

# TESIS DOCTORAL

Mecanismos de resistencia a  
antibióticos macrólidos,  
lincosamidas y estreptograminas en  
*Streptococcus* y *Enterococcus*

**Aránzazu Portillo Barrio**



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA



# **TESIS DOCTORAL**

Mecanismos de resistencia a  
antibióticos macrólidos,  
lincosamidas y estreptograminas en  
*Streptococcus* y *Enterococcus*

**Aránzazu Portillo Barrio**

Universidad de La Rioja  
Servicio de Publicaciones  
2003

Esta tesis doctoral, dirigida por las Doctoras Doña Carmen Torres Manrique y Doña Fernanda Ruiz Larrea, fue leída el 29 de abril de 2002, y obtuvo la calificación de Sobresaliente cum Laude por Unanimidad

© Aránzazu Portillo Barrio

Edita: Universidad de La Rioja  
Servicio de Publicaciones

ISBN 84-688-2331-7



**UNIVERSIDAD DE LA RIOJA**

**Dpto. de Agricultura y Alimentación**

**Área de Bioquímica y Biología Molecular**

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos de resistencia a  
antibióticos macrólidos,  
lincosamidas y estreptograminas  
en *Streptococcus* y *Enterococcus***

**Memoria presentada por ARÁNZAZU PORTILLO BARRIO  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Rioja**

**Logroño, febrero de 2002**



**UNIVERSIDAD DE LA RIOJA**

DEPARTAMENTO AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

COMPLEJO CIENTÍFICO TECNOLÓGICO. Madre de Dios, 51. 26006 LOGROÑO (LA RIOJA). Tf. 941/299 720. Fax 941 299 721

**Dra. CARMEN TORRES MANRIQUE**, Profesora Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja y

**Dra. FERNANDA RUIZ LARREA**, Profesora Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja,

por la presente declaran que,

la memoria titulada “**Mecanismos de resistencia a antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas en *Streptococcus* y *Enterococcus***”, que presenta Dña. ARÁNZAZU PORTILLO BARRIO, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja bajo su dirección, y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor,

lo que hacen constar en Logroño, a veinticinco de febrero de 2002.

Fdo.: Carmen Torres Manrique

Fdo.: Fernanda Ruiz Larrea

*A mis padres y*

*a Miguel.*

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Género <i>Streptococcus</i></b> .....	4
1.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	5
1.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	7
1.3 <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos de los grupos C y G.....	9
1.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	10
<b>2. Género <i>Enterococcus</i></b> .....	12
<b>3. Antibióticos MLS (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas)</b> .....	16
3.1 Estructura química de los macrólidos.....	17
3.1.1 Macrólidos de 14 átomos.....	18
3.1.2 Macrólidos de 15 átomos.....	19
3.1.3 Macrólidos de 16 átomos.....	19
3.2 Estructura química de las lincosamidas.....	20
3.3 Estructura química de las estreptograminas.....	22
<b>4. Mecanismo de acción de los antibióticos MLS</b> .....	22
<b>5. Mecanismos de resistencia a antibióticos MLS</b> .....	25
5.1 Resistencia intrínseca (impermeabilidad de las membranas).....	25
5.2. Resistencia adquirida.....	25
5.2.1. Modificación de la diana por acción de metilasas.....	25
5.2.2. Eflujo activo del antibiótico.....	32
5.2.3. Modificación de la diana por mutaciones del ARNr 23S y/o proteínas ribosomales.....	35
5.2.4. Inactivación enzimática.....	35
<b>6. Consumo de macrólidos y selección de resistencias en <i>Streptococcus</i></b> .....	37
<b>7. Datos referentes al consumo de macrólidos en España</b> .....	41
<b>8. Empleo de antibióticos MLS en animales</b> .....	43

---

<b>OBJETIVOS</b> .....	47
------------------------	----

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>1. Estirpes bacterianas</b> .....	53
<b>2. Medios y condiciones de cultivo</b> .....	55
<b>3. Estudios de sensibilidad a antibióticos</b> .....	56
3.1    Método de difusión por disco o antibiograma .....	56
3.2    Determinación de la CMI.....	58
<b>4. Extracción de ADN genómico</b> .....	59
<b>5. Extracción de ADN plasmídico</b> .....	62
<b>6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	64
<b>7. Electroforesis en gel de agarosa</b> .....	70
<b>8. Hibridación con sonda de ADN</b> .....	70
8.1    Preparación de la membrana para <i>dot blotting</i> .....	70
8.2    Transferencia por presión positiva: preparación de la membrana para <i>southern blotting</i> .....	70
8.3    Hibridación con digoxigenina ( <i>dot blotting</i> o <i>southern blotting</i> ) .....	72
8.4    Hibridación radioactiva ( <i>southern blotting</i> ) .....	73
8.5    Hibridación tras lisis de colonias.....	74
<b>9. Electroforesis de campos pulsados (PFGE)</b> .....	75
<b>10. Conjugación bacteriana</b> .....	77
<b>11. Vectores de clonaje</b> .....	78
<b>12. Enzimas de restricción</b> .....	81
<b>13. Preparación de células competentes</b> .....	81
<b>14. Ligación</b> .....	82
<b>15. Transformación bacteriana</b> .....	82
<b>16. Selección de células transformantes</b> .....	83
<b>17. Ensayos de acumulación intracelular de eritromicina</b> .....	84
<b>18. Bioensayos de inactivación de eritromicina</b> .....	84

---

## RESULTADOS

<b><i>S. pyogenes</i> en La Rioja</b> .....	89
1. Estudio epidemiológico.....	89
2. Estudios de sensibilidad a eritromicina y otros antibióticos MLS.....	90
3. Mecanismos de resistencia MLS.....	96
4. Caracterización clonal de las cepas de <i>S. pyogenes</i> resistentes a eritromicina .....	99
<b><i>S. agalactiae</i> en La Rioja</b> .....	103
1. Estudio epidemiológico.....	103
2. Estudios de sensibilidad a eritromicina y otros antibióticos MLS.....	104
3. Mecanismos de resistencia MLS.....	108
4. Transferencia por conjugación del gen <i>mef(A)</i> .....	111
5. Caracterización clonal de las cepas de <i>S. agalactiae</i> resistentes a eritromicina .....	112
<b><i>Streptococcus</i> <math>\beta</math>-hemolíticos los grupos G y C en La Rioja</b> .....	115
1. Estudio epidemiológico.....	115
2. Estudios de sensibilidad a eritromicina y otros antibióticos MLS.....	116
3. Mecanismos de resistencia MLS.....	120
4. Caracterización clonal de las cepas de SGG y SGC resistentes a eritromicina .....	122
<b><i>S. pneumoniae</i> en La Rioja</b> .....	125
1. Estudio epidemiológico.....	125
2. Estudios de sensibilidad a eritromicina y otros antibióticos MLS.....	126
3. Mecanismos de resistencia MLS.....	131
4. Resistencia a penicilina y cefotaxima .....	134

---

<b><i>Enterococcus spp</i></b> .....	139
1. Genes de resistencia a antibióticos MLS .....	139
1.1 Detección de genes <i>erm</i> .....	140
1.2 Detección de genes relacionados con inactivación de macrólidos ...	142
1.3 Detección de genes relacionados con eflujo de macrólidos .....	144
2. Gen <i>msrC</i> .....	146
2.1 Caracterización del gen <i>msrC</i> .....	146
2.2 Acumulación intracelular de eritromicina .....	152
2.3 Clonaje .....	158

## DISCUSIÓN

<i>S. pyogenes</i> .....	165
<i>S. agalactiae</i> .....	172
<i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos del grupo G y grupo C .....	179
<i>S. pneumoniae</i> .....	181
<i>Enterococcus spp</i> .....	190

<b>CONCLUSIONES</b> .....	197
---------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	201
---------------------------	-----

<b>ANEXO</b> .....	247
--------------------	-----

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.-** Macrólidos de uso terapéutico aislados de especies bacterianas.
- Tabla 2.-** Clasificación de los macrólidos.
- Tabla 3.-** Clases de genes *erm*.
- Tabla 4.-** Genes *erm* descritos en *Streptococcus* y *Enterococcus*.
- Tabla 5.-** Genes de eflujo de macrólidos en cocos Gram-positivos.
- Tabla 6.-** Genes de inactivación de antibióticos MLS en cocos Gram-positivos.
- Tabla 7.-** Antibióticos MLS empleados en antibiogramas.
- Tabla 8.-** Antibióticos empleados en los estudios de sensibilidad.
- Tabla 9.-** Componentes de una reacción de PCR.
- Tabla 10.-** Cebadores y condiciones de PCR de genes *erm*.
- Tabla 11.-** Cebadores y condiciones de PCR de genes de bombas de eflujo de macrólidos.
- Tabla 12.-** Cebadores y condiciones de PCR de genes de inactivación de macrólidos.
- Tabla 13.-** Cebadores y condiciones de PCR para identificación de especies de *Enterococcus*.
- Tabla 14.-** Cebadores y condiciones de PCR del gen *aph(3')*.
- Tabla 15.-** Otros cebadores y condiciones de PCR utilizados en este estudio.
- Tabla 16.-** Origen de las muestras de las que se aislaron las cepas de *S. pyogenes*.
- Tabla 17.-** Edades de los pacientes de los que se aislaron las cepas de *S. pyogenes*.
- Tabla 18.** Sensibilidad de *S. pyogenes* a eritromicina, penicilina y cefotaxima.
- Tabla 19.-** Número y porcentaje de cepas de *S. pyogenes* Er<sup>R</sup>.
- Tabla 20.-** Fenotipos de resistencia MLS en las cepas de *S. pyogenes* Er<sup>R</sup>.
- Tabla 21.** Sensibilidad a Er y mecanismos de resistencia en *S. pyogenes*.
- Tabla 22.-** Patrones de restricción de aislados de *S. pyogenes* Er<sup>R</sup>.
- Tabla 23.-** Origen de las muestras de las que se aislaron las cepas de *S. agalactiae*.
- Tabla 24.-** Edades de los pacientes de los que se aislaron las cepas de *S. agalactiae*.
- Tabla 25.-** Sensibilidad de *S. agalactiae* a eritromicina, penicilina y cefotaxima.
- Tabla 26.-** Número y porcentaje de cepas de *S. agalactiae* Er<sup>R</sup>.
- Tabla 27.-** Fenotipos de resistencia MLS en las cepas de *S. agalactiae* Er<sup>R</sup>.
- Tabla 28.-** Sensibilidad a Er y mecanismos de resistencia en *S. agalactiae*.

