me han brindado su apoyo.

A Francisco Medina, por su ayuda, comprensión, paciencia, apoyo y cariño durante tantos años y en especial durante la realización de esta tesis. Por estar conmigo e impulsarme siempre a ir más adelante y alcanzar mis metas. Sin ti esto no habría sido posible.

A mis amigos de la facultad Alan y Araceli con quienes siempre pude contar y quienes me ayudaron en muchas ocasiones.

A Luis Manuel Perea y Alma Inzunza por su paciencia, tiempo y apoyo en la realización de este trabajo.

Karla Zavala Maldonado

Contenido

1. RESUMEN.....	3
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
3. LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
4. ANTECEDENTES	12
4.1 Clasificación y características generales de los estreptococos	12
4.2 Generalidades sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> (EGB)	14
4.3 Factores de virulencia de <i>Streptococcus agalactiae</i>	16
4.4 Diagnóstico y patogénesis.....	24
4.5 Generalidades sobre antibióticos.....	27
4.6 Resistencia a antibióticos	29
4.7 Pruebas de susceptibilidad.....	31
4.8 Tetraciclina	32
4.8.1 Resistencia a tetraciclina	33
4.9 Macrólidos.....	34
4.9.1 Eritromicina.....	35
4.9.2 Resistencia a eritromicina	36
4.10 Importancia clínica de la resistencia a tetraciclina en <i>Streptococcus agalactiae</i>	38
4.11 Importancia clínica de la resistencia a eritromicina en <i>Streptococcus agalactiae</i>	39
4.12 Estudios sobre <i>S. agalactiae</i> hechos previamente en México.....	40
5. HIPÓTESIS.....	41
6. OBJETIVO	41
6.1. Objetivos particulares.....	41
7. MATERIAL Y MÉTODOS	42
7.1 Obtención y manejo inicial de las cepas estudiadas.....	42
7.2 Pruebas de susceptibilidad a eritromicina [15 µg] y a tetraciclina [30 µg].....	42
7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	44

7.4 Proceso de selección de cepas.....	51
8. RESULTADOS.....	52
8.1 Estandarización de la PCR.....	52
8.2 Estudios con cepas resistentes de <i>S.agalactiae</i>	52
8.3 Resultados del grupo I Cepas resistentes solo a eritromicina	53
8.4 Resultados del grupo II Cepas resistentes solo a tetraciclina.	58
8.5 Resultados del grupo III cepas con resistencia dual.....	62
8.6 Resultados de serotipos encontrados con base en el origen de la muestra.....	69
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	71
9.1 Análisis de pruebas de susceptibilidad.....	71
9.2 Análisis de resultados del grupo I. Cepas resistentes solo a eritromicina	71
9.3 Análisis de resultados del grupo II. Cepas resistentes solo a tetraciclina	73
9.4 Análisis de resultados del grupo III. Cepas con resistencia dual.....	73
9.5 Análisis del origen de procedencia de la muestra y su asociación con los serotipos capsulares.....	74
10. CONCLUSIONES.....	76
11. REFERENCIAS	77

1. RESUMEN

La especie *Streptococcus agalactiae* (EGB), un estreptococo β -hemolítico, es el principal causante de sepsis neonatal y se subdivide en 9 serotipos diferentes, de acuerdo a la composición de su cápsula de polisacáridos, se ha observado que existe una mayor prevalencia de ciertos serotipos para determinadas zonas geográficas.

El antibiótico de primera elección para el tratamiento de infecciones por EGB es la penicilina; sin embargo, para personas que presentan alergias a ésta, la segunda opción son los macrólidos. El incremento del uso de antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas ha conducido a un aumento de la resistencia a dichos antibióticos en algunos patógenos.

Estudios efectuados en diferentes países han demostrado que existe una tendencia creciente de cepas de *Streptococcus agalactiae* resistentes a macrólidos, por lo que es importante llevar a cabo un monitoreo de este tipo de cambios.

Los EGBs resistentes a macrólidos suelen presentar alguno de los genes normalmente asociados a la resistencia a macrólidos, tales como el *ermA*, *ermB* y *mefA*.

Los cocos Gram-positivos, como los EGB, suelen ser resistentes a antibióticos como la tetraciclina. Al observarse en algunos países variaciones

en la resistencia a la tetraciclina en estreptococos de grupo A, se llevaron a cabo estudios similares en EGB.

Los genes asociados comúnmente a resistencia a la tetraciclina en estreptococos, son *tet(O)* y *tet(M)*; en algunos casos pueden presentarse ambos.

El objetivo del presente trabajo fue conocer el comportamiento de la resistencia de *Streptococcus agalactiae* a tetraciclina y eritromicina en cepas aisladas en México y compararlos con los obtenidos en otros países.

Así mismo se determinó si existía una relación entre el serotipo capsular y la presencia de uno o más genes de resistencia a eritromicina o tetraciclina.

2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.- Estructura química de los serotipos capsulares Ia y Ib de <i>S.agalactiae</i>	17
Figura 2.- Estructura química del serotipo capsular II de <i>S.agalactiae</i>	18
Figura 3.- Estructura química del serotipo capsular III de <i>S.agalactiae</i>	19
Figura 4.- Estructura química del serotipo capsular IV de <i>S.agalactiae</i>	20
Figura 5.- Estructura química del serotipo capsular V de <i>S.agalactiae</i>	21
Figura 6.- Estructura química del serotipo capsular VI de <i>S.agalactiae</i>	22
Figura 7.- Estructura química del serotipo capsular VII de <i>S.agalactiae</i>	22
Figura 8.- Estructura química del serotipo capsular VIII de <i>S.agalactiae</i>	23
Figura 9.- Fórmula estructural de la tetraciclina	32
Figura 10.- Fórmula estructural de la eritromicina	35
Figura 11.- Gráfico de porcentaje de genes asociados a la resistencia a eritromicina en cepas mono resistentes	53

Figura 12.- Serotipos capsulares de las cepas que presentaron el gen <i>ermB</i>	54
Figura 13.- Serotipos capsulares de las cepas que presentaron el gen <i>mefA</i>	55
Figura 14.- Serotipos capsulares de las cepas cuyo gen de resistencia a eritromicina fue diferente de los 3 genes trabajados en el laboratorio	55
Figura 15.- Fotografía del gel de electroforesis donde se muestran los amplificados de los genes <i>ermB</i> , <i>ermA</i> y <i>mefA</i>	57
Figura 16.- Genes asociados con la resistencia a Tetraciclina	58
Figura 17.- Serotipos capsulares de cepas con el gen <i>tetM</i>	59
Figura 18.- Serotipos capsulares de cepas con los genes <i>tetM/tetO</i>	59
Figura 19.- Serotipos capsulares de cepas con el gen <i>tetO</i>	60
Figura 20.- Fotografía del gel de electroforesis donde se muestran los amplificados de los genes <i>tetM</i> y <i>tetO</i>	61
Figura 21.- Genes de resistencia en cepas con resistencia dual	63
Figura 22.- Serotipos capsulares de cepas con resistencia dual, que presentaron el gen <i>ermB</i>	64
Figura 23.- Serotipos capsulares de cepas con resistencia dual que presentaron el gen <i>ermA</i>	65

Figura 24.- Serotipos capsulares de cepas con resistencia dual que presentaron el gen <i>mefA</i>	66
Figura 25.- Serotipos capsulares de cepas con resistencia dual cuyo gen asociado con la resistencia a eritromicina no pudo determinarse en el laboratorio.....	67
Figura 26.- Comparación de los serotipos capsulares encontrados y la distribución de genes de resistencia a eritromicina y tetraciclina.....	68
Figura 27.- Fotografía del gel de electroforesis donde se muestran los amplificados de todos los serotipos capsulares.....	69
Figura 28.- Gráfico de distribución de serotipos capsulares de acuerdo al origen de la muestra.....	70
Tabla 1.- Aminoglúcido del hidrato de carbono específico de los principales grupos de Lancefield.....	13
Tabla 2.- Enfermedades causadas por EGB.....	15
Tabla 3.- Miembros de la familia de proteínas Alp encontradas en cepas de <i>S. agalactiae</i> de diferentes serotipos.....	24
Tabla 4.- Factores de virulencia del estreptococo de grupo B implicados en infecciones neonatales.....	26
Tabla 5.- Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	31
Tabla 6.- Clasificación de Macrólidos.....	34

Tabla 7.- Porcentaje de resistencia a tetraciclina de EGB reportada en diferentes países.....	38
Tabla 8.- Porcentaje de resistencia a eritromicina reportada para EGB en diversos países.....	39
Tabla 9.- Criterios para la interpretación del diámetro de inhibición para eritromicina y tetraciclina para estreptococos hemolíticos.....	43
Tabla 10.- Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR para determinar el gen asociado a la resistencia a eritromicina.....	45
Tabla 11.- Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR para determinar el gen asociado a la resistencia a tetraciclina.....	46
Tabla 12.- Controles positivos utilizados para la determinación de genes asociados a la resistencia a los antibióticos estudiados.	46
Tabla 13.- Controles positivos utilizados para determinar los serotipos capsulares de las cepas estudiadas.....	47
Tabla 14.- Mezcla de reacción para amplificar <i>mefA</i> y <i>ermB</i> . Vol. Final = 30 μ L.....	48
Tabla 15.- Mezcla de reacción para amplificar <i>ermA</i> . Vol. Final = 30 μ L.....	48
Tabla 16.- Mezcla de reacción para amplificar <i>tetM</i> . Vol.Final = 50 μ L	48

Tabla 17.- Mezcla de reacción para amplificar <i>tetO</i> .	
Vol. Final = 50 μ L	48
Tabla 18.- Mezcla de reacción para amplificar serotipos Ia y Ib .	
Vol. Final = 30 μ L	49
Tabla 19.- Mezcla de reacción para amplificar serotipo II .	
Vol. Final = 30 μ L	49
Tabla 20.- Mezcla de reacción para amplificar serotipos III y V .	
Vol. Final = 30 μ L	49
Tabla 21.- Tamaño de los amplificadores de cada control para los diferentes genes de resistencia	51
Tabla 22.- Porcentaje de cepas pertenecientes a cada grupo de estudio	52
Tabla 23.- Porcentaje de serotipos capsulares en cepas resistentes a eritromicina	56
Tabla 24.- Porcentaje de serotipos capsulares determinados en cepas resistentes a tetraciclina	60
Tabla 25.- Porcentaje de genes de resistencia en cepas con resistencia dual	63

3. LISTA DE ABREVIATURAS

ADN (DNA)	Ácido desoxirribonucleico
AMH	Agar Mueller Hinton
BHI	Infusión cerebro corazón
CAMP	Christie Atkins Muench-Peterson
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CPS	Polisacáridos capsulares
dNTP	dinucleótido trifosfato
EGA	Estreptococo de grupo A
EGB (GBS)	Estreptococo de grupo B (Group B Streptococci)
EOD	Early onset disease (Síndrome de inicio temprano)
GS	Gelosa sangre
LOD	Late onset disease (Síndrome de inicio tardío)
MLS	Macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B
iMLS	Resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B
cMLS	Resistencia constitutiva a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPR	Proteínas de protección ribosomal
RNA (ARN)	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia

4. ANTECEDENTES

4.1 Clasificación y características generales de los estreptococos

Los estreptococos son bacterias esféricas Gram positivas y catalasa negativas, que miden 0.6 a 1.0 μm de diámetro, la mayoría son anaerobios facultativos y algunos estrictos, son inmóviles y de manera característica forman pares o cadenas durante su multiplicación. El nombre del género *Streptococcus* proviene del latín "strep"= cadena y "coccus"= cocos. Tienen una amplia distribución en la naturaleza, siendo algunos de ellos miembros de la microbiota normal del tracto gastrointestinal, respiratorio y genital de animales y seres humanos; son colonizadores transitorios de piel y mucosas, e inclusive, algunos están relacionados con enfermedades humanas importantes.

Las especies de mayor importancia médica son *Streptococcus pyogenes* (estreptococo beta-hemolítico de grupo A), *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), *Streptococcus agalactiae* (estreptococo beta-hemolítico de grupo B, EGB) y los estreptococos del grupo "Viridans".⁽³⁶⁾

Tradicionalmente los estreptococos se clasifican con base en su morfología colonial, tipo de hemólisis, reacciones bioquímicas y especificidad serológica de los carbohidratos de su pared celular. Una característica relevante para su clasificación está basada en la reacción de hemólisis que se observa alrededor de las colonias cuando éstas crecen en placas de gelosa sangre. Esta clasificación fue propuesta por Brown en 1919; la destrucción completa de los eritrocitos con el aclaramiento de la gelosa sangre alrededor del crecimiento bacteriano se denomina β -hemólisis. La lisis incompleta de los eritrocitos con reducción de hemoglobina y la formación de un pigmento verde se llama α -hemólisis. Las colonias que no presentan hemólisis son denominadas no hemolíticas. Los Estreptococos de grupo A casi siempre son

β -hemolíticos; los de grupo B pueden ser α, β o no hemolíticos. Muchos neumococos son α -hemolíticos pero causan β -hemólisis en condiciones anaerobias.

Los Estreptococos se agrupan serológicamente con base en las diferencias antigénicas de su carbohidrato C, el cual está contenido en la pared celular de muchos Estreptococos y constituye la base de su agrupamiento en los grupos de Lancefield, ésta clasificación se estableció en 1938 y actualmente se cuenta con 18 grupos. La especificidad serológica del carbohidrato específico de grupo está determinada por un aminoglúcido ⁽³⁶⁾ (Tabla 1).

Tabla 1. Aminoglúcido del hidrato de carbono específico de los principales grupos de Lancefield.

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

Existen reactivos comerciales que permiten realizar la serotipificación de los principales grupos de estreptococos de interés clínico, mediante una reacción de coaglutinación. Para los estreptococos de importancia médica como *S. pyogenes*, la base de la tipificación se encuentra en las diferencias antigénicas que muestra la proteína M en la superficie, mientras que para *S. agalactiae* y *S. pneumoniae*, la tipificación se basa en la composición de la cápsula.

En un proceso de patogenicidad, los estreptococos se deben 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. Los estreptococos interactúan con receptores celulares del huésped y regulan las vías de señalización intracelular para inducir su propia adherencia, colonización y la subsecuente invasión de las células epiteliales.

El diagnóstico de las infecciones estreptocócicas está basado en el cultivo in vitro y por lo general, las muestras provienen de exudados faríngeos, hemocultivos o secreciones purulentas en piel. Para su crecimiento requieren de medios complejos enriquecidos con sangre permitiendo evaluar su capacidad hemolítica; comúnmente las muestras son sembradas en placas base agar BBL con sangre de carnero al 5%, aunque estos microorganismos también se desarrollan en medios selectivos para Gram positivos, como el agar alcohol feniletílico o el agar Columbia adicionado de colistina y ácido nalidíxico. Su desarrollo se ve favorecido en ambientes con 5% de CO₂⁽³⁶⁾.

4.2 Generalidades sobre *Streptococcus agalactiae* (EGB)

Streptococcus agalactiae, del griego "agalactia", que significa querer leche, se describió como causante de la mastitis bovina. El metabolismo que lleva a cabo es fermentativo, con ácido láctico como principal producto final. En caldo con glucosa el pH final es de 4.2-4.8; el ácido es producido a partir de la glucosa, maltosa, sacarosa y trealosa. El glicerol sólo es fermentado en condiciones aeróbicas. La xilosa, arabinosa, rafinosa, inulina, manitol y sorbitol no son fermentados. Todas las cepas hidrolizan el hipurato de sodio, lo que se utiliza como prueba para diferenciarlas de los enterococos.

El factor de CAMP, proteína difusible extracelular de 23.5 kDa producida por los estreptococos del grupo B, se une a la membrana del eritrocito alterada

por la esfingomielinasa C de *Staphylococcus aureus* y esto resulta en una lisis total de los eritrocitos.

Los EGB forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio humano. Se encuentra colonizando la vagina de entre 10 al 30% de las mujeres sanas, la colonización faríngea es baja (5%).

Es el principal agente causal de sepsis neonatal y meningitis, pero puede ocasionar otras enfermedades en adultos, es también causa importante de endometritis y amnionitis en mujeres embarazadas, recientemente ha surgido como causa de enfermedad en adultos con diabetes (Tabla 2).

Tabla 2. Enfermedades causadas por EGB.⁽⁵⁾

Recién nacidos	Adultos	Embarazadas
septicemia	artritis	endometritis
neumonía	endometritis	amnionitis
meningitis	celulitis	pielonefritis

Las enfermedades neonatales por EGB se clasifican de acuerdo con el tiempo que tardan en presentarse y se determinan como:

-Síndrome de inicio temprano (EOD- **E**arly-**O**nset **D**isease). Del nacimiento hasta los 7 días de vida.

-Síndrome de inicio tardío (LOD- **L**ate-**O**nset **D**isease). De los 7 días a las 12 semanas.

Las EOD son las que se presentan con mayor frecuencia y ocurren cuando el neonato es expuesto al EGB a su paso por el canal de parto, aunque se cree

que la mayoría de ellas ocurren cuando el EGB ha logrado atravesar la membrana placentaria y ha llegado al líquido amniótico.⁽³⁶⁾

Las LOD son menos comunes y en algunos casos ocurren como epidemias nosocomiales en las que los recién nacidos se infectan con el EGB a través del personal médico.

Los EGB asociados a enfermedades en humanos son casi siempre encapsulados y pertenecen a uno de los nueve serotipos capsulares reconocidos, los cuales están compuestos por glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico; la especificidad de serotipo está determinada por las diferentes disposiciones de estos cuatro componentes en cada uno de los nueve tipos capsulares. Los antígenos capsulares se designan **Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII.**⁽²¹⁾

4.3 Factores de virulencia de Streptococcus agalactiae

La cápsula es el factor de virulencia más importante de los EGB, la efectiva interferencia en la deposición de C3 por la cápsula de polisacáridos es muy importante para la virulencia del EGB. Situado en el punto de convergencia entre la vía clásica y la vía alterna del complemento, la deposición de C3 en la superficie bacteriana, con la subsecuente escisión y degradación a fragmentos activos para la opsonización (C3a y C3b), es un elemento esencial para la defensa del huésped contra la infección.

Según la disposición de los polisacáridos capsulares (CPS), se determina a cuál de los siguientes serotipos pertenece la bacteria:

Serotipos Ia y Ib

Análisis de resonancia magnética nuclear muestran que los CPS nativos de GBS de serotipos **Ia** y **Ib** son estructuralmente similares, sólo difieren en el enlace entre la galactosa y la N-acetilglucosamina. El CPS del serotipo **Ia**

tiene un enlace β -(1 \rightarrow 4) mientras que el CPS del serotipo **Ib** tiene un enlace β -(1 \rightarrow 3) como se muestra en la figura 1.

