



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

Caracterización de aislamientos clínicos de estreptococos *beta*-hemolíticos de grupo C y G. Tipificación del gen *emm* y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Paola Gómez Nava



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: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: Profesor: LUIS MANUEL PEREA MEJÍA

1er SUPLENTE: Profesor: ROSALÍA GUEVARA LEONEL

2º SUPLENTE: Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR

SUPERVISOR

TECNICO

M. en C. Luis Manuel Perea Mejía

M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel

SUSTENTANTE

Paola Gómez Nava

Agradecimientos

Estos años de esfuerzo culminan con la realización de esta tesis, sin el apoyo de ustedes mis padres, Laura y Javier, además del apoyo de Arturo, este proceso no hubiese sido llevadero, no solo el apoyo económico es lo que les agradezco, su apoyo incondicional en todas las cosas que emprendi en estos años, y sobre todo por la gran mujer que ayudaron a crecer, muchas de las cosas que eh logrado ha sido por eso, por la fortaleza que me inculcaron desde pequeña, y a pesar de que algunas veces quise caerme siempre estuvieron ahí para levantarme.

A Gustavo, amor, eres uno de los principales motores de mi vida, no me queda mas que darte las gracias por tu paciencia, por la tranquilidad que me das en los momentos más difíciles, y por haber estado ahí cuando más débil fui, sin ese apoyo quizás esto no estuviera pasando.

A mis amigos, que en las buenas, en las malas y en las peores siempre estuvieron ahí, los quiero y les agradezco haber estado ahí, y espero estemos ahí siempre.

Luis Manuel Perea Mejía y Alma Inzunza, gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por su paciencia, apoyo y tiempo dedicado a este trabajo.

A la Dra. Laura Ongay y la Química Guadalupe Codiz del Instituto de Fisiología Celular, gracias por las secuencias obtenidas para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	3
3. LISTA DE ABREVIATURAS	6
4. ANTECEDENTES.....	9
4.1 Estreptococos.....	9
4.2 Estreptococos de los grupos C y G.....	12
4.2.1 <i>Streptococcus milleri</i>	13
4.2.2 <i>Streptococcus equi</i>	14
4.2.2.1 <i>Streptococcus equi</i> subsp <i>equi</i>	14
4.2.2.2. <i>Streptococcus equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i>	15
4.2.3 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	16
4.2.3.1 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp <i>equisimilis</i>	16
4.2.3.2 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp <i>dysgalactiae</i>	16
4.3 Factores de patogenicidad.....	17
4.3.1 Mecanismos de adhesión.....	17
4.3.1.1 Proteínas de unión a fibronectina.....	17
4.3.1.2 Proteínas de unión a fibrinógeno.....	18
4.3.1.3 Otras proteínas de unión.....	19
4.3.2 Factores antifagocíticos.....	20
4.3.2.1 Proteína M y semejantes a M.....	20
4.3.3 C5a peptidasa.....	22
4.3.4 Factores específicos.....	22
4.4 Antibióticos.....	24
4.4.1 Antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular.....	26
4.4.2 Antibióticos que dañan la membrana citoplásmica.....	26
4.4.3 Antibióticos que interfieren con la síntesis de proteínas.....	26
4.4.4 Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.....	28
4.4.5 Inhibidores de rutas metabólicas (síntesis de ácido fólico).....	28
4.5 Resistencia a antibióticos.....	29
4.5.1 Resistencia en estreptococos grupo C y G.....	31

4.6 Susceptibilidad antimicrobiana.....	32
4.6.1 Interpretación del antibiograma.....	34
5. HIPÓTESIS.....	35
6. OBJETIVO.....	35
6.1 Objetivos particulares.....	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
7.1 Selección y manejo de cepas analizadas.....	36
7.2 Pruebas de susceptibilidad a diversos antibióticos.....	37
7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	38
7.4 Digestión enzimática del producto de la PCR del gen <i>emm</i>	43
7.5 Caracterización molecular y subtipificación de las cepas.....	44
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	47
8.1 Origen de los aislamientos clínicos.....	47
8.2 Susceptibilidad antimicrobiana.....	48
8.3 Aislamiento del ADN.....	51
8.4 Amplificación del gen <i>emm</i>	51
8.5 Identificación del alelo del gen <i>emm</i> (tipo M) en estreptococos de los grupos C y G.....	53
8.6 Relación entre la presencia o no del gen <i>emm</i> que codifica para la proteína M con la susceptibilidad antimicrobiana.....	64
9. CONCLUSIONES.....	67
10. BIBLIOGRAFIA.....	69

1. INTRODUCCIÓN

Los estreptococos son microorganismos *grampositivos* que a menudo aparecen formando cadenas o pares; son anaerobios facultativos, catalasa-negativa y se subdividen en grupos mediante anticuerpos que reconocen a los antígenos de superficie (Clasificación de Lancefield).

De acuerdo con su crecimiento en agar sangre de carnero se les puede clasificar según a su comportamiento hemolítico como *alfa*, *beta* y no hemolíticos. La hemólisis *alfa* se refiere a una lisis parcial de eritrocitos, que manifiesta una coloración verde alrededor de las colonias; en la hemólisis *beta* se observa una zona clara e incolora producida por la lisis total de los eritrocitos alrededor de la colonia. Los estreptococos del grupo A, B, C y G son *beta* hemolíticos. Los estreptococos de los grupos C y G de Lancefield presentan residuos inmunodeterminantes de N-acetilgalactosamina y ramnosa, respectivamente, en las cadenas laterales de oligosacáridos de los antígenos de la pared celular. Las especies pertenecientes a estos grupos pueden afectar a humanos y animales y han sido aisladas de piel, nariz, garganta, vagina y tracto gastrointestinal, en donde están presentes como flora oportunista.

Los aislamientos de estreptococos de los grupos C y G pueden compartir con *S. pyogenes* no solo la presencia de la proteína M y proteínas semejantes a M, sino también exotoxinas superantigénicas, proteínas de unión a fibronectina, estreptocinasa y C5a peptidasa. Actualmente la tipificación de la proteína M se realiza por técnicas moleculares mediante el análisis del gen *emm*.

El objetivo general de este trabajo fue determinar el perfil de resistencia a antibióticos de 139 aislamientos clínicos de estreptococos de los grupos C y G, y se relacionó con la presencia/ausencia del gen *emm* o de su alelo. Encontramos un alto porcentaje de cepas resistentes a tetraciclina y un número significativo con resistencia a ceftibuteno y a oxacilina. Un 57% de las cepas estudiadas contienen el gen *emm*, los tipos *stg653* y *stg485* fueron los más comunes.

2. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura de proteína M donde se representan las dos cadenas con las regiones A, B, C e hipervariable	21
Figura 2. Modo de acción de los principales agentes quimioterapéuticos antimicrobianos.....	25
Figura 3. Diagrama de temperaturas empleadas en la PCR para la amplificación del gen <i>emm</i>	42
Figura 4. Origen clínico de las cepas de estreptococos analizadas en el estudio..	47
Figura 5. Prevalencia de resistencia antimicrobiana de estreptococos registrada por grupo.....	48
Figura 6. Fotografía digital de corrimiento electroforético de ADN extraído con kit DNeasy de QIAGEN.....	51
Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR del gen <i>emm</i>	52
Figura 8. Representación gráfica de los resultados positivos para el gen <i>emm</i> separado por grupos.....	53
Figura 9. Corte enzimático gen <i>emm/Ddel</i> en estreptococos de grupo G.....	54
Figura 10. Frecuencia de los tipos M encontrados en cepas estudiadas.....	56
Figura 11. Porcentajes de los alelos para el gen <i>emm</i> encontrados en las cepas estudiadas.....	56
Figura 12. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . tipo <i>stG653</i>	57
Figura 13. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . A. tipo <i>stG840</i> y B. tipo <i>stC36</i>	58
Figura 14. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . tipo <i>stC839</i>	59
Figura 15. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . tipo <i>stG643</i>	59

Figura 16. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . tipo <i>stG480</i>	60
Figura 17. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . tipo <i>stG485</i>	61
Figura 18. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . tipo <i>stG2574</i>	61
Figura 19. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . A tipo <i>stG6792</i> , B tipo <i>stG4831</i>	62
Figura 20. RFLP's de los productos de PCR del gen <i>emm</i> cortados con la enzima <i>Ddel</i> . Alelos encontrados en una solo cepa. A sin referencia, B con referencia....	63

TABLAS

Tabla 1. Aminoglúcidos del carbohidrato específico de los principales grupos de Lancefield en estreptococos.....	11
Tabla 2. Proteínas de unión a fibronectina descritas en estreptococos de grupo C y G.....	18
Tabla 3. Factores de patogenicidad descritos de los grupos C y G de estreptococos.....	24
Tabla 4. Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana.....	32
Tabla 5. Antibióticos utilizados para las pruebas de susceptibilidad y su concentración por disco.....	37
Tabla 6. Criterios para la interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad aplicadas a los estreptococos hemolíticos (CLSI).....	38
Tabla 7. Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR para determinar el gen asociado a la presencia de proteína M.....	40
Tabla 8. Mezcla de reacción para amplificar gen <i>emm</i>	41
Tabla 9. Mezcla de reacción preparada para cortar gen <i>emm</i>	43

Tabla 10. Prevalencia y porcentaje resistencia en las cepas de los grupos C y G.....	48
Tabla 11. Alelos del gen <i>emm</i> determinados para las cepas de los grupos C y G.....	55
Tabla 12. Resultados de resistencia asociada a presencia del gen <i>emm</i>	64
Tabla 13. Distribución de la resistencia en cepas no tipificables.....	65

3. LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µL	Microlitro
ADN (DNA)	Ácido Desoxirribonucleico
AE	Buffer de Elusión
AL	Buffer de Lisis
AW ₁	Buffer de lavado 1
AW ₂	Buffer de lavado 2
AMH	Agar Mueller Hinton
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP's	Desoxinucleótidos Trifosfatados
GCS	Estreptococo de Grupo C
GGG	Estreptococo de Grupo G

IFC	Instituto de Fisiología Celular
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MLS	Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
cMLS	Resistencia constitutiva a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
iMLS	Resistencia inducible a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
ng	Nanogramo
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular, Marcador de Peso Molecular

RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
RNA (ARN)	Ácido Ribonucleico
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
tRNA	Ácido Ribonucleico de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
TBE	Buffer de Tris-Boratos-EDTA
TH	Todd-Hewitt
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta

4. ANTECEDENTES

4.1 Estreptococos

Los estreptococos integran un género de bacterias *grampositivas* pertenecientes a la familia *Streptococcaceae*, descrita por primera vez en 1874 por Billroth ^(8,54).

Existen alrededor de 20 especies de estreptococos, entre los que destacan, debido a una mayor virulencia *Streptococcus pyogenes* (grupo A de Lancefield), *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *Streptococcus pneumoniae*⁽⁵⁴⁾. Dados los fines del presente trabajo resultan importantes las especies *Streptococcus equi* (grupo C), *Streptococcus zooepidemicus* (grupo C) y *Streptococcus dysgalactiae* (grupo G).

Los estreptococos (*Strep*=cadena; *coccus*=cocos) son organismos *grampositivos* que a menudo aparecen formando cadenas o pares. El grosor de su pared celular va de los 20 a los 40 nm y está constituida por una gruesa capa de peptidoglicano, ácido lipoteicoico, carbohidratos específicos de grupo y algunos poseen proteínas antigénicas como M, T, R y G ^(7, 45, 51). Son anaerobios facultativos, algunas especies requieren de un ambiente con 5-10% de CO₂ ⁽³⁹⁾, y su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C ⁽⁸⁾.

Los estreptococos son clasificados con base a su morfología colonial, tipo de hemólisis, reacciones bioquímicas y especificidad serológica de los carbohidratos de su pared celular. Comparten las características de ser no formadores de esporas y catalasa negativa, la presencia de cápsula es variable y en su mayoría son inmóviles, oxidasa negativa y reducción de nitratos negativa ⁽³⁶⁾.

Las colonias de estreptococos son grisáceas, aunque pueden existir algunas con coloración ligeramente rojiza; su consistencia llega a ser desde dura hasta butirácea, pueden ser planas o convexas y su tamaño es muy variable, se pueden encontrar desde 1 hasta 4 mm de diámetro.

Para el aislamiento de los estreptococos se requiere base de agar sangre con 5% de sangre de carnero (Agar Sangre), debido a que éste es un medio libre de azúcares reductores, lo cual es de vital importancia para el desarrollo y producción de hemólisis de dichas bacterias nutricionalmente exigentes ^(21,39, 54).

Después del crecimiento en agar sangre se puede clasificar de acuerdo a su comportamiento hemolítico en *alfa*, *beta* y no hemolítico (clasificación propuesta por Brown en 1919⁽⁴⁰⁾). La correcta identificación de la hemólisis es importante para la clasificación inicial de los estreptococos. La hemólisis alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado biliverdina). La hemólisis *beta* se refiere a un halo de hemólisis completamente claro, dicho comportamiento depende de la producción de una o de dos hemolisinas extracelulares llamadas estreptolisinas ⁽⁶⁰⁾, estas pueden ser la estreptolisina S que es no inmunogénica y estable en presencia de oxígeno, y la estreptolisina O que es inmunogénica y lábil al oxígeno. De esta manera los estreptococos β -hemolíticos son aquellos que producen tanto la estreptolisina O como la S, los α -hemolíticos sólo producen la estreptolisina S, y los *gamma* o no hemolíticos aquellos que no producen ninguna estreptolisina.

Una de las propiedades antigénicas más importantes de los estreptococos es manifestada por el carbohidrato C, el cual forma parte de su pared celular y es específico para cada grupo (grupo de Lancefield, clasificación establecida en 1938 y actualmente con 18 grupos); dicho carbohidrato se puede extraer enzimáticamente para detectar el grupo al que pertenece un estreptococo a través de una prueba de coaglutinación. En esta prueba, se emplean sueros que contienen anticuerpos de conejo unidos a partículas de látex, los cuales están dirigidos en contra de esos carbohidratos; los más utilizados por ser los que se encuentran con mayor frecuencia en muestras clínicas, son anticuerpos contra los grupos A, B, C, D, F y G ^(8, 39). La especificidad serológica del carbohidrato está determinada por un aminoglúcido ⁽⁴⁴⁾ (Tabla 1).

Tabla 1. Aminoglúcidos del carbohidrato específico de los principales grupos de Lancefield en estreptococos.

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

Para poder actuar como patógenos los estreptococos se deben adherir, colonizar e invadir al tejido blanco. Para lograr una colonización eficaz, las bacterias unen

sus adhesinas a los receptores localizados sobre las células blanco (hospedero), seguido de la estimulación de las vías de señalización intracelular para inducir la adherencia, colonización e invasión de las células epiteliales.

4.2 Estreptococos de los grupos C y G

El carbohidrato C de los grupos C y G presenta aminoglúcidos de ramnosa-N-acetilgalactosamina y ramnosa, respectivamente. Las especies estreptocócicas de los grupos C y G se clasifican morfológicamente en dos categorías, basadas en el tamaño de la colonia:

Colonias pequeñas:

- Streptococcus anginosus*
- Streptococcus milleri* { *Streptococcus constellatus*
- Streptococcus intermedius*

Estas especies son comensales comunes de la cavidad oral humana, y de los tractos gastrointestinal y genitourinario ⁽⁵⁶⁾.