- Tabla 29.-** Patrones de restricción de aislados de *S. agalactiae* Er<sup>R</sup>.
- Tabla 30.-** Origen de las muestras de las que se aislaron las cepas de SGG y SGC.
- Tabla 31.-** Edades de los pacientes de los que se aislaron las cepas de SGG y SGC.
- Tabla 32.** Sensibilidad de SGG y SGC a eritromicina, penicilina y cefotaxima.
- Tabla 33.-** Número de cepas de SGG y SGC Er<sup>R</sup> y fenotipos de resistencia MLS.
- Tabla 34.-** Sensibilidad a Er y mecanismos de resistencia en SGG y SGC.
- Tabla 35.-** Patrones de restricción de aislados de SGG y SGC Er<sup>R</sup>.
- Tabla 36.-** Origen de las muestras de las que se aislaron las cepas de *S. pneumoniae*.
- Tabla 37.-** Edades de los pacientes de los que se aislaron las cepas de *S. pneumoniae*.
- Tabla 38.-** Sensibilidad de *S. pneumoniae* a eritromicina.
- Tabla 39.-** Número y porcentaje de cepas de *S. pneumoniae* Er<sup>R</sup>.
- Tabla 40.-** Fenotipos de resistencia MLS en las cepas de *S. pneumoniae* Er<sup>R</sup>.
- Tabla 41.-** Sensibilidad a Er y mecanismos de resistencia en *S. pneumoniae*.
- Tabla 42.-** Sensibilidad de *S. pneumoniae* a penicilina y cefotaxima.
- Tabla 43.-** Número y porcentaje de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y cefotaxima.
- Tabla 44.-** Procedencia de las cepas de *Enterococcus* spp.
- Tabla 45.-** Genes de resistencia a macrólidos en cepas de *Enterococcus* spp.
- Tabla 46.-** Resultados del test de Gots para Er con cepas de *Enterococcus* spp.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.-** Estructura química de antibióticos MLS representativos.
- Figura 2.-** Mecanismo de acción de antibióticos MLS.
- Figura 3.-** Sitios de unión de macrólidos.
- Figura 4.-** Impacto ecológico del empleo de antibióticos en animales.
- Figura 5.-** Mapa del vector pGEM-T Easy.
- Figura 6.-** Mapa del vector pCL84-*xyl*.
- Figura 7.-** Mapa del vector pAM401.
- Figura 8.-** Mapa del vector pMP278.
- Figura 9.-** Distribución de fenotipos de resistencia MLS en *S. pyogenes*.
- Figura 10.-** Cepa de *S. pyogenes* con fenotipo M. A) E- test; B) Test de doble difusión con disco.
- Figura 11.-** Distribución de CMI<sub>s</sub> a Er en *S. pyogenes* según su fenotipo.
- Figura 12.-** Hibridación por *dot blotting* usando una sonda *erm*(TR).
- Figura 13.-** Amplificación por PCR con los cebadores *mef*(A/E).
- Figura 14.-** Distribución de CMI<sub>s</sub> a Er y genes de resistencia en *S. pyogenes* Er<sup>R</sup>.
- Figura 15.-** Perfiles de PFGE en aislados de *S. pyogenes* Er<sup>R</sup>.
- Figura 16.-** Evolución de la resistencia a Er en *S. agalactiae*.
- Figura 17.-** Distribución de fenotipos de resistencia MLS en *S. agalactiae*.
- Figura 18.-** Amplificación por PCR con los cebadores *erm*(TR).
- Figura 19.-** Amplificación por PCR con los cebadores *mre*(A).
- Figura 20.-** Distribución de CMI<sub>s</sub> a Er y genes de resistencia en *S. agalactiae* Er<sup>R</sup>.
- Figura 21.-** Perfiles de PFGE en aislados de *S. agalactiae* Er<sup>R</sup>.
- Figura 22.-** Fenotipos MLS de cepas de SGG: A) Sensible; B) MLS<sub>B</sub> constitutivo; C) MLS<sub>B</sub> inducible.
- Figura 23.-** Perfiles de PFGE en aislados de SGC Er<sup>R</sup>.
- Figura 24.-** Evolución de la resistencia a Er en *S. pneumoniae*.
- Figura 25.-** Fenotipos MLS de cepas de *S. pneumoniae*: A) Sensible; B) M; C) MLS<sub>B</sub> constitutivo.
- Figura 26.-** Distribución de fenotipos de resistencia MLS en *S. pneumoniae*.
- Figura 27.-** Amplificación por PCR con los cebadores *erm*(B).

- Figura 28.-** Amplificación por PCR con los cebadores *mef*(E).
- Figura 29.-** Distribución de CMIa a Er y genes de resistencia en *S. pneumoniae* Er<sup>R</sup>.
- Figura 30.-** Evolución de la resistencia a penicilina en *S. pneumoniae*.
- Figura 31.-** Distribución de CMIa a penicilina en cepas de *S. pneumoniae*.
- Figura 32.-** Evolución de la resistencia a cefotaxima en *S. pneumoniae*.
- Figura 33.-** Distribución de CMIa a cefotaxima en cepas de *S. pneumoniae*.
- Figura 34.-** Amplificación por PCR con los cebadores *erm*(A).
- Figura 35.-** A) Amplificación por PCR con los cebadores *erm*(TR); B) *Southern blotting* del gel mostrado con una sonda *erm*(TR).
- Figura 36.-** *Micrococcus luteus* sensible a Er y ensayo de inactivación de Er con sobrenadante de *Enterococcus*.
- Figura 37.-** Amplificación por PCR con los cebadores *mef*(A/E).
- Figura 38.-** Amplificación por PCR con los cebadores *msr*(A).
- Figura 39.-** Comparación de la proteína MsrC con otros transportadores ABC.
- Figura 40.-** A) Extracción de ADN genómico y plasmídico de *Enterococcus*.  
B) *Southern blotting* con una sonda *msrC*.
- Figura 41.-** Secuencia de *E. faecium* para el diseño de cebadores de PCR de *msrC*.
- Figura 42.-** Comparación de proteína MsrC *E. faecium* AR10 vs. *E. faecium* E136.
- Figura 43.-** Ensayo de acumulación de Er en la cepa de *E. faecium* E136.
- Figura 44.-** Ensayo de acumulación de Er en la cepa de *E. faecium* AR10.
- Figura 45.-** Ensayo de acumulación de Er en la cepa de *E. faecalis* E9.
- Figura 46.-** Sistema de bombeo de Er en las cepas SE34 y F11.
- Figura 47.-** Ensayo de acumulación de Er en la cepa de *S. aureus* RN4220.
- Figura 48.-** Ensayo de acumulación de Er en la cepa de *S. aureus* SAM1100.
- Figura 49.-** Ensayo de acumulación de Er en la cepa de *S. aureus* SA1.
- Figura 50.-** Bombeo de Er sin CCCP de las cepas SAM1100 y RN4220 vs. SA1.
- Figura 51.-** Estrategia de clonaje de *msrC* con pGEM-T easy y pCL84-*xyl*.
- Figura 52.-** Amplificación por PCR con los cebadores *msrC*-12 y *msrC*-5.

## ABREVIATURAS

ABC	Dominio de unión a ATP ( <i>ATP-Binding Cassette</i> )
ADN	Ácido desoxirribonucleico
amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN transferente
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo ( <i>American Type Culture Collection</i> )
Az	Azitromicina
BHI	Infusión de cerebro y corazón ( <i>Brain Heart Infusion</i> )
cat	Cloranfenicol
CCCP	Carbonil cianuro <i>m</i> -clorofenil hidrazona
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMI	Concentración mínima inhibitoria
cpm	Cuentas por minuto
Ctx	Cefotaxima
D.O.	Densidad óptica
DDD	Dosis definida diaria
DHD	DDD/1000 habitantes/día
dNTPs	Desoxinucleótidos
Er	Eritromicina
Er <sup>R</sup>	Cepas resistentes a eritromicina
Er <sup>S-1</sup>	Cepas sensibles o con sensibilidad disminuida a eritromicina
E-test	Epsilometer test
FD	Faradio
g	Gramo
h	Hora
I	Intermedio
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosas
K	Factor K de un rotor de centrifugación

Kb	Kilobase
kV	Kilovoltio
l	Litro
LB	<u>L</u> uria <u>b</u> roth
LCR	Líquido cefalo-raquídeo
M	Molaridad
MDR	Sistemas de multirresistencia ( <i>multidrug resistance</i> )
MF	<i>Major facilitator</i> (Superfamilia de proteínas transportadoras)
MH	Müeller Hinton
min	Minutos
MLS	Antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas.
MLS <sub>B</sub>	Antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B
MLS <sub>B</sub> c	Fenotipo MLS <sub>B</sub> constitutivo
MLS <sub>B</sub> i	Fenotipo MLS <sub>B</sub> inducible
mM	Milimolar
N	Normalidad
n	Número de cepas
NBD	Sitio de unión de nucleótidos ( <i>nucleotide binding domain</i> )
NCCLS	<u>N</u> ational <u>C</u> ommittee for <u>C</u> linical <u>L</u> aboratory <u>S</u> tandards
ND	No determinado
nm	Nanómetro
ohm	Ohmio
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/V	Relación peso/volumen
pb	Pares de bases
PBPs	Proteínas fijadoras de penicilina ( <i>Penicillin Binding Proteins</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PFGE	Electroforesis de campos pulsados ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> )
Pn	Penicilina
Pr I	Pristinamicina I
R	Resistente
rpm	Revoluciones por minuto

S	Sensible
SD	Secuencia de Shine Dalgarno
SDS	Sodio dodecil sulfato
seg	Segundo
SGC	<i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos del grupo C
SGG	<i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos del grupo G
Sp	Espiramicina
spc	Espectinomicina
SS	Solución salina
T	Timidina
T.R.S.	Tracto respiratorio superior
tet	Tetraciclina
TM	Transmembrana
Tn	Transposón
TSA	Agar de soja tripticada ( <i>Triptic Soy Agar</i> )
TSB	Caldo de soja tripticada ( <i>Triptic Soy Broth</i> )
U	Unidades de enzima
u.a.a.	Unidad arbitraria de absorbancia
U.V.	Ultravioleta
UFC	Unidades formadoras de colonias
V/V	Relación volumen/volumen

# INTRODUCCIÓN



Uno de los aspectos más problemáticos que existe hoy en día es el de tratar adecuadamente una infección, lo que en principio representa una paradoja, al considerar que nunca anteriormente se ha tenido en el arsenal terapéutico tal variedad de compuestos eficaces para hacer frente a una buena parte de procesos infecciosos producidos por microorganismos.