Serotipo II

La unidad estructural repetida de CPS del serotipo **II** está compuesta de galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico. Esta unidad estructural repetida tiene en un extremo de la cadena un residuo de ácido siálico y en el otro extremo un residuo de galactosa, los cuales están vinculados por separado a la cadena principal de pentasacárido (Figura 2).

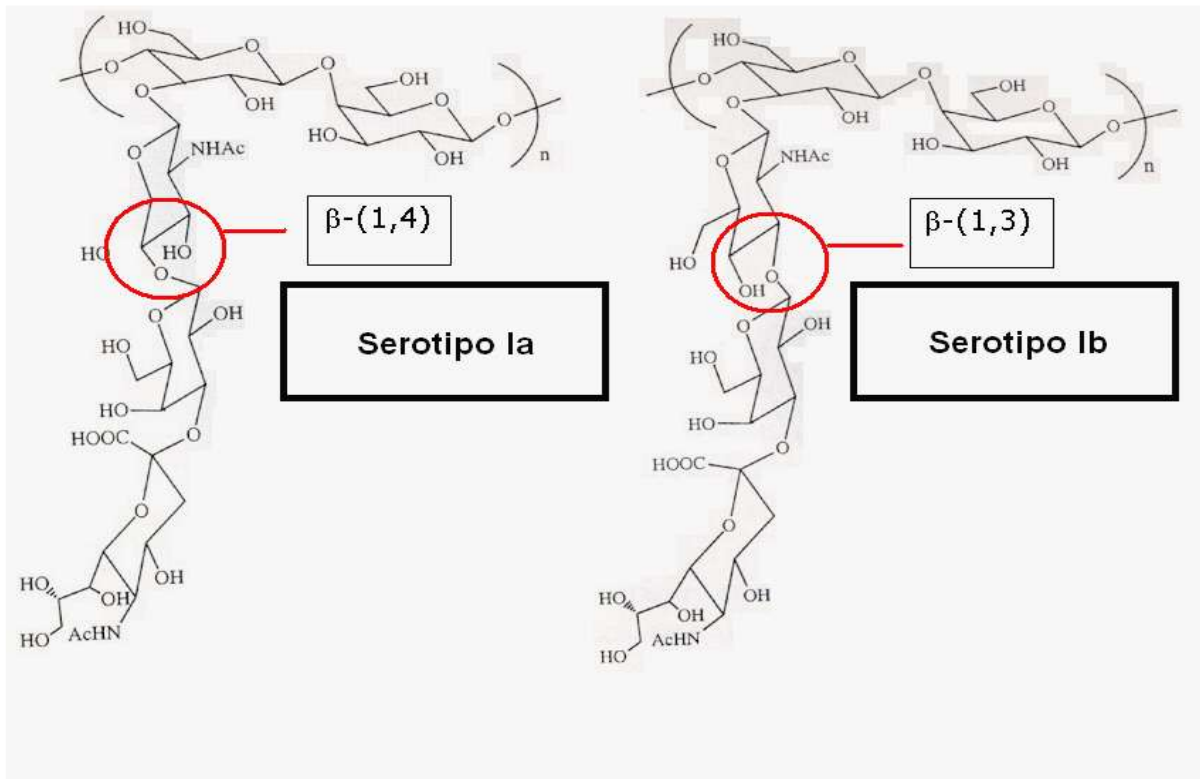


Figura 1. Estructura química de los serotipos capsulares **Ia** y **Ib** de *S.galactiae*.⁽²¹⁾

Serotipo III

Los CPS del serotipo **III** tiene un esqueleto trisacárido principal de glucosa, N-acetilglucosamina y galactosa. Tiene también un disacárido de ácido siálico y galactosa en un lado de la cadena unido mediante un enlace β -(1 \rightarrow 4) con la N-acetilglucosamina (Figura 3).

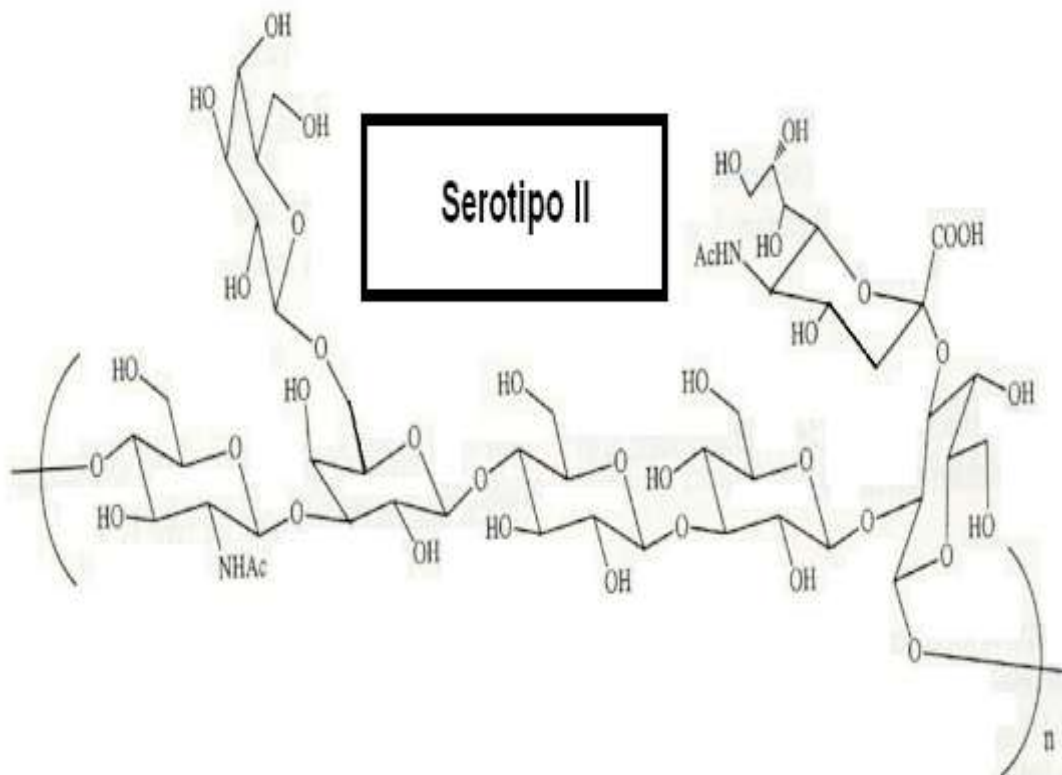
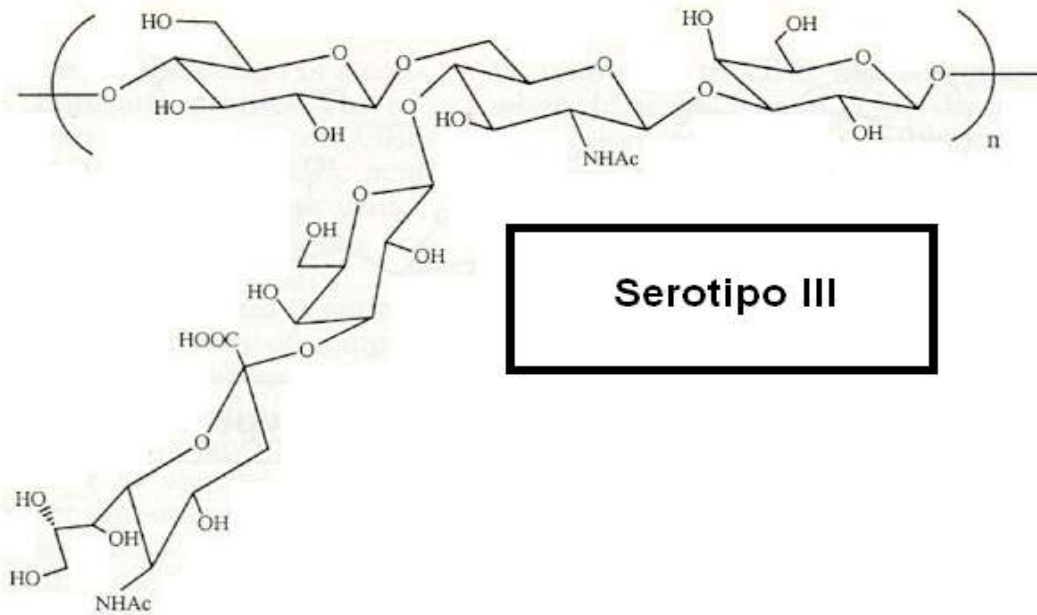


Figura 2. Estructura química del serotipo capsular **II** de *S. agalactiae*.⁽²¹⁾



Serotipo III

Figura 3. Estructura química del serotipo capsular **III** de *S. agalactiae*.⁽²¹⁾.

Serotipo IV

Los CPS tipo **IV** contienen galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico (Figura 4).

Serotipo V

La estructura repetitiva del CPS de tipo **V** está compuesta de 7 azúcares. El esqueleto es un trisacárido de glucosa, galactosa y glucosa y 2 cadenas laterales, una de ellas es de glucosa con una unión β -(1 \rightarrow 3) a la galactosa del esqueleto de 3 azúcares. La otra cadena es un trisacárido de N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico, esta cadena se une mediante un enlace β -(1 \rightarrow 6) a la glucosa (Figura 5).

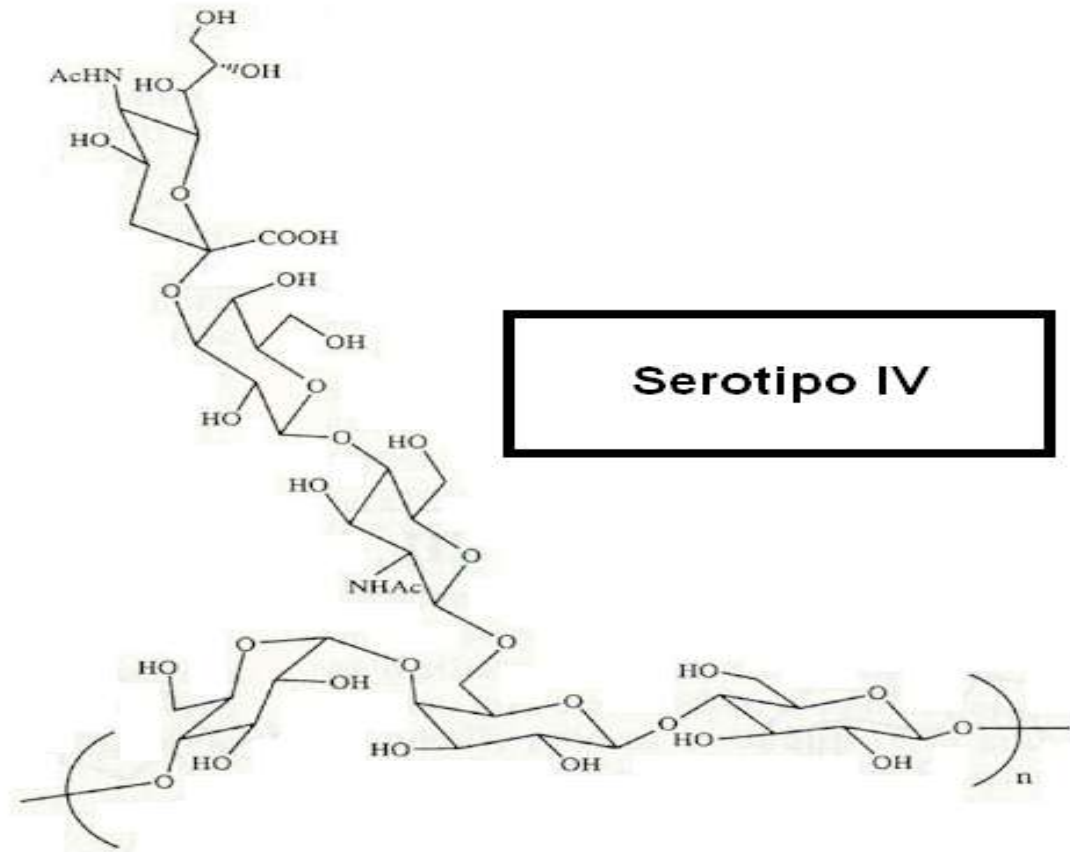


Figura 4. Estructura química del serotipo capsular **IV** de *S. agalactiae*.⁽²¹⁾

Serotipo VI

La unidad repetitiva del CPS de tipo **VI** está compuesta de galactosa, glucosa y ácido siálico, fue el primer serotipo descrito que no contenía N-acetilglucosamina (Figura 6).

Serotipo VII

CPS formado por un esqueleto trisacárido y una cadena lateral trisacárida, formados de galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico (Figura 7).

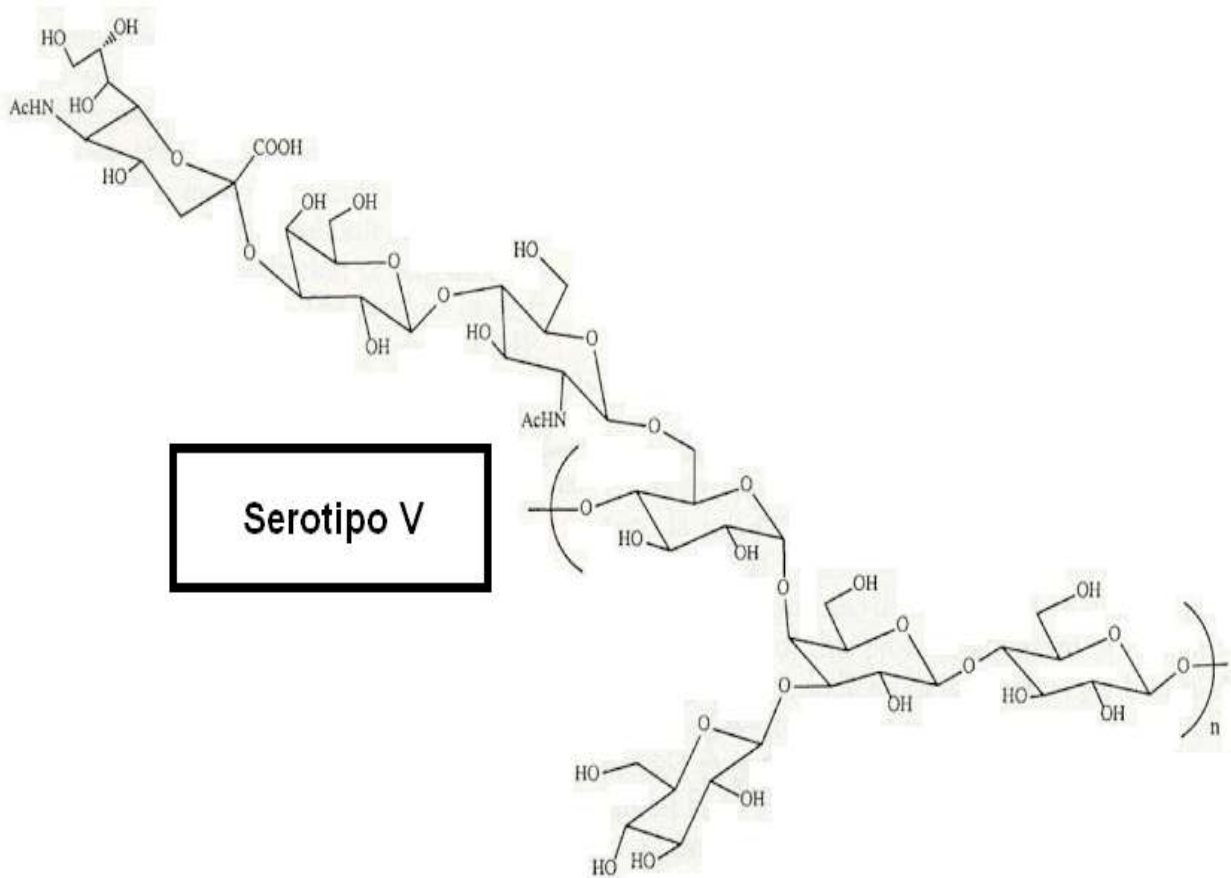


Figura 5. Estructura química del serotipo capsular **V** de *S. agalactiae*.⁽²¹⁾

Serotipo VIII

La estructura de los CPS del tipo **VIII** es la más simple e inusual de todos los serotipos. Al igual que el serotipo **VI**, carece de N-acetilglucosamina, pero a diferencia de todos los serotipos, el CPS de tipo **VIII** está compuesto por un tetrasacárido que contiene ramnosa. La unidad repetitiva contiene glucosa, galactosa, ramnosa y ácido siálico (Figura 8).