Colonias grandes o largas:

- Streptococcus equi* { *Streptococcus equi* subsp. *equi*
- Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

- Streptococcus dysgalactiae* { *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*
- Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Estas últimas pueden causar bacteremia, peritonitis, artritis séptica, neumonía y meningitis ^(3, 6, 62). Cabe mencionar que, dentro de las colonias grandes, las especies pertenecientes a *Streptococcus equi*, son exclusivas del grupo C, mientras que las de *Streptococcus dysgalactiae* pueden ser grupo C o grupo G, lo que va a depender del carbohidrato C presente en su pared celular.

Por convención, las especies de colonias pequeñas son nombradas por su subespecie, es decir: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*. Análogamente las que producen colonias grandes son mencionadas como *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equisimilis* ⁽¹⁶⁾.

4.2.1 *Streptococcus milleri*

Agrupar una variedad de estreptococos que están relacionados con infecciones piogénicas, se incluyen especies hemolíticas como no hemolíticas, las cepas de estas especies pueden presentar antígenos de los grupos de Lancefield A, C, F, y G. Las características generales que comparten las especies pertenecientes a este grupo son: producción de acetoina, es decir son Voges-Proskauer positivo; fermentan: trehalosa, salicina y sacarosa; hidrolizan: esculina y arginina ^(1, 18, 22, 42). La fermentación de rafinosa, melibiosa y manitol es variable ⁽⁵⁶⁾. La presencia de bajas cantidades de CO₂ estimula su crecimiento, desarrollan mejor en ambientes anaerobios y su temperatura óptima es de 37°C, pero dado el tamaño de sus colonias es recomendable incubarlos por 48 h para lograr una mejor observación.

La diferencia entre *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*, está dada por la fermentación de lactosa, donde *S. intermedius* es el único que puede llevar a cabo dicha fermentación ⁽⁵⁶⁾.

En agar sangre, las colonias de las especies que forman este grupo son aproximadamente de 0.5 mm de diámetro y pueden ser lisas o rugosas ⁽³⁵⁾. Todas forman parte de la microbiota bacteriana humana, pero pueden causar enfermedades tales como: abscesos hepáticos y cerebrales, principalmente en personas con alguna inmunodeficiencia. Debido a los lugares donde estas especies se pueden encontrar, una infección causada por ellas y no tratada a tiempo puede resultar en complicaciones graves.

La mayoría de las cepas de *Streptococcus milleri* son resistentes a la bacitracina, nitrofurazona y a las sulfonamidas ⁽⁴⁷⁾. Sin embargo se ha demostrado que son susceptibles a la penicilina, ampicilina, eritromicina y tetraciclina ⁽⁵⁷⁾.

4.2.2 *Streptococcus equi*

Se trata de un grupo de estreptococos β -hemolíticos que producen colonias grandes y cuyo carbohidrato C presenta un aminoglúcido de ramnosa-N-acetilgalactosamina.

4.2.2.1 *Streptococcus equi* subsp. *equi*

Esta especie afecta principalmente a los caballos, pero se han reportado casos clínicos en humanos. A los equinos les provoca una enfermedad llamada “equine

strangles”, la cual es muy contagiosa, infecta principalmente a las vías respiratorias y puede causar la muerte ⁽⁷⁾.

Las colonias de esta especie son mucoides y sin pigmento en agar sangre, con un tamaño mayor a los 0.5 mm de diámetro, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, son anaerobios facultativos y catalasa negativa. La fermentación de carbohidratos por esta especie es rara, aunque algunas veces puede dar positivo para lactosa, hidroliza la arginina y es fosfatasa alcalina positiva ⁽³⁶⁾.

4.2.2.2 *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Estreptococo parte de la microbiota normal de los caballos, se ha encontrado en otros mamíferos tales como: vacas, conejos y puercos ⁽⁵⁾. Se ha logrado aislar también de humanos, principalmente el tracto respiratorio, el hallazgo de este grupo de estreptococos en humanos se puede deber al contacto con los caballos o con alguno de los mamíferos antes mencionados que se encuentre infectado o bien por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar ⁽³¹⁾.

Es un estreptococo β -hemolítico que produce ácido hialurónico pero no estreptolisina O. Es lactosa positiva y capaz de fermentar sorbitol y ribosa, por estas últimas dos características es que se distingue de la especie *Streptococcus equi* subsp. *equi* ^(5,15,55).

Como miembro de los estreptococos del grupo C, este microorganismo es altamente susceptible a la penicilina, ampicilina, nitrofuranos, y a eritromicina ⁽⁵⁾. Por el contrario, es resistente a amikacina, trimetoprim y sulfadiazina ⁽²⁾.

4.2.3 *Streptococcus dysgalactiae*

Conjunto de estreptococos β -hemolíticos donde se agrupan especies pertenecientes a los grupos C y G de Lancefield.

4.2.3.1 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

Especie de estreptococos comensal común en humanos que ocasiona cuadros clínicos similares a los de *Streptococcus pyogenes*: faringoamigdalitis, infecciones en piel y tejidos blandos; cuadros invasivos como fascitis necrosante, síndrome tóxico estreptocócico, bacteriemia y endocarditis ⁽³⁾. Las colonias pertenecientes a este grupo son por lo general mayores a 0.5 mm de diámetro, se desarrollan mejor a una temperatura de 37°C, acidifican la trehalosa y ribosa, son beta-glucuronidasa positiva ⁽²⁰⁾. En esta especie se pueden encontrar ambos grupos de Lancefield, es decir, C y G ⁽¹⁵⁾.

Es común encontrar resistencia hacia antibióticos como cefalosporinas de tercera generación, penicilinas semisintéticas y eritromicina ⁽⁵³⁾.

4.2.3.2 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Especie de estreptococos que actúa como patógeno común en animales principalmente ganado vacuno, causa mastitis y poliartritis, en casos muy raros puede causar meningitis en seres humanos ^(11, 38, 49, 63).

Comparte factores de virulencia con *Streptococcus pyogenes* tales como la cápsula de hialuronato y proteína M ⁽²⁷⁾. Así mismo tiene las características de crecimiento y resistencia de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Sin embargo, en esta especie solo se encuentran estreptococos con el grupo C de Lancefield ⁽¹⁵⁾.

4.3 Factores de patogenicidad

Los grupos C y G de los estreptococos constituyen un conjunto heterogéneo de especies que pueden actuar como comensales comunes en humano sin llegar a ser patógenos o bien como agentes causales de infecciones severas, que dañan órganos y producen altos niveles de mortalidad.

Entre los factores que utilizan especies pertenecientes a estos grupos para infectar al huésped y causar enfermedad se encuentran: estructuras de adhesión que inician el proceso de infección, antifagocíticos que ayudan a la bacteria a evadir el sistema inmune del huésped, aquellos que están implicados de manera sobresaliente en que la bacteria se disemine a través de los tejidos y los que se unen específicamente a componentes del huésped para degradarlo o dañarlo ⁽¹⁶⁾.

4.3.1 Mecanismos de adhesión

La adhesión de los microorganismos al huésped representa una fase crítica en el desarrollo de una infección, regularmente comienza con la localización del tejido seguido de la unión de la bacteria a componentes de la matriz extracelular de las células que forman dicho tejido ^(12,43).

4.3.1.1 Proteínas de unión a fibronectina

Uno de los componentes de la matriz extracelular que es blanco común para los cocos *grampositivos* es la glucoproteína de alto peso molecular llamada

fibronectina, por sí misma es responsable de la adhesión de sustratos en células eucariontes mediante factores específicos de superficie que forman parte de la familia de las integrinas. Interacciona específicamente con otros componentes de la matriz extracelular como: colágeno, fibrina y glucosaminoglucanos.

Al estar presente la fibronectina en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos, así como en el plasma y otros fluidos corporales en su forma soluble, se aprovecha para unirse a células diana específicas ⁽¹⁶⁾. Se ha observado que esta característica de la fibronectina es utilizada por los estreptococos de los grupos C y G para colonizar el tracto respiratorio en humanos, demostrándose en dichos microorganismos la expresión de genes que codifican para proteínas de unión a fibronectina.

Tabla 2. Proteínas de unión a fibronectina descritas en estreptococos grupo C y G.

Organismo	Proteína
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	FnBA
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	FnBB
<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	FNZ
<i>Streptococcus equisimilis</i>	FnB
<i>Streptococcus</i> Grupo C	GfbA

4.3.1.2 Proteínas de unión a fibrinógeno

El fibrinógeno (Fg), es la principal proteína de la coagulación en el plasma, desempeña un papel clave en la coagulación sanguínea y en la trombosis. Es una proteína inducible por estrés; su síntesis es afectada durante la inflamación y en

infecciones sistémicas. La regulación de la expresión de Fg indica que está implicada en la defensa del huésped hacia infecciones.

Es blanco para una gran variedad de bacterias *grampositivas*, cuenta con un par de dominios denominados D y uno llamado E, las especies de los grupos C y G de estreptococos se adhieren al dominio D de dicha proteína, sin embargo el mecanismo por el cual se unen a él es aún desconocido ⁽⁵²⁾.

4.3.1.3. Otras proteínas de unión

Otros mecanismos de adherencia que utilizan los estreptococos de grupo C y G son vía unión a vitronectina y colágeno.

La vitronectina es la glicoproteína de adhesión más asociada a la regulación de la coagulación sanguínea. La unión de dicha proteína en los estreptococos de grupo G se favorece con la presencia de heparina, en los de grupo C no se ha encontrado la causa, lo que sugiere que actúan en diversos dominios de la proteína ⁽¹⁴⁾. Se cree que la unión de los grupos C y G a la vitronectina es semejante a la unión de los estreptococos grupo A con esta proteína, es decir a través de su dominio parecido a hemopexilo ⁽³⁴⁾.

El colágeno es una proteína de matriz que influye en la estructura de los tejidos y está involucrada en la adhesión, proliferación y diferenciación celular, se divide en aproximadamente 14 tipos. Se ha encontrado que el colágeno tipo II favorece la adhesión de *Streptococcus zooepidermicus* a los tejidos que lo contienen aunque dicho mecanismo no se ha descrito a profundidad ⁽⁶⁵⁾.

Se conoce también que hay proteínas de unión para el plasminógeno, sin embargo no se mencionarán en este trabajo dado que este mecanismo de adherencia solo ocurre en el ganado bovino ⁽¹⁵⁾.

4.3.2 Factores antifagocíticos

4.3.2.1 Proteína M y semejantes a M

Uno de los factores de patogenicidad de los estreptococos que contribuye fuertemente con su virulencia es la capacidad que tienen para resistir la fagocitosis. Esta característica les es conferida a través de la proteína M, dicha proteína se identificó y se caracterizó en los estreptococos de grupo A de Lancefield ^(4,23).

La proteína M se compone de dos cadenas polipeptídicas que forman una hélice alfa. Está formada por 4 unidades de repetición (A-D), donde la variación de la unidad A (localizada cercana a la región amino-terminal) es la más importante, en ella se encuentra la especificidad de serotipo, está anclada por el grupo carboxilo a la membrana citoplasmática y, por una secuencia altamente conservada, se extiende a través de la pared celular ^(26,40). Es una molécula fibrilar expuesta en la superficie de la bacteria e impide la opsonización del organismo por la vía alterna del complemento, de este modo se evade la respuesta inmune no específica del huésped. Las bacterias que tienen dicha proteína en su superficie son capaces de sobrevivir y multiplicarse en la sangre.

El evitar la fagocitosis por células polimorfonucleares se basa en la deposición de C3 de la superficie bacteriana. Se sugiere que la interacción específica de la

proteína M con el fibrinógeno y con el factor H del huésped son los responsables de que se afecte la vía alterna del complemento ^(13,25).

La proteína M ayuda a la adhesión e internalización de la bacteria a las células epiteliales de huésped y se une a través de su región C, al factor H sérico, el cual causa la degradación del componente C3b del complemento, evitando de esta manera la opsonofagocitosis de la bacteria.

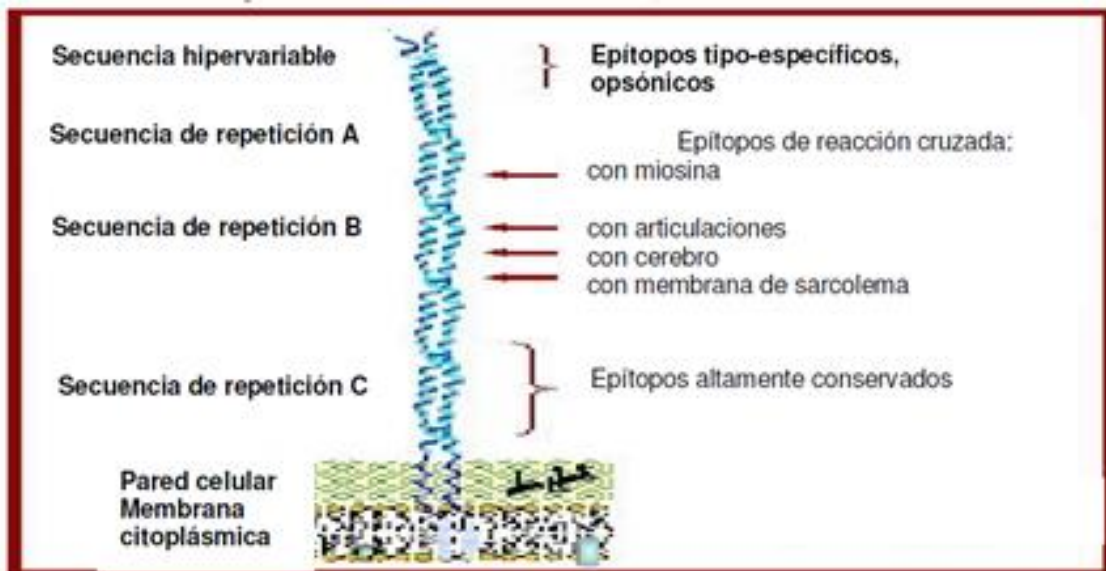


Figura 1. Estructura de proteína M donde se representan las dos cadenas con las regiones A, B, C e hipervariable ⁽²⁶⁾

La proteína M está codificada por el gen *emm* ⁽⁴⁰⁾ representa el principal factor de virulencia de *Streptococcus pyogenes*; para propósitos epidemiológicos se han tipificado más de 120 serotipos M. Los aislamientos de estreptococos de los grupos C y G pueden compartir la presencia de la proteína M y proteínas semejantes a M ⁽¹⁵⁾. Actualmente la tipificación de la proteína M se realiza mediante el análisis del gen *emm*. Mediante este análisis se han determinado 12 serotipos M en las cepas del grupo C y 22 en cepas del grupo G. Se ha reportado

que hay una alta similitud entre los genes de proteínas M clase I del grupo A con las del grupo G de muestras humanas, esto pudo haber sido adquirido mediante una transferencia horizontal de genes ⁽⁵⁸⁾ y que el tipo mosaico que flanquea las regiones es resultado de los subsecuentes reordenamientos. También se ha descrito similitud entre los genes *emm* de los grupos C y G, ambos provenientes de muestras clínicas humanas ⁽⁴⁶⁾.

4.3.3 C5a peptidasa. Solamente cepas del grupo G provenientes de muestras humanas expresan dicha enzima, esta destruye específicamente a la molécula C5a del complemento, la cual sirve como quimioatrayente de células fagocíticas, conduciendo así a un reclutamiento reducido de éstas, específicamente de células polimorfonucleares ⁽¹⁷⁾.

4.3.4 Factores específicos

Estos factores pueden o no encontrarse en las cepas de estreptococos grupo C y G, son factores que se comparten con los estreptococos de grupo A, sin embargo en la mayoría de ellos no se tiene del todo claro cómo es que actúan, se sugiere que de la misma manera que en los estreptococos del grupo A.