Mucho antes del descubrimiento de la penicilina y su posible aplicación para el tratamiento de algunas infecciones, ya existía la resistencia, al tratarse de un fenómeno natural ligado a la propia producción del antimicrobiano. En efecto, existen en la naturaleza diferentes microorganismos capaces de excretar sustancias que destruyen a otros considerados como competidores suyos. El primer requisito de los microorganismos productores de antibióticos es que la sustancia antimicrobiana que elaboren no les afecte a ellos; para eso, disponen de mecanismos selectivos que impiden que el antibiótico sintetizado les perjudique, en definitiva, disponen de mecanismos de resistencia a los mismos.

Este fenómeno de la resistencia ha ido aumentando y apareciendo en otras bacterias y con otros antibióticos. El uso continuado de antibióticos ha condicionado la selección de bacterias resistentes, que se han ido extendiendo de acuerdo con el tipo de bacteria, la cantidad de antibióticos consumida, la prevalencia de determinadas infecciones y la densidad de población en un lugar determinado. En general, existe una correlación entre los antimicrobianos utilizados masivamente en un hospital determinado y la aparición de bacterias resistentes a los mismos.

La búsqueda de mecanismos que expliquen porqué las bacterias adquieren resistencias ha sido una constante de la investigación biomédica. Para cada grupo de antibióticos hay distintas vías para hacerse resistentes, que incluyen en ocasiones la participación de elementos genéticos móviles (plásmidos, genes extracromosómicos con capacidad de replicación autónoma...), que en determinadas circunstancias pueden transmitirse de bacteria a bacteria por conjugación, como elemento de recombinación genética más frecuente.

## 1. GÉNERO *Streptococcus*

Los estreptococos son cocos Gram-positivos, dispuestos en parejas o en cadenas de longitud variable. Estos microorganismos son anaerobios facultativos, catalasa-negativos, no forman esporas, por lo general son inmóviles y tienen requerimientos nutricionales complejos y variables. Para su identificación se tienen en cuenta dos factores: el serogrupo de Lancefield y los patrones de hemólisis en agar sangre de cordero.

1. La clasificación de Lancefield (1933) se basa en la constitución de carbohidratos de la pared celular. En medicina clínica, los estreptococos más importantes según este esquema son:

- ✓ Grupo A: *Streptococcus pyogenes*.
- ✓ Grupo B: *Streptococcus agalactiae*.
- ✓ Grupo D: *Streptococcus* spp. (no se debe confundir con *Enterococcus* spp., que también posee el antígeno D).
- ✓ Grupo C: *Streptococcus equisimilis*.
- ✓ Grupo G: *Streptococcus anginosus*.

2. Los patrones hemolíticos son los siguientes:

- ✓ Estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos: Provocan la destrucción incompleta de los glóbulos rojos dentro del agar sangre de cordero, dando lugar a una decoloración verde oscura al medio, alrededor o debajo de las colonias, que refleja la presencia de biliverdina y otros componentes de tipo hemo. Los neumococos y estreptococos viridans son típicamente  $\alpha$ -hemolíticos.
- ✓ Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos: Destruyen completamente las células rojas en el agar sangre de cordero, dando lugar a la transparencia del agar. La estreptolisina O es una hemolisina lábil al oxígeno encontrada en estreptococos, especialmente en *S. pyogenes* y, en pequeña cantidad, en estreptococos del grupo C y G. La estreptolisina S estable al oxígeno está presente en el 98% de los aislados de *S. pyogenes*. La zona de  $\beta$ -hemólisis aumenta si el cultivo se incuba en anaerobiosis. *S. pyogenes* y *S. agalactiae* son  $\beta$ -hemolíticos, así como otras especies de estreptococos de poca relevancia clínica.
- ✓ Estreptococos no hemolíticos: Se encuentran a menudo como comensales.

Tanto los estreptococos del grupo D como los enterococos pueden ser alfa, beta o no hemolíticos.

### 1.1 *Streptococcus pyogenes*

*S. pyogenes*, también denominado estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo A, fue descubierto por Pasteur en 1882. Es un coco Gram-positivo, catalasa negativo, inmóvil y no esporulado. Tras 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias son  $\beta$ -hemolíticas, de forma redonda u ovalada y aparecen en parejas o formando cadenas cortas.

**Ecología:** Las infecciones provocadas por *S. pyogenes* son transmitidas frecuentemente por portadores asintomáticos en el tracto respiratorio superior o en la piel. Las infecciones se propagan por contacto interpersonal directo, probablemente a través de la saliva o de secreciones nasales, provocando microepidemias en el entorno familiar, escolar, laboral o callejero. Este hecho ha sido documentado en áreas confinadas, por ejemplo en guarderías, donde hasta el 50% de los niños estaban colonizados por *S. pyogenes* (Feldman *et al.*, 1987). Más recientemente, Nguyen *et al.* (1997) estudiaron el polimorfismo genético de cepas de *S. pyogenes* aisladas de pacientes y de individuos sanos en contacto con ellos en un área con infecciones estreptocócicas endémicas. Se estudiaron 52 pacientes con faringotonsillitis estreptocócica aguda, que mostraron 14 clones de *S. pyogenes* no relacionados, lo que da idea de la diversidad genética de esta especie. Durante los 3 ó 4 meses siguientes, se hizo un seguimiento a los pacientes ya curados, y se observó que la recolonización por *S. pyogenes* fue de un 20%: pacientes curados eran colonizados por clones nuevos, que en su mayoría, coincidían con los que portaban individuos sanos en contacto diario con ellos. Estos resultados sugieren una rápida diseminación y redistribución de cepas de *S. pyogenes* entre personas que viven en contacto.

**Importancia clínica:** *S. pyogenes* es uno de los patógenos bacterianos de mayor importancia en el ser humano. Es la causa más frecuente de faringoamigdalitis aguda de etiología bacteriana -especialmente en los niños-, produce numerosas afecciones supuradas cutáneas y sistémicas en pacientes de todas las edades y puede dar lugar,

ocasionalmente, a dos importantes secuelas: la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda postestreptocócica.

El pico de la incidencia de la enfermedad respiratoria atribuida a *S. pyogenes* se da entre los 6 y los 13 años de edad, siendo más común a finales de invierno y comienzos de primavera en climas templados. En España e Italia se han descrito estas variaciones estacionales (Orden *et al.*, 1996; Baquero *et al.*, 1999b; Borzani *et al.*, 1997), con una menor incidencia de cepas de *S. pyogenes* en los meses de verano. Las infecciones de la piel son más frecuentes en niños en edad preescolar y se manifiestan especialmente en verano y comienzos de otoño en climas templados.

**Susceptibilidad a antibióticos:** Por fortuna, *S. pyogenes* se ha venido manteniendo durante años uniformemente sensible a la penicilina. En el momento actual son muchos los autores que siguen manteniendo este fármaco como tratamiento de elección, ya que, en sentido estricto, no existe resistencia a penicilina en *S. pyogenes*. Las únicas cepas resistentes debido a modificaciones en sus proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) se han obtenido siempre en condiciones de laboratorio. El porqué esta selección, relativamente fácil de conseguir en el laboratorio, no se ha dado *in vivo*, cuando es notorio que numerosos pacientes están sometidos durante periodos prolongados de tiempo a concentraciones tisulares relativamente bajas de penicilina, es una cuestión por dilucidar (Tomasz *et al.*, 1995). Sin embargo, actualmente se dan dos circunstancias que han hecho que algunos autores se planteen la pertinencia de mantener la penicilina como tratamiento de elección: el aumento de fracasos terapéuticos y la aparición de nuevos fármacos que podrían constituir una buena alternativa. Diversos estudios describen, con frecuencia creciente en algunas áreas, fracasos terapéuticos en faringoamigdalitis estreptocócicas tratadas con penicilina (Pichichero, 1995), que se achacan a disminuciones en la síntesis de PBPs en los tejidos, dando lugar a un cierto grado de tolerancia o a una hipotética protección por betalactamasas producidas por otras bacterias integrantes de la microbiota faríngea. Además van apareciendo otros fármacos, como las nuevas cefalosporinas orales y los nuevos macrólidos y derivados que, con una actividad sobre *S. pyogenes* próxima a la de la penicilina, presentan características farmacocinéticas mucho más favorables.

Los macrólidos han sido y son aún el tratamiento de elección de las infecciones producidas por *S. pyogenes* en los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a las penicilinas. No obstante, desde que en 1959 se describió la primera cepa de *S. pyogenes* resistente a eritromicina y a otros macrólidos (Lowbury and Hurst, 1959) aislada en una unidad de quemados de un hospital de Birmingham en Reino Unido, se han comunicado resistencias a este antibiótico en diversos países, aunque con grandes variaciones geográficas. Durante los años posteriores a la comunicación del primer aislamiento resistente, éstos se presentaban de forma esporádica (Gerber, 1995). Sin embargo, a principios de 1970 se observa en Japón un rápido y alarmante incremento de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina, llegándose a alcanzar, en 1979, cifras del 61,8% (Maruyama *et al.*, 1979). En otros países de Europa y Norteamérica el número de aislamientos resistentes oscilaba, en ese momento, entre un 0,7 y un 5% (Scott *et al.*, 1989; Järvinen *et al.*, 1989 y Wittler *et al.*, 1990). Durante la década de 1990 se ha observado un incremento importante de la resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* en Europa, especialmente en Finlandia, Italia y España (Kataja *et al.*, 1999; Giovanetti *et al.*, 1999 y Pérez-Trallero *et al.*, 1998).