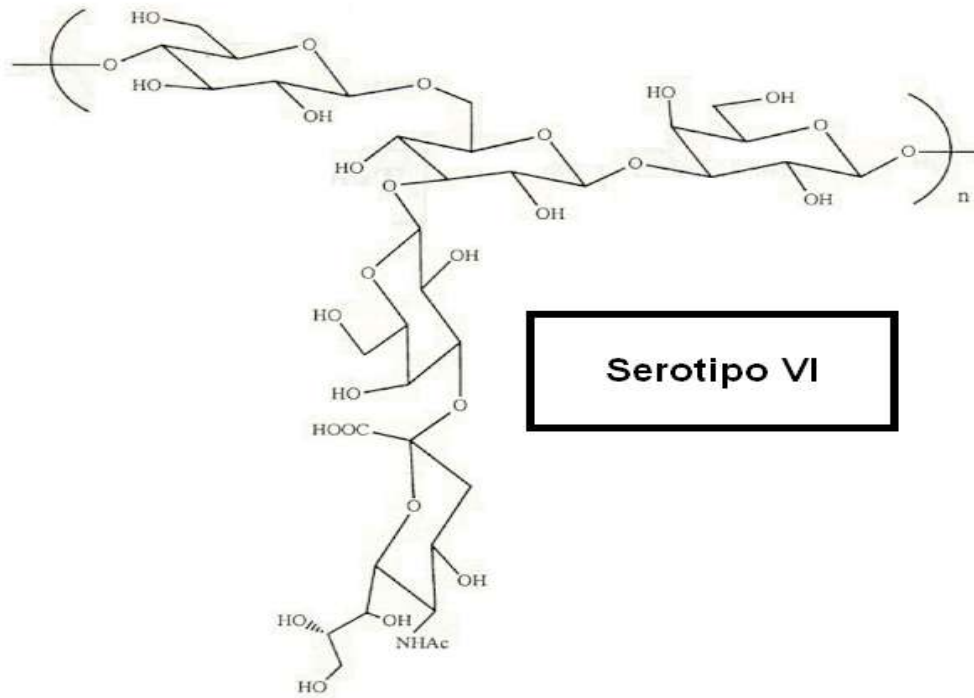


Figura 6. Estructura química del serotipo capsular **VI** de *S. agalactiae*.⁽²¹⁾

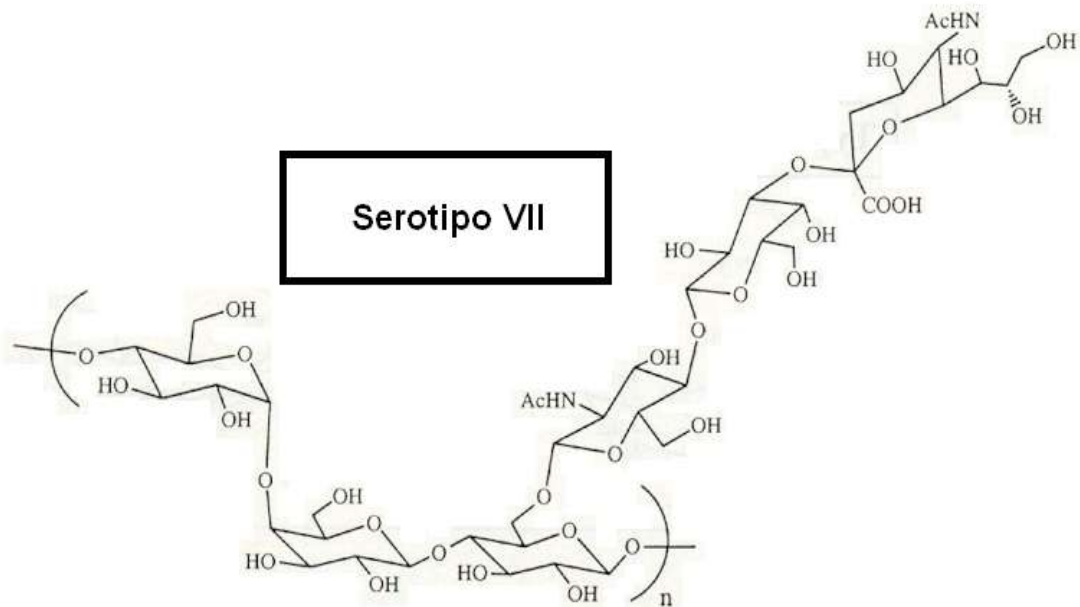


Figura 7. Estructura química del serotipo capsular **VII** de *S. agalactiae*.⁽²¹⁾

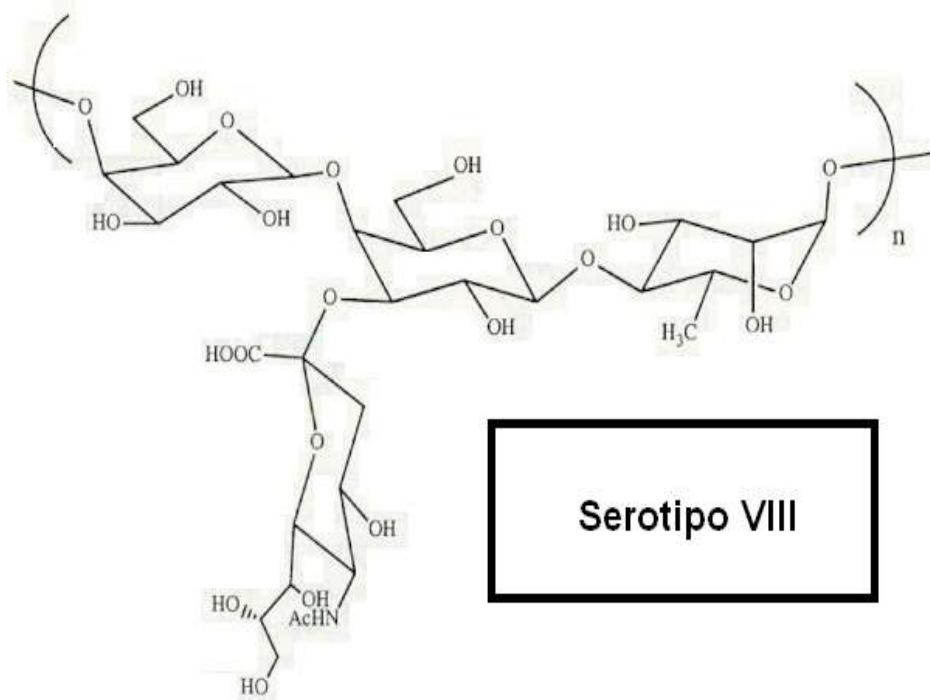


Figura 8. Estructura química del serotipo capsular **VIII** de *S. agalactiae*. ⁽²¹⁾

El EGB produce también la enzima C5a peptidasa que parte e inactiva específicamente a C5. Los EGB también secretan la enzima hialuronidasa la cual degrada el ácido hialurónico que es un componente importante de la matriz extracelular en humanos.

En la actualidad se cree que algunas proteínas de superficie pueden actuar también como factores de virulencia:

- **Antígeno C (Ibc)**, constituido de dos componentes proteicos no relacionados, la proteína α resistente a tripsina y la proteína β sensible a tripsina.
- **Familia de proteínas Alp (α -like protein)**⁽²⁷⁾, cuatro miembros de esta familia han sido identificados como α , Rib, R28 y proteínas Alp2. Se han relacionado estas proteínas con algunos serotipos de *S. agalactiae* (Tabla 3).

Tabla 3. Miembros de la familia de proteínas Alp encontradas en cepas de *S. agalactiae* de diferentes serotipos.⁽²⁷⁾

Serotipo capsular	Proteína de la familia Alp comúnmente expresada
Ia	α
Ib	α
II	α , Rib
III	Rib
V	R28
VIII	R28

- **Proteína LMB.** Es una lipoproteína de superficie que muestra homología con miembros de la familia de proteínas Lra1, que son implicadas en la adhesión y el transporte de metales en bacterias Gram positivas. Fue identificada como una proteína de unión a laminina y juega un papel en la colonización e invasión de epitelios dañados.

4.4 Diagnóstico y patogénesis

El EGB representa la principal causa de sepsis neonatal y meningitis. El diagnóstico se realiza por cultivo del líquido cefalorraquídeo y hemocultivo. En la sepsis neonatal por EGB del 10-20% de los niños mueren, mientras que de un 30-50% de los sobrevivientes desarrollan daños permanentes en cerebro.

El primer paso para la patogénesis por EGB es la colonización asintomática del tracto genital femenino, tienen una máxima adherencia a pH ácido característico de la mucosa vaginal. Los EGB se adhieren a una variedad de tejidos de niños, de adultos y fetales; atraviesan la placenta hasta la

cavidad amniótica y es altamente invasivo para las células coriónicas. Una vez que el fluido amniótico infectado es aspirado, el siguiente sitio de infección en el recién nacido es el pulmón.

Para llegar del espacio alveolar hasta la circulación sistémica, el EGB debe atravesar tres barreras del huésped: el epitelio alveolar, el intersticio pulmonar y el endotelio pulmonar. Para poder causar meningitis, los EGB circulantes en la sangre deben penetrar las células micro vasculares endoteliales del cerebro humano, las cuales constituyen la barrera hematoencefálica.⁽²¹⁾

La infección congénita se lleva a cabo durante el embarazo y el nacimiento, la bacteria puede entrar al líquido amniótico o colonizar al neonato a su paso por el canal de parto, en la mayoría de los casos tanto el niño como la madre no cuentan con anticuerpos contra la bacteria. Los factores de riesgo para la infección perinatal son:

1. Colonización de la vagina por *S. agalactiae*.
2. Premadurez del lactante que aumenta el riesgo de infección.
3. Rompimiento de membranas amnióticas que incrementa la posibilidad de exposición a *S. agalactiae*.

Si falla la función de la barrera epitelial y el sistema inmunológico, el EGB puede establecerse y causar bacteremia en el neonato, desarrollo de sepsis, y en muchos casos la consecuencia es un choque séptico profundo, hipotensión sistémica, hipertensión pulmonar, hipoxemia tisular, acidosis, inestabilidad en la temperatura, coagulación intravascular diseminada, neutropenia y finalmente falla multiorgánica (Tabla 4).

Tabla 4. Factores de virulencia del estreptococo de grupo B implicados en infecciones neonatales.⁽²¹⁾

Patogenicidad	Mecanismos específicos	Factores de virulencia
Adherencia a superficies epiteliales	Colonización de mucosas vaginales Unión a epitelios respiratorios Unión a fibronectina Unión a fibrinógeno Unión a laminina	Ácidos lipoteicoicos, proteína C, C5a peptidasa, proteína FbsA, proteína Lral
Invasión celular de barreras epiteliales y endoteliales	Invasión coriónica Invasión del epitelio pulmonar Invasión del endotelio pulmonar Invasión del endotelio cerebral	Proteína C, C5a peptidasa, β -hemolisina, LTA
Daño directo a los tejidos del huésped	Daño a membranas placentarias Daño a células del epitelio pulmonar Daño a células del endotelio celular Daño y apoptosis de hepatocitos Daño al endotelio de la barrera hematoencefálica	β -hemolisina, proteasas, colagenasas, hialuronidasa, factor de CAMP
Inducción del síndrome de sepsis	Liberación de citocinas. Inducción de la óxido nítrico sintasa. Inflamación del sistema nervioso central.	Peptidoglicano, β -hemolisina, lípidos de la pared celular
Anulación de la respuesta inmunológica	Resistencia a la opsonofagocitosis Bloqueo del reclutamiento de neutrófilos Resistencia a péptidos antimicrobianos	Cápsula de polisacáridos, C5a peptidasa, Proteína C

4.5 Generalidades sobre antibióticos

El uso de fármacos antibacterianos tiene como finalidad destruir microorganismos patógenos o detener su crecimiento a concentraciones lo más bajas posibles para evitar un daño indeseable al huésped. Se pueden dividir en dos grupos: los antibióticos, de origen natural (betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas) y los quimioterápicos, de origen sintético (imidazoles, quinolonas, sulfonamidas).⁽⁴⁰⁾

Los agentes antimicrobianos se clasifican también de acuerdo a sus mecanismos de acción contra las células bacterianas. Estos agentes pueden interferir con la síntesis de la pared celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la síntesis de ácido nucleico, o inhibir una ruta metabólica. Los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas son muy similares⁽³⁰⁾:

- **Interferencia con la síntesis de la pared celular:** Los agentes antimicrobianos que interfieren con la síntesis de la pared celular bloquean la síntesis del péptidoglicano y por tanto son activos contra bacterias en crecimiento. Los agentes antimicrobianos que interfieren con la síntesis de la pared celular son bactericidas.
- **Desestabilización de la membrana citoplásmica:** Las moléculas de polimixina se difunden a través de la membrana externa y pared celular de células susceptibles hacia la membrana citoplásmica. Éstas se unen a la membrana citoplásmica alterándola y desestabilizan. Esto causa el derrame del citoplasma hacia el exterior de la célula lo que resulta en muerte celular. Los agentes antimicrobianos que interfieren con la membrana citoplásmica son bactericidas.

- **Interferencia con la síntesis de proteínas mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S:**

Existen tres tipos de interferencia⁽³⁰⁾:

1. El antibiótico se une a la subunidad 30S del ribosoma y bloquea la entrada del RNA de transferencia (tRNA). Puesto que no se pueden agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento, la síntesis de proteínas es inhibida.
2. El antibiótico se puede unir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se una al RNA mensajero (RNAm).
3. La presencia del antibiótico en el ribosoma podría provocar la lectura incorrecta del RNAm. Esto resulta en la traducción de aminoácidos erróneos en la proteína e interfiere con la capacidad de los aminoácidos para unirse con otros aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

- **Inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S⁽³⁰⁾:**

Los macrólidos y las lincosamidas se adhieren a la subunidad ribosómica 50S provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos son primordialmente bacteriostáticos.

- **La interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos es causada por dos tipos de agentes antimicrobianos**

Las fluoroquinolonas interfieren con la síntesis de ADN bloqueando la enzima ADN girasa. La enzima se une al ADN e induce rupturas dobles en las cadenas que permiten al ADN desenrollarse. Las fluoroquinolonas se unen al complejo ADN girasa e inducen que las cadenas de ADN rotas se liberen dentro de la célula lo que produce muerte celular.

La rifampicina se une a la ARN polimerasa ADN dependiente lo que bloquea la síntesis de ARN y resulta en la muerte de la célula.

- **Inhibición de la ruta metabólica para síntesis de ácido fólico causada por sulfonamidas y trimetoprima:**

Para muchos organismos el ácido para-aminobenzoico (PABA) es un metabolito esencial y está involucrado en la síntesis de ácido fólico, un importante precursor para la síntesis de ácidos nucleicos. Las sulfonamidas son estructuras análogas del PABA y compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato sintetasa. La trimetoprima actúa en la ruta de síntesis del ácido fólico en un punto posterior al de las sulfonamidas. Ésta inhibe la enzima dihidrofolato reductasa.

4.6 Resistencia a antibióticos

En algunas bacterias la resistencia hacia algún antibiótico es una propiedad intrínseca o innata. Las bacterias también pueden adquirir resistencia a los agentes antimicrobianos por eventos genéticos como mutaciones o recombinación genética (conjugación, transformación, transducción y transposición).⁽³⁰⁾

- **Mutación.** La resistencia cromosómica se desarrolla como resultado de una mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a un determinado agente antimicrobiano. La mutación

espontánea ocurre con una frecuencia relativamente baja. Las mutaciones espontáneas también podrían ocurrir en plásmidos.

- **Conjugación.** Las bacterias con frecuencia contienen elementos genéticos extra cromosómicos llamados plásmidos, muchos de los cuales llevan genes de resistencia antimicrobiana. Cuando dos células bacterianas se encuentran cerca, el pilus es responsable del reconocimiento entre ellas y su adhesión. Esto permite que una copia del plásmido se replique y transfiera de una célula a la otra.
- **Transformación.** Las bacterias podrían encontrar fragmentos de ADN desnudos que transportan genes de resistencia a antibióticos. Estos fragmentos son introducidos en la célula mediante un proceso denominado transformación. El fragmento de ADN es incorporado en el cromosoma de la célula huésped por recombinación y la célula resultante es resistente.
- **Transducción.** Cuando los virus bacterianos (bacteriófagos) se están multiplicando en el citoplasma de una bacteria, fragmentos de ADN de plásmidos o cromosomas podrían empacarse en una cápsula viral y entrar en otra célula huésped. Cuando los fragmentos contienen genes de resistencia a un agente antimicrobiano estos pueden transferir la resistencia a la nueva célula huésped.
- **Transposición.** Los transposones son secuencias genéticas especializadas "móviles" que tienen la capacidad de moverse de un sitio del cromosoma bacteriano a otro o entre cromosomas y plásmidos o ADN de bacteriófagos. Los transposones de ADN pueden estar incorporados a plásmidos y de esa manera transportar genes de resistencia a antibióticos.

Tabla 5. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos.⁽³⁰⁾

Mecanismos de resistencia a antibióticos
1. Producción de enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes que alcance el sitio blanco o que lo modifican para que no sea reconocido por su blanco
2. Impermeabilidad de la pared celular al agente antimicrobiano
3. Alteración del sitio blanco por mutación impidiendo la unión del agente antimicrobiano
4. Bomba de eflujo que expulsa al agente antimicrobiano fuera de la bacteria
5. Alteración de rutas metabólicas específicas para que el agente antimicrobiano no pueda provocar un efecto

4.7 Pruebas de susceptibilidad

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas son métodos in vitro que determinan las susceptibilidades de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas.

La técnica de difusión en agar es de las más utilizadas para evaluar la susceptibilidad de un microorganismo a un determinado antimicrobiano. Se prepara una placa Petri con un medio con agar inoculado uniformemente con el microorganismo a ensayar. Cantidades conocidas del agente antimicrobiano se añaden a discos de papel filtro que se colocan en la superficie del agar. Durante la incubación, el agente difunde desde el papel al agar; la concentración del agente disminuye a medida que aumenta la distancia al papel filtro. A una determinada distancia del disco se alcanza la

concentración mínima inhibitoria (CMI). Se crea un halo de inhibición; el diámetro de la zona es proporcional a la cantidad de antimicrobiano añadido al disco, la solubilidad del agente, el coeficiente de difusión y la eficacia del agente. Este método se usa de forma rutinaria para ensayar la sensibilidad a los antibióticos en patógenos.

4.8 Tetraciclina

La tetraciclina se produce en forma semisintética a partir de la clortetraciclina elaborada por *Streptomyces aureofaciens*.

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

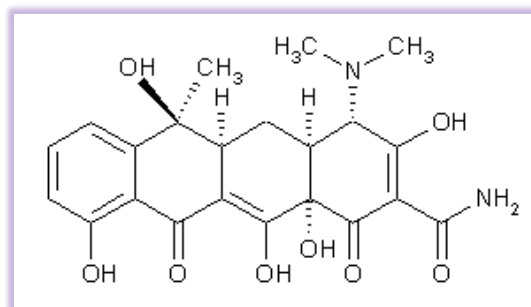


Figura 9. Fórmula estructural de la tetraciclina.

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro inhiben la síntesis de proteínas; son activos contra muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La forma protonada de la tetraciclina difunde a través de la membrana citoplasmática de Gram positivos o Gram negativos.^(10,45) Las células susceptibles concentran al fármaco de manera intracelular.

Una vez dentro de las células, las tetraciclinas se unen reversiblemente a las subunidades 30S de los ribosomas bacterianos, bloqueando la unión del

aminoacil-tRNA al sitio aceptor sobre el complejo ribosomal del RNAm, lo que impide la adición de aminoácidos al péptido en crecimiento.

4.8.1 Resistencia a tetraciclina

La resistencia a la tetraciclina es la más comúnmente encontrada en la naturaleza. Aunque puede ser el resultado de mutaciones cromosómicas que afecten la permeabilidad de la membrana, se ha encontrado que es más frecuente la adquisición de DNA exógeno que codifica proteínas involucradas en la expulsión selectiva o en la protección del ribosoma. ⁽⁴²⁾

Se han descrito tres mecanismos de resistencia a las tetraciclinas ⁽²⁶⁾:

1. Acumulación intracelular disminuida, debida tanto a la entrada impedida como a la salida aumentada por una bomba de transporte activo.
2. Enzimas inhibitoras de las tetraciclinas.
3. Protección ribosomal debida a producción de proteínas que interfieren con la unión de tetraciclinas a los ribosomas.