Cápsula de ácido hialurónico. La producen sólo algunas cepas del grupo C y casi nunca cepas del grupo G ⁽²⁴⁾. Las células del tejido conjuntivo del huésped contienen ácido hialurónico, por lo que las bacterias que contienen dicha cápsula podrán no ser reconocidas por las células fagocíticas y así evitar la fagocitosis ⁽¹⁰⁾.

Estreptocinasa. Proteína extracelular que convierte el plasminógeno en plasmina, que es una proteasa que degrada la fibrina y al fibrinógeno, favorece la degradación de coágulos ⁽³⁹⁾.

Estreptolisina O. Proteína extracelular que lisa eritrocitos, leucocitos y plaquetas, se le atribuyen propiedades cardiotoxícas. Durante una infección por bacterias que la producen se favorece la producción de anticuerpos antiestreptolisina que ayudan a identificar dicha infección y la bacteria causante. Esta proteína puede ser inhibida por el colesterol, por lo que en una infección cutánea no se detectan dichos anticuerpos.

Estreptolisina S. Proteína extracelular que se caracteriza por lisar eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Destruye a las células encargadas de la fagocitosis al estimular la liberación del contenido lisosomal de éstas.

Estreptodornasa. Es una ADNasa también conocida como desoxirribonucleasa estreptocócica, la cual depolimeriza el ADN. El huésped produce anticuerpos contra esta enzima, que pueden ser utilizados para el diagnóstico serológicos de las infecciones.

Proteína G. Proteína de superficie con capacidad de unión a inmunoglobulinas. La unión se produce con el dominio Fc de los anticuerpos ⁽³²⁾. Poco se sabe del mecanismo de patogenicidad.

Tabla 3. Factores de patogenicidad descritos de los grupos C y G de estreptococos ⁽¹⁶⁾

Grupo serológico	Factor bacteriano	Factores del huésped involucrados	Función
C y G	Proteínas de unión a fibronectina	Fibronectina soluble	Adherencia
C y G	Proteínas de unión a vitronectina	Vitronectina	Adherencia
C	Proteínas de unión a colágeno	Colágeno	Adherencia
C y G	Proteína M y proteínas semejantes a M	Fibrinógeno, factor H, IgG, plasminógeno	Antifagocítico, Adherencia ?
G	C5a peptidasa	C5a	Antifagocítico
C y G	Estreptocinasa	Activación de plasmina (proteína M como cofactor)	Extensión
C y G	Proteína G	Albumina, IgG Fc, IgG Fab	Antifagocítico? Adherencia ? Sensorial ?
C y G	Estreptolisina O	Membrana celular	Toxico para las células, efectos múltiples.
C	Proteína FAI	Fibrinógeno, albúmina, IgG	Antifagocítico? Sensorial ?

4.4 Antibióticos

Un antibiótico se ha definido como una sustancia química producida por un microorganismo capaz de inhibir el desarrollo de otros microorganismos, aquellos a los que se les realiza alguna modificación química se siguen considerando como tales.

Un agente antimicrobiano es activo contra los microorganismos y puede ser producido en forma natural por microorganismos o sintéticamente en el laboratorio. El término agente quimioterápico se ha empleado para referirse a agentes antimicrobianos sintéticos o naturales y también se refiere a agentes que

actúan contra células humanas. Siempre se busca que su acción sea efectiva a concentraciones que no sean dañinas para el huésped ⁽³⁷⁾.

Pueden ser clasificados de acuerdo a su origen, es decir, naturales o sintéticos, o bien por su mecanismo de acción. Los naturales son llamados antibióticos y son ejemplos de ellos los beta-lactámicos, tetraciclinas y macrólidos. Dentro de los sintéticos llamados quimioterapéuticos o antimicrobianos sintéticos podemos encontrar a los imidazoles, quinolonas y sulfonamidas ^(37,48).

Por su mecanismo de acción se clasifican como: los que interfieren con la síntesis de la pared celular, los que dañan la membrana citoplasmática, inhibidores de la síntesis de proteínas, aquellos que interfieren con la síntesis de ácido nucleico y los que interfieren o inhiben alguna ruta metabólica ⁽³⁷⁾.

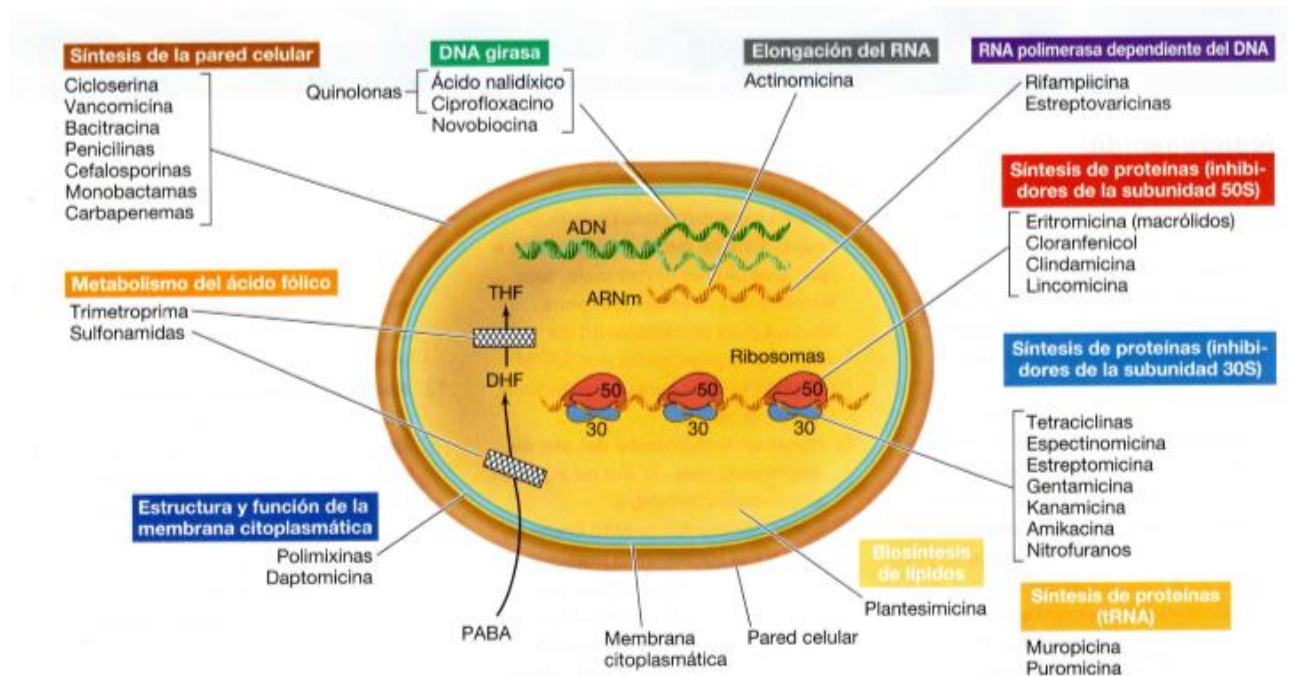


Figura 2. Modo de acción de los principales agentes quimioterapéuticos antimicrobianos ⁽³⁷⁾.

4.4.1 Antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular. Actúan a distintos niveles de la biosíntesis del péptidoglicano, capa esencial para la supervivencia de las bacterias, y el daño se produce por la pérdida de la rigidez de la célula bacteriana que puede causarle la muerte; por lo tanto son considerados como agentes bactericidas. La síntesis del péptidoglicano se lleva a cabo en tres etapas y los distintos antimicrobianos pueden afectar cada una de ellas. Los representantes de este grupo son las penicilinas y cefalosporinas.

4.4.2 Antibióticos que dañan la membrana citoplásmica: El daño se causa debido a la desorganización de la membrana provocada por agentes aniónicos y catiónicos como la polimixina B y la colistina (polimixina E). La desorganización de la membrana afecta la permeabilidad lo que ocasiona la salida de cationes de la célula bacteriana. Otro antibiótico que actúa en la membrana es la gramicidina, la cual produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la formación de poros por donde puede haber pérdida del contenido citoplasmático de la bacteria.

4.4.3 Antibióticos que interfieren con la síntesis de proteínas. Existen numerosos antibióticos de este tipo, y actúan interaccionando con el ribosoma y alterando la traducción. Estas interacciones son muy específicas y muchas implican una unión al rRNA ⁽³⁷⁾. Los ribosomas 70S bacterianos están constituidos por dos subunidades designadas como subunidad 30S y subunidad 50S. Estas subunidades constituyen el sitio de acción de agentes antimicrobianos, localizándose en ellas proteínas específicas a las cuales se unen los fármacos.

Los hay de diferentes tipos de interferencia, los que interfieren con la subunidad 30S y los que afectan a la subunidad 50 S.

Existen tres mecanismos con los que interfiere con la subunidad 30S.

- Bloqueadores de entrada del RNA de transferencia (tRNA). La síntesis es inhibida al no poder agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que se está sintetizando. Como ejemplo las tetraciclinas, su efecto es bactericida.
- Aquellos que evitan que la subunidad 30S se una al RNA mensajero (RNAm). Ejemplo los aminoglicósidos y tetraciclinas, su efecto es bactericida.
- Los que provocan la lectura incorrecta del RNAm, esto da como resultado una traducción errónea en la proteína. Con esto se afecta la capacidad de los aminoácidos para unirse con otros mediante el enlace peptídico. Ejemplo los aminoglicósidos y su efecto es bactericida.

Antibióticos que interfieren con la subunidad 50S.

Son tres principalmente: cloranfenicol, macrólidos (eritromicina, oleandomicina) y lincinoides (lincomicina, clindamicina). Su acción es bacteriostática y actúan inhibiendo la formación de uniones peptídicas al bloquear la enzima peptidil transferasa. Los macrólidos también bloquean la translocación del ribosoma.

4.4.4 Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos ⁽³⁷⁾: Pueden inhibir la síntesis de nucleótidos o causar una interconversión de nucleótidos, pueden interferir con polimerasas involucradas en la replicación y transcripción del ADN.

La inhibición de la replicación del DNA puede provocarse por antimicrobianos como las quinolonas o fluoroquinolonas que inhiben la actividad de la DNA girasa, involucrada en el rompimiento y reunión de cadenas de DNA. Las hebras de DNA fragmentadas son liberadas dentro de la célula y provoca muerte celular.

La rifampicina inhibe la actividad de la RNA polimerasa bacteriana dependiente de DNA, uniéndose en forma no covalente pero muy firme a esta enzima. Con esto se bloquea la síntesis de ARN y por consecuencia la bacteria muere.

4.4.5 Inhibidores de rutas metabólicas (síntesis de ácido fólico): El ácido para-aminobenzoico (PABA) es un metabolito esencial para muchos organismos, forma parte del ácido fólico, un importante precursor en la síntesis de ácido nucleico. La sulfanilamida es un análogo del PABA y compite con él por la enzima dihidropteroato sintetasa, actúa bloqueando la síntesis del ácido fólico e inhibe así la síntesis de ácido nucleico. Otro antibiótico que afecta en esta misma síntesis pero en un paso posterior al de la sulfonamida es el trimetoprim, solo que aquí se inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa.

4.5 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana.

Los mecanismos bioquímicos de resistencia se pueden agrupar en tres grupos ⁽⁶⁴⁾.

- Inactivación enzimática: hidrólisis en las betalactamasas y los betalactámicos, modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos.
- Modificaciones en el sitio blanco: modificaciones en el gen que codifica para el propio blanco del antibiótico o la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales.
- Alteraciones de la permeabilidad: mediante alteraciones de las membranas bacterianas, alteraciones en la entrada de antibióticos dependiente de energía o aumento de la salida de antibióticos.

La resistencia también puede ser adquirida por eventos genéticos como mutaciones o por recombinación (transducción, transformación, conjugación, transposición).

Las mutaciones pueden aparecer en el gen que codifica a la proteína “blanco” y alterar su estructura al grado de que ya no se ligue al fármaco, pueden suceder en una proteína que interviene en el transporte del antibiótico o en un gen o un

promotor regulador que altera la expresión de un “blanco” o en una enzima inactivadora ⁽⁴⁵⁾.

La transducción surge por la intervención de un bacteriófago que contiene DNA bacteriano incorporado dentro de su cubierta proteica, si dicho material genético incluye un gen que codifica la resistencia al un antibiótico, una bacteria recién infectada por el bacteriófago puede adquirir resistencia a dicho compuesto y será capaz de transmitir esta característica a sus células hijas ⁽⁴⁵⁾.

Transformación es un fenómeno que ocurre cuando la bacteria receptora incorpora ADN extracelular procedente de una bacteria donante y este contiene genes con resistencia a antibióticos ⁽⁴⁵⁾.

Conjugación es la transferencia de genes extracromosomales (plásmidos), que contengan genes de resistencia a antimicrobianos, a través del pili de bacterias F⁺, el cual permite un reconocimiento y adhesión entre las células bacterianas, se transfiere una cadena del plásmido de una bacteria F⁺ a una F⁻, en esta última se sintetiza la cadena complementaria ⁽⁴⁵⁾.

La transposición es un mecanismo especial de recombinación en donde un segmento del DNA puede saltar de una zona a otra del cromosoma bacteriano o entre cromosomas y plásmidos o DNA bacteriófagos, dicho segmento se llama transposón o elemento genético transponible, y al estar incorporado a cromosomas o plásmidos, puede transportar genes que confieran resistencia.

4.5.1 Resistencia en estreptococos grupo C y G

El antibiótico de elección para tratar las infecciones causadas por estreptococos de los grupos C y G es por lo regular la penicilina G, otros agentes que han mostrado tener una buena actividad en contra de estos grupos son la vancomicina, eritromicina, cefazolina, penicilinas semisintéticas (oxacilina, ceftizoxima, ceftibuteno) y cefotaxima⁽²⁸⁾. Antibióticos como los macrólidos y las tetraciclinas son utilizados también en el tratamiento de infecciones causadas por los grupos C y G, sin embargo de unos años a la fecha se ha encontrado resistencia hacia estos. La literatura reporta un 18.5% de resistencia en los estreptococos de grupo C hacia eritromicina y un 16±1% en el grupo G. En cuanto a la tetraciclina el dato se comparte para ambos grupos con un 19.4%^(9, 19,29, 59).

Los dos mecanismos de resistencia que se han descrito para los macrólidos son:

- Modificación del sitio de acción mediado por una metilasa resistente a la eritromicina (*erm*) que reduce la unión de los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS) con el sitio de acción en la subunidad ribosomal 50S⁽³³⁾. La expresión de los genes *erm* puede ser constitutiva (cMLS) o inducible (iMLS)⁽⁶¹⁾.
- Bomba de expulsión de antibióticos. Los genes *mefA /E* codifican para estas bombas conocidas como Transportadores Efflux, estas expresan resistencia a eritromicina y sensibilidad a lincosamidas (fenotipo M).

La resistencia a las tetraciclinas es adquirida mediante plásmidos y es una característica que puede ser inducida. Se conocen tres mecanismos por lo cual sucede esto.

- Disminución o pérdida de la permeabilidad bacteriana para el antibiótico o la adquisición de una vía de salida dependiente de energía.
- Menor acceso de la tetraciclina al ribosoma bacteriano.
- Producción o síntesis de enzimas bacterianas que metabolizan al antibiótico.

4.6 Susceptibilidad antimicrobiana ⁽⁴¹⁾

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.

Tabla 4. Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana ⁽⁴¹⁾

Método	Categorías	CMI µg/ml
Difusión en agar (discos)	S, I, R	No
Dilución en agar	S, I, R	Sí
Dilución en caldo	S, I, R	Sí
Métodos automatizados	S, I, R	Sí
E-test	S, I, R	Sí

Abreviaciones: S, susceptible; I, Intermedio; R, resistente; CMI, concentración mínima inhibitoria.