## 1.2 *Streptococcus agalactiae*

*S. agalactiae*, o estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo B, es un coco Gram-positivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable. Puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre o suero favorecen su crecimiento. Tras 18-24 horas de incubación en agar sangre, las colonias son de aproximadamente 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de  $\beta$ -hemólisis, aunque existen cepas no hemolíticas. Presenta, además del antígeno polisacárido común que le caracteriza como perteneciente al grupo B de Lancefield, antígenos polisacáridos específicos y antígenos proteicos, que permiten su clasificación en serotipos.

**Ecología:** *S. agalactiae* forma parte de la flora normal del tracto gastrointestinal desde donde coloniza la vagina y a veces el tracto urinario. La colonización del tracto genital puede ser intermitente y es un hecho importante en las mujeres gestantes, por la posible transmisión de este microorganismo al recién nacido.

**Importancia clínica:** Durante los últimos años *S. agalactiae* ha demostrado ser un agente etiológico importante en un amplio espectro de infecciones, sobre todo en neonatos y en adultos susceptibles, como diabéticos o alcohólicos, entre otros. Comúnmente, coloniza la vagina y la región ano-rectal de la población femenina, con más frecuencia en mujeres embarazadas. En los países industrializados es causa importante de infección neonatal. La cifra de colonización oscila entre 15% y 40%, pero varía según la región geográfica (Committe, 1992). La colonización vaginal en mujeres embarazadas se correlaciona con las infecciones neonatales por este germen. La principal vía para transmitir el microorganismo consiste en el paso por el canal del parto colonizado, aunque también puede obtenerse por infección intrauterina y adquisición nosocomial postparto. En los neonatos es un patógeno importante que causa neumonía, sepsis y meningitis, con una mortalidad alta. En las madres, puede producir infecciones intrauterinas, endometritis, fiebre postparto, infección urinaria y bacteriemia. Aunque la transmisión madre-hijo ocurre entre el 29% y el 70% de los casos, no todos los neonatos desarrollan infecciones (Suara *et al.*, 1994).

Cada vez con mayor frecuencia *S. agalactiae* origina problemas de salud, sobre todo en ancianos y en adultos con enfermedades crónicas y con algún grado de inmunosupresión (particularmente cirróticos y diabéticos). En estos individuos las manifestaciones más comunes son infecciones de la piel y de los tejidos blandos. La bacteriemia de fuente desconocida es la manifestación más frecuente de infección invasiva; también es causa de urosepsis, neumonía, peritonitis, meningitis, artritis séptica y endocarditis (Verghese *et al.*, 1986; Opal *et al.*, 1988; Farley *et al.*, 1993; Wessels *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1995; Marrón *et al.*, 1997).

**Susceptibilidad a antibióticos:** El tratamiento de las infecciones por *S. agalactiae* es complejo porque la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la penicilina, por lo general, es mayor que para otras especies de *Streptococcus* y, además, se observan altas concentraciones de la bacteria en el lugar de la infección. Por este motivo, se requieren dosis mayores de penicilina y muchas veces es necesario emplear otros antibióticos, como los aminoglicósidos. Aunque rara vez se prueba, la resistencia de alto nivel a aminoglicósidos, indicativa de que la cepa no se

verá afectada sinérgicamente por la combinación de una penicilina y un aminoglicósido, se ha descrito en cepas de *S. agalactiae* (Buu-Hoï *et al.*, 1990). En ocasiones se producen fallos terapéuticos, según el tipo de pacientes en los que se presenta la infección.

### 1.3 *Streptococcus* $\beta$ -hemolíticos de los grupos C y G de Lancefield

Además de ser clasificados por el grupo carbohidrato de Lancefield, los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos se subdividen según formen colonias grandes o pequeñas en placas de agar suplementadas con sangre de cordero (Carmeli *et al.*, 1995): las colonias de morfología grande se asocian generalmente con infecciones en humanos. Los *Streptococcus* del grupo C (SGC) y los *Streptococcus* del grupo G (SGG) comparten muchos factores de virulencia con *S. pyogenes* (VanDamme *et al.*, 1996).

**Ecología:** Los SGC son patógenos comunes en animales, pero ocasionalmente provocan infecciones en humanos, que pueden adquirirse por contacto con animales o por ingestión de productos crudos de origen animal. Asimismo, pueden colonizar el tracto respiratorio, digestivo y urogenital en un pequeño porcentaje de individuos sanos (Duma *et al.*, 1969). Por otra parte, los SGG abarcan dos especies distintas: *Streptococcus milleri* y *Streptococcus canis*. Esta última, que forma las colonias más grandes, es la que se asocia con más frecuencia a humanos y puede encontrarse en la flora normal de la faringe, intestino, vagina y piel (Gaunt and Seal, 1987).

**Importancia clínica:** Desde que en la década de 1930 se establecieron los métodos para distinguir estreptococos de los grupos A, C y G, y se consideró *S. pyogenes* como la mayor fuente de infecciones humanas severas, se ha venido desestimando la importancia clínica de SGC y SGC. Sin embargo, desde los años 80 ha habido un creciente interés por el papel de estos microorganismos como patógenos humanos nosocomiales y oportunistas, que pueden producir septicemia (Skogberg *et al.*, 1988) y con menor frecuencia, artritis séptica (Schattner *et al.*, 1998). Los SGC se consideran agentes causales de faringitis exudativa en colegiales (Turner *et al.*, 1997) y adultos (Meier *et al.*, 1990), y causa poco común de

bacteriemia (Berenguer *et al.*, 1992) y otras infecciones severas (Salata *et al.*, 1989). A su vez, los SGG pueden causar faringitis y una gran variedad de enfermedades severas en humanos (Vartian *et al.*, 1985).

**Susceptibilidad a antibióticos:** La mayoría de SGC y SGG demuestran *in vitro* sensibilidad a penicilinas, vancomicina, eritromicina y cefalosporinas (Rolston *et al.*, 1982; Bayer *et al.*, 1983). Sin embargo, se ha descrito tolerancia a penicilina y a otros antibióticos en cepas de SGC y SGG (Noble *et al.*, 1980; Portnoy *et al.*, 1981; Rolston *et al.*, 1984).

#### 1.4 *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* fue descubierto por Pasteur y sus discípulos en la saliva de un individuo en 1881, y por Talamon en 1883, en el esputo de un paciente neumónico. Es un coco Gram-positivo, catalasa-negativo, de forma ovalada o lanceolada que aparece formando parejas (diplococo) o cadenas cortas. El polisacárido capsular, del cual existen 85 tipos diferentes, es su principal factor de virulencia. No posee antígeno específico de grupo según la clasificación de Lancefield. Tras 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias son  $\alpha$ -hemolíticas si crecen aeróbicamente; en cambio, si el crecimiento es anaeróbico puede aparecer  $\beta$ -hemólisis por debajo de la superficie del agar, debido a la producción de una pneumolisina que es lábil al oxígeno.

**Ecología:** *S. pneumoniae* es un comensal común del tracto respiratorio superior humano, aislándose en un 5-70% de la población adulta sana. El estado de portador sano varía con la edad, ambiente y época del año. Este porcentaje es mucho más alto durante los meses de invierno, en los niños que en los adultos y en comunidades cerradas que en la población general urbana (Liñares *et al.*, 1992).

**Importancia clínica:** A partir de la puerta de entrada respiratoria, *S. pneumoniae* es capaz de producir diferentes cuadros clínicos que afectan al tracto respiratorio superior, como la otitis media, mastoiditis y sinusitis, o al tracto respiratorio inferior, como la neumonía. Entre los cuadros clínicos extrarrespiratorios destaca la

meningitis, que puede ser debida a la entrada directa del microorganismo a través de una fístula que comunique la nasofaringe con el espacio meníngeo, o bien puede ser una complicación de la neumonía bacteriémica, mastoiditis, sinusitis o endocarditis. Otras localizaciones de la enfermedad neumocócica son el empiema, la endocarditis, la artritis y la peritonitis espontánea (Musher, 2000).

En los últimos años se ha producido un incremento de la prevalencia de infecciones neumocócicas en determinados grupos de riesgo, como son los pacientes ancianos, los que tienen infección por el VIH y aquéllos que presentan enfermedades debilitantes crónicas (Nuorti *et al.*, 2000). Actualmente, los cuadros clínicos más frecuentes son la neumonía, la meningitis y la otitis media aguda. *S. pneumoniae* es el agente etiológico de, aproximadamente, el 60% de las neumonías bacterianas adquiridas en la comunidad. Después de *Neisseria meningitidis*, es el segundo agente causal de meningitis bacteriana en la población adulta y la causa de más de la mitad de los casos de otitis media aguda en la población infantil.

**Susceptibilidad a antibióticos:** El desarrollo de resistencias a antibióticos por parte de *S. pneumoniae* ha originado problemas terapéuticos. Hasta hace unos años, la penicilina era el tratamiento de elección para infecciones causadas por neumococos. Durante la década de los años 80 y 90 se ha observado en todo el mundo el desarrollo de resistencia de este microorganismo a la penicilina por alteraciones de PBPs, presentando a su vez resistencia cruzada a otros  $\beta$ -lactámicos (Doern *et al.*, 1998; Baquero *et al.*, 1999a; Thornsberry *et al.*, 1999a; Hsueh *et al.*, 2000). En España, se han encontrado variaciones estacionales en las infecciones por neumococos, con mayores tasas de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en verano e invierno (Baquero *et al.*, 1999c; Marco *et al.*, 2000), que pueden ser debidas al consumo de antibióticos, aunque estas variaciones no se han observado para los macrólidos. La eritromicina ha sido durante mucho tiempo una alternativa a la penicilina en el tratamiento de infecciones respiratorias. Sin embargo, en el momento actual, en Europa alrededor de un 36% de neumococos son resistentes a este antibiótico y suelen mostrar frecuentemente (30%) resistencia cruzada al resto de macrólidos y lincosamidas (Baquero *et al.*, 1999a).