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, con un 75% de similitud en sus secuencias. Dos determinantes son consideradas diferentes entre si cuando existe una variación del más del 20% entre las secuencias proteicas de ambos determinantes. El determinante de resistencia a tetraciclina es una unidad genética de origen natural, el cual incluye los genes estructurales y reguladores.

Las proteínas de protección ribosomal (PPR) son polipéptidos de 650 aminoácidos y 72.5 kDa. Las que están ampliamente distribuidas son Tet(M)

y Tet(O) aunque hay otros 11 miembros de esta clase de proteínas entre los que se encuentran Tet(S), Tet(T), Tet(Q) y Tet(W).

4.9 Macrólidos

Son antibióticos que tienen un anillo lactónico multisustituído. Son producidos por diferentes especies de *Streptomyces*⁽²⁴⁾.

Son comúnmente usados contra especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Legionella* y algunas especies de *Corynebacterium*⁽⁴⁶⁾.

Se clasifican de acuerdo al número de carbonos que componen al anillo lactónico (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación de Macrólidos

14 carbonos	15 carbonos	16 carbonos
eritromicina	azitromicina	espiramicina
oleandomicina		josamicina
roxitromicina		miocamicina
fluritromicina		rokitamicina
claritromicina		tlosina
diritromicina		

Se clasifican también con base en cuatro generaciones químicas, ya que se ha buscado mejorar sus propiedades terapéuticas, farmacocinéticas y químicas debido al surgimiento de varios tipos de resistencia hacia ellos⁽⁵⁰⁾.

Primera generación: Macrólidos con anillos de 14 miembros. Surgimiento de resistencia iMLS en *Staphylococcus aureus*.

Segunda generación: Macrólidos con anillos de 16 miembros. Surgimiento de resistencia cMLS en *Staphylococcus aureus*.

Tercera generación: Macrólidos de amplio espectro con anillos de 14 y 15 miembros, semisintéticos y ácido-estables. Surgimiento de resistencia inducible en *Mycobacterium spp.* y *Helicobacter pylori*.

Cuarta generación: Macrólidos con anillos de 14 miembros que no inducen resistencia MLS (cetólidos).

4.9.1 Eritromicina

Fue obtenida en 1952, encontrada en los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erythreus*.

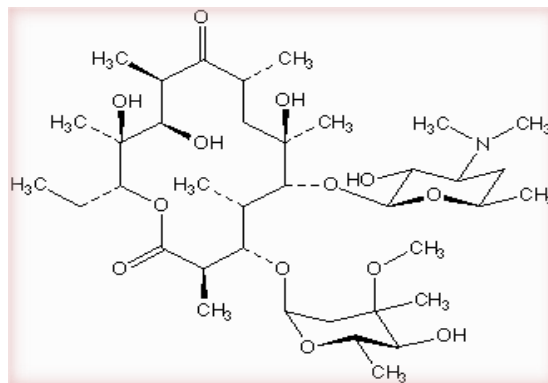


Figura 10. Fórmula estructural de la eritromicina.

Es eficaz contra microorganismos gram positivos como neumococos, estreptococos, estafilococos y corinebacterias⁽²⁶⁾. La acción antibacteriana de la eritromicina puede ser bacteriostática o bactericida para microorganismos susceptibles. La actividad se incrementa a pH alcalino. La inhibición de la síntesis de proteínas ocurre por unión a la subunidad ribosomal 50S del RNA, que impide la reacción de translocación, en la que un peptidil tRNA recién sintetizado se desplaza de un sitio aceptor (sitio A) a un sitio donador (sitio

P) en el ribosoma, por lo que el proceso de elongación del péptido es interrumpido^(22,24,46).

4.9.2 Resistencia a eritromicina

En cocos Gram positivos, la expresión de la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS), puede ser inducible o constitutiva. Cuando es constitutiva, la cepa es resistente a todos los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (cMLS); si es inducible, la cepa es resistente solo a macrólidos de 14 y 15 miembros (iMLS)⁽²⁸⁾.

Para la resistencia MLS, se han identificado tres mecanismos:

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

En cepas de *Streptococcus agalactiae* no se ha detectado el primer mecanismo, sin embargo los últimos dos mecanismos se presentan muy frecuentemente.

La modificación del sitio blanco está codificada por los genes *erm* y se da principalmente en el 23S rRNA. La modificación enzimática del sitio blanco 23S rRNA puede ocurrir por tres causas⁽⁴⁵⁾:

1. Metilación postranscripcional del dominio V.
2. Mutaciones en el dominio II.
3. Mutaciones en el dominio V.

Los genes *mefA/E* codifican para bombas de expulsión selectiva de antibióticos, conocidas como transportadores efflux, que expresa resistencia de bajo nivel a eritromicina y sensibilidad a lincosamidas (fenotipo M).

El transportador M, consiste en la formación de una proteína integral hidrofóbica de 44.2 kDa ⁽⁴⁾, cuya función es transportar el macrólido, expulsando selectivamente macrólidos de 14 y 15 miembros ⁽⁴⁷⁾.

Debido a que tanto los genes *erm* como los *mefA/E* son transportados por plásmidos y/o transposones, la transmisión puede ser tanto de manera vertical como horizontal, por lo que es necesario el estudio continuo de la evolución de la resistencia del EGB a macrólidos.⁽²⁾

4.10 Importancia clínica de la resistencia a tetraciclina en *Streptococcus agalactiae*

A diferencia de otras bacterias como los EGA, cuya resistencia a tetraciclina se ha visto disminuida en algunos países y aumentada en otros, la resistencia a tetraciclina en EGB se ha mantenido constante, con porcentajes alrededor del 80% (Tabla 7) a partir de los años 90s.

Tabla 7. Porcentaje de resistencia a tetraciclina de EGB reportada en diferentes países.

Año	País	Porcentaje de resistencia
2000	Brasil ⁽¹⁸⁾	100%
2001	Zimbawe ⁽³²⁾	100%
2001	España ⁽⁸⁾	89.8%
1998	Canadá ⁽¹⁴⁾	85%
2002	EUA ⁽¹⁷⁾	84.6%
1999	Francia ⁽³⁷⁾	83.2%
2006	Italia ⁽³¹⁾	77%

4.11 Importancia clínica de la resistencia a eritromicina en *Streptococcus agalactiae*

La penicilina es el antibiótico de primera elección para el tratamiento de las infecciones por EGB. En personas alérgicas a la penicilina la segunda opción son los macrólidos (eritromicina).

El incremento en el uso de eritromicina ha tenido como consecuencia un aumento de la resistencia de *Streptococcus agalactiae* a los macrólidos en diferentes países, algunos de los porcentajes de resistencia a eritromicina a partir del año 2000 se muestran a continuación (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de resistencia a eritromicina reportada para EGB en diversos países.

Año	País	Porcentaje de resistencia a eritromicina
2011	Malasia⁽¹⁾	4%
2002	México	5.9%
2011	Australia⁽¹⁾	6.4%
2010	India⁽⁴⁸⁾	14.3%
2011	Italia	15%
2011	Chile	17.1%
2010	España⁽³⁾	26%
2011	E.U.A⁽¹⁾	38%
2011	Taiwán⁽¹⁾	65%

4.12 Estudios sobre *S. agalactiae* hechos previamente en México

En estudios previos en el año 2002 con cepas mexicanas de *S. agalactiae* se observó que el porcentaje de resistencia a eritromicina era 5.9%⁽²³⁾, mientras que en otro estudio en 2004, se obtuvo un porcentaje menor al 4%⁽⁴⁹⁾. Los serotipos capsulares que se encontraron con mayor frecuencia en el primer estudio fueron el **Ia** con 61.3%, **II** con el 25.7% y el **III** con 12.8%⁽²³⁾, en el segundo estudio los resultados fueron los siguientes: **Ia** con 68%, **III** con el 28% y el **II** con 4%.⁽⁴⁹⁾

En los estudios hechos en México no se ha determinado el gen que se asocia con la resistencia a eritromicina. Sin embargo, en otros países se ha observado que el más prevalente es el gen *ermB*⁽⁸⁾⁽⁹⁾. En cuanto a estudios sobre resistencia a tetraciclina, tampoco se ha determinado en México el gen que se asocia a dicha resistencia, en otros países se sabe que la mayoría de las cepas resistentes presentan el gen *tetM* y en segundo lugar el *tetO*, siendo muy pocas las cepas que presentan ambos genes⁽⁸⁾.

5. HIPÓTESIS

En cepas clínicas de *Streptococcus agalactiae*, la resistencia a eritromicina se asociará mayormente a la presencia del gen *ermB*; la resistencia a tetraciclina se asociará mayoritariamente a la presencia del gen *tetM*. Las cepas serán en su mayoría de serotipo capsular **Ia** o **III**.

6. OBJETIVO

Identificar los genes de resistencia a macrólidos (*ermA*, *ermB* y *mefA*) y a tetraciclinas (*tetM* y *tetO*) en cepas clínicas de *Streptococcus agalactiae* y correlacionarlos con el serotipo capsular.

6.1. Objetivos particulares

Seleccionar 102 aislamientos clínicos de *Streptococcus agalactiae* que muestren resistencia a eritromicina [15 µg] y 100 aislamientos resistentes a tetraciclina [30 µg].

Estandarizar las condiciones adecuadas para la amplificación de los genes de resistencia a tetraciclina (*tetM* y *tetO*).

Detectar por PCR los genes de resistencia a macrólidos (*ermA*, *ermB* y *mefA*) que prevalecen en cepas clínicas de *Streptococcus agalactiae* resistentes a eritromicina.

Detectar por PCR los genes de resistencia a tetraciclina (*tetM* y *tetO*) que prevalecen en cepas clínicas de *Streptococcus agalactiae* resistentes a tetraciclina.

Determinar el serotipo capsular de las cepas estudiadas de *Streptococcus agalactiae*.

Correlacionar el serotipo capsular de las cepas con el genotipo de resistencia.

Correlacionar el serotipo de las cepas con el origen de la muestra.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención y manejo inicial de las cepas estudiadas

Se seleccionaron de una colección de más de 2000 cepas de Estreptococos, 202 aislamientos clínicos provenientes de diversos hospitales de la ciudad de México (102 cepas resistentes a eritromicina y 100 cepas resistentes solo a tetraciclina), las cuales se hallaban conservadas a una temperatura de -70°C en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol al 15%.

Las cepas seleccionadas se sembraron en placas con base de agar BBL a las que se les adicionó 5% de sangre desfibrinada estéril de carnero para la prueba de CAMP en la que se utilizó también una cepa de *Staphylococcus aureus* productor de Esfigomielinasa (hemolisina beta). Posteriormente, se realizó la determinación del grupo de Lancefield utilizando el kit Pastorex Strep BIORAD para asegurar que las cepas pertenecían al grupo B.

7.2 Pruebas de susceptibilidad a eritromicina [15 µg] y a tetraciclina [30 µg]

Las cepas en estudio se resembraron en placas con base de agar con 5% de sangre desfibrinada estéril de carnero Hemoprovedores, se incubaron a 37°C por 24 h en una incubadora Isotemp 750D, se prepararon con ellas suspensiones bacterianas en solución salina isotónica de 1.5×10^8 UFC/mL, equivalente al 0.5 en la escala de McFarland, utilizando solución salina estéril, un vortex GENIE-2 Scientific Industries y un nefelómetro; las

soluciones se inocularon con hisopos estériles en placas de Agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero Bioxon.

Se utiliza un disco impregnado de antibiótico que se coloca sobre el agar previamente inoculado con la bacteria que se desea probar; el disco capta la humedad y el antibiótico difunde radialmente a través del agar, por lo tanto la concentración disminuye a medida que se va alejando del disco.

En un punto, la concentración del antibiótico en el medio será incapaz de inhibir el crecimiento de la bacteria, el diámetro del área de inhibición alrededor del disco es interpretada de acuerdo a las categorías: susceptible, intermedio o resistente de acuerdo a las tablas publicadas por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI).

Una vez inoculadas, se prosiguió a colocar los discos de eritromicina de 15 µg BD BBL Sensi-Disc y los discos de tetraciclina 30 µg BIORAD siguiendo los lineamientos establecidos en los Estándares para las Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos (CLSI). Las placas se incubaron a 37°C por 24 h, después se llevaron a cabo las lecturas de susceptibilidad.

Para determinar la resistencia a eritromicina y tetraciclina se utilizaron los estándares para la interpretación del diámetro de inhibición correspondientes (Tabla 9).

Tabla 9. Criterios para la interpretación del diámetro de inhibición para eritromicina y tetraciclina para estreptococos hemolíticos.⁽¹²⁾

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Susceptible
Eritromicina (15 µg)	≤15mm	16-20mm	≥21mm
Tetraciclina (30 µg)	≤ 18mm	19-22mm	≥23mm

7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

▶ Aislamiento de ADN.

Con cultivos de 24 h de las cepas en estudio se hicieron suspensiones bacterianas de 2×10^9 células/mL inoculando en tubos con caldo Todd-Hewitt, que fueron incubados a 37°C por 24 h en agitación constante en una incubadora Isotemp 750D. Se depositó 1 mL de caldo de cada tubo en tubos de 1.5 mL, los cuales fueron centrifugados a 7500 rpm en una microcentrífuga SIGMA 1-15 durante 10 min, el paquete celular obtenido fue resuspendido en 180 µL de buffer de lisis e incubado a 37°C durante 30 min. Posteriormente fueron adicionados 25 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer AL, se mezcló y se incubó por 30 min a 70°C en una parrilla Multi-block Heater.

Una vez concluida la incubación, se agregaron a cada tubo 200 µL de etanol al 96% mezclándolo perfectamente con ayuda de un vortex GENIE-2 Scientific Industries. Se transfirió todo el contenido de cada tubo a Minicolumnas QIAGEN de extracción que fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 1 min en la microcentrífuga. Al ADN retenido por la Minicolumna se le realizó un primer lavado con buffer AW₁ y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, posteriormente se realizó otro lavado con buffer AW₂ y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Finalmente se eluyó el ADN retenido en la columna con 200 µL de buffer AE, se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm.

Todos los reactivos utilizados fueron los contenidos en el kit de extracción DNeasy QIAGEN.

► Iniciadores.

Los iniciadores se seleccionaron con base en trabajos previos hechos en el laboratorio (Tablas 10 y 11).

Tabla 10. Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR para determinar el gen asociado a la resistencia a Eritromicina. ^(11,47)

Gen	Secuencias	Localización en el gen	Tamaño del producto amplificado
<i>mefA1</i>	5'-CTA TGA CAG CCT CAA TGC G-3'	1 - 19	1.5 kb
<i>mefA2</i>	5'-ACC GAT TCT ATC AGC AAA G-3'	1435 - 1417	
<i>ermA1</i>	5'-AGG TTA TAA TGA AAC AGA-3'	-8 - 10	208pb
<i>ermA2</i>	5'-GCA TGA CAT AAA CCT TCA-3'	200 - 183	
<i>ermB1</i>	5'-GAA AAA GTA CTC AAC CAA	43 - 63	639pb
<i>ermB2</i>	ATA-3'	681 - 658	
	5'-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3'		

Tabla 11. Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR para determinar el gen asociado a la resistencia a Tetraciclina. ^(34,45)

Gen	Secuencias	Localización en el gen	Tamaño del producto amplificado
<i>tetM1</i>	5'-GTT TAT CAC GGA AGT GCA A-3'	654	680 pb
<i>tetM2</i>	5'-GGA GCC CAG AAA GGA TTC G-3'	1334	
<i>tetO1</i>	5'-AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC-	219	494 pb
<i>tetO2</i>	3' 5'-TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA- 3'	713	

► Controles.

Las muestras controles utilizadas para la determinación de cada uno de los genes asociados a la resistencia a eritromicina o a tetraciclina se muestran en el tabla 12.

Tabla 12. Controles positivos utilizados para la determinación de genes asociados a la resistencia a los antibióticos estudiados.

No. Cepa	gen	PM de la PCR
502	<i>mefA</i>	1400 pb
503	<i>ermA</i>	200 pb
504	<i>ermB</i>	600 pb
1017 B	<i>tetM</i>	680 pb
675	<i>tetO</i>	494 pb

Las cepas con los números 502,503 y 504 fueron donadas por el Laboratorio de Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadá; mientras que las cepas con números 675 y 1017B pertenecen a la colección de estreptococos del laboratorio de Salud Pública.

Tabla 13 .Controles positivos utilizados para determinar los serotipos capsulares de las cepas estudiadas.

Serotipo	Número de Cepa
Ia	1501
Ib	1116
II	1591
III	1440
IV	1450
V	1439
VI	1287

► Estandarización de la PCR.

Los volúmenes, concentraciones de reactivos y temperaturas utilizadas en la PCR para determinar los genes asociados a la resistencia a eritromicina fueron obtenidas de estandarizaciones previas hechas en el laboratorio, en las cuales se encontró que no había interferencias entre los productos de los genes *mefA* y *ermB* por lo que se estableció que se hiciera una PCR dual para estos productos y una individual para el gen *ermA*.

Para determinar los genes asociados a la resistencia a tetraciclina se llevó a cabo una estandarización de la PCR que consistió únicamente en la determinación de la temperatura óptima de hibridación durante la reacción ya que tanto los volúmenes y concentraciones de reactivos se tenían ya establecidas de trabajos previos hechos en el laboratorio. De igual modo los amplificadores de *tetO* y *tetM* no interferían entre ellos, por lo que se decidió hacer una PCR dual.