Difusión por agar. Es el método más frecuentemente usado, y es también llamado difusión por disco o Kirby-Bauer. En este método, el microorganismo es inoculado uniformemente en la superficie de una placa de agar MH, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban de 16-18 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco 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 es incapaz de inhibir al microorganismo en estudio. El tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco se interpreta como susceptible, intermedio o resistente (S, I o R) de acuerdo a las tablas publicadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

Dilución en agar. Es considerado el método de referencia. En este método, placas conteniendo una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas de 16 a 18 h. Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el antibiótico.

Dilución en caldo. En este caso, tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de la microplaca y la CMI es determinada después de la incubación, de la misma forma que el método de dilución en agar.

E-test. Es más simple que otros métodos para obtener una CMI. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van desde 0.016 µg/mL hasta 256 µg/mL. Esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el organismo en estudio. Después de incubar la placa de 16 a 18 horas, se forma un área de inhibición de forma elíptica, en la cual la concentración mínima inhibitoria puede ser leída directamente.

Métodos automatizados. En este momento existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de susceptibilidad. Utilizan una medición turbidimétrica o fluorométrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio líquido. La mayoría de ellos emplea el método de microdilución y períodos de incubación menores que los habituales.

4.6.1 Interpretación del antibiograma

Susceptible. Significa que la infección causada por un determinado microorganismo puede ser efectivamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado.

Sensibilidad intermedia. Esta categoría incluye microorganismos que son inhibidos por concentraciones del antibiótico que están muy cercanas a las alcanzadas en el plasma.

Resistente. Significa que el microorganismo no es inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismos de resistencia contra ese determinado antibiótico.

5. HIPÓTESIS

En los aislamientos clínicos de estreptococos de los grupos C y G, se espera encontrar resistencia hacia tetraciclina y macrólidos. La presencia del gen *emm* que codifica para la proteína M podría estar asociada a dicha resistencia.

6. OBJETIVO

Determinar la susceptibilidad antimicrobiana en 139 aislamientos clínicos de estreptococos de los grupos C y G, relacionar la resistencia antimicrobiana con la presencia o ausencia del gen *emm* que codifica para la proteína M.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de estreptococos de los grupos C y G para cada uno de los 10 antibióticos mediante la técnica de Kirby-Bauer.
- Identificar la presencia del gen *emm* en los aislamientos de estreptococos de los grupos C y G por medio de la técnica de la PCR.
- Determinar el alelo del gen *emm* mediante el análisis del RFLP o la secuencia del gen *emm* en cepas de estreptococos de los grupos C y G.
- Determinar los tipos M (alelos del gen *emm*) que se presentan con mayor prevalencia en las cepas de estreptococos de los grupos C y G en México.
- Correlacionar la presencia o ausencia del gen *emm* con la resistencia antimicrobiana presentada en cepas de Estreptococo de los grupos C y G.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Selección y manejo de cepas analizadas

A partir de una colección de más de 2,700 aislamientos clínicos de estreptococos *beta*-hemolíticos provenientes de diferentes Hospitales e Instituciones de Salud Pública, se seleccionaron 139 cepas de estreptococos pertenecientes a los grupos C y G, 53 y 86, respectivamente. Dentro de los nosocomios de donde se obtuvo la mencionada colección se incluyen Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (ISSSTE), Clínica 92 (IMSS), Centro de Apoyo Diagnóstico San Rafael (ISSSTE), Hospital General Gonzalo Castañeda (ISSSTE), Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) hoy CENAVECE.

Las cepas se mantienen conservadas a una temperatura de -70°C en caldo de infusión cerebro corazón (BHI, BBL) con glicerol al 15%, los aislamientos seleccionados se sembraron en placas base Agar Sangre (BBL), al cual se le adicionó 5% de sangre de carnero desfibrinada estéril (Hemoprovedores) para confirmar su pureza y realizar las pruebas de CAMP y bacitracina (Bio Rad 0.04 U), las cuales se hacen de rutina para todas las cepas que llegan al laboratorio. Adicionalmente se les realizó la determinación del grupo de Lancefield, para lo cual se utilizó el kit Pastorex Strep (Bio Rad), esto permitió corroborar que las cepas pertenecieran a alguno de los grupos de interés, en este caso los grupos C y G.

7.2 Pruebas de susceptibilidad a diversos antibióticos

Para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad, las cepas se resembraron en placas con base de agar sangre y se incubaron a 37°C por 24 h en la incubadora Isotemp 750D. A partir de las colonias aisladas se prepararon suspensiones bacterianas de 1.5×10^8 UFC/mL, equivalente al 0.5 de la escala de McFarland, en solución salina isotónica estéril; para ajustar a dicha concentración, se utilizaron como apoyo un vortex GENIE-2 (Scientific Industries) y un nefelómetro Densimat (bioMérieux). Las suspensiones bacterianas fueron inoculadas uniformemente en la placa correspondiente, con ayuda de hisopos estériles. Las placas empleadas contenían Agar Mueller-Hinton enriquecido con 5% de sangre desfibrinada estéril de carnero (Hemoprovedores). Posteriormente se colocaron los discos impregnados con los antibióticos (Oxoid) para probar la susceptibilidad que presentaban las bacterias frente a ellos. El fundamento de esta prueba se describió previamente en el apartado 5 ubicado en el marco teórico de este mismo trabajo.

Tabla 5. Antibióticos utilizados para las pruebas de susceptibilidad y su concentración por disco.

Antibiótico	Concentración (µg)
Ceftibuteno	30
Ceftizoxima	30
Cloranfenicol	30
Eritromicina	15
Levofloxacina	5
Oxacilina	1
Penicilina	10 U
Q-D	15
Tetraciclina	30
Vancomicina	30

Para interpretar los resultados se utilizaron criterios estandarizados, asociados al diámetro de inhibición correspondiente (Tabla 6)⁽⁶⁶⁾.

Tabla 6. Criterios para la interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad aplicadas a los estreptococos hemolíticos (CLSI).

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Susceptible
Ceftibuteno (30 µg)			≥20 mm
Ceftizoxima (30 µg)			≥29 mm
Cloranfenicol (30 µg)	≤17 mm	18-20 mm	≥21 mm
Eritromicina (15 µg)	≤15 mm	16-20 mm	≥21 mm
Levofloxacina(5 µg)	≤13 mm	14-16 mm	≥17 mm
Oxacilina (1 µg)			≥17 mm
Penicilina (10 U)			≥24 mm
Quinupristina-Dalfopristina (Q-D) (15 µg)	≤15 mm	16-18 mm	≥19 mm
Tetraciclina (30 µg)	≤ 18 mm	19-22 mm	≥23 mm
Vancomicina (30 µg)			≥17 mm

7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos en base de agar sangre con 24 h de incubación de las cepas en estudio, de los cuales se inocularon tubos de ensaye con tapón de rosca con 2 mL de caldo Todd-Hewith (TH), y se incubaron a 37°C por 24 h con agitación constante en la incubadora Isotemp 750D; las suspensiones se ajustaron a una concentración de 2×10^9 células/mL, se tomó 1 mL de dicha suspensión y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL, estos se

centrifugaron a 7,500 rpm por 10 min en la microcentrífuga SIGMA 1-15 (Nr 12124) , del paquete celular obtenido se realizó la extracción de ADN cromosomal con kit de extracción DNeasy (QIAGEN), resuspendiendo el paquete celular en 180 μ L de buffer de lisis e incubado a 37°C durante 30 min. Posteriormente se agregaron 25 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) y 200 μ L de buffer AL, se mezcló e incubó en la Multi-block Heater durante 30 min a 70°C.

Después de la incubación se agregaron a cada tubo 200 μ L de etanol absoluto frío se mezcló con ayuda del vortex GENIE-2 (Scientific Industries) se transfirió el contenido de cada tubo a minicolumnas de extracción (QIAGEN), se centrifugaron a 8,000 rpm por 1 min. El ADN que se retuvo en la minicolumna se lavó con buffer AW₁ y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min, el segundo lavado se realizó con buffer AW₂ se centrifugó a 13,500 rpm durante 3 min, para eliminar todo el líquido. El ADN retenido con la columna fue eluido con 200 μ L de buffer AE, incubado por 1 min a temperatura ambiente y centrifugado a 8,000 rpm por 1 min.

Para evaluar la calidad y cantidad de ADN extraído se realizó una electroforesis, 5 μ L de cada muestra de ADN se cargaron en un gel de agarosa al 1% (Research Organics), en buffer 0.5x de Tris-Boratos-EDTA (TBE). El gel se corrió en una cámara de electroforesis modelo Minisub-cell GT (Bio-rad), utilizando una fuente de poder para electroforesis modelo 4000 (Life Technologies Inc). El revelador fue bromuro de etidio 10 mg/mL (Research Organics).

La calidad y cantidad del ADN se evaluó utilizando un UV transiluminador (Lab-Tech). Los geles de agarosa se fotografiaron con una cámara digital DC290 Kodak y un Software Kodak 1D 3.5v.

Primers

Los primers utilizados para la detección del gen *emm* son los mismos que se utilizan para la detección de este gen en cepas de *Streptococcus pyogenes* (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR para determinar el gen asociado a la presencia de proteína M ^(83,84)

Gen	Primer	Secuencias
<i>emm</i>	<i>emm1A</i> * (forward)	5'-GGGAATTCTATTSGCTTAGAAAATTAA -3'
	<i>emm1B</i> (reverse)	5'- GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT-3'

(*) El primer *emm1A* es un primer degenerado (S es un 50% de C y 50 % de G).

Componentes de reacción

Las condiciones, volúmenes, concentraciones de reactivos y temperaturas utilizadas en la PCR para determinar la presencia del gen *emm* se tomaron de estandarizaciones realizadas con anterioridad en el laboratorio. Así mismo los controles utilizados en la PCR fueron la cepa de *S. pyogenes* (2522) del laboratorio, la cepa de *S. pyogenes* (SS633) del CDC, la cepa de grupo C (SS1625) del CDC y la cepa de grupo G (SS1596) también del CDC. Los controles usados amplifican para el gen *emm*.

Para la mezcla de reacción se utilizaron los siguientes reactivos:

- Buffer 10x (Roche) (Tris-HCl 100 mM, pH=8.3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, gelatin 0.01% w/v)
- Desoxinucleótidos trifosfato 1.25 mM (dNTP's, Roche)

- H₂O ultrapura estéril
- Taq DNA polimerasa 5 U/μL (Roche)
- Dimetilsulfoxido
- Iniciadores 10 mM (*emm1A**, *emm1B*).

La mezcla de reacción utilizada para la realización de la PCR fue:

Tabla 8. Mezcla de reacción para amplificar gen *emm*. Vol. Final = 50 μL

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer 10x	5.0	1x
dNTP's 1.25 mM	8.0	0.25 mM
Primer <i>emm1A*</i> 10 μM	1.0	0.2 μM
Primer <i>emm1B</i> 10 μM	1.0	0.2 μM
Taq 5 U/μL	0.15	0.1 U
DNA (0.5-5 μg)	1.0	0.5-5 μg
H₂O	33.85	
DMSO	0.2	

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el Termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

El programa usado para la reacción de la PCR consta de un ciclo de desnaturalización (fase inicial); 30 ciclos que implican las etapas de desnaturalización (94°C), alineamiento (47°C) y elongación (72°C); y una etapa final de elongación. Las temperaturas y los tiempos que se utilizaron en este trabajo se presentan en la Figura 3.

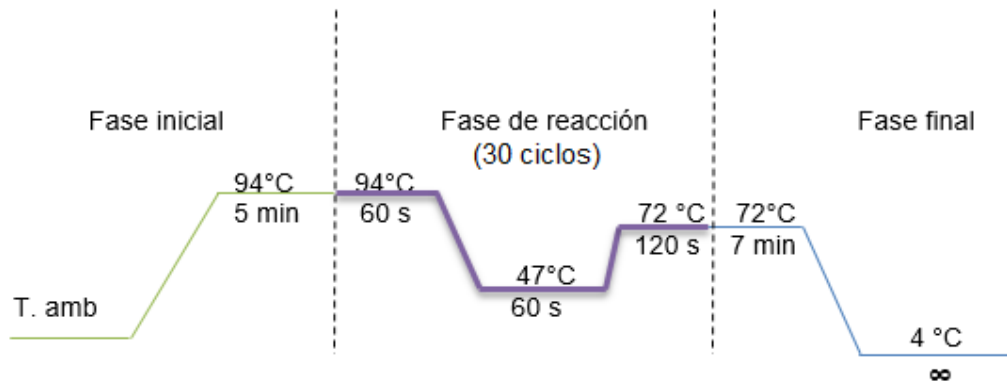


Figura 3. Diagrama de temperaturas empleadas en la PCR para la amplificación del gen *emm*.

La fase de desnaturalización consiste en desdoblarse y abrir la doble cadena del ADN, en la fase de alineamiento la temperatura desciende para permitir que los primers reconozcan su secuencia complementaria en el ADN y en la fase de elongación se incrementa de nuevo la temperatura para que la enzima polimerasa sintetice el ADN. Al finalizar las tres etapas, la temperatura disminuye a 4°C para detener la reacción.

Productos de PCR

Revelado

Para el revelado de los productos de la PCR obtenidos se tomaron 5 µL de cada muestra y se corrieron en geles de agarosa al 1.5% (Research Organics) a 80 volts/40 min en una cámara de electroforesis modelo Minisub-cell GT marca (Bio-Rad), utilizando una fuente de poder para electroforesis modelo 4000 (Life Technologies Inc). En todos los geles se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100pb (Fermentas plus) y el revelador fue bromuro de etidio 10 mg/mL (Research Organics).

Los amplificadores se observaron utilizando un transiluminador de luz UV (Lab-Tech) y se obtuvieron fotografías con una cámara digital DC290 Kodak y un Software Kodak 1D 3.5v. Este software sirvió también para determinar el peso molecular o tamaño de los productos obtenidos.

7.4 Digestión enzimática del producto de la PCR del gen *emm* (Caracterización del gen)

Para poder realizar la digestión enzimática los productos de PCR se separaron por grupo de Lancefield, y dentro de los dos grupos formados se ordenaron de menor a mayor peso molecular del gen *emm* (dato obtenido del revelado de productos de PCR en gel de agarosa al 1.5%). El corte enzimático en los productos de PCR se realizó con la enzima *DdeI* (Fermentas, Hpy F31, ER1881) utilizando el buffer Tango (Fermentas, #BY5). Esta enzima corta el ADN cuando reconoce la secuencia 5'CTNAG-3' (donde N puede ser cualquiera de los cuatro nucleótidos comunes).

Tabla 9. Mezcla de reacción realizada para cortar gen *emm*. Vol. Final = 40 μ L

Reactivo	Volumen (μ L)	Concentración final
Buffer Tango 10x	4.0	1x
Enzima <i>DdeI</i> 10 U/ μ L	0.2	2 U/ μ L
Amplificado del gen <i>emm</i>	35.8	

Los tubos con la mezcla de reacción para corte enzimático se incubaron al menos 12 h a 37°C.

El producto cortado se corrió posteriormente a 80 volts por aproximadamente 65-80 min en geles con 2% de agarosa 1000 (Ultra-pure, Invitrogen), utilizando la misma fuente de poder, marcador de peso molecular y revelador que en el proceso de revelado de los productos de PCR. Se utilizó la cámara de electroforesis Wide SUB-CELL GT (Bio-rad), la cámara digital y el software utilizado para analizar el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) se describieron anteriormente.