La nueva generación de fluoroquinolonas (levofloxacino, sparfloxacino, grepafloxacino y trovafloxacino) parece ser una buena alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones causadas por neumococos multirresistentes (George *et al.*, 1997; Piddock *et al.*, 1998), aunque su uso indiscriminado puede llevar en un tiempo corto al desarrollo de resistencias.

## 2. GÉNERO *Enterococcus*

**Ecología:** La clasificación de enterococos como estreptococos del grupo D se remonta al esquema establecido por Rebecca Lancefield a principios de 1930 (Lancefield, 1933). En 1984, se otorgó a los enterococos la categoría de género, después de que estudios de hibridación ADN-ADN y ADN-ARN demostraron una relación filogenética distante con los estreptococos (Schleifer *et al.*, 1984). Generalmente, los enterococos se consideran microorganismos comensales del tracto gastrointestinal de una variedad de organismos, incluido el hombre. Se encuentran en variedad de ambientes, debido probablemente a la diseminación mediante excrementos animales y a su adaptación ambiental. Ciertas especies de enterococos, por sus características intrínsecas, pueden sobrevivir largos periodos de tiempo, lo que contribuye a su difusión y persistencia. Así, *Enterococcus faecalis* es capaz de crecer en 6,5% de NaCl, a temperaturas que oscilan entre 10 y 45°C y puede sobrevivir 30 minutos a 60°C. Además, crece en presencia de 40% de sales biliares y en un amplio rango de pH (Moellering, 1995). Cuando se examinaron las condiciones ambientales de estos microorganismos, se observó que *E. faecalis* se adapta a la presencia de sales biliares y detergentes como sodio dodecil sulfato (SDS), al cultivarse primero a niveles subletales durante tan sólo 5 segundos (Flahaut *et al.*, 1996a; Flahaut *et al.*, 1996b). La habilidad de los enterococos para adaptarse y resistir en presencia de detergentes les permite sobrevivir en condiciones poco higiénicas, contribuyendo a su persistencia en el hospital. Numerosos estudios han demostrado que estos microorganismos pueden transmitirse de persona a persona en el hospital, a través de las manos del personal sanitario o de instrumentos clínicos, como los termómetros (Chenoweth *et al.*, 1990; Jett *et al.*, 1994).

**Importancia clínica:** La patogenicidad de los enterococos fue estudiada a finales del siglo XIX por MacCallum y Hastings, quienes aislaron un microorganismo de un caso de endocarditis aguda y, basándose en sus propiedades fermentativas, lo designaron como *Micrococcus zymogenes* (MacCallum and Hastings, 1899). Dicho microorganismo era resistente a la desecación, al calentamiento a 60°C y a varios antisépticos, incluido el cloroformo. Asimismo, resultó ser letal al ser inyectado intraperitonealmente en ratones blancos y era capaz de producir endocarditis en un modelo canino. Un siglo más tarde, los enterococos son considerados patógenos nosocomiales relevantes, responsables del 12% de los procesos infecciosos (NNIS, 1997), ocupando el segundo lugar después de las infecciones nosocomiales causadas por *Escherichia coli*. Las infecciones causadas por el género *Enterococcus* (generalmente por *E. faecalis*) incluyen infecciones del tracto urinario, bacteriemia, infecciones intra-abdominales y endocarditis (Huycke *et al.*, 1991; Moellering *et al.*, 1995).

Los enterococos colonizan el tracto gastrointestinal humano y son relativamente abundantes en heces humanas ( $10^5$ - $10^7$  microorganismos por gramo) (Noble, 1978). Es probable que exista asociación entre los enterococos y su hospedador, ya que si no, éstos serían eliminados simplemente por movilidad intestinal (Jett *et al.*, 1994). Existen estudios sobre la posible unión de enterococos al epitelio intestinal. Además, estos microorganismos son capaces de sobrevivir al paso a través del estómago, a pesar del bajo pH, lo que facilita la colonización. Uno de los enigmas de la infección nosocomial enterocócica es la colonización de un medio ya ocupado por miembros de la misma especie. Los antibióticos sin acción enterocócica (que no afectan a cepas endógenas de enterococos) predisponen a la infección por este género bacteriano (Chenoweth *et al.*, 1990). Estas infecciones son causadas por cepas de enterococos multirresistentes adquiridas de forma exógena y que compiten con enterococos endógenos en ausencia de selección directa. Los microorganismos exógenos deberían encontrarse en un número muy bajo frente a los endógenos; sin embargo, el hecho de que las cepas multirresistentes colonicen el tracto gastrointestinal sugiere que no compiten directamente por el mismo nicho, lo que podría explicarse por la presencia de proteínas de superficie de membrana o por una mejor utilización de nutrientes por parte de las cepas multirresistentes.

Los enterococos ocupan el segundo puesto como agentes causantes de bacteriemia nosocomial, con un 12,8% de los casos (NNIS, 1997). El paso de enterococos a través de la barrera del epitelio intestinal conduce a bacteriemias sin origen identificable (Wells *et al.*, 1990; Jett *et al.*, 1994), pero éstas también pueden provocarse por vía intravenosa, abscesos e infecciones del tracto urinario (Jett *et al.*, 1994). Entre los factores de riesgo de mortalidad asociada a bacteriemia por enterococos se encuentran la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente y el uso de antibióticos de amplio espectro, como cefalosporinas de tercera generación o metronidazol (Sood *et al.*, 1998).

Las infecciones del tracto urinario atribuidas a enterococos son más frecuentes en pacientes con anomalías estructurales, prótesis o enfermedades genitourinarias de base (Huycke *et al.*, 1998). La interacción de los enterococos con el tejido uroepitelial es compleja y depende de adhesinas de superficie, de proteínas y/o de la naturaleza de carbohidratos.

Por último, de todas las infecciones causadas por enterococos, la endocarditis infecciosa es uno de los mayores retos terapéuticos (Megran, 1992). Los enterococos son la tercera causa de endocarditis infecciosa, enfermedad más frecuente en hombres que en mujeres (relación 2:1). Las personas con defectos congénitos en válvulas del corazón tienen mayor riesgo de padecer endocarditis enterocócica que las personas sanas (Chenoweth, 1990; Murray, 1990). En concreto, *E. faecalis* es el responsable del 15% del total de endocarditis, con una mortalidad del 25%.

**Susceptibilidad a antibióticos:** La fortaleza intrínseca de los enterococos también confiere un inusual nivel de tolerancia a varias clases de antibióticos, incluyendo aminoglicósidos,  $\beta$ -lactámicos y quinolonas. La resistencia de enterococos a aminoglicósidos se debe a su habilidad para bloquear el antibiótico en la pared celular (Hewitt *et al.*, 1966; Moellering *et al.*, 1971). La dificultad de un aminoglicósido para atravesar la membrana bacteriana y alcanzar la diana queda superada cuando éste se asocia con un agente activo frente a la pared celular: un  $\beta$ -lactámico o un glicopéptido. Sin embargo, este tratamiento combinado se ha visto comprometido por la rápida diseminación de altos niveles de resistencia a aminoglicósidos entre enterococos (CMI  $\geq 2000$   $\mu\text{g/ml}$ ) (Horodniceanu *et al.*, 1979).

La resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en enterococos se debe, generalmente, a la presencia de enzimas modificantes de aminoglucósidos, como la enzima bifuncional APH(2'')-AAC(6') (Ferretti *et al.*, 1986), la fosfotransferasa APH(3')-III o las nucleotidiltransferasas ANT(4')(4'') y ANT(6), entre otras (Eliopoulos *et al.*, 1988; Ounissi *et al.*, 1990). Muchas cepas de enterococos, especialmente de *Enterococcus faecium*, son resistentes a la mayoría de agentes antimicrobianos de uso clínico (Centers for Disease Control and Prevention, 1993; Sawicka-Grzelak *et al.*, 1999), lo que hace que las infecciones con estos microorganismos sean a veces difíciles de tratar (Dennesen *et al.*, 1998; Murray, 1990). En poco más de 10 años, la resistencia a antibióticos se ha diseminado entre enterococos, llegando a ser un importante problema de salud pública (Gilmore *et al.*, 1999; Murray, 2000).

Es evidente que el principal problema de las infecciones nosocomiales por enterococos es su resistencia a múltiples antibióticos. Por poner un ejemplo, en un estudio comparativo entre pacientes con bacteriemia provocada por *E. faecium* con distintos niveles de sensibilidad a vancomicina, se encontraron diferencias en la duración de la enfermedad en pacientes infectados por la cepa resistente (46 días) o por la sensible (19 días). Además, la presencia de enterococos resistentes a vancomicina en sangre se ha asociado con un aumento de la mortalidad (37% vs. 16%) (Edmond *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios más recientes señalan que la resistencia a vancomicina en enterococos no es un factor de predicción de consecuencias clínicas importantes (Mainous *et al.*, 1997; Lucas *et al.*, 1998). Quinupristín-dalfopristín es una combinación antimicrobiana desarrollada recientemente para el tratamiento de infecciones provocadas por cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina (Fuller *et al.*, 1996).

Las tendencias de la resistencia en las especies *E. faecalis* y *E. faecium* han sido recientemente revisadas en la literatura. Así, los datos obtenidos de aproximadamente quince mil aislados en EE.UU. en un periodo de tres años (1995-1997) mostraron que, mientras la resistencia a ampicilina y vancomicina es relativamente poco frecuente en *E. faecalis* (<2%), en *E. faecium* se observa un aumento de cepas resistentes a ampicilina (83%) y vancomicina (52%). En cambio, *E. faecalis* es la especie más frecuentemente detectada en infecciones nosocomiales (79%) (Huycke *et al.*, 1998). Las razones de la disparidad entre el número de

infecciones provocadas por *E. faecalis* y *E. faecium* no se conocen muy bien. Una explicación puede estar relacionada simplemente con la abundancia natural de una especie sobre otra. Varios estudios indican que *E. faecalis* es más abundante en el tracto gastrointestinal humano (Noble, 1978; Benno *et al.*, 1986). Una explicación alternativa es que el mayor número de infecciones provocadas por *E. faecalis* se deba a una mayor virulencia de esta especie (Jett *et al.*, 1994; Huycke *et al.*, 1998).