Las mezclas de reacción para cada PCR fueron las siguientes:

Tabla 14. Mezcla de reacción para amplificar *mefA* y *ermB*. Vol. Final = 30 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer	3.0
dNTP's	5.0
MefA_F	1.0
MefA_R	1.0
ErmB_F	1.0
ErmB_R	1.0
Taq	0.15
DNA	1.0
H₂O	16.85

Tabla 15. Mezcla de reacción para amplificar *ermA*. Vol. Final = 30 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer	3.0
dNTP's	5.0
ermA_F	1.00
ErmA_R	1.00
Taq	0.15
DNA	1.0
H₂O	18.85

Tabla 16. Mezcla de reacción para amplificar *tetM*. Vol.Final = 50 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer	5.0
dNTP's	6.0
TetM_F	1.0
TetM_R	1.0
Taq	0.2
DNA	1.0
H₂O	35.8

Tabla 17. Mezcla de reacción para amplificar *tetO* Vol. Final = 50 μ L

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer	5.0
dNTP's	6.0
TetO_R	1.0
TetO_F	1.0
Taq	0.2
DNA	1.0
H₂O	35.8

Tabla 18. Mezcla de reacción para amplificar serotipos **Ia** y **Ib**. Vol. Final = 30 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer	3.0
dNTP's	5.0
Ia_F	0.6
Ia_R	0.6
Ib_F	0.6
Ib_R	0.6
Taq	0.17
DMSO	0.2
DNA	1.0
H₂O	18.23

Tabla 19. Mezcla de reacción para amplificar serotipo **II**. Vol. Final = 30 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer	3.0
dNTP's	5.0
II_F	0.6
II_R	0.6
Taq	0.17
DMSO	0.2
DNA	1.0
H₂O	19.43

Tabla 20. Mezcla de reacción para amplificar serotipos **III** y **V**. Vol. Final = 30 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer	3.0
dNTP's	5.0
III_F	0.6
III_R	0.6
V_F	0.6
V_R	0.6
Taq	0.17
DMSO	0.2
DNA	1.0
H₂O	18.23

Para las mezclas de reacción se utilizaron los siguientes reactivos:

- Buffer 10X (100 mM Tris-HCl, pH=8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% w/v gelatina)
- Deoxinucleósido trifosfato 1.25 mM
- H₂O ultrapura
- Taq DNA polimerasa 5U/μL Roche
- MgCl₂ 25 mM
- Iniciadores 10 μM (mefA_R, mefA_F/ ermA_R, ermA_F/ ermB_R, ermB_F/ tetO_R, tetO_F/ tetM_R, tetM_F/ Ia_R, Ia_F/ Ib_R, Ib_F/ II_R, II_F/ III_R, III_F/ IV_R, IV_F/ V_R, V_F/ VI_R y VI_F).

Todas las PCRs se llevaron a cabo en un Termociclador Gene Amp PCR System 9700.

- ▶ Revelado de productos de PCR.

Los productos de PCR se corrieron en geles al 1.5% de agarosa grado biología molecular Research Organics. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el GeneRuler 100pb Fermentas plus. El revelador fue bromuro de etidio 10 mg/mL Research Organics.

Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis modelo minisub-cell GT marca Bio-Rad usando una fuente de poder para electroforesis mod. 4000 Life Technologies Inc. Los amplificados se observaron utilizando un UV Transiluminador Lab-Tech y fueron fotografiados con una cámara digital DC290 Kodak y un Software Kodak 1D 3.5v.

El peso molecular de los amplificados esperados para cada gen se muestra a continuación (Tabla 21).

Tabla 21. Tamaño de los amplificadores de cada control para los diferentes genes de resistencia.

Gen	Amplicón	Gen	Amplicón
<i>mefA</i>	1400 pb	<i>tetM</i>	680 pb
<i>ermA</i>	200 pb	<i>tetO</i>	500 pb
<i>ermB</i>	600 pb		

7.4 Proceso de selección de cepas.

Se seleccionó una población de 202 cepas de un universo de más de 2000 cepas con las siguientes características:

- a) El 90% de las cepas presentó resistencia a tetraciclina,
- b) El 4.6% de las cepas presentó resistencia a eritromicina.

Las cepas seleccionadas para el estudio se dividieron en tres grupos:

- 1) Cepas que presentan solo resistencia a eritromicina.
- 2) Cepas que presentan solo resistencia a tetraciclina.
- 3) Cepas que presentan resistencia dual (eritromicina y tetraciclina).

8. RESULTADOS

8.1 Estandarización de la PCR

Después de evaluar varias temperaturas de hibridación se estableció una temperatura de 60°C para tetraciclina y 48°C para eritromicina; la temperatura de hibridación de las PCRs para la determinación de todos los serotipos fue también de 60°C.

Para todas las PCRs la temperatura de desnaturalización fue de 94°C y la de elongación de 72°C.

8.2 Estudios con cepas resistentes de *S.agalactiae*

De las 202 cepas resistentes seleccionadas, se obtuvieron los siguientes porcentajes para cada grupo de estudio:

Tabla 22. Porcentaje de cepas pertenecientes a cada grupo de estudio.

Grupo de estudio	Número de cepas	Porcentaje (%)
Resistencia sólo a eritromicina (E) Grupo I	20	9.9
Resistencia sólo a tetraciclina (T) Grupo II	100	49.5
Resistencia a eritromicina y a tetraciclina (E/T) Grupo III	82	40.6

8.3 Resultados del grupo I Cepas resistentes solo a eritromicina

Como se muestra en la figura 11, el 9.9% de las cepas estudiadas presentaron resistencia únicamente a eritromicina (E), 40.6% de las cepas presentaron resistencia dual a eritromicina y tetraciclina (E/T) y 49.5% de las cepas presentaron únicamente resistencia a tetraciclina (T)

La figura 11 muestra que el gen que más se asocia con la resistencia a eritromicina es el *ermB* (55%), mientras que el 25% de las cepas no presentó ninguno de los tres genes que se determinaron en el laboratorio; el 20% de las cepas presentó el gen *mefA*. De las cepas que solo fueron resistentes a eritromicina ninguna presentó el gen *ermA*.

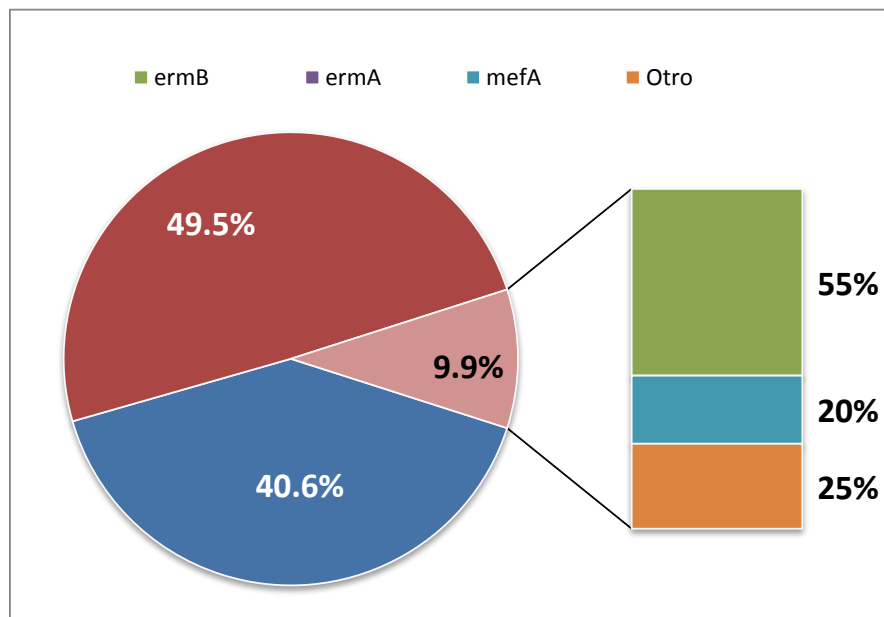


Figura 11. Porcentaje de genes asociados a la resistencia a eritromicina en cepas mono resistentes, donde (E) se refiere a cepas resistentes solo a eritromicina, (E/T) a cepas resistentes a eritromicina y tetraciclina, y (T) solo a resistentes a tetraciclina.

Las figuras 12, 13 y 14 muestran que de las cepas resistentes solo a Eritromicina, el 30% de ellas tiene el gen *ermB* y son de serotipo capsular **V**. El 15% de las cepas tiene el gen *mefA* y pertenecen al serotipo capsular **III**.

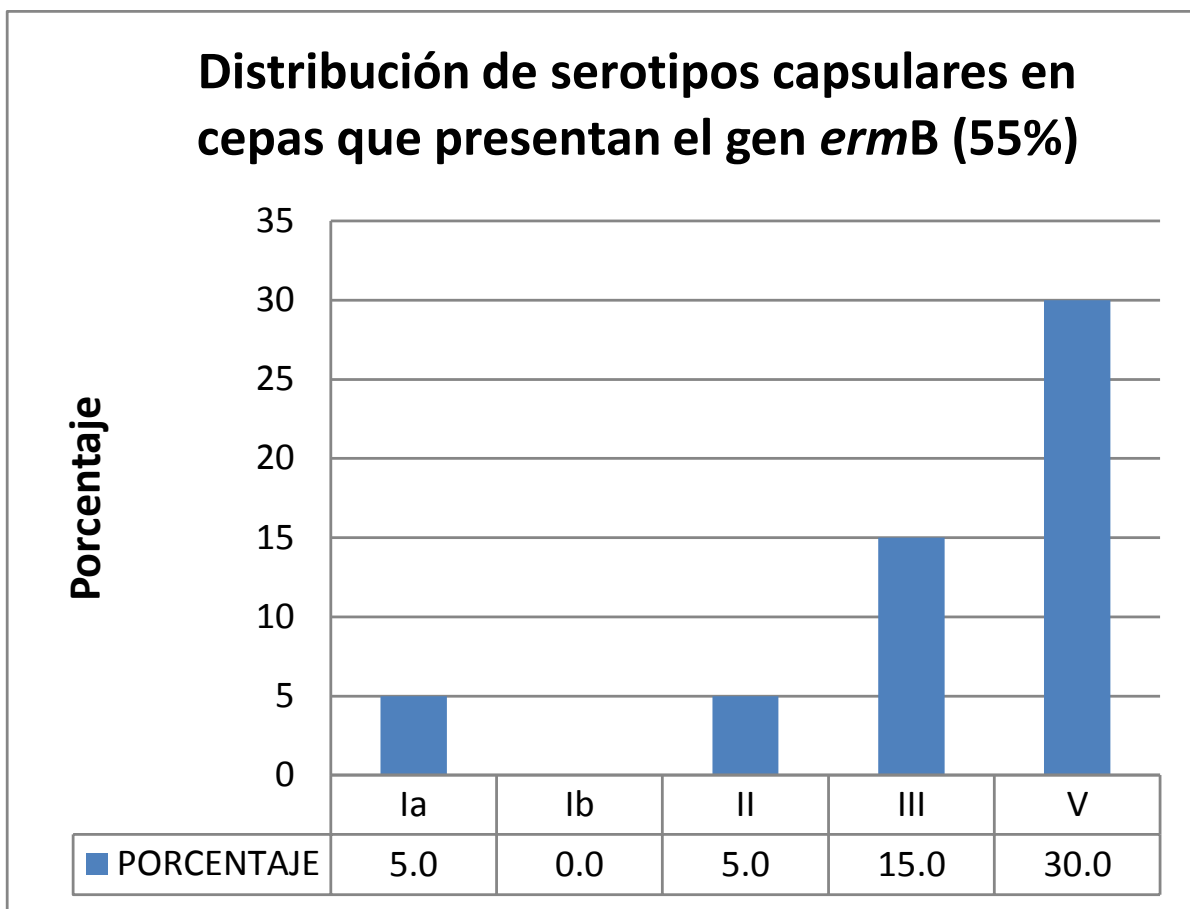


Figura 12. Serotipos capsulares de las cepas que presentaron el gen *ermB*.

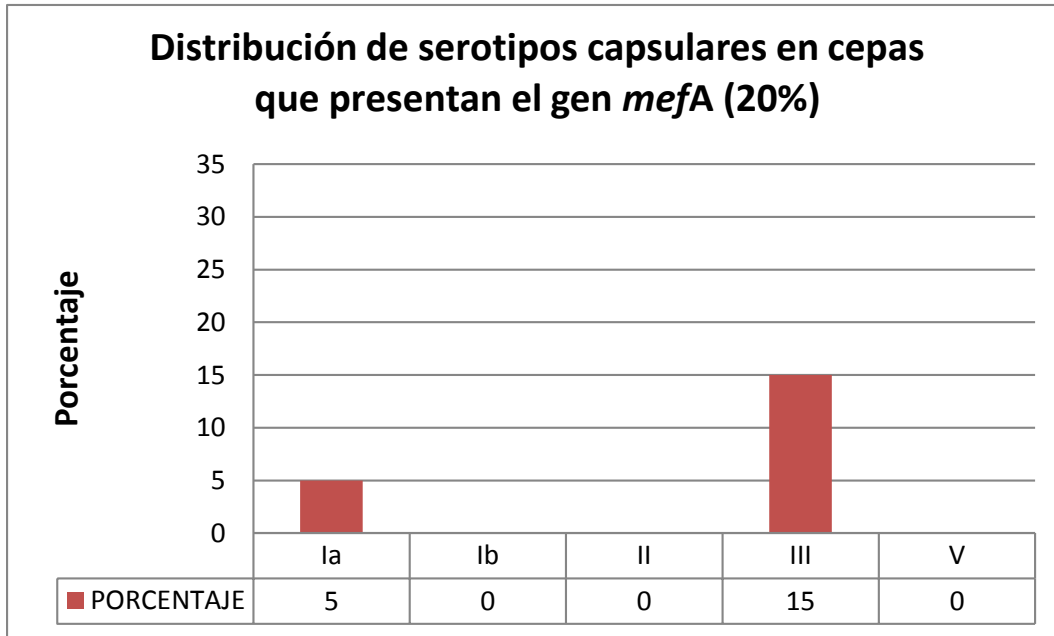


Figura 13. Serotipos capsulares de las cepas que presentaron el gen *mefA*.

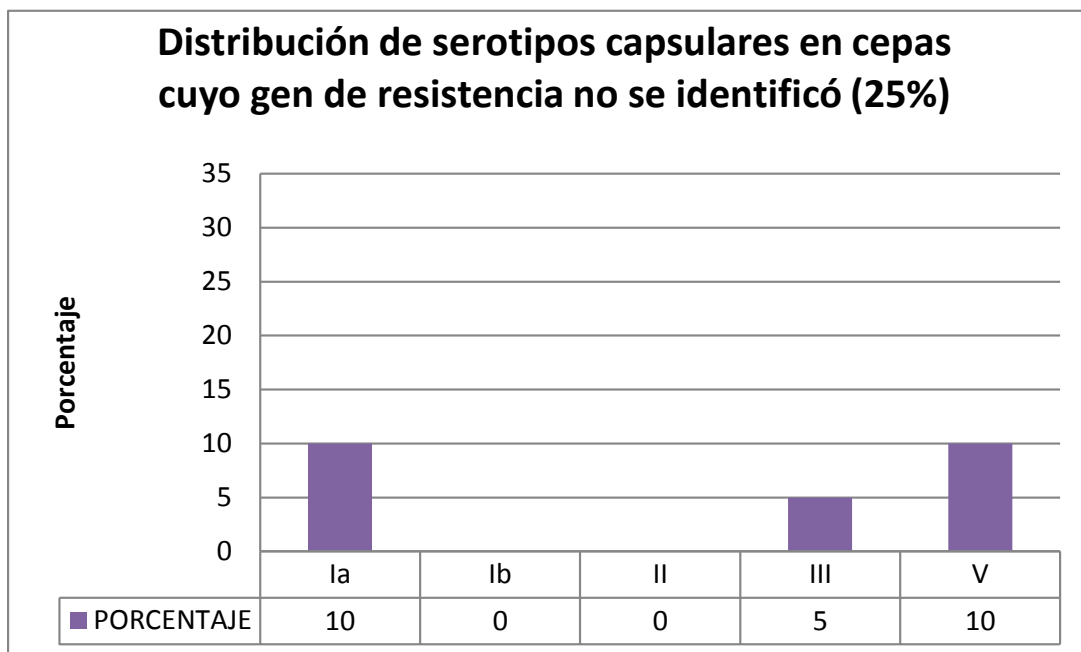


Figura 14. Serotipos capsulares de las cepas cuyo gen de resistencia a eritromicina fue diferente de los 3 genes trabajados en el laboratorio.

De manera general, cuatro serotipos fueron los más frecuentes (**Ia**, **II**, **III** y **V**) entre las cepas resistentes a eritromicina, de las cuales el 75% de ellas pertenecen a los serotipos **III** y **V** como se observa en el tabla 23.

Tabla 23. Porcentaje de serotipos capsulares en cepas resistentes a eritromicina.

Serotipo capsular	Porcentaje (%)
V	40
III	35
Ia	20
II	5

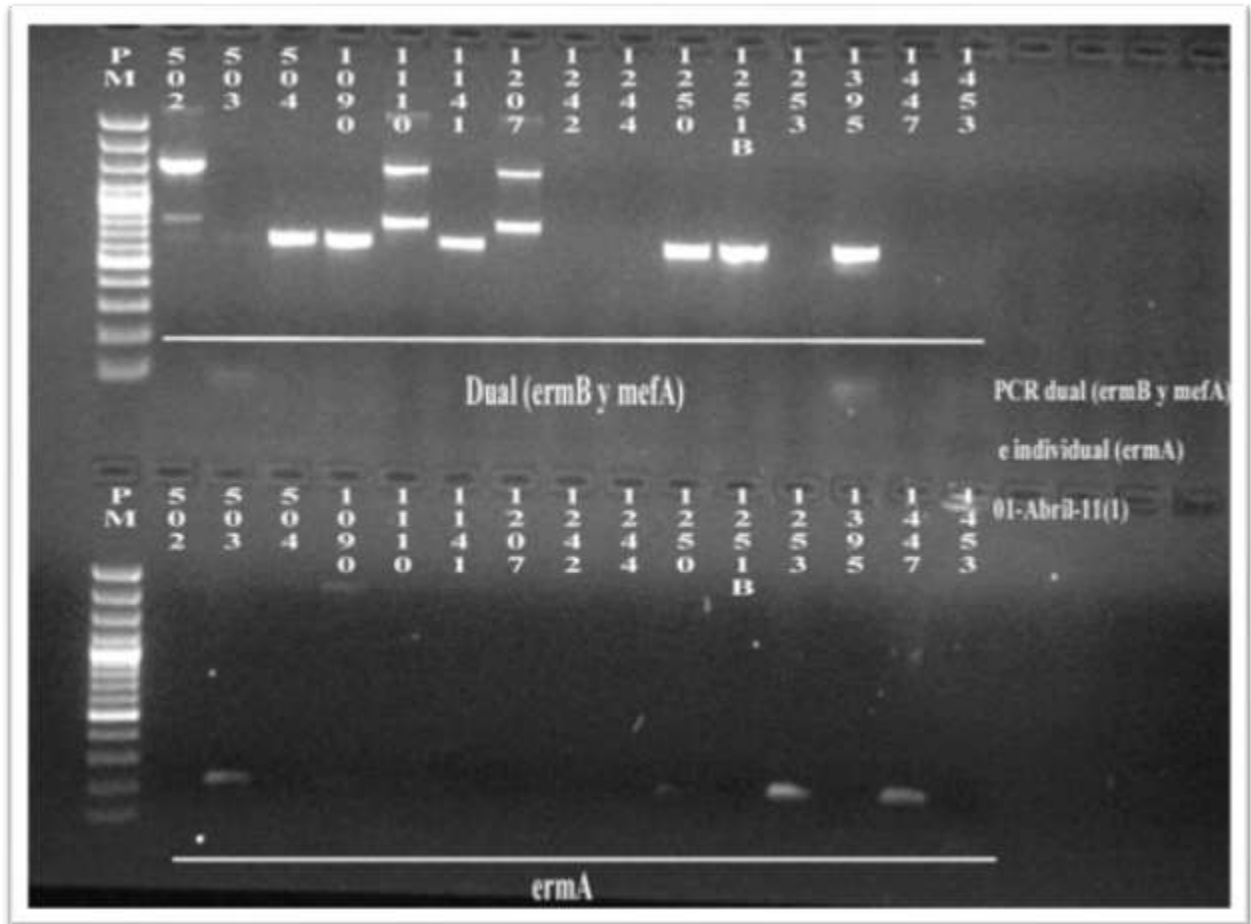


Figura 15. Fotografía del gel de electroforesis donde se muestran los amplificados de los genes *ermB*, *ermA* y *mefA*. En el marcador de peso molecular, cada banda es de 100 pb.