7.5 Caracterización molecular y subtipificación de las cepas

Una vez obtenidos los RFLP's se agruparon de acuerdo al patrón que mostraban en cuanto a sus bandas y también tomando en cuenta el peso molecular del producto de la PCR. De cada subgrupo formado, se seleccionó una cepa, a la cual se le amplificó de nuevo el gen *emm*, el producto de la PCR se purificó para determinar la secuencia del mismo.

Durante el proceso de purificación del producto de la PCR se eliminan todas las impurezas remanentes del proceso de amplificación como restos de desoxirribonucleótidos, otros reactivos que se emplean en la PCR y amplificados inespecíficos o incompletos del gen. Dicho proceso se realizó usando el kit comercial Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore), que consiste en columnas que tienen una membrana que impide el paso de moléculas grandes de ADN (por arriba de 100,000 Da). El proceso de purificación del producto de la PCR se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Colocar cada columna sobre un tubo de colecta y agregar 355 μL de agua destilada estéril, sin tocar la membrana de la columna.
- Agregar el producto de la PCR a la columna.
- Centrifugar durante 20 min a 12,500 rpm, eliminar filtrado.
- Adicionar 400 μL de agua destilada estéril a la columna.
- Centrifugar durante 20 min a 12,500 rpm, eliminar filtrado.
- Invertir cuidadosamente la columna en un nuevo tubo de colecta y centrifugar durante 30 s a 13,500 rpm.
- Al producto purificado se le agregó agua ultrapura estéril para llegar a un volumen de 40 μL .

La eficiencia de la purificación se evaluó mediante una electroforesis (mismas condiciones de revelado de productos de PCR), utilizando 2 μL (235 ng) de marcador de peso molecular Low DNA Mass (Invitrogene), con el cual fue posible calcular el peso molecular y la cantidad aproximada de ADN en cada banda utilizando la cámara digital DC290 Kodak y un Software Kodak 1D 3.5v. De cada muestra se tomaron 2 μL .

Los productos purificados de la PCR se enviaron al Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM, donde se secuenciaron en un equipo automatizado ABI-3100 de Applied Biosystems. Las muestras se secuenciaron empleando el primer *emm1A**, su secuencia fue descrita en la Tabla 7. Se utilizó este primer dado que reconoce la región hipervariable de la proteína M que es donde se define la especificidad del tipo M.

El archivo electrónico de la secuencia enviado por el IFC se analizó con el software EditSeq (DNASTar Madison Wis), el cual nos dió la secuencia de nucleótidos. Teniendo la secuencia del gen *emm* se accedió a la página web del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) *Streptococcus pyogenes*, en el apartado de [Blast-*emm* and download *emm* databases](#) se introdujo la secuencia y en unos minutos se obtuvo el análisis Blast de la secuencia enviada la cual es comparada con la base de secuencias que se tiene para la identificación de los alelos del gen *emm*.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1 Origen de los aislamientos clínicos

Se analizaron 139 cepas de estreptococos, de las cuales 53 pertenecían al grupo C y 86 al grupo G. Todas las cepas analizadas presentaron una β hemólisis, en mayor o menor grado. El origen clínico más común en ambos grupos fue el exudado faríngeo (85%), seguido del vaginal. Dentro del grupo de los varios se encuentran aislamientos obtenidos de heridas con secreciones y de pie diabético. (Figura 4). La mayoría de los aislamientos se obtuvieron del sexo femenino sin tener una prevalencia en la edad.

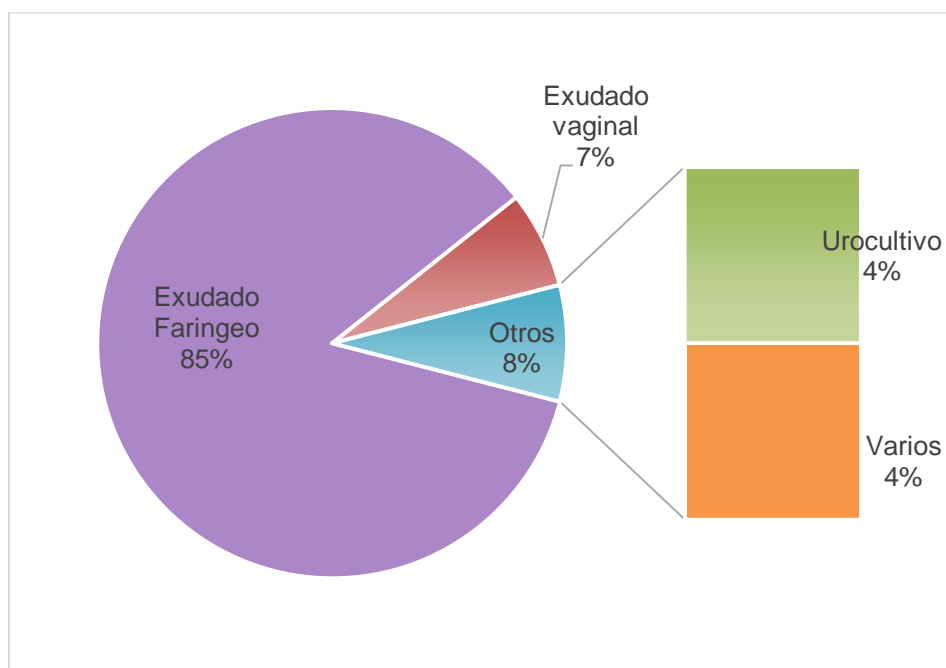


Figura 4. Origen clínico de las cepas de estreptococos analizadas en el estudio.

8.2 Susceptibilidad antimicrobiana

Los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de estreptococos de los grupos C y G, a los 10 antibióticos probados, obtenidos por el método de Kirby-Bauer se presentan en la Tabla 10. Estos datos de resistencia están representados de manera gráfica en la Figura 5.

Tabla 10. Prevalencia y porcentaje de resistencia en las cepas de los grupos C y G

Antibiótico	Total de Cepas resistentes		Cepas resistentes de grupo C		Cepas resistentes de grupo G	
	n = 139	%	n = 53	%	n = 86	%
Ceftibuteno	38	27.3	15	28.3	23	26.7
Ceftizoxima	11	7.9	4	7.5	7	8.1
Clorafenicol	1	0.7			1	1.2
Eritromicina	11	7.9	3	5.7	8	9.3
Levofloxacina	1	0.7			1	1.2
Oxacilina	27	19.4	9	17	18	20.9
Penicilina	1	0.7	1	1.9		
(Q-D)	1	0.7	1	1.9		
Tetraciclina	59	42.4	22	41.5	37	43
Vancomicina	14	10.1	9	17	5	5.8

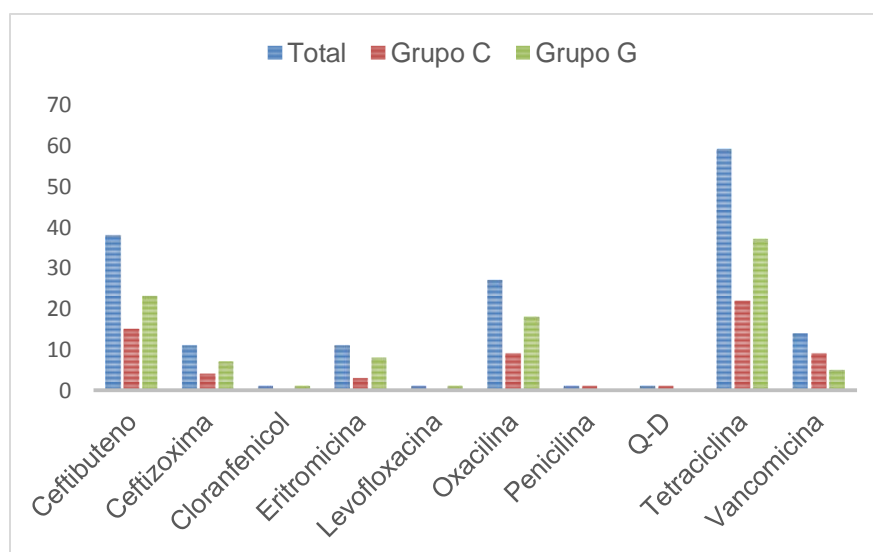


Figura 5. Prevalencia de resistencia antimicrobiana de estreptococos registrada por grupo.

Como se puede observar en la Tabla 10 y en la Figura 5, la resistencia a tetraciclina fue la que presentó mayor incidencia para los grupos de estreptococos estudiados. Este resultado se esperaba, aunque no tan elevado, debido a que en la literatura se ha descrito una resistencia del 19.4% para ambos grupos, en este estudio se presentó en un 42.4%, y los porcentajes de los grupos analizando por separado fueron semejantes.

El hecho de que se presentara una resistencia a ceftibuteno del 27.3% es relevante debido a que para este antibiótico que es una cefalosporina de tercera generación de amplio espectro, no se tienen registros previos de resistencia. El caso de oxacilina es similar, al ser esta una penicilina semisintética resistente a penicilinasas, no debería presentarse resistencia hacia este antibiótico y sobre todo porque los estreptococos no producen esta enzima, sin embargo se presentó en un 19.4% de las cepas analizadas.

Dada la relevancia que tiene el haber observado resistencia con porcentaje alto hacia penicilinas semisintéticas y cefalosporinas de tercera generación, sería importante estudiar qué es lo que determina esta característica. Podría hacerse relación con los estreptococos de grupo B, los cuales pueden presentar resistencia a estos antibióticos cuando se encuentran mutaciones en el gen *pbp2X*⁽³⁰⁾.

Para poder determinar el factor o la situación que está otorgando la resistencia en estreptococos de los grupos C y G hacia oxacilina y ceftibuteno, como primer paso tendría que confirmarse la resistencia determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Como segundo paso se tendría que explorar o conocer el mecanismo de resistencia donde las mutaciones en el gen *pbp2x* han sido

atribuidas para cepas de baja susceptibilidad a penicilina en *S. agalactiae*, o bien con la técnica de PCR identificar los genes de virulencia que tienen las cepas de los grupos C y G como los que codifican para las proteínas de unión a fibronectina (*fnbA*, *fnbB*, *gfbA*) o los que codifican para algún otro factor.

En el marco teórico se mencionan reportes previos de una resistencia a eritromicina para los grupos de estreptococos C y G con 18.5% y 16.2% ^(9,19), respectivamente. En la presente investigación el porcentaje de resistencia a este antibiótico fue de 7.9% para el grupo C y 9.3% para el grupo G, el tener en nuestra población un porcentaje menor al reportado en otros países es resaltante debido a que la eritromicina, y los demás macrólidos, representan el tratamiento de elección cuando el paciente es alérgico a las penicilinas. En el laboratorio se han encontrado porcentajes menores al 10% de resistencia hacia eritromicina por parte de los grupos de estreptococos A y B, lo que hace referencia a que los macrólidos se pueden seguir utilizando como alternativa en infecciones causadas por estreptococos.

En cuanto a la resistencia en cepas del grupo C, se encontró en los mismos antibióticos que en el grupo G, con excepción en penicilina y quinupristina-dalfopristina que presentaron resistencia únicamente para el grupo C, así como el cloranfenicol y levofloxacina solo presentaron resistencia en cepas del grupo G. La diferencia en la incidencia no es realmente significativa. Cabe resaltar que en el caso de vancomicina la resistencia presentada por el grupo C (17%) es casi del triple con respecto a la del grupo G (Tabla 10).

8.3 Aislamiento del ADN

Es importante que el ADN que se va a utilizar para la amplificación de un gen se encuentre en perfectas condiciones, es decir una pureza y concentración deseable, por esta razón la extracción de ADN de cada una de las cepas se evaluó previamente, mediante una electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 6 se presenta un ejemplo de cómo se observaron los ADN's puros que se extrajeron.

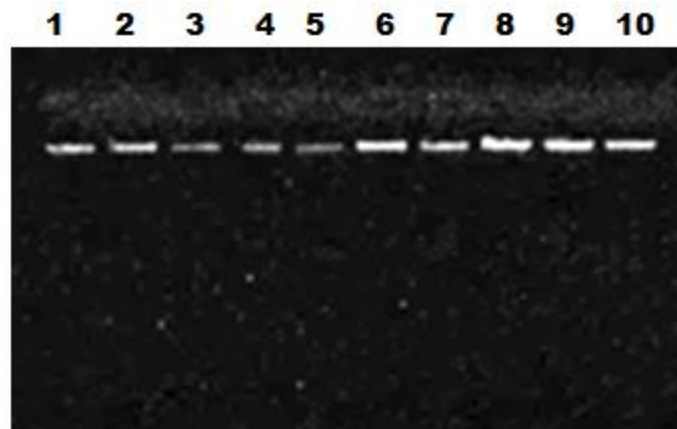


Figura 6. Fotografía digital de corrimiento electroforético de ADN extraído con kit DNeasy de QIAGEN.

8.4 Amplificación del gen *emm*

La amplificación del gen *emm* con la Reacción en Cadena de la Polimerasa dió como resultado productos cuyo tamaño molecular presentó variaciones, que fueron desde 1,000 hasta 1,950 pb. Esta variación fue evidente al realizar el corrimiento electroforético (Figura 7) y está relacionada con las diferencias en el número y tamaño de las unidades de repetición de la porción del gen que codifica para la región A de la proteína M, se sabe que estas diferencias determinan el tipo de proteína M que codifica el gen.

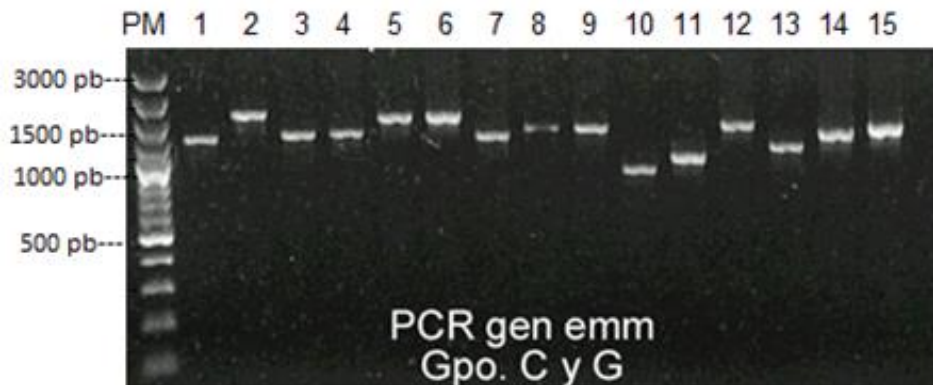


Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR del gen *emm*.

Para la amplificación del gen *emm* para los estreptococos del grupo C y G se utilizaron las mismas condiciones que para estreptococos del grupo A. En la mayoría de los casos dichas condiciones fueron las óptimas, solo cuando en el corrimiento electroforético el producto de PCR se observó débil se cambió la temperatura de alineamiento a 42°C para disminuir la astringencia en la reacción.

En el caso de los estreptococos de grupo A el gen *emm* es constitutivo, por lo que las cepas tienen que amplificar con los primers utilizados. Sin embargo para los estreptococos de los grupo C y G el gen *emm* no es constitutivo, por lo que no se espera la amplificación del mismo en la totalidad de las cepas. Se necesitó un buen rendimiento de los amplificados para realizar la digestión enzimática con *DdeI* y determinar el alelo del gen *emm* (tipo M) por RFLP o secuenciación.