### **3. ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS (MLS)**

Los antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B (MLS<sub>B</sub>) forman un grupo de antibióticos porque comparten mecanismos de acción similares y tienen un patrón de resistencia común. Los macrólidos entran en la célula bacteriana por difusión pasiva y su actividad antibacteriana se incrementa a pH alcalino. Se consideran primariamente bacteriostáticos, igual que las lincosamidas, aunque también pueden comportarse como bactericidas, dependiendo del microorganismo, la concentración de antibiótico y el tiempo de exposición. Las estreptograminas naturales de tipo A o de tipo B consideradas de forma individual, poseen escasa actividad y son bacteriostáticas; sin embargo, en asociación, muestran actividad bactericida sinérgica.

La eritromicina fue aislada en 1952 de entre los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erythreus*, obtenida de un cultivo de tierras filipinas, y se convirtió en el prototipo de agente antimicrobiano del grupo de los macrólidos (McGuire *et al.*, 1952). La mayoría de macrólidos naturales se han obtenido a partir de la fermentación de cepas de *Streptomyces* y de *Micromonospora* spp.; sin embargo, también pueden ser producidos por otros géneros bacterianos. Por ejemplo, la eritromicina A puede obtenerse de la fermentación de especies de *Streptomyces* o de *Arthrobacter* spp. (French *et al.*, 1970).

Dentro del grupo de las lincosamidas, la lincomicina fue el primer antibiótico descubierto. Se aisló en Nebraska, en 1964, de un caldo de fermentación de una cepa de *Streptomyces lincolnensis* (Mason *et al.*, 1964). Otro representante del mismo grupo, la clindamicina, fue obtenida en 1966, modificando sintéticamente la estructura de la lincomicina.

Por último, las estreptograminas son los antimicrobianos más recientemente descritos dentro del grupo MLS. La primera estreptogramina natural, denominada pristinamicina, se obtuvo a partir de *Streptomyces pristinaespiralis* (Barrière *et al.*, 1992).

**Tabla 1.- Macrólidos de uso terapéutico aislados de especies bacterianas.**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Microorganismo productor</b>	<b>Referencia</b>
<b>Eritromicina A</b>	<i>Streptomyces erythreus</i> (reclasificada como <i>Saccharopolyspora erythraea</i> )	McGuire <i>et al.</i> , 1952
<b>Oleandomicina</b>	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Sobin <i>et al.</i> , 1954
<b>Espiramicina</b>	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Pinnert-Sindico <i>et al.</i> , 1954
<b>Josamicina</b>	<i>Streptomyces narbonensis</i> <i>var. josamyceticus nova sp.</i>	Osono <i>et al.</i> , 1967
<b>Midecamicina</b>	<i>Streptomyces mycarofaciens</i>	Niida <i>et al.</i> , 1971
<b>Rosaramicina</b>	<i>Micromonospora rosaria</i>	Wagman <i>et al.</i> , 1972
<b>Leucomicina</b>	<i>Streptoverticillium kitasatoensis</i>	Hata <i>et al.</i> , 1953
<b>Tilosina</b>	<i>Streptomyces fradiae</i>	McGuire <i>et al.</i> , 1961

### 3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS MACRÓLIDOS

Como indica su nombre, los macrólidos son moléculas complejas formadas por un gran anillo básico lactónico, una macrolactona -que es la que da nombre a todo el grupo- de 12 a 23 átomos de carbono, al que se une un azúcar aminado mediante enlaces glucosídicos. Esta estructura limitó su manipulación química a través de la introducción de nuevos grupos funcionales que permitieran mejorar las propiedades farmacológicas y microbiológicas de la eritromicina. Los cambios iniciales consistieron en la adición de varios ésteres, pero los compuestos así sintetizados (troleandomicina, lactobionato de eritromicina, moxidecina y terdecamicina) no poseían un perfil que se diferenciase claramente de la eritromicina. Posteriormente, para obtener nuevos derivados se recurrió a técnicas de ingeniería genética, modificando sus vías biosintéticas (mutasíntesis). Con la utilización de ADN recombinante se lograron nuevos antibióticos híbridos en cultivos de *Saccharopolyspora erythraea* genéticamente manipulados (Weber *et al.*, 1991). La combinación de estas técnicas de genética molecular con otras de química orgánica

ha permitido obtener un número creciente de antibióticos macrólidos semisintéticos que, según su estructura química, pueden clasificarse en tres grupos. Así, existen macrólidos con un anillo lactónico de 14, 15 y 16 átomos.

**Tabla 2.- Clasificación de los macrólidos.**

De 14 átomos		De 15 átomos	De 16 átomos	
Naturales	Semisintéticos	Semisintéticos	Naturales	Semisintéticos
Eritromicina	Claritromicina	Azitromicina	Espiramicina	Rokitamicina
Oleandomicina	Roxitromicina		Josamicina	Miocamicina
Esporeamicina	Diritromicina		Midecamicina	
	Fluritromicina		Kitasamicina o leucomicina	

### 3.1.1 Macrólidos de 14 átomos

#### Naturales:

a) Eritromicina: Su estructura fue determinada en 1957 (Wiley *et al.*, 1957). La molécula de eritromicina consta de una lactona de 14 átomos, denominada critronólido, a la que se une un amino azúcar, D-desosamina, en el C-5 y un azúcar neutro en el C-3 (L-cladinoso o L-micaroso) (Figura 1). El complejo de eritromicina consta de seis moléculas denominadas eritromicina A, B, C, D, E y F. Excepto la eritromicina E y F, el resto son intermediarios de la síntesis de eritromicina A, que es la más activa frente a patógenos comunes.

b) Oleandomicina: Su estructura química fue descrita en 1958 (Celmer *et al.*, 1958; Els *et al.*, 1958). La molécula de oleandomicina posee una lactona de 14 átomos, oleandólido, con un grupo epoxi en el C-8. Al núcleo de lactona se unen dos azúcares (L-oleandrosa en el C-3 y D-desosamina en el C-5). La introducción de un grupo acilsulfonamida en el C-4 hace que esta molécula tenga mayor actividad frente a animales, pero no frente a humanos.

c) Esporeamicina: Es un macrólido de 14 átomos, aislado de un cultivo filtrado de *Saccharopolyspora* (Yaginuma *et al.*, 1992). En medio ácido es más estable que la eritromicina A, pero menos activo que ésta.

**Semisintéticos:** El grupo hidroxilo en C-6 de la eritromicina está implicado en la inactivación por ácido de esta molécula. Al pH ácido del estómago se pierde ese

grupo hidroxilo y se forma rápidamente anhidroeritromicina, un derivado bacteriológicamente inactivo.

a) Claritromicina: Es un derivado semisintético de la eritromicina que contiene un grupo metoxilo en vez del hidroxilo del C-6 (es la 6-O-metileritromicina), lo que la convierte en una molécula resistente a la degradación por ácido, al tiempo que mejora su espectro antibacteriano *in vitro* e *in vivo*.

b) Roxitromicina: Es otro macrólido semisintético de 14 átomos en el que el anillo principal ha sido modificado para prevenir la inactivación por el medio ácido gástrico, así como para mejorar la toxicidad gastrointestinal de otros macrólidos.

c) Diritromicina: En su molécula, el grupo 9-ceto del eritronólido A ha sido sustituido por un grupo amino.

d) Fluritromicina: Es otro derivado semisintético de la eritromicina en el cual se ha introducido una fluorina en C-8 del eritronólido A.

### 3.1.2 Macrólidos de 15 átomos

Bright *et al.* (1988) sintetizaron una serie de macrólidos con un anillo de 15 átomos y propusieron el nombre de azálidos para designarlos de modo general. El representante de este grupo es la azitromicina, que posee un átomo más (N) en el anillo lactónico, lo que le confiere características especiales (mejor farmacocinética y actividad que la eritromicina).

### 3.1.3 Macrólidos de 16 átomos

#### Naturales:

a) Espiramicina: Su molécula está compuesta por una lactona de 16 átomos (platenólido), dos amino azúcares (D-micaminosa y D-forosamina) y un azúcar neutro (L-micarosa). El complejo de espiramicina consta de tres componentes mayores (I, II y III) y tres menores (IV, V y VI). Su estructura química y configuración fue determinada por varios equipos (Paul *et al.*, 1959; Kuehne *et al.*, 1965; Omura *et al.*, 1969; Mitscher *et al.*, 1973; Freiberg *et al.*, 1974).

b) Josamicina: Es un macrólido con un anillo de lactona de 16 átomos al que se unen dos azúcares: D-micaminosa y L-micarosa.

c) Midecamicina: Incluye cuatro componentes: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub>. Las midecamicinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub> son los componentes minoritarios de la mezcla producida por *Streptomyces mycarofaciens*. El componente mayoritario, midecamicina A<sub>1</sub>, ha sido comercializado. Su espectro antibacteriano es similar al de otros macrólidos relacionados, pero su actividad es menor que la de la eritromicina A, similar a la de la josamicina y mejor que la de la espiramicina.

d) Kitasamicina o leucomicina: Se divide en cinco grupos, que se diferencian estructuralmente en las posiciones C-9 (cetona o hidroxilo), C-12 y C-13 (presencia o ausencia de un grupo epoxi) del anillo de lactona.

### **Semisintéticos:**

a) Rokitamincina: Es un derivado semisintético de 16 átomos que se obtiene añadiendo propionato a la posición 3'' de la leucomicina A<sub>5</sub> (Sakakibara *et al.*, 1981a; Sakakibara *et al.*, 1981b).

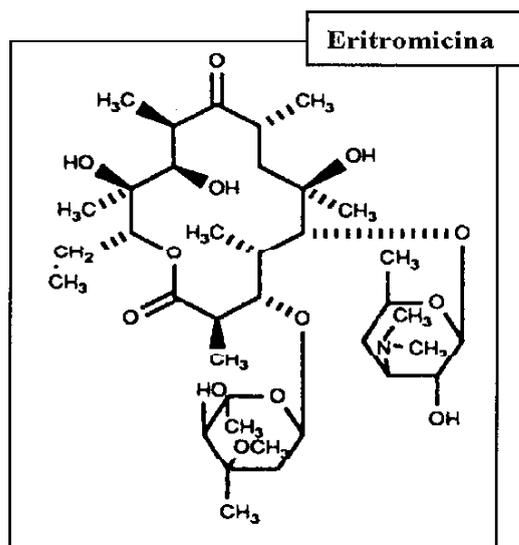
b) Miocamicina: Es un macrólido semisintético de 16 átomos derivado de la midecamicina A<sub>1</sub> por la introducción de dos grupos acetilo en las posiciones C-3 y C-9. (Omoto *et al.*, 1976).