En la figura 15 pueden observarse cepas que presentan los genes *ermB* y *mefA* en la mitad superior, mientras que en la inferior se observan amplificados del gen *ermA*. Hay tres cepas en las que no se observan amplificados para ninguno de los 3 genes mencionados.

Las cepas con números 502, 503 y 504 son los controles positivos para los genes *mefA*, *ermA* y *ermB* respectivamente.

8.4 Resultados del grupo II Cepas resistentes solo a tetraciclina.

La figura 16 muestra que del 49.5% de las cepas resistentes sólo a Tetraciclina, el 85% presentó únicamente el gen *tetM* mientras que el otro 13% presentó la combinación de genes *tetM/tetO* y el 2% presentó el gen *tetO*.

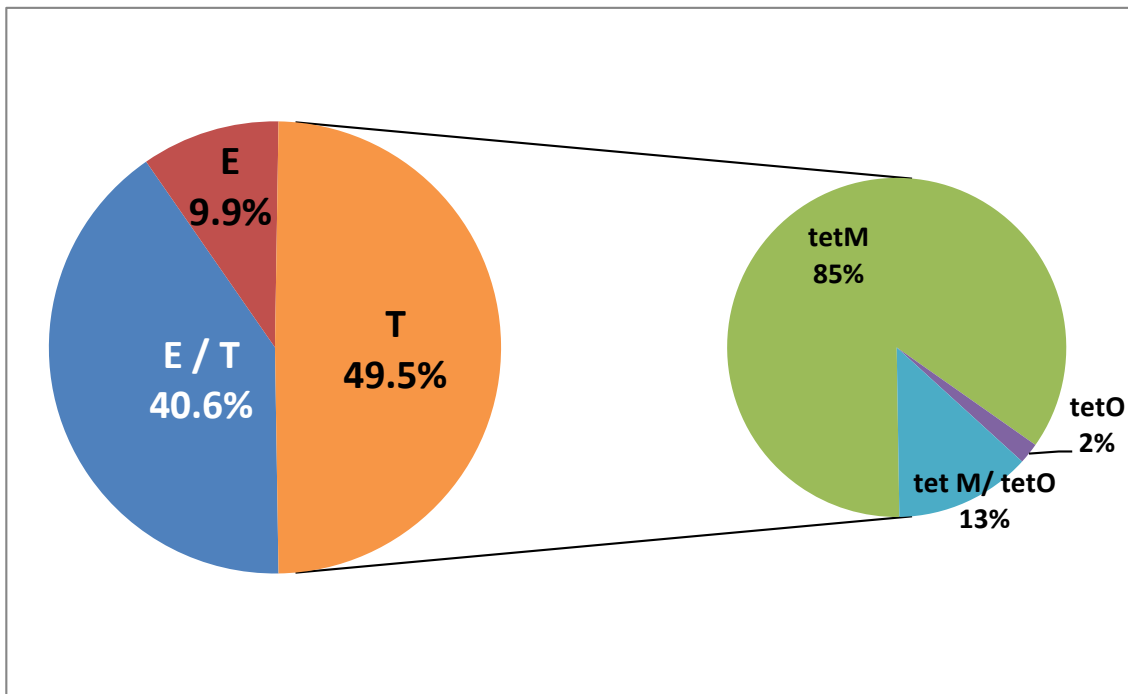


Figura 16. Genes asociados con la resistencia a Tetraciclina.

La mayoría de las cepas con el gen *tetM* de los serotipos capsulares **V**, **III** y **Ia** con distribuciones similares entre sí (figura 17), mientras que para las cepas con los genes *tetM/tetO* el serotipo más prevalente fue el **V** (figura 18); para cepas que presentaron el gen *tetO*, los dos serotipos que se encontraron fueron el **II** y el **V** (figura 19).

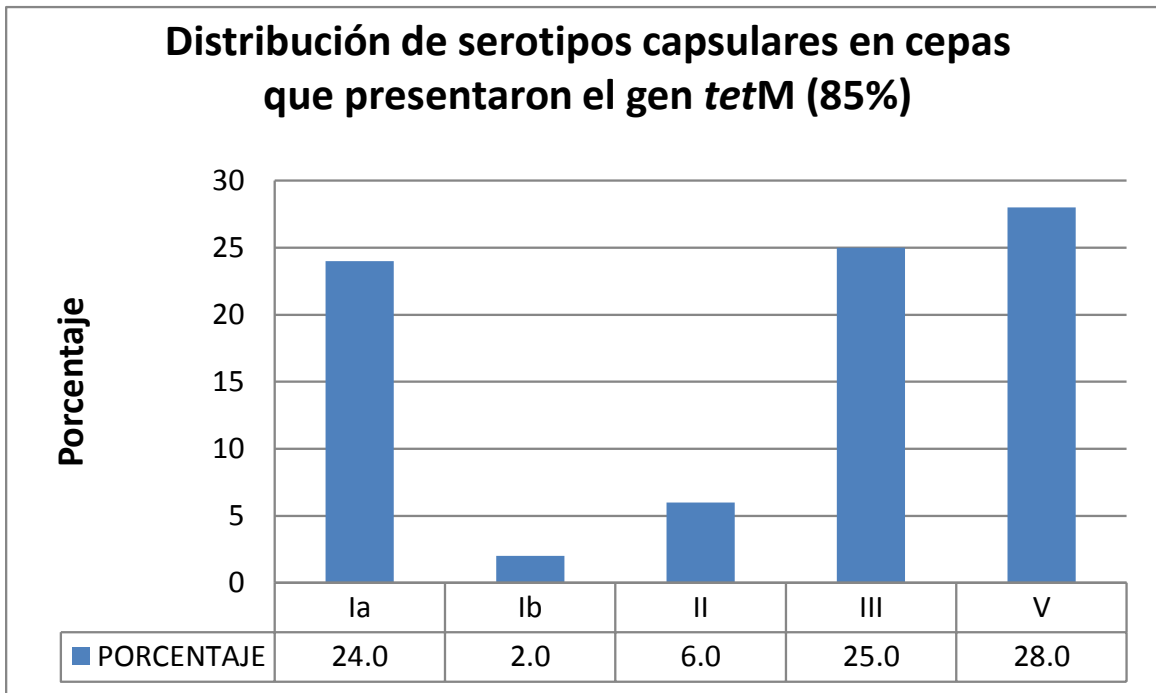


Figura 17. Serotipos capsulares de cepas con el gen *tetM*.

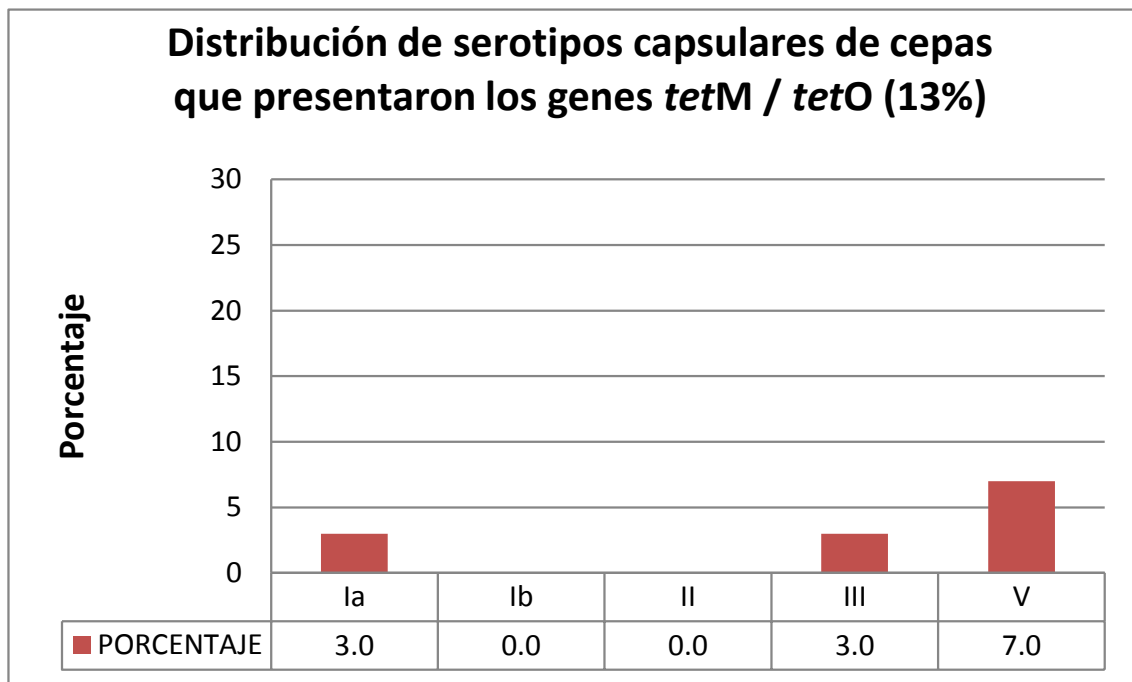


Figura 18. Serotipos capsulares de cepas con los genes *tetM/tetO*.

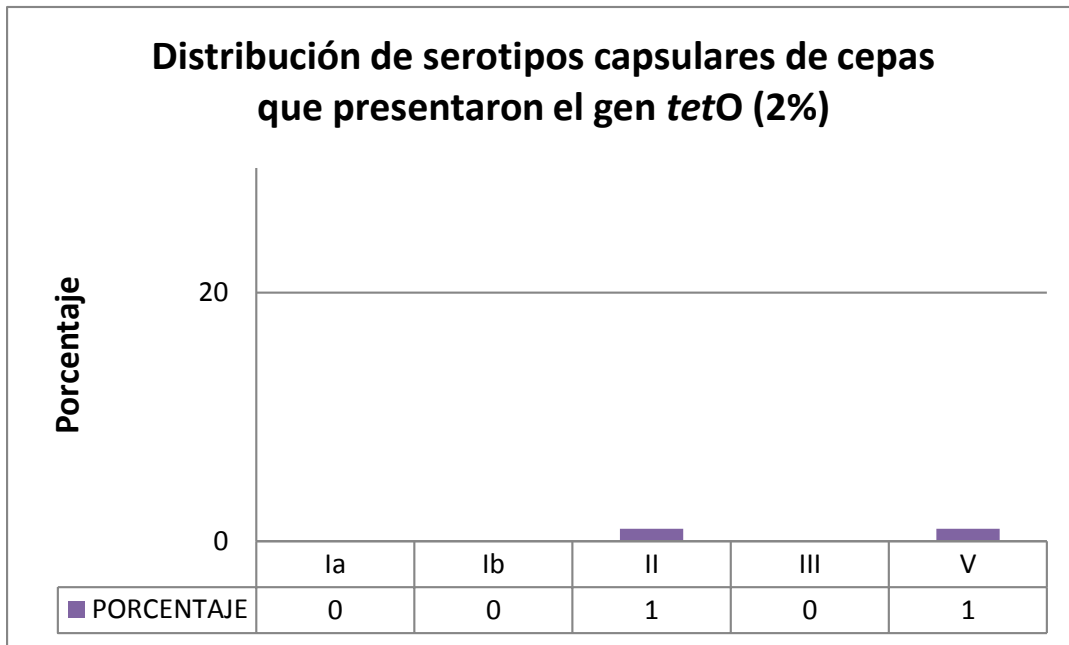


Figura 19. Serotipos capsulares de cepas con el gen *tetO*.

En la tabla 24 se presentan en general los serotipos determinados para las cepas resistentes únicamente a tetraciclina, más del 90% de las cepas pertenecen a los serotipos capsulares **Ia, III y V**.

Tabla 24. Porcentaje de serotipos capsulares determinados en cepas resistentes a tetraciclina.

Serotipos capsulares	Porcentaje
V	36
III	28
Ia	27
II	7
Ib	2

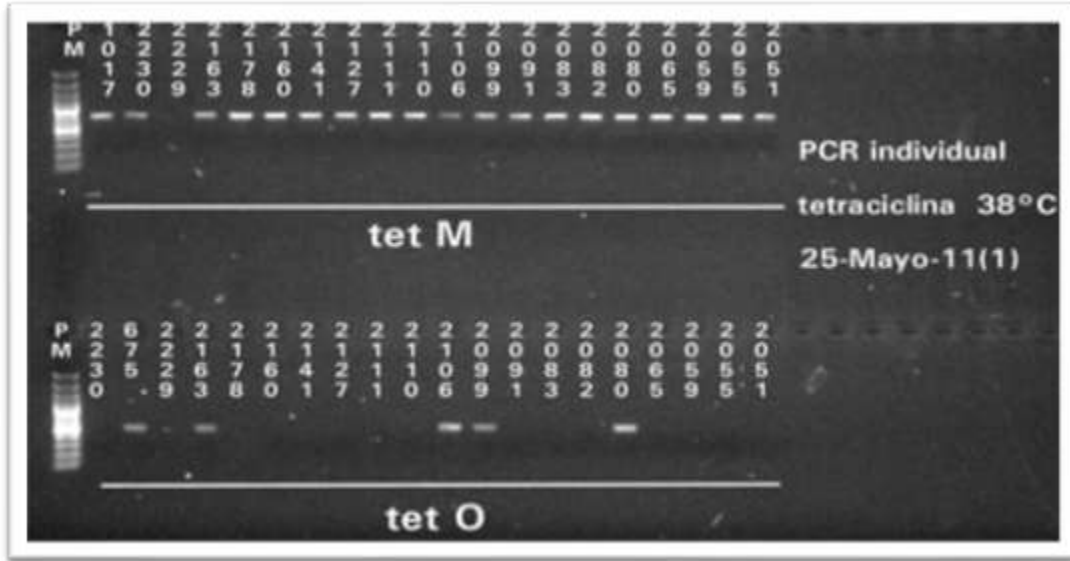


Figura 20. Fotografía del gel de electroforesis donde se muestran los amplificadores de los genes *tetM* y *tetO*. En el marcador de peso molecular, cada banda es de 100 pb.

En la figura 20 se observan ejemplos de cepas que presentaron el gen *tetM* y el gen *tetO*, las 4 cepas que presentaron el gen *tetO* también amplificaron para el gen *tetM*.

Las cepas con números 1017 y 675 fueron los controles positivos para los genes *tetM* y *tetO* respectivamente.

8.5 Resultados del grupo III cepas con resistencia dual

De las cepas estudiadas, el 40.6% de ellas presentaron resistencia dual (eritromicina y tetraciclina), de estas, el 68.3% presentó el gen *ermB*, de ellas el 59.8% presentó también el gen *tetM* mientras que el 8.5% presentó ambos genes de resistencia a tetraciclina *tetM/tetO*.

El porcentaje de cepas que presentó el gen *ermA* fue de 13.4%, de las cuales el 12.3% presentó también el gen *tetM* y solo el 1.2% presentó la combinación de genes *tetM/tetO*.

El gen de resistencia *mefA* se presentó en el 7.3% de las cepas, de ellas el 4.9% presentó a la vez el gen *tetM*; el gen *tetO* y la combinación de genes *tetM/tetO* se presentaron en un 1.2% cada uno.

Para las cepas cuyo gen de resistencia a eritromicina no se identificó (11%), se observó que el 9.8% de ellas presentaron el gen *tetM* y solo el 1.2% de ellas presentó la combinación de genes de resistencia *tetM/tetO*.

La figura 21 muestra los porcentajes más relevantes mencionados previamente.

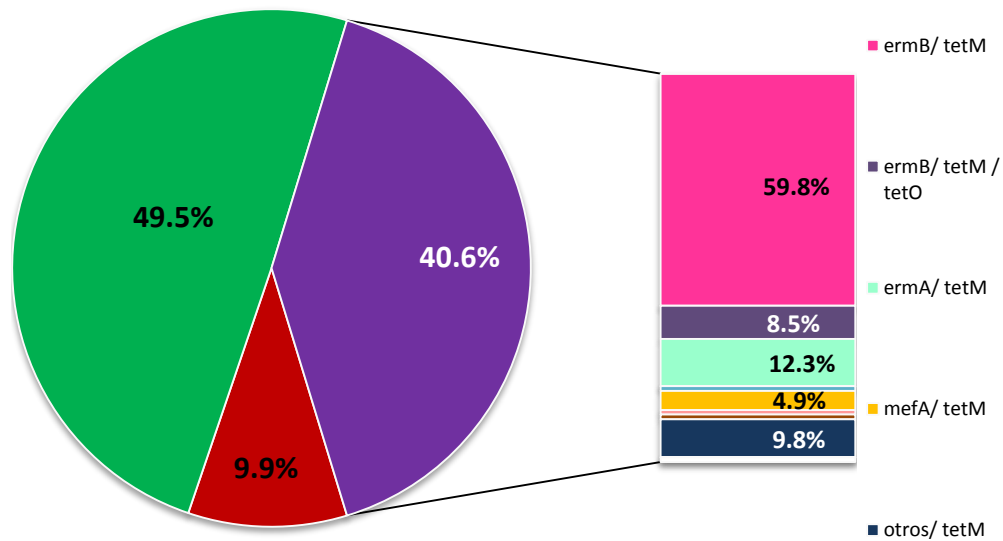


Figura 21. Genes de resistencia en cepas con resistencia dual.

En la figura 21 solo se presentan los porcentajes más representativos, el total de los porcentajes se puede observar en la Tabla 25.

Tabla 25. Porcentaje de genes de resistencia en cepas con resistencia dual.