De las 139 cepas analizadas, 80 resultaron positivas para el gen *emm*. De las 53 cepas del grupo C estudiadas 31 amplificaron el gen (58%) y de las 86 cepas de grupo G 49 fueron positivas para *emm* (57%), este dato es relevante debido a que en ambos grupos se observa una proporción semejante, sin embargo no existen

reportes en la literatura con los cuales pueda ser comparado. En la Figura 8 se puede observar la proporción para cada grupo.

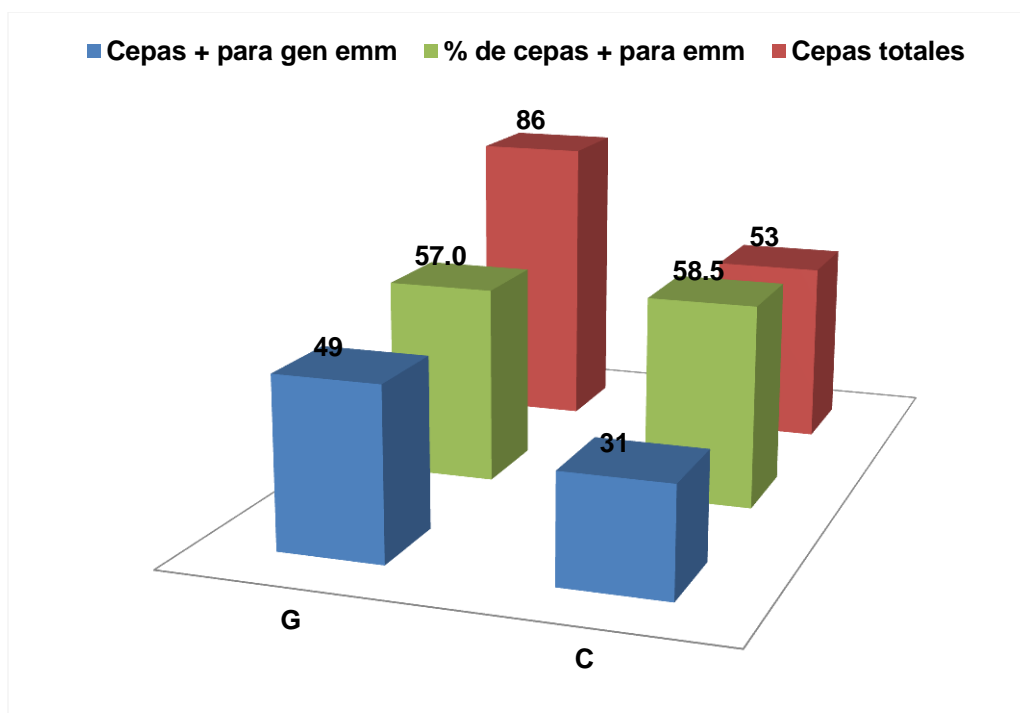


Figura 8. Representación gráfica de los resultados positivos para el gen *emm* separado por grupos.

8.5 Identificación del alelo del gen *emm* (tipo M) en estreptococos grupo C y

G

Después de realizar la digestión enzimática se pudo llevar a cabo el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) y su comparación con las cepas de referencia, esto para poder relacionarlo con el tipo M, es decir alelo del gen *emm*, al que pertenecían las cepas. Se agruparon las cepas que presentaron patrones de corte similares para ser comparados con los patrones de las cepas de referencia del CDC con que se cuenta en el laboratorio, con esta estrategia solo se lograron identificar 7 de las 80 cepas a analizar

Una vez agrupadas se seleccionó una cepa de cada conjunto formado para determinar la secuencia del gen *emm*, al igual que los amplificados de las cepas que seguían sin poder ser agrupadas.

En la Figura 9 se puede observar la diferencia entre los patrones de las cepas analizadas, debido a esto se presentó la dificultad para agrupar dichas cepas.

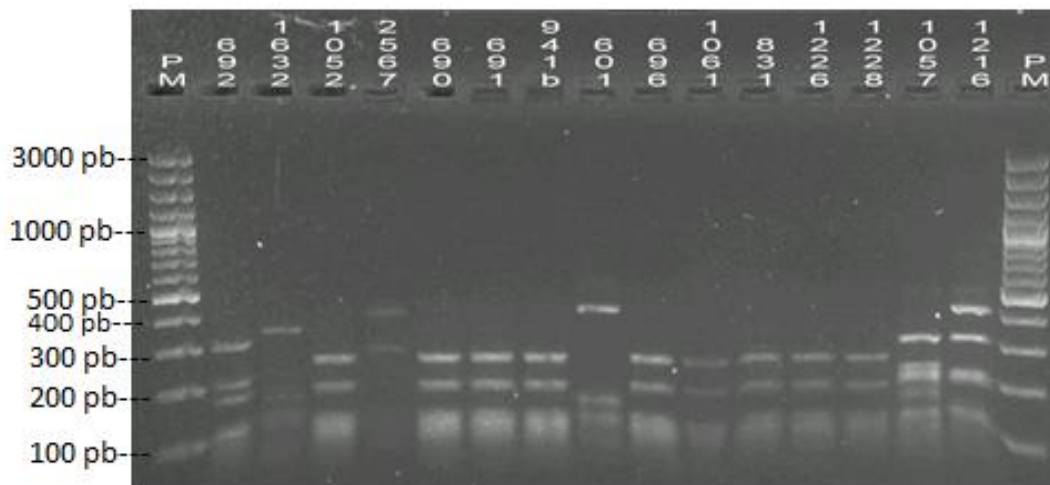


Figura 9. Corte enzimático gen *emm/DdeI* en estreptococos de grupo G.

Al realizar el análisis de las secuencias, se seleccionó el tipo M que tuviera un porcentaje mayor al 95% de identidad con algún tipo M ya reportado, porcentajes menores al 95% se consideran como subalelos según el CDC, en esta investigación la cepa 1569, con el tipo M *stG480* presentó una identidad del 94%, esto debido a una inserción de 9 bases en la posición 118, con respecto a las secuencias de la base de datos del CDC (TGC TAA ACT), sin embargo como se podrá observar en la Figura 16, donde se muestran los patrones de restricción de las cepas *stG480* que tienen un porcentaje de identidad cercano al 100%, este no es muy variable.

En la tabla 11 se presentan los tipos M encontrados en las cepas analizadas, en azul se indican los tipos M encontrados para cepas del grupo G (11), en negro los de las cepas del grupo C (6) y con asterisco los alelos que se encontraron tanto en el grupo C como en el G.

Tabla 11. Alelos del gen *emm* determinados para las cepas de los grupos C y G.

Alelos del gen <i>emm</i>	Total	Grupo		PM (pb)
		C	G	
stG653*	11	3	8	1400.4 ± 49
stG485*	11	1	10	1663.6 ± 171.4
stG840	10		10	1317.5 ± 36.9
stC839	9	9		1481.1 ± 69
stC36*	7	6	1	1364.2 ± 87.2
stG480	6		6	1435.6 ± 88.3
stG6792*	5	1	4	1457.6 ± 123.8
stG2574	4	4		1542.3 ± 238.7
stG643	4	4		1014.2 ± 16.4
stG4831	2		2	1425 ± 225
stG166b	1		1	1360
stC-NSRT2	1		1	1573.3
emm2	1	1		875
stC1400	1	1		1037.5
stG245	1		1	1150
stC1376	1		1	1921.1
stG5420	1		1	1587.1
emm6	1	1		969.7
stG652	1		1	1277.4
stG120	1		1	1406.5
stC6979	1		1	1200
Totales	80	31	49	

Haciendo el análisis de los grupos y el tipo M se observó la frecuencia de cada uno de ellos en nuestro grupo de estudio, siendo los tipos *stG653* y *stG485* los más comunes, seguidos de los tipos *stG840* y *stC839*.

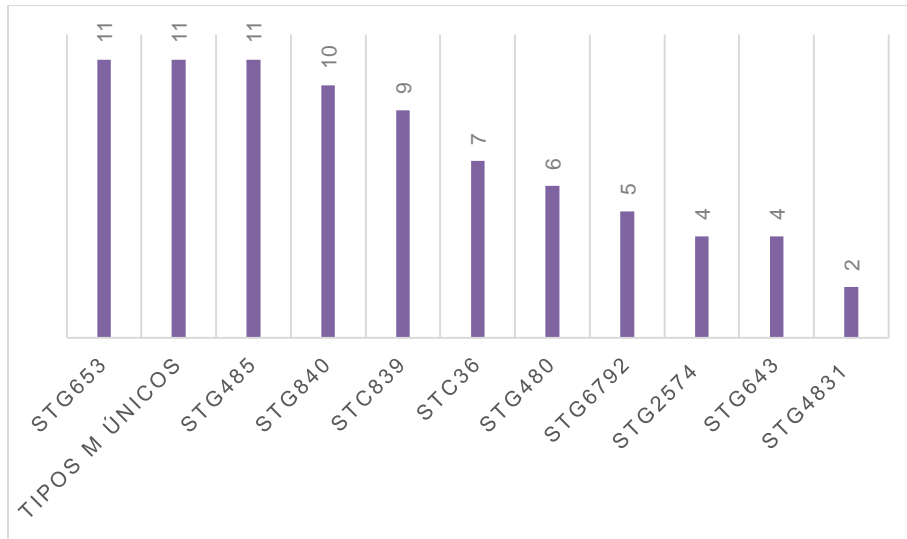


Figura 10. Frecuencia de los tipos M encontrados en cepas estudiadas.

Teniendo la frecuencia de estos se proyectaron los resultados hacia porcentaje, en la Figura 11 se puede observar esto.

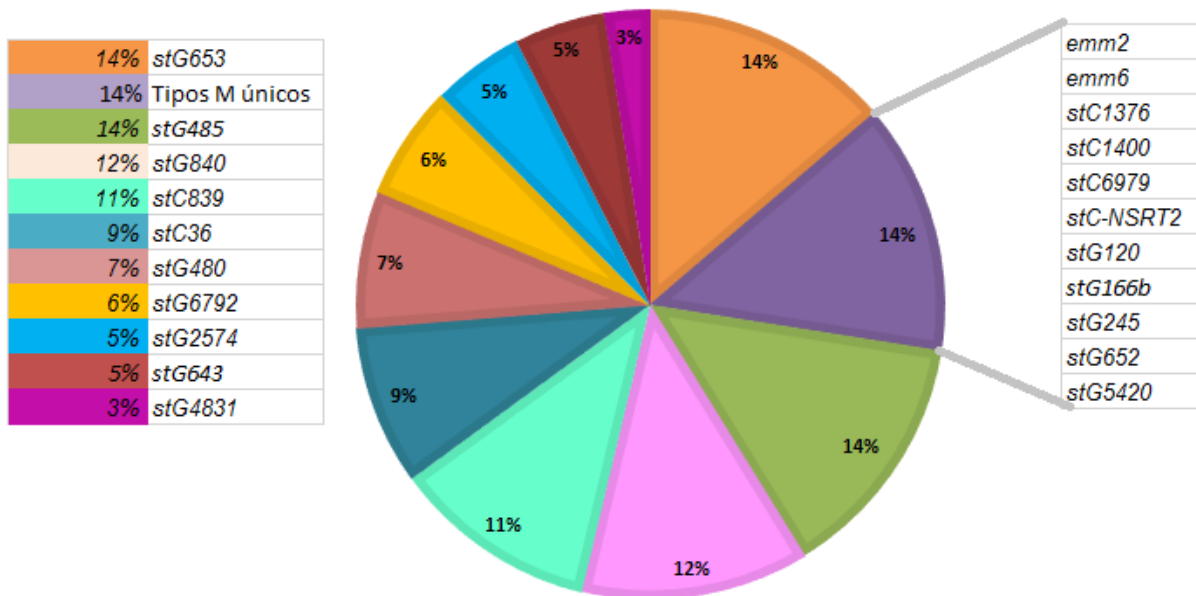


Figura 11. Porcentajes de los alelos para el gen *emm* encontrados en cepas estudiadas.

En estudios anteriores se ha informado que los serotipos más comunes para estos grupos de estreptococos son: *stG480* (19%), *stG6* (16%), *stG485* (16%) y *stG643* (11%)⁽⁵⁰⁾, en la investigación realizada se encontraron 3 de los 4 serotipos más comunes según la literatura, pero no con la misma prevalencia, quizás el más cercano a lo antes descrito sea el caso del serotipo *stG485* con un 14%.

A continuación se presentan los patrones de los serotipos encontrados en las cepas analizadas. Los recuadros en color violeta, indican los patrones de las cepas a las que se les obtuvo la secuencia del gen *emm*.

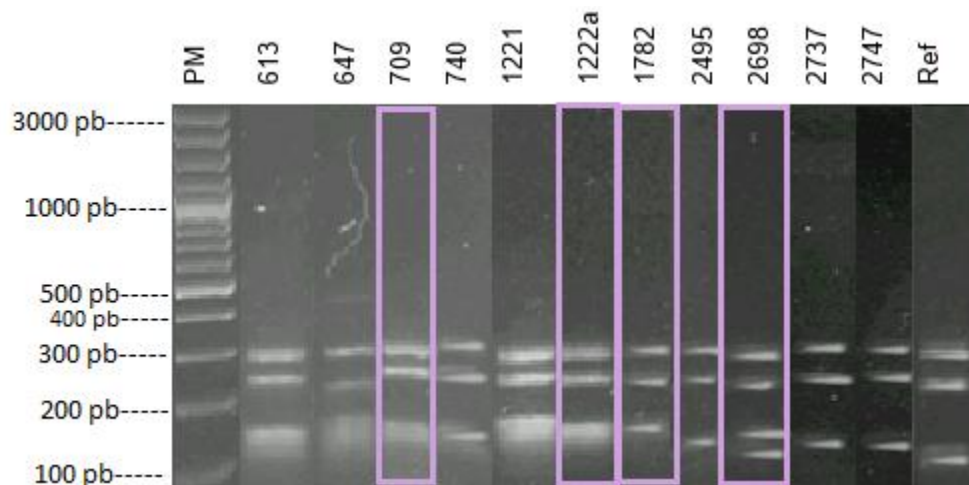


Figura 12. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *DdeI*. tipo *stG653*

En la Figura 12 se puede observar un patrón similar entre las cepas que presentaron el serotipo *stG653*, existía la cepa con el patrón de referencia en el laboratorio, sin embargo hasta que se analizó la secuencia se pudo tener certeza de que todas estas cepas pertenecían a dicho serotipo, de este grupo se mandaron a secuenciar cuatro cepas. La misma situación es observada en las imágenes A y B de la figura 13, que corresponden a las cepas de los tipos *stG840* con 10 aislamientos y siete cepas *stC36*.