## **3.2 LINCOSAMIDAS**

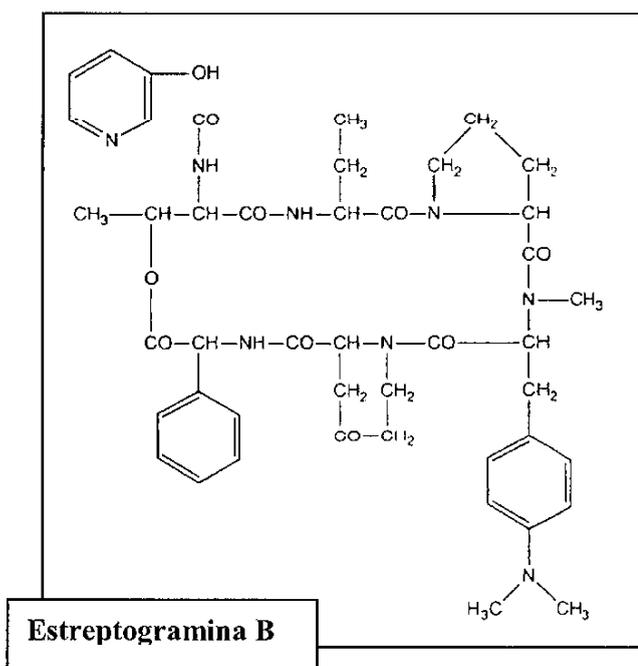
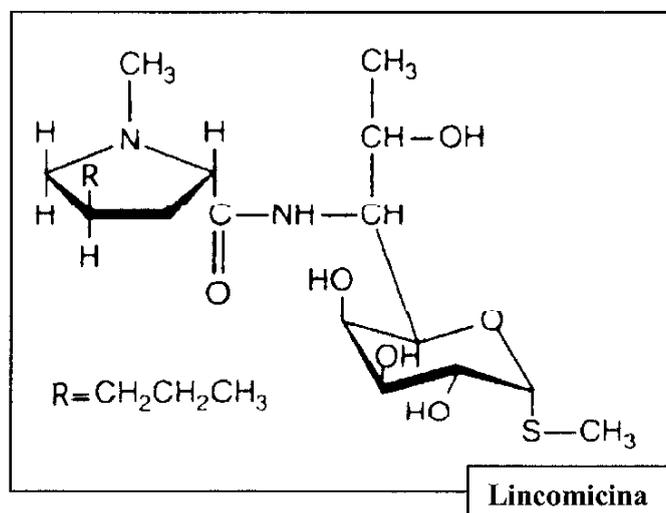
Las lincosamidas están constituidas por un ácido aminado (metilprolina) y un azúcar (piranosa) unidos por una amida. En este grupo se incluyen dos antibióticos:

a) Lincomicina: La estructura química de la molécula de lincomicina consta de un aminoácido (ácido trans-L-4-propilhigrínico) unido a un azúcar mediante un enlace amida (Figura 1).

b) Clindamicina: En la molécula de clindamicina se ha sustituido el hidroxilo en posición 7 por un átomo de cloro (7-cloro-7-desoxi derivado de lincomicina).



**Figura 1.- Estructura química de antibióticos MLS representativos.**



### 3.3 ESTREPTOGRAMINAS

Tras la pristinamicina, se han ido describiendo nuevas estreptograminas que, al igual que ésta, consisten en una combinación de dos moléculas químicamente no relacionadas. Estas dos moléculas son macrolactonas cíclicas poliinsaturadas, denominadas estreptograminas del grupo A (estreptogramina A, pristinamicina IIA, B y C, dalfopristina y virginiamicina M) y depsipéptidos cíclicos, en el caso de las estreptograminas del grupo B (estreptogramina B, pristinamicina IA, B y C, quinupristina y virginiamicina S) (Figura 1). Las estreptograminas utilizadas en clínica son:

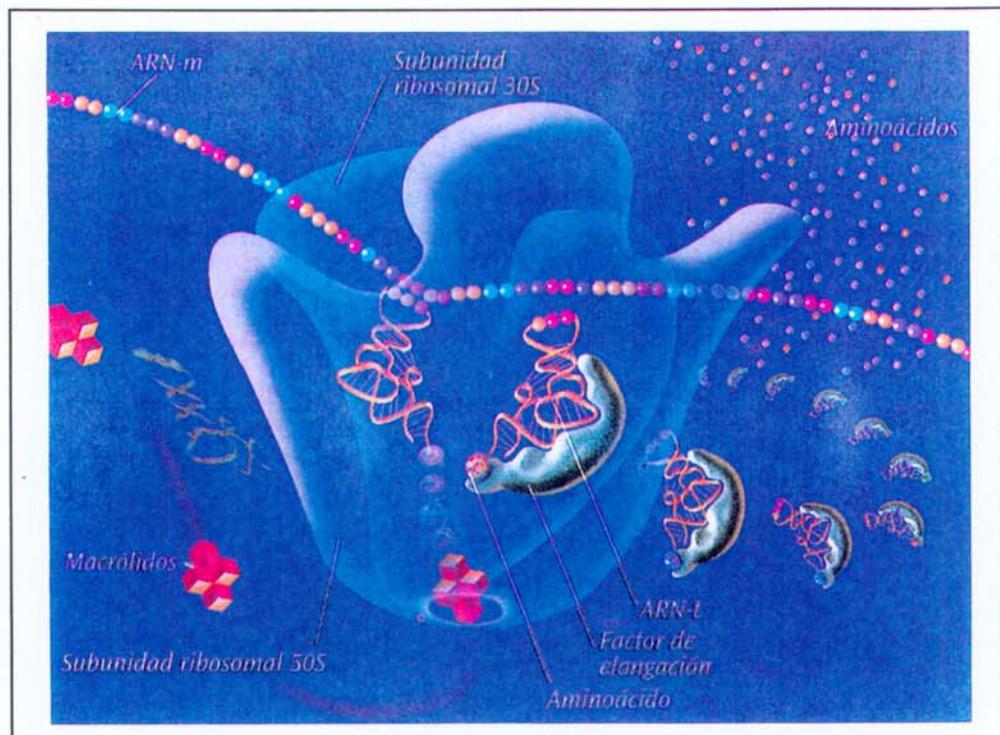
- ✓ Pristinamicina, que está compuesta por pristinamicina IA y IIA. Sólo puede administrarse por vía oral, y por su escasa solubilidad tiene una biodisponibilidad muy baja, lo que impide su uso para el tratamiento de infecciones graves.
- ✓ Sinergistina (quinupristín-dalfopristín), que se caracteriza por ser la primera estreptogramina semisintética soluble en agua. Es una mezcla inyectable de estreptograminas semisintéticas de tipo B (quinupristín) y de tipo A (dalfopristín), de uso reciente en humanos.

## 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS MLS

La reacción clave en la síntesis proteica es la formación del enlace peptídico, que se lleva a cabo en el centro catalítico de la subunidad 50S (centro de la peptidil transferasa). Los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub> y otros relacionados, como las estreptograminas de tipo A o el cloranfenicol, inhiben la síntesis proteica, bloqueando la función del centro de la peptidil transferasa (Di Giambattista *et al.*, 1990) (Figura 2). La síntesis proteica bacteriana se inhibe reversiblemente por macrólidos y lincosamidas e irreversiblemente por estreptograminas. Cada antibiótico MLS tiene un sitio de unión distinto en la subunidad 50S. Estos sitios se localizan juntos en dominios del centro activo de la peptidil transferasa, y algunos se superponen (Cocito, 1983).

Las estreptograminas de tipo A bloquean la unión del sustrato (peptidil-ARNt y aminoacil-ARNt) a los sitios donador y aceptor del centro activo de la peptidil transferasa, impidiendo el inicio de la fase de elongación (Noller, 1991). Por otra parte, las estreptograminas de tipo B y los macrólidos impiden la extensión de la

cadena proteica y provocan la liberación de péptidos incompletos desde el sitio donador (Di Giambattista *et al.*, 1986).



**Figura 2.- Mecanismo de acción de antibióticos MLS.**

En estudios recientes se ha observado que, además de impedir la elongación peptídica, los macrólidos también afectan al ensamblaje de subunidades ribosomales nacientes 50S (Champney, 1999). El bloqueo metabólico de la síntesis proteica producido por estreptograminas de tipo B se realiza en una etapa posterior al provocado por las estreptograminas de tipo A (Di Giambattista *et al.*, 1986). Además, las estreptograminas de tipo A sólo pueden unirse a sitios A y P de la subunidad 50S libres de aminoacil-ARNt, ya que la unión de aminoacil-ARNt a los sitios de unión del sustrato impide la fijación de estos antibióticos al ribosoma. Sin embargo, las estreptograminas de tipo B se pueden unir al ribosoma en cualquier paso del ciclo (Vannuffel *et al.*, 1992a). Cuando la inhibición de etapas iniciales (estreptograminas de tipo A) se asocia con la de etapas más avanzadas (estreptograminas de tipo B) se produce un bloqueo metabólico doble. Es lo que se conoce como efecto sinérgico y tiene lugar cuando la bacteria se incuba con una mezcla de estreptograminas.

Como los receptores de estreptograminas de tipo A y B se localizan en dominios del centro de la peptidil transferasa, su identificación permitiría determinar el centro catalítico para la síntesis proteica en la superficie del ribosoma. En una primera aproximación, el sitio de unión se estableció en la base de la protuberancia central de la subunidad 50S y, en un estudio más exhaustivo, se identificaron las proteínas L presentes en el sitio de unión de estreptograminas de tipo B (Cundliffe, 1987; Vannuffel *et al.*, 1992b). Al contrario de lo que ocurre con la eritromicina y las estreptograminas de tipo B, los sitios de unión de estreptograminas B y de lincosamidas no se solapan. Estas últimas –y en concreto, la lincomicina- parecen unirse al dominio II del centro de la peptidil transferasa (Di Giambattista *et al.*, 1987). Por otra parte, en estafilococos y otros patógenos, se ha visto que los macrólidos interactúan con el dominio V de la estructura secundaria del ARNr 23S (dentro del centro de la peptidil transferasa) (Weisblum, 2000). En *E. coli*, mutaciones en el dominio II están también implicadas en la resistencia a eritromicina (Douthwaite *et al.*, 1985) (Figura 3).