Genes de resistencia	Porcentaje (%)
ermB/tetM	59.8
ermB/tetO	0.0
ermB/tetM/tetO	8.5
ermA/tetM	12.3
ermA/tetO	0.0
ermA/tetM/tetO	1.2
mefA/tetM	4.90
mefA/tetO	1.2
mefA/tetM/tetO	1.2
otros/tetM	9.7
otros/tetO	0.0
otros/tetM/tetO	1.2

Como se observa en las figuras 22, 23, 24 y 25, los serotipos más comúnmente encontrados (74.3%) en cepas con resistencia dual fueron el **III** y **V** (30.6% y 35.5% respectivamente) para las distintas combinaciones de genes de resistencia; para cepas cuyo gen asociado con la resistencia a eritromicina fue el *ermB* se encontraron también los serotipos **Ia** (7.3%) y **II** (7.3%); los demás serotipos no se encontraron en porcentajes mayores al 5% para ninguna de las cepas con genes diferentes a los ya mencionados.

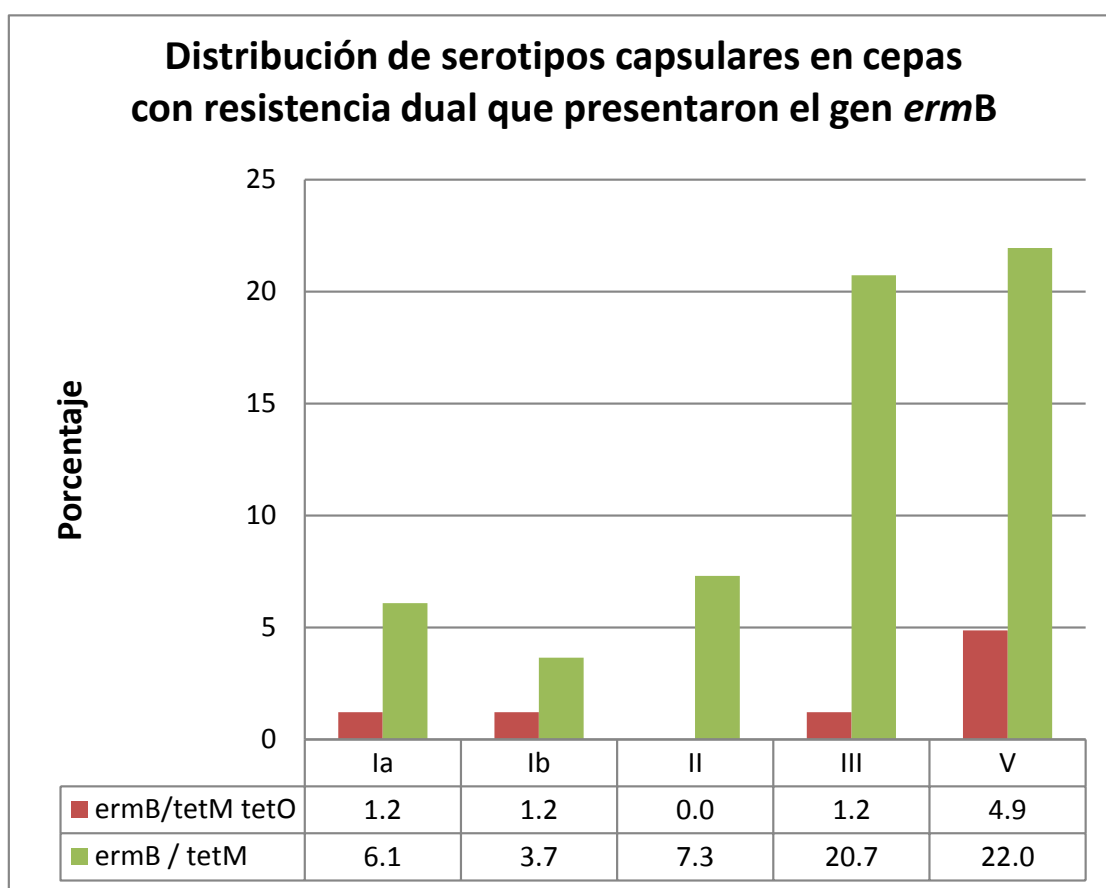


Figura 22. Serotipos capsulares de cepas con resistencia dual, que presentaron el gen *ermB*.

Distribución de serotipos capsulares de cepas con resistencia dual que presentaron el gen *ermA*

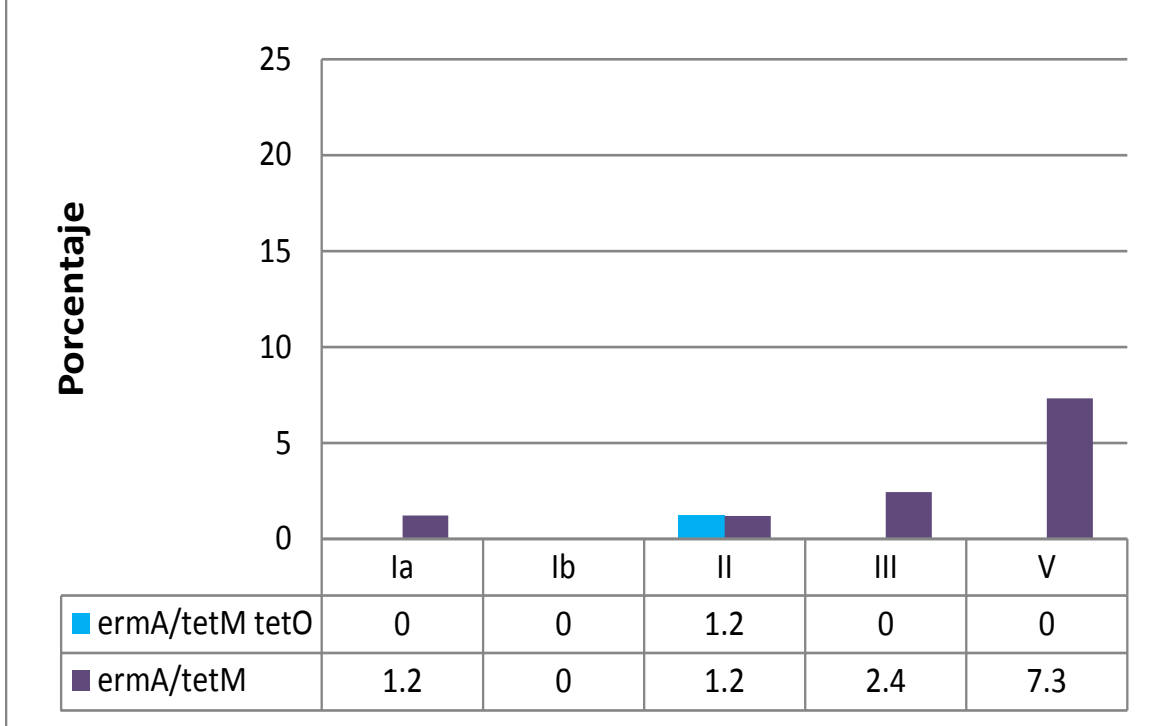


Figura 23. Serotipos capsulares de cepas con resistencia dual que presentaron el gen *ermA*.

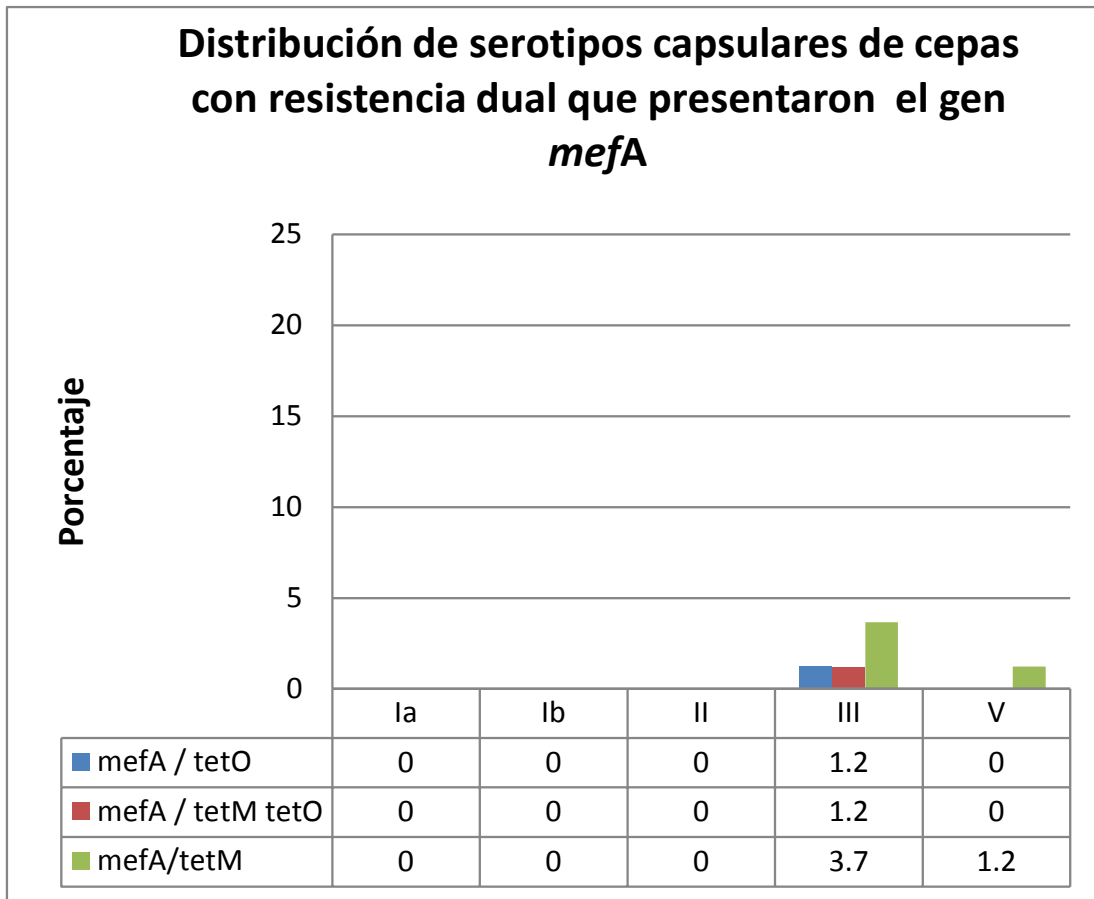


Figura 24. Serotipos capsulares de cepas con resistencia dual que presentaron el gen *mefA*.

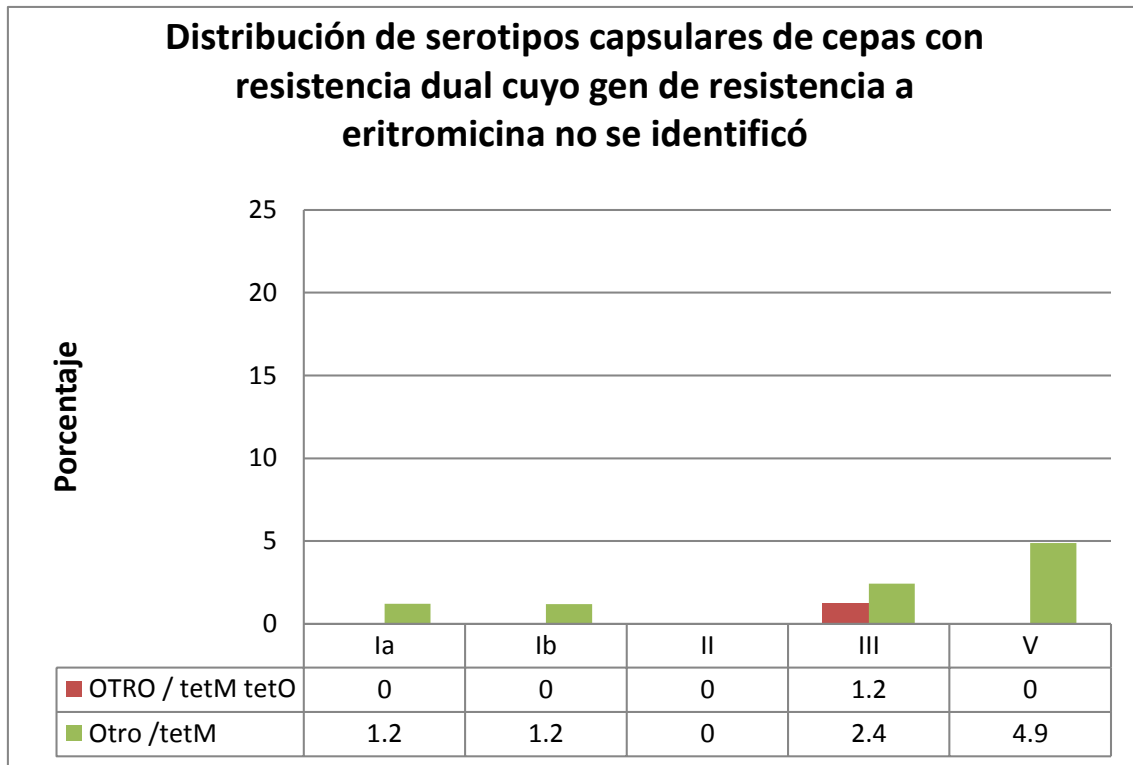


Figura 25. Serotipos capsulares de cepas con resistencia dual cuyo gen asociado con la resistencia a eritromicina no pudo determinarse en el laboratorio.

La figura 26 muestra que más del 40% de las cepas con resistencia dual, poseen los genes *ermB* y *tetM*, además estas mismas cepas pertenecen a los serotipos **III** o **V**, teniendo una distribución muy similar entre ellos, con una diferencia del 1%.

Distribución de serotipos capsulares de acuerdo a las combinaciones de genes de resistencia más frecuentes

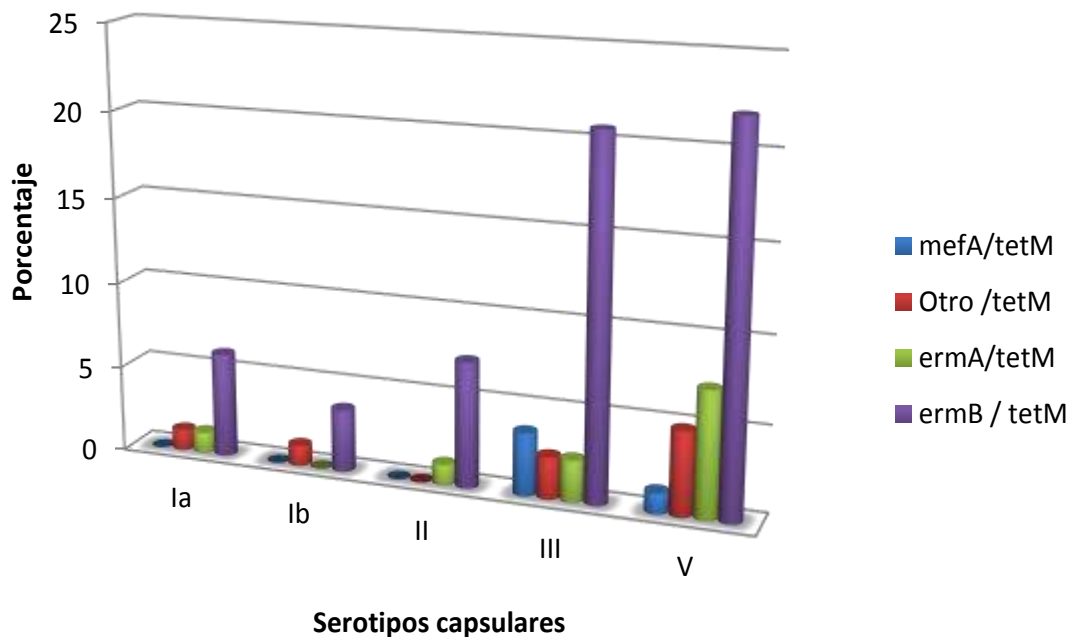


Figura 26. Comparación de los serotipos capsulares encontrados y la distribución de genes de resistencia a eritromicina y tetraciclina.

En la figura 27 se pueden observar todos los serotipos capsulares que se determinaron para las cepas de *S.agalactiae* seleccionadas para el estudio.

Para las muestras faríngeas, el serotipo capsular que más se presentó fue el **Ia** con el 4% y no se registraron cepas con serotipo capsular **III**, mientras que para las cepas de diversos orígenes, el serotipo capsular más frecuente fue el **III** con el 4%. (figura 28).

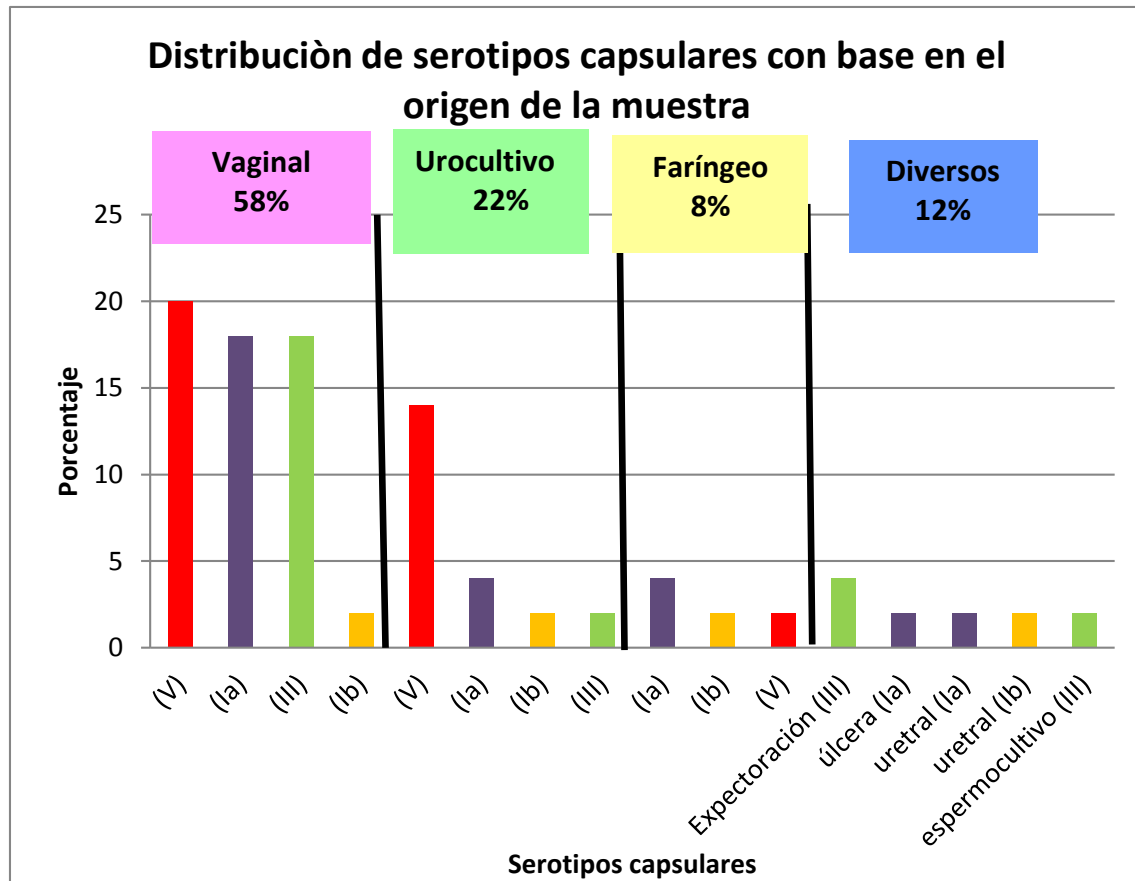


Figura 28. Gráfico de distribución de serotipos capsulares de acuerdo al origen de la muestra.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Análisis de pruebas de susceptibilidad

Del universo de cepas de *S.agalactiae* que se ha analizado en el laboratorio, el porcentaje de resistencia a eritromicina es del 5.0%, este porcentaje es mayor al 4.0% de cepas resistentes reportado en 2004 para una población de mujeres embarazadas en México, por lo que no se reportan cambios significativos de cepas resistentes a eritromicina en la población mexicana en un periodo de 8 años. Este porcentaje es menor que en Taiwán (65%)⁽¹⁾, Francia (25%)⁽³⁸⁾, E.U.A (38%)⁽¹⁾ donde se observa que la resistencia a eritromicina está presente en porcentajes mucho más alarmantes.