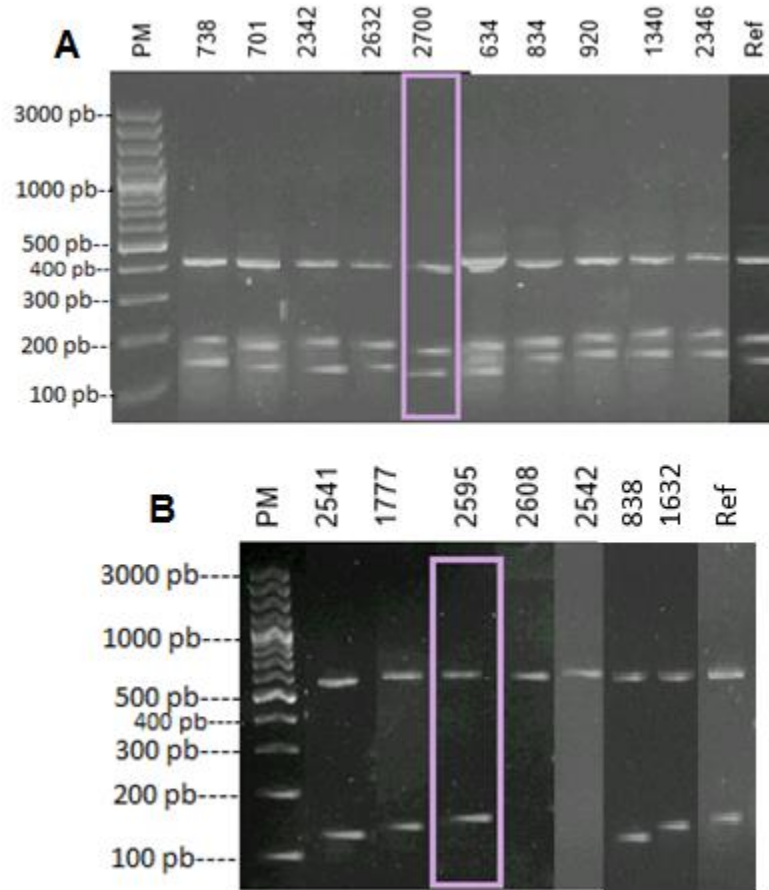


Figura 13. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *DdeI*. A. tipo *stG840* y B. tipo *stC36*.

Sin embargo para las figuras (14-17) con los serotipos *stC839*, *stG643*, *stG480* y *stG485*, la cepa de referencia trabajada bajo las mismas condiciones que las cepas analizadas no presentan un patrón similar, esto pudo ser la causa por la cual no se lograron agrupar dentro de dicho serotipo en un principio con la comparación de los RFLP's.

En el RFLP de la cepa de referencia del tipo M *stC839* de la Figura 14 fue perceptible la banda entre 100 y 200 pb que presentan las demás cepas aunque en un peso molecular más bajo al resto de las demás, pero como se seleccionaron para secuenciar dos cepas con diferente peso molecular en la última banda y

estas resultaron ser el mismo alelo del gen *emm*, se consideró a todo el grupo como un solo tipo M.

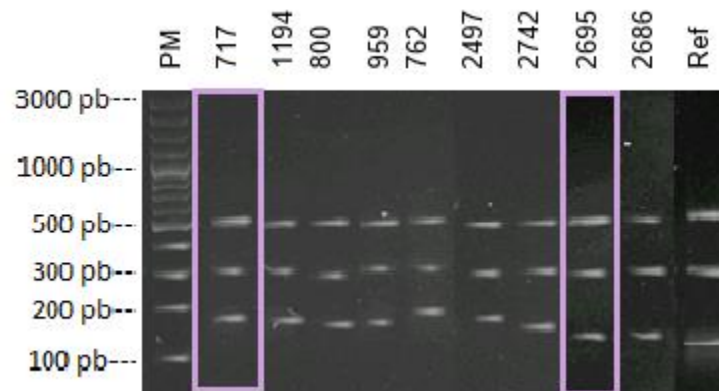


Figura 14. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *DdeI*. tipo *stC839*

En la Figura 15 se observa un patrón muy diferente entre las cepas analizadas y la de referencia, *stG643*, esto representa un nuevo patrón de corte para dicho serotipo, el cual tendrá que considerarse ya que las cepas en estudio pertenecientes a este grupo lo presentaron.

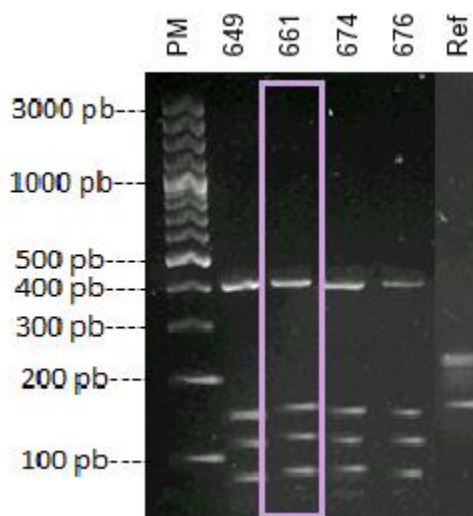


Figura 15. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *DdeI*. tipo *stG643*

La Figura 16 es un caso similar al anterior (Fig. 15) ya que el patrón de restricción de la cepa de referencia, *stG480*, no presenta la banda localizada cercana a las 300 pb pero si la cercana a 200 y la banda superior se encuentra en el mismo rango que las de las cepas en estudio, aquí también tenemos un nuevo patrón para dicho serotipo.

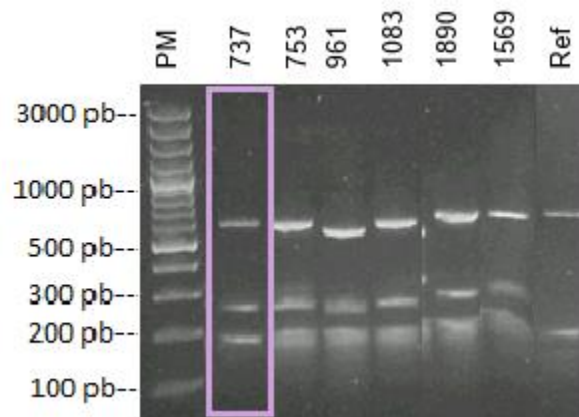


Figura 16. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *Ddel*. tipo *stG480*

En el caso de las cepas tipificadas como *stG485* la situación difiere un poco a los casos anteriores (*stG643* y *stG480*) ya que aquí el RFLP de la cepa de referencia presenta una banda adicional ubicada por debajo de 200 pb que las cepas en estudio no poseen (Figura 17).

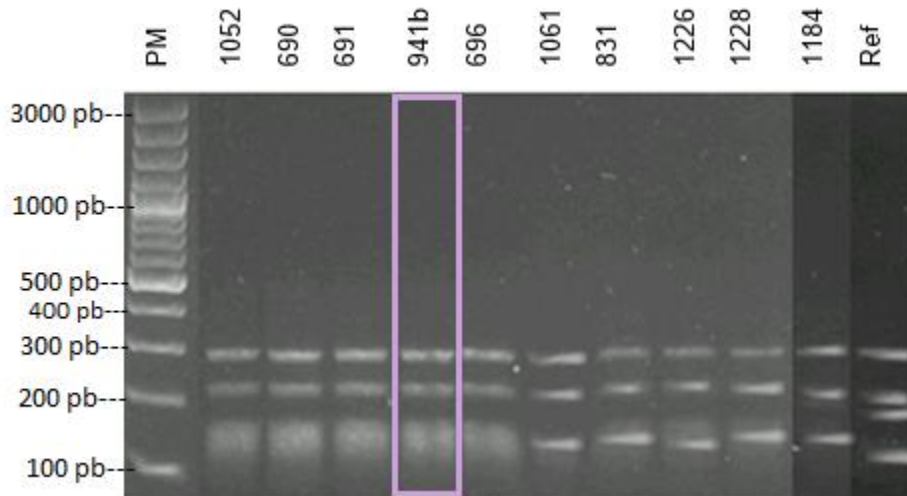


Figura 17. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *Ddel*. tipo *stG485*

En las figuras con los tipos *stG2574*, *stG6792* y *stG4831* (Fig. 18-20) no se cuenta en el laboratorio con una cepa de referencia de estos tipos M, pero se agruparon al presentar el mismo serotipo según la secuencia aunque en las imágenes los patrones se observen muy diferentes.

En la figura 18 se puede observar la presencia de dos bandas constantes en las 4 cepas entre 300 pb y 200 pb, sin embargo las bandas que están alrededor de 100 pb y debajo de este valor no están presentes en todas las cepas, por lo que en este caso no se tendría la certeza de cuál es el patrón para dicho serotipo.

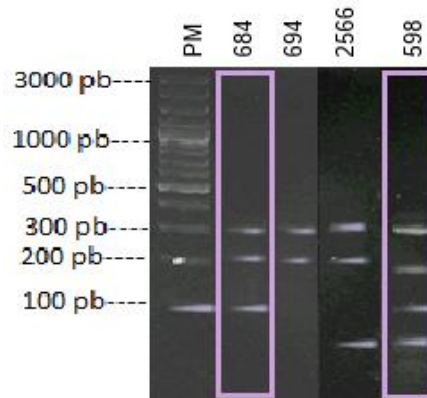


Figura 18. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *Ddel*. Serotipo *stG2574*.

Los tipos M *stG6792* y *stG4831* ilustrados en las Figura 19 se agruparon de acuerdo al resultado de la secuencia del gen *emm*, por eso los patrones observados no son idénticos entre las cepas.

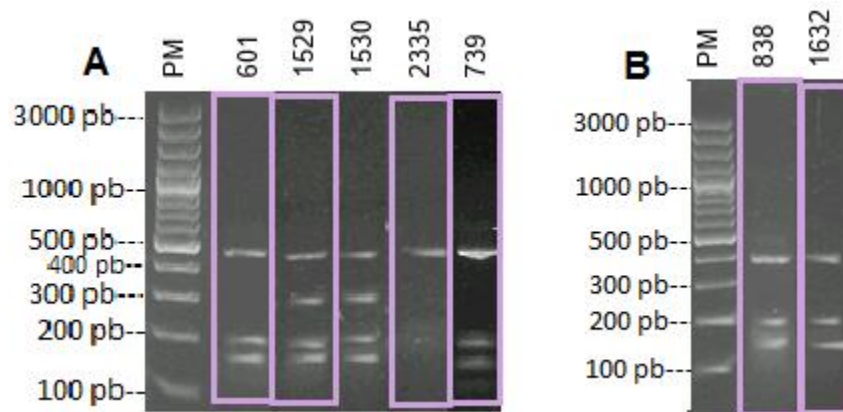


Figura 19. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *DdeI*.
A tipo *stG6792* y B tipo *stG4831*.

En la Figura 20, imagen A se encuentran los 5 tipos M que se encontraron como únicos dentro de las cepas estudiadas, y de los que no se cuenta con una cepa de referencia en el laboratorio, por lo que el patrón mostrado es el patrón para cada uno de los tipos M y está indicado en la parte superior de la imagen. Mientras que en la imagen B se presentan las seis cepas con RFLP único, determinado de la secuencia del gen *emm* y que se cuenta con referencia en el laboratorio, cabe mencionar que dentro de esta imagen se encuentran dos tipos de proteína M pertenecientes al grupo A de estreptococos por lo que esto confirmaría la semejanza que puede existir entre los grupos en estudio (C y G) con el grupo antes mencionado.

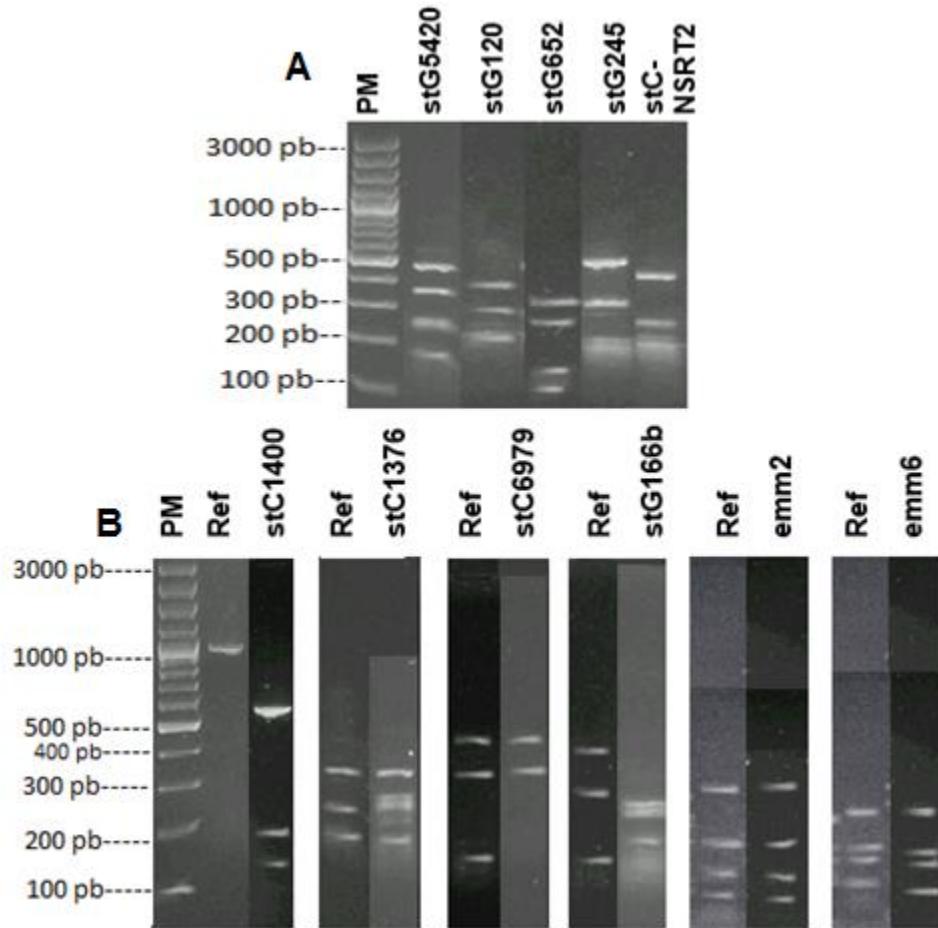


Figura 20. RFLP's de los productos de PCR del gen *emm* cortados con la enzima *DdeI*. Alelos presentados en una sola cepa. A sin referencia, B con referencia.

En el marco teórico se mencionó que es común encontrar tipos M del grupo A de estreptococos en los grupos C y G. En la figura 23 se puede observar esto, dentro de las cepas analizadas se encontraron los tipos M, emm2 y emm6, no son de los más comunes dentro de los tipos M para grupo A, pero confirma lo antes mencionado.

8.6 Relación entre la presencia o ausencia del gen *emm* que codifica para la proteína M con la susceptibilidad antimicrobiana

Como se mencionó anteriormente de las 139 cepas en estudio, 80 dieron positivo para la amplificación del gen *emm*, de estas 80 se relacionó la presencia del gen que codifica para la proteína M con la resistencia que presentaron y los resultados fueron los siguientes. A las cepas que presentan el gen *emm* se les denominó cepas tipificables.

Tabla 12. Resultados de resistencia asociada a presencia del gen *emm*.

Alelo del gen <i>emm</i>	Totales	Resistentes	Antibiótico			
			Tetraciclina	Vancomicina	Eritromicina	Ceftizoxima
<i>stG653</i>	11	6	6	1		1
<i>stG485</i>	11	10	8	1	1	
<i>stG840</i>	10	8	8	2	3	1
<i>stC839</i>	9	3	2	2		1
<i>stG480</i>	6	5	3		1	1
<i>stG6792</i>	5	1		1		
<i>stG2574</i>	4	1		1		
<i>stG643</i>	4	4	4			
<i>stG4831</i>	2	1	1			
<i>stC-NSRT2</i>	1	1	1			1
<i>stC1400</i>	1	1	1			
<i>stG245</i>	1	1			1	
<i>stC1376</i>	1	1	1			
<i>stG5420</i>	1	1			1	
<i>stG652</i>	1	1	1			
<i>stG120</i>	1	1	1	1		
<i>stC6979</i>	1	1	1			
Total	70	47	38(47.5%)	9 (11.2%)	7 (8.75%)	5 (6.2%)

Como se puede observar en la Tabla 12, asociando la resistencia presentada por las cepas analizadas con la presencia del gen *emm* que codifica para la proteína M, se puede decir que la presencia de este se asocia en distinta medida a la resistencia hacia la tetraciclina (47.5%) y vancomicina (11.2%), comparado con las cepas en las que no se pudo identificar el gen *emm*, a las que se les nombró no tipificables y presentan porcentajes menores de resistencia a los antibióticos antes mencionados (Tabla 13). Las cepas con los tipos *stG653*, *stG840* y *stG485* son los que mayor resistencia hacia tetraciclina presentan.