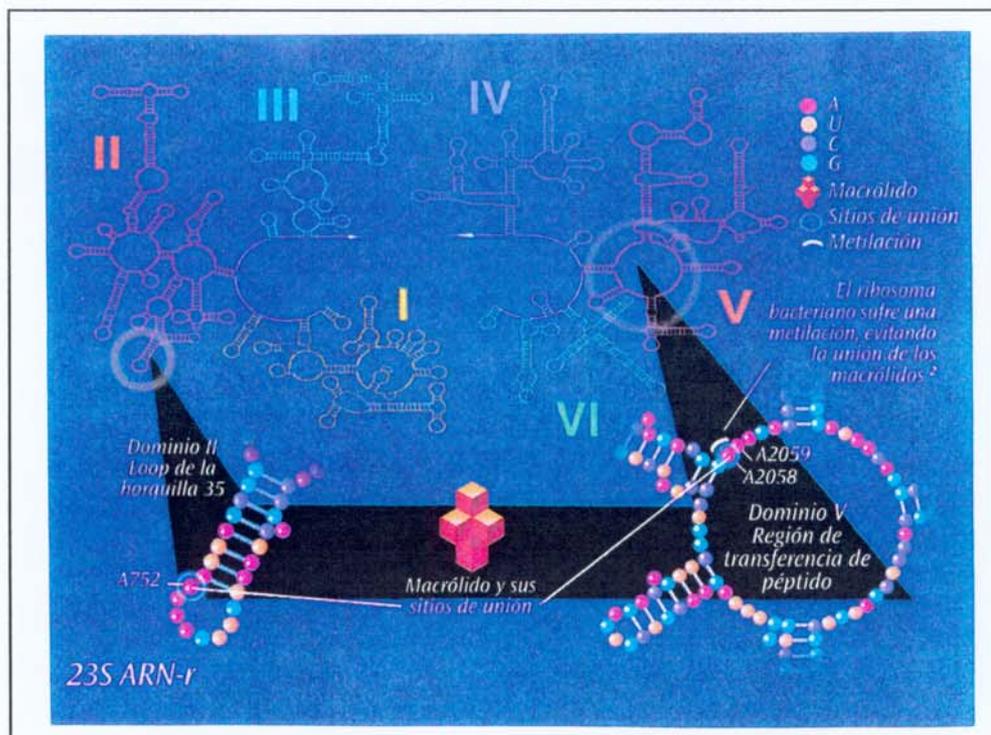


Figura 3.- Sitios de unión de macrólidos.

Presumiblemente, mutaciones en las proteínas ribosomales L4 y L22 que confieren resistencia a macrólidos en cepas de laboratorio de *E. coli* (Pardo and Rosset, 1977), modifican la estructura del ARNr 23S, permitiendo que una molécula de eritromicina contacte simultáneamente con los dominios II y V (Gregory and Dahlberg, 1999).

Los sitios de unión de estreptograminas de tipo A no han sido todavía identificados, pero parece que inducen complejos cambios en el centro de la peptidil transferasa (Vannuffel *et al.*, 1994).

## **5. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE ANTIBIÓTICOS MLS**

### **5.1 RESISTENCIA INTRÍNSECA**

La resistencia MLS de bacilos Gram-negativos, en particular enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp., probablemente se debida a la relativa impermeabilidad de la membrana externa a estos compuestos hidrofóbicos (Mao *et al.*, 1968). Las lincosamidas tienen actividad reducida frente a ciertas bacterias, incluidas las enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y otros bacilos Gram-negativos. La resistencia a lincomicina en *Enterococcus* spp. (excepto en algunas cepas de *Enterococcus durans* y *E. faecium*), *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri* (Kloos *et al.*, 1976), *Haemophilus* spp. y *Neisseria* spp. es útil para su identificación. Los enterococos son además resistentes a estreptograminas de tipo A.

### **5.2 RESISTENCIA ADQUIRIDA**

Los mecanismos de resistencia adquirida a antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub>, todos ellos descritos en *Streptococcus*, incluyen: 1) modificación de la diana por acción de metilasas, 2) eflujo activo del antibiótico, 3) modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o proteínas ribosomales, y 4) inactivación enzimática.

#### **5.2.1 Modificación de la diana por acción de metilasas**

Éste es el mecanismo más frecuente y el que mejor se conoce. Se debe a la acción de enzimas (metilasas), que mono o dimetilan un residuo de adenina (A2058 en

*Escherichia coli*) del dominio V del ARNr 23S en la posición N<sup>6</sup> (Lai *et al.*, 1971). La metilación provoca un cambio conformacional en el ribosoma, que reduce la unión de antibióticos MLS a la subunidad 50S, probablemente porque se superponen los sitios de unión de estos antibióticos a los ribosomas (Fernández-Muñoz *et al.*, 1971). Este mecanismo no afecta a las estreptograminas de tipo A, y la sinergia entre estreptograminas de tipo A y B frente a cepas resistentes a antibióticos MLS se mantiene (Chabbert *et al.*, 1971). Su expresión se caracteriza por resistencia cruzada a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B (fenotipo MLS<sub>B</sub>).

En general, los genes que codifican estas metilasas se han denominado genes *erm* (*erythromycin resistance methylase*), aunque hay excepciones, especialmente en organismos productores de antibióticos (Weisblum, 1998). Durante los últimos 30 años, se han aislado genes *erm* en un gran número de bacterias aerobias Gram-negativas (desde *E. coli* a *Haemophilus influenzae*) y Gram-positivas (desde *S. pneumoniae* a *Corynebacterium* spp.), e incluso en diferentes bacterias anaerobias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Roberts *et al.*, 1999). Las secuencias aminoacídicas de las metilasas codificadas por estos determinantes están relacionadas, lo que indica que los genes *erm* derivan de un ancestro común, probablemente de un productor de antibióticos (Arthur *et al.*, 1987). Mediante comparación de secuencias e hibridación en condiciones estrictas, se han diferenciado más de 20 clases de determinantes *erm* de resistencia (Rasmussen *et al.*, 1986; Arthur *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1999). En vista del creciente número de genes *erm* existente en la literatura, y dado que su denominación no había sido consistente en muchos casos, Roberts *et al.* (1999) propusieron una nueva nomenclatura para denominar los genes MLS. Según esta nueva clasificación, dos genes con una identidad de aminoácidos  $\geq 80\%$  se designaron con la misma letra y se incluyeron en la misma clase, mientras que dos genes que codificasen proteínas con una identidad  $\leq 79\%$  fueron designados con letras diferentes. Sin embargo, esta reciente reclasificación de genes no ha sido unánimemente aceptada. Así, por ejemplo, algunos autores prefieren seguir diferenciando el gen *erm(A)* de su variante, el gen *erm(TR)* (Farrel *et al.*, 2001).

Tabla 3.- Clases de genes *erm* según la nueva nomenclatura (Roberts *et al.*, 1999).

Clase	Proteína	Nomenclatura actual del gen	Genes incluidos	Géneros bacterianos
A	Erm(A)	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (A), <i>erm</i> (TR)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <b><i>Streptococcus</i></b> <sup>(1)</sup> , <b><i>Enterococcus</i></b> <sup>(2)</sup> , <i>Peptostreptococcus</i> <sup>(3)</sup> ,
B	Erm(B)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (AM), <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (AMR), <i>erm</i> (BC), <i>erm</i> (P), <i>erm</i> (BP), <i>erm</i> (IP), <i>erm</i> (Z), <i>erm</i> (BZ1), <i>erm</i> (BZ2), <i>erm</i> , <i>erm</i> (Z)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Escherichia</i> , <b><i>Enterococcus</i></b> , <i>Klebsiella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <b><i>Streptococcus</i></b> , <i>Wolinella</i>
C	Erm(C)	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C), <i>erm</i> (IM), <i>erm</i> (M)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <b><i>Streptococcus</i></b> , <i>Wolinella</i> , <b><i>Enterococcus</i></b> <sup>(4)</sup>
D	Erm(D)	<i>erm</i> (D)	<i>erm</i> (D), <i>erm</i> (J), <i>erm</i> (K)	<i>Bacillus</i>
E	Erm(E)	<i>erm</i> (E)	<i>erm</i> (E), <i>erm</i> (E2)	<i>Streptomyces</i>
F	Erm(F)	<i>erm</i> (F)	<i>erm</i> (F), <i>erm</i> (FS), <i>erm</i> (FU)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Selenomonas</i> , <b><i>Streptococcus</i></b> , <i>Treponema</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Wolinella</i>
G	Erm(G)	<i>erm</i> (G)	<i>erm</i> (G)	<i>Bacillus</i> , <i>Bacteroides</i>
H	Erm(H)	<i>erm</i> (H)	<i>car</i> (B)	<i>Streptomyces</i>
I	Erm(I)	<i>erm</i> (I)	<i>mdm</i> (A)	<i>Streptomyces</i>
N	Erm(N)	<i>erm</i> (N)	<i>tlr</i> (D)	<i>Streptomyces</i>
O	Erm(O)	<i>erm</i> (O)	<i>lrm</i> , <i>srm</i> (A)	<i>Streptomyces</i>
Q	Erm(Q)	<i>erm</i> (Q)	<i>erm</i> (Q)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <b><i>Streptococcus</i></b> , <i>Wolinella</i>
R	Erm(R)	<i>erm</i> (R)	<i>erm</i> (R)	<i>Aeromicrobium</i>
S	Erm(S)	<i>erm</i> (S)	<i>erm</i> (SF), <i>tlr</i> (A)	<i>Streptomyces</i>
T	Erm(T)	<i>erm</i> (T)	<i>erm