En el caso de la resistencia a tetraciclina, el 90% de las cepas del laboratorio fueron resistentes al antibiótico, este porcentaje es mayor al reportado en Francia e India, en donde las cepas resistentes a tetraciclina fueron el 72%⁽³⁸⁾ y 71.4%⁽⁴⁸⁾ respectivamente.

9.2 Análisis de resultados del grupo I. Cepas resistentes solo a eritromicina

Como se muestra en la figura 11, para cepas de *S. agalactiae*, provenientes de aislamientos clínicos de pacientes mexicanos, resistentes a eritromicina, la distribución de genes asociados a dicha resistencia presenta una tendencia muy marcada hacia el gen *ermB* (55%), mientras que es nula para el gen *ermA*. La otra parte de la población se distribuye de manera casi equitativa para el gen *mefA* (20%) y para otros genes que no fueron determinados en el laboratorio (25%).

Los porcentajes encontrados se compararon con los porcentajes obtenidos en Francia (21% *ermB*, 35% *ermA* y 35% *mefA*)⁽³⁸⁾ en donde a diferencia de lo encontrado para cepas mexicanas, el gen que menos se asoció a la resistencia a eritromicina fue el gen *ermB*; en este mismo estudio en Francia no se menciona el otro 9% faltante. En España, los reportes que se tienen demuestran que el gen que se asocia en la mayoría de las cepas a la resistencia a eritromicina es el gen *ermB*.⁽²⁾

En cuanto a los serotipos capsulares, las figuras 12, 13 y 14 muestran que el 60% de las cepas cuyos genes de resistencia si fueron determinados, pertenecen a los serotipos **III** (30%) y **V** (30%); para las cepas que tienen genes de resistencia diferentes a *ermB*, *ermA* y *mefA*, los serotipos más comunes fueron el **Ia** y el **V** (ambos con 10%).

El serotipo **III** se presentó en un 35%; similar a lo encontrado en países como Francia (28.4%)⁽³⁸⁾ y Taiwán (28.5%)⁽⁵²⁾, fue el que se reportó en la mayoría de los casos.

En Taiwán⁽⁵²⁾, el segundo serotipo más comúnmente encontrado fue el **V** (27.1%) y en tercer lugar el **Ia** (12.7%), a diferencia de las cepas mexicanas, el **V** fue el más común con un 40% y el **Ia** el tercero con 20%.

En Francia el segundo serotipo más común fue el **Ia** (25.5%)⁽³⁸⁾ y en tercer lugar el **V**(17.6%)⁽³⁸⁾. Al igual que en México, en Italia el serotipo más común fue el **V**, con un 56.8%.⁽¹³⁾⁽¹⁵⁾

9.3 Análisis de resultados del grupo II. Cepas resistentes solo a tetraciclina

La distribución de los genes asociados con la resistencia a tetraciclina, puede observarse claramente en la figura 16, en donde se demuestra que casi el total (98%) de las cepas resistentes a tetraciclina presentan el gen *tetM*, ya sea solo (85%) o en combinación con el gen *tetO* (*tetM* / *tetO* 13%), mientras que el gen *tetO* como único gen de resistencia se encontró solamente en el 2%.

Al igual que en Francia⁽⁴⁰⁾ y en Italia⁽¹⁵⁾ el gen que más se asoció a la resistencia a tetraciclina fue el *tetM*, presente en el 93.6% de los casos.

En las figuras 17, 18 y 19 se puede observar la distribución de las cepas resistentes a tetraciclina en los diferentes serotipos capsulares, siendo esta muy similar en cepas con solo el gen *tetM* para los serotipos **Ia** (24%), **III** (25%) y **V** (28%).

Para las cepas que presentaron tanto el gen *tetM* como el gen *tetO* la distribución presentó una mayor tendencia hacia el serotipo **V** con un 7%, mientras que para **Ia** y **III** fue de 3% en ambos casos.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados en Francia para el serotipo **Ia** (25.5%)⁽³⁹⁾, sin embargo difieren un poco para el serotipo **III** que fue el que más se reportó en cepas francesas (28.4%)⁽⁴⁰⁾ y finalmente son muy diferentes para el serotipo **V** (17.6%)⁽⁴⁰⁾. En Italia, el serotipo que más se reportó fue el **III**.⁽¹³⁾

9.4 Análisis de resultados del grupo III. Cepas con resistencia dual

En un estudio en Francia, para el 93.6% de las cepas, el gen asociado con la resistencia a tetraciclina fue el gen *tetM*⁽³⁹⁾ mientras que para la

resistencia a eritromicina, los porcentajes de los genes de resistencia presentes (*ermA* 35%, *mef* 35%, *ermB* 21%)⁽³⁸⁾ variaron mucho comparados con los de cepas mexicanas, en las cuales el gen *ermB* fue el más común (68.3%), para el gen *ermA* se obtuvo un porcentaje de 13.4%, para genes *mefA* se obtuvo un 7.3% y finalmente para cepas resistentes a eritromicina pero cuyo gen asociado a dicha resistencia no fue ninguno de los mencionados anteriormente se obtuvo un 11%.

De estas cepas, los resultados reportados en Francia para los serotipos capsulares fueron⁽³⁸⁾: **III** (83%), **Ia** (11%) y **Ib** (6%); en México, el serotipo **V** se encontró en el 40.3% de las cepas, el **III** en 34.1%, el **Ia** en 9.8% , el **II** en 9.7% y finalmente el **Ib** en 6.1%.

Como se observa en la figura 22 la frecuencia en las que se encontró el serotipo **V** fue similar a la del serotipo **III** para la combinación de genes *ermB/tetM* pero fue muy diferente respecto a la frecuencia determinada para la combinación de genes *ermB/tetM/tetO* que fue del 5% para el serotipo **V** y de 1.2% para el serotipo **III**.

Como se muestra en la figura 26, los genes que se encuentran en la mayoría de las cepas mexicanas con resistencia dual son los genes *tetM* y *ermB*. Los serotipos capsulares de estas mismas cepas suelen ser **III** o **V** en la mayoría de los casos.

9.5 Análisis del origen de procedencia de la muestra y su asociación con los serotipos capsulares

En este estudio se encontró que los serotipos para muestras vaginales fueron el **III**, **Ia**, **V** y **Ib**, sobresaliendo solo un poco más el serotipo **V**, ya que **Ia** y **III** se encontraron en la misma proporción, mientras que **Ib** en menos del 5% de las muestras. En urocultivos se encontraron los mismos serotipos capsulares que en vaginales pero la proporción de

estos fue diferente manteniéndose el **V** como el más prevalente pero seguido del **Ia** y finalmente del **III** y **Ib**; el **Ib** se encontró en urocultivos y muestras faríngeas pero en ambos casos en porcentajes menores al 5% (figura 28)

En el caso de las muestras faríngeas, el serotipo más prevalente fue el **Ia** con menos del 5% seguido de los serotipos **Ib** y **V** ambos en la misma proporción; el serotipo **III** fue el que se encontró mayoritariamente en muestras de orígenes diversos, para estas muestras no se encontró el serotipo **V** (figura 28).

10. CONCLUSIONES

- En cepas resistentes solo a eritromicina se identificaron los genes *ermB* y *mefA*, estando el gen *ermB* asociado a la resistencia a macrólidos en un 55% de las cepas.
- Se detectó que un 25% de cepas de *Streptococcus agalactiae* resistentes a eritromicina presenta un gen de resistencia a macrólidos diferente a los genes *ermB*, *ermA* y *mefA*.
- El 75% de cepas resistentes solo a eritromicina pertenecen a los serotipos capsulares **III** o **V**.
- En cepas resistentes solo a tetraciclina, el gen asociado a dicha resistencia fue el gen *tetM* en 98% de las cepas.
- Los tres serotipos capsulares más frecuentes en cepas resistentes solo a tetraciclina fueron los serotipos capsulares **Ia**, **III** y **V**.
- De las cepas con resistencia dual, el 68.3% de las cepas presentó el gen *ermB* y el gen *tetM*, de ellas el 8.5% presentó también el gen *tetO*.
- La distribución de serotipos en cepas con resistencia dual no muestra un comportamiento azaroso ya que la mayoría de estas cepas pertenecen a los serotipos **III** y **V**.
- En muestras de origen vaginal y urocultivos se detectaron los serotipos capsulares **Ia**, **Ib**, **III** y **V**, siendo en ambos casos el serotipo **V** el más prevalente. El serotipo **Ia** fue el más prevalente en muestras faríngeas y el serotipo **III** fue el más prevalente en muestras de orígenes diversos.

11. REFERENCIAS

1. Abarzúa F.C., Arias A.E., García P.C., Ralph C.T., Cerda J.L., Riedel I.K., Gárate C.O. Aumento de resistencia de *Streptococcus agalactiae* vaginal-anal en el tercer trimestre de gestación a eritromicina y clindamicina al cabo de una década de tamizaje universal. Rev Chil Infect 2011; 28 (4): 334-337
2. Ardanuy C, Tubau F, Liñares J, Domínguez MA, Pallarés R, Martín R, et al. Distribution of subclasses *mefA* and *mefE* of the *mefA* gene among clinical isolates of macrolide-resistant (M-phenotype) *Streptococcus pneumoniae*, viridans group streptococci, and *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:827-829.
3. Artiles F., Cañas A., Álamo I., Lafarga B. Fenotipos y mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas en aislados de *Streptococcus agalactiae* con significación clínica en un período de ocho años (2002-2010). Rev Esp Quimioter 2012; 25(1):42-46
4. Banks D., Porcella S., Barbian K., Martin J., Musser J. Structure and Distribution of an Unusual Chimeric Genetic Element Encoding Macrolide Resistance in Phylogenetically Diverse clones of Group A Streptococcus. J Infect Dis. 2003; 188:1898-1908.
5. Balter S., Schuchat A., Whitney C.G. Epidemiology of Group B Streptococcal infections. p.154-162. In: Fischetti V .A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. (ed). Gram-Positive Pathogens. 2000. ASM Press, Washington, D.C.
6. Barbadoro P., Marigliano A., Savini S., D'Errico M.M., Prospero E. Group B streptococcal sepsis: an old or ongoing threat? Am J Infect Control 2011; 39: 45-48
7. Bergseng H., Radtke A., Lyng R.V., Bergh K. Epidemiology and characterization of invasive *Streptococcus agalactiae* (GBS) strains in Norway during the last decade. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 8. Group B streptococcal infections. p.53. June 2008. Porto Heli, Grecia.

8. Betriu C., Culebras E., Rodriguez-Avial I., Gomez M., Sanchez B.A., Picazo J.J. In vitro activities of tigecycline against erythromicine-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*: mechanisms of macrolide and tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1):323-325.
9. Brzychy-Wloch M., Gosiewski T., Bodaszewska M., Bulanda M., Kochan P., Strus M., Heczko PB. Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance. *J Med Microbiol* 2010; 59:780-786.
10. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Mcrobiol Mol Biol Rev.* 2001; 65:232-236.
11. Clancy J., Petitpas J., Dib-Hajj F., Yuan W., Cronan M., Kamath A., Bergeron J., Retsema J. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol.Microbiol.* 1996; 22(5):867-879.
12. 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.
13. Creti R., Berardi A., Gherardi G., Imperi M., Baldassarri L., Pataracchia M., Recchia S., Orefici G. Group B Streptococcus (GBS) neonatal infections: virulence characteristics and molecular epidemiology of Strains From a Pilot study in Italy. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 7. Group B streptococcal infections. p.53. June 2008. Porto Heli, Grecia.
14. 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 Chemoter* 2001; 45(12):3504-3508.
15. De Francesco M.A., Caracciolo S., Gargiulo F. Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-

resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. DOI 10.1007/s10096-011-1495-4.

16. Deutscher, M., Lewis M., Zell E.R., Taylor Jr. T.H., Van Beneden C., Schrag S. Incidence and Severity of Invasive *Streptococcus pneumoniae*, Group A Streptococcus, and Group B Streptococcus Infections Among Pregnant and Postpartum Women. Streptococcal Infections in Pregnancy CID 2011:53).

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):5899-5906.

18. Duarte R.S., Bellei B.C., Miranda O.P., Brito M.A., Teixeira L.M. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B Streptococci recovered from bovine and human sources. Antimicrob Agent Chemother. 2005; 49(1):97-103.

19. Ferrieri P., Flores A.E., Lynfield R. Invasive disease due to Group B Streptococcus Serotype V. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 8. Group B streptococcal infections. p.284. June 2008. Porto Heli, Grecia.

20. Ferrieri P., Flores A.E., Hillier S.L. Group B Streptococcal (GBS) Colonization in nonpregnant women enrolled in a GBS III-TT vaccine trial. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 7. Group B streptococcal infections. p.49. June 2008. Porto Heli, Grecia.

21. Fischetti V. et al. Gram positive pathogens. ASM Press. Washington, D.C. 2000: 125-162

22. González P., Barreto P., Rodríguez R., Alonso L., Alonso P. *Macrólidos*. Acta Médica. 1998; 8(1):71-74.

23. González Pedraza A., Ortiz Z., Mota V. Serotypes and antimicrobial susceptibility of group B Streptococcus from pregnant women in Mexico. Rev Latinoam Microbiol. 2002; 44:133-136.

24. Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de a terapéutica. 9ª. Ed. México, McGraw-Hill Interamericana, 1996: 1205-1207.
25. Gottlieb D., Shaw P. Antibiotics, Biosynthesis. Vol.II, 1ª. Ed. USA, Edit. Springer-Verlag N. Y. Inc. 1967:155-180.
26. Katzung B.G. Farmacología básica y clínica. 10ª Ed. México, Manual moderno. 2004: 771-779
27. Lindahl G., Staºlhammar-Carlemalm M., Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clinical microbiology reviews, Am Soc for Microbiol. 2005; 18:102–127
28. Leclercq R., Courvalin P. Bacterial resistance to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin Antibiotics by Target Modification. Minireviews. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(7):1267-1272.
29. Mankeshwar A., Karmarkar M., Nayar A., Deshpande V., Santosh K., Rathod D., Mehta P. Epidemiological study of group B streptococci in Mumbai. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 8. Group B Streptococcal infections. p.286. June 2008. Porto Heli, Grecia.
30. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. American Society for Microbioloy. Organización Panamericana de la Salud. 2005.
31. 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):566-568.
32. 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.
33. 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.
34. Opavski N., Smitran A., Petkovic M., Mijac V., Ranin L. Isolation rate and antibiotic susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolates

from pregnant women in Belgrade. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 3. Molecular epidemiology of Antimicrobial Resistance. p.166. June 2008. Porto Heli, Grecia.

35. Perea L.M., Monroy I., Ramírez N., Juárez S., Tobias M., Inzunza A.E., Garza R. Distribution of capsular serotypes of GBS isolated from different sources in Mexico. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 8. Group B streptococcal infections. p.166. June 2008. Porto Heli, Grecia.

36. Perea Mejía L.M. Streptococcus. p.173-184. En Tay J., Manjarrez M.E., Molina, J. Microbiología Bacteriología y Virología. 1ª Ed. 2010. Méndez editores. México.

37. 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):794-797.

38. Poyart C., Réglie-Poupet H., Tazi A., Morand P., Brochet M., Billoet A., Dmytruk N., Trieu-Cuot P. Group B streptococcal invasive disease in non-pregnant adult: a one-year survey by the French National Reference Centre of Streptococci. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 7. Group B streptococcal infections. p.51. June 2008. Porto Heli, Grecia.

39. Poyart C., Tazi A., Réglie-Poupet H., Billoet A., Dmytruk N., Bidet P., Bingen E., Raymond J., Trieu-Cuot P. Clinical characteristics, serotypes, genotypes and antibiotic resistance of group B streptococci causing neonatal infections in France in 2007. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 8. Group B streptococcal infections. p.285. June 2008. Porto Heli, Grecia.

40. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A.(ed). Microbiología. 4^{ta} Ed. 1999. McGraw-Hill. p.699-719.

50. Weisblum B. Resistance to the Macrolide-Lincosamide-Streptogramin Antibiotics. 694-710. In:Fischetti V., Novick R., Ferretti J., Portnoy D., Rood J. (ed). Gram-Positive Pathogens. 1^a .Ed. 2000. ASM Press, Washington, D.C.

51. Zachariadou L., Charissiadou A. h., Stathi A., Petropoulou N., Raftopoulou A., Chrisaki K., Petridou E., Chronopoulou G., Pangalis A. Trebling of invasive *Streptococcus agalactiae* neonatal infections during 2007- Dominance of serotype III the last twelve years in Greece. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal diseases. Abstract Book. Session 8. Group B streptococcal infections. p.287. June 2008. Porto Heli, Grecia.

52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11453594>. Ko WC., Lee HC., Wang LR., Liu AJ., Wu JJ. Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B Streptococcus over an eight-year period in southern Taiwan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.