En cuanto a las cepas que no fueron tipificables, es decir que no amplifican el gen *emm*, es sobresaliente el hecho de que todas las cepas de este estudio que son resistentes a ceftibuteno y a oxacilina están dentro de este grupo (Tabla 13), lo que reiteraría la propuesta que se hizo anteriormente de que la resistencia a estos antibióticos podría estar asociada a una mutación o algún otro gen de virulencia, presentándose de manera clonal y no a la presencia del gen *emm*. Otro aspecto a tomar en cuenta para mejorar el análisis es la determinación de las especies o subespecies de las cepas.

Tabla 13. Distribución de la resistencia en cepas no tipificables.

No tipificables		Antibiótico			
		Tetraciclina	Vancomicina	Eritromicina	Ceftizoxima
Totales	59				
Resistentes	50	21 (35.5%)	3 (5%)	3 (5%)	4 (6.7%)
		Ceftibuteno	Oxacilina	Levofloxacina	Quinupristina-Dalfopristina
		38 (64%)	27(45.7%)	1 (1.7%)	1(1.7%)

Realizando un análisis comparativo de la resistencia encontrada en las cepas tipificables contra la encontrada en las no tipificables (porcentaje que se encuentra entre paréntesis en las tablas 12 y 13), se observa que la resistencia a eritromicina y ceftizoxima en ambos grupos es semejante, sin embargo la resistencia encontrada en tetraciclina y vancomicina es más alta en las cepas tipificables para el gen *emm*, por esta razón podría asociarse dicha resistencia a la presencia del gen. Por otro lado la resistencia que se encontró para ceftibuteno y oxacilina es única en las cepas no tipificables, en este caso se podría asociar la ausencia del gen a dicha resistencia, para poder aseverar esto se tendría que identificar la especie a la que pertenece la cepa, realizar estudios como CMI, PCR de genes de algún factor de virulencia, o bien por análisis de MLST, sin embargo para la última técnica solo se podrían analizar a profundidad las cepas de *Streptococcus dysgalactiae* subsp *dysgalactiae*.

9. CONCLUSIONES

- Las cepas analizadas de estreptococos de los grupos C y G tienen una resistencia elevada hacia tetraciclina (42%), ceftibuteno (27%) y oxacilina (19%), teniendo en cuenta que no se han reportado cepas resistentes a ceftibuteno y oxacilina.
- La resistencia para tetraciclina se encontró en una proporción de más del doble de lo que se esperaba, se podría analizar la proporción de cepas que expresan los genes de resistencia para tetraciclina.
- La resistencia encontrada para eritromicina fue menor a lo que se esperaba (<10%), puede seguir siendo utilizado como tratamiento en infecciones por estreptococos.
- En cerca del 57% de las cepas de estreptococos de los grupos C y G se identificó el gen *emm* que codifica para la proteína M.
- Los alelos *stG653*, *stG485*, *stG840* y *stC839* representaron la mitad de las cepas de los grupos C y G con presencia del gen *emm*.
- La resistencia a tetraciclina es más elevada en cepas tipificables que en no tipificables, es decir se encuentra asociada en su mayoría a cepas que presentan el gen *emm*.
- La resistencia a ceftibuteno y oxacilina en los aislamientos de estreptococos de los grupos C y G se asocia a cepas no tipificables (ausencia del gen *emm*).

- En 80 cepas positivas para el gen *emm* se encontraron 21 tipos M diferentes, uno de estos fue considerado como subalelo nuevo (*stG 166b*).

10. BIBLIOGRAFIA

1. Ball LC, Parker MT. (1979). The cultural and biochemical characters of *Streptococcus milleri* strains isolated from human sources. JOURNAL OF HYGIENE 82:63-78.
2. Balsamo GA. (2007). Antibacterial agent susceptibility and resistance & bacterial anatomical site analysis. INFECTIOUS DISEASE EPIDEMIOLOGY SECTION OFFICE OF PUBLIC HEALTH LOUISIANA US. Disponible en: http://new.dhh.louisiana.gov/assets/oph/CenterPHCH/CenterCH/infectious_e_pi/AntibioticSensitivity/VetRelatedAR/AntibioticAnimal2006_Introduction.pdf Consultado 10-02-13.
3. Barnham M, Kerby J, Chandler RS, Millar MR. (1989). Group C streptococci in human infection: a study of 308 isolates with clinical correlations. EPIDEMIOLOGY AND INFECTION 102(3):379-390.
4. Beall B, Facklam R, Thompson T. (1996). Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 4(4):953-958.
5. Bisno AL, Gaviria JM. (2000). Group C and G Streptococci. Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis. New York: Oxford University Press.
6. Bradley SF, Gordon JJ, Baumgartner DD, Marasco WA, Kauffman CA. (1991). Group C Streptococcal bacteremia: analysis of 88 cases. REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES 13(2):270-280.

7. Breiman RF, Silverblatt FJ. (1986). Systemic *Streptococcus equi* infection in a horse handler-a case of human strangles. THE WESTERN JOURNAL OF MEDICINE 145(3):385-386.
8. Brooks G, Butel J, Morse S. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª ed. El Manual Moderno. (2008). pp: 251-261. México.
9. Chang YC, Lo HH. (2013). Identification, clinical aspects, susceptibility pattern, and molecular epidemiology of *beta*-haemolytic group G *Streptococcus anginosus* group isolates from central Taiwan. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE 76(3):262-265 .
10. Chanter N, Collin NC, Mumford JA. En: H. Nakajima, W. Plow- right (Eds.), Equine Infectious Diseases VII: Proceedings of the Seventh International Conference, Tokyo, 8-11 Junio 1994, R & W Publications Ltd. Newmarket, 1994, pp. 201–205.
11. Cheeseman M, Genain C, Smith CD. (1990). Group C streptococcal meningitis with favorable recovery. A case report. THE JOURNAL OF THE KENTUCKY MEDICAL ASSOCIATION 88 (10):545-546.
12. Chhatwal GS, Blobel H. (1986). Binding of host plasma proteins to streptococci and their role in streptococcal pathogenicity. IRCS MEDICAL SCIENCE 14:1-3.
13. Chhatwal GS, Dutra IS, Blobel H. (1985). Fibrinogen binding inhibits the fixation of the third component of human complement on surface of groups A, B, C, and G streptococci. MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY 29(10):973-980.

14. Chhatwal GS, Preissner KT, Müller-Berghaus G, Blobel H. (1987). Specific binding of the human S protein (vitronectin) to streptococci, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. INFECTION AND IMMUNITY 55(8): 1878–1883.
15. Chhatwal GS, Talay SR. Capítulo 16: Genetics and Pathogenicity Factors of group C and G Streptococci. pp. 163-176. En libro: Gram-Positive Pathogens. American Society for Microbiology (2000). Washington D.C.
16. Chhatwal GS, Talay SR. Capítulo 17: Pathogenicity factors in Group C and G Streptococci. pp. 177-183. En libro: Gram-Positive Pathogens. American Society for Microbiology (2000). Washington D.C.
17. Cleary PP, Peterson J, Chen C, Nelson C. (1991). Virulent human strains of group G streptococci express a C5a peptidase enzyme similar to that produced by group A streptococci. INFECTION AND IMMUNITY 59(7):2305-2310.
18. Colman G, Williams REO. Taxonomy of some human viridans streptococci pp. 281-299. En: Wannamaker, Matsen MJ (ed.), Streptococci and streptococcal diseases: recognition, understanding and management. 1972.
19. Dhanda V, Chaudhary P, Toor D, Kumar R, Chakraborti A. (2013). Antimicrobial susceptibility pattern of *beta*-haemolytic group A, C and G streptococci isolated from North India. JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 62(Pt 3):386-393.
20. Euzéby JP. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: "*Streptococcus equisimilis*". Disponible en:

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdicto/ss/dysgalactiae.html> Consultado 10-02-13.

21. Facklam R. Manual de Procedimientos. Aislamiento e identificación de *Streptococcus*. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Atlanta Georgia US (1975) pp. 3-6, 35-38.
22. Facklam RR. (1977). Physiological differentiation of viridans streptococci. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 5:184-201.
23. Fischetti VA. (1989). Streptococcal M protein: Molecular design and biological behavior. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 2(3):285-314.
24. Günther E, Ozegowski JH, Köhler W. (1996). Occurrence of extracellular hyaluronic acid and hyaluronatlyase in streptococci of groups A, B, C, and G. *ZENTRALBLATT FÜR BAKTERIOLOGIE: INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY* 285(1):64-73.
25. Horstmann RD, Sievertsen HJ, Knobloch J, Fischetti VA. (1988). Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 85(5):1657-1661.
26. Inzunza A, Perea L. (2005). Fiebre Reumática. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/fiebre/pato.html>. Consultado 05-02-2013.
27. Jean-François MJ, Poskitt DC, Turnbull SJ, Macdonald LM, Yasmeen D. (1991). Protection against *Streptococcus equi* infection by monoclonal

antibodies against an M-like protein. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY 137(9):2125-2133.

28. Johnson C, Tunkel A. Viridans streptococci and Group C and G streptococci. En: Mandell, Bennett, Dolin, editors. Principles and practice of infectious diseases, vol. 2, 5^a ed. (2000). Filadelfia Churchill Livingstone.
29. Kataja J, Seppälä H, Skurnik M, Sarkkinen H, Huovinen P. (1998). Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 42(6):1493-1494.
30. Kimura K, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Arakawa Y. (2009). Practical disk diffusion test for detecting group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 47(12):4154-4157.
31. Kuusi M, Lahti E, Virolainen A, Hatakka M, Vuento R, Rantala L, Vuopio-Varkila J, Seuna E, Karppelin M, Hakkinen M, Takkinen J, Gindonis V, Siponen K, Huotari K. (2006). An outbreak of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* associated with consumption of fresh goat cheese. BMC INFECTIOUS DISEASES 27 6:36.
32. Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. NATURE 379(6563):311-319.
33. Leclercq R, Courvalin P. (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 35(7):1267-1272.

34. Liang OD, Preissner KT, Chhatwal GS. (1997). The hemopexin-type repeats of human vitronectin are recognized by *Streptococcus pyogenes*. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 234(2):445-449.
35. Liu P. (1954). Carbon dioxide requirement of group F and minute colony G hemolytic streptococci. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 68(3):282-288.
36. MacFaddin JF. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ªed. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2003, pp. 522-524.
37. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock Biología de los microorganismos. 12ª ed. Pearson Education. Madrid, España. 2009, pp. 880-882.
38. Mollison LC, Donaldson E. (1990). Group C streptococcal meningitis. THE MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA 152(6):319-320.
39. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 5ªed. Elsevier. Barcelona, España. 2006, pp. 18, 21, 233, 235, 237-251.
40. Murray RP, Rosenthal KS, Pfaller M. Capítulo 22: *Streptococcus*. En LIBRO Patrick R. Murray. Microbiología Médica. 6ª ed. Elsevier-Mosby. España 2009.
41. Palavecino-Rosales E. Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Boletín de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile 26(3). Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/laboratorio/Interpretacion.html>. Consultado 05-02-13.

42. Parker MT, Ball LC. (1976). Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 9(3):275-302.
43. Patti JM, Höök M. (1994). Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY 6(5):752-758.
44. Perea Mejía L.M. *Streptococcus* pp:173-184. En Tay J., Manjarrez M.E., Molina, J. Microbiología Bacteriología y Virología. 1ª Ed. 2010. Méndez editores. México.
45. Petri W, Chambers H. Antimicrobianos. En Goodman A, Hardman J, Limbird L. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ª ed. Vol. II. Mcgraw-Hill Interamericana. 2003, pp. 1162-1164, 1207-1224. México D.F.
46. Podbielski AM, Mignon J, Weber-Heynemann N, Schnitzler R, Kaufhold A. Characterization of groups C (GCS) and G (GGS) streptococcal M protein (emm) genes. pp. 234-236. En libro: Totolian (ed.), Pathogenic Streptococci: Present and Future. Lancer Publications, (1994). San Petersburgo, Rusia.
47. Poole CM, Wilson G. Infection with minute colony forming *Beta*-hemolytic streptococci. (1976). JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 29(8):740-745.
48. Prescott LM, Harley JP, Klein DA (ed). Microbiología. 4ª ed. McGraw-Hill. 1999, pp. 699-719.
49. Quinn RJ, Hallett AF, Appelbaum PC, Cooper RC. (1978). Meningitis caused by *Streptococcus dysgalactiae* in a preterm infant. AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 70(6):948-50.

50. Rantala S, Vahakuopus S, Vuopio-Varkila J, Vuento R, Syrjanen J. (2010). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Bacteremia, Finland, 1995-2004. EMERGING INFECTIOUS DISEASES 16(5):843-846.
51. Rice K, Bayles K. (2008). Molecular control of bacterial death and lysis. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS 72(1):85-109.
52. Rivera J, Vannakambadi G, Höök M, Speziale P. (2007). Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 98(3):503-511.
53. Rolston KV, LeFrock JL, Schell RF. (1982). Activity of nine antimicrobial agents against Lancefield group C and group G streptococci. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 22(5):930-932.
54. Romero R. Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. Médica Panamericana. 2007, pp. 699-705. México D.F.
55. Rose HD, Allen JR, Witte G. (1980). *Streptococcus zooepidemicus* (group C) pneumonia in a human. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 11(1):76-78.
56. Ruoff KL. (1988). "*Streptococcus anginosus*: The unrecognized pathogen. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS 1(1):102-108.
57. Shlaes DM, Lerner PI, Wolinsky E, Gopalakrishna KV. (1981). Infections due to Lancefield group F and related streptococci. MEDICINE 60(3):197-207.
58. Simpson WJ, Musser JM, Cleary PP. (1992). Evidence consistent with horizontal transfer of the gene (*emm12*) encoding serotype M12 protein

- between group A and group G pathogenic streptococci. *INFECTION AND IMMUNITY* 60(5):1890-1893.
59. Soedarmanto I, Schwarz S, Liebisch B, Lämmler C. (1995). Tetracycline resistance determinants among streptococci of serological group G and L. *VETERINARY MICROBIOLOGY* 45(4):331-337.
60. Struthers J, Westran R. *Clinical Bacteriology*. ASM Press (2003) pp: 19-31, 39, 49-65. Washington DC.
61. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. (1996). *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 40(8):1817-1824.
62. Turner JC, Hayden FG, Lobo MC, Ramirez CE, Murren D. (1997). Epidemiologic evidence for Lancefield group C *beta*-hemolytic streptococci as a cause of exudative pharyngitis in college students. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 35(1):1-4.
63. Vasi J, Frykberg L, Carlsson LE, Lindberg M, Guss B. (2000). M-like proteins of *Streptococcus dysgalactiae*. *INFECTION AND IMMUNITY* 68(1):294-302.
64. Vignoli R, Seija V. Capítulo 35 Principales mecanismos de resistencia antibiótica. pp. 649-662. En libro *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2ª ed. Universidad de la República; Uruguay; 2006.
65. Visai L, Bozzini S, Raucci G, Toniolo A, Speziale P. (1995). Isolation and characterization of a novel collagen-binding protein from *Streptococcus*

pyogenes strain 6414. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
270(1):347-353.

- 66.** Wayne P. (2005). Clinical and Laboratory Standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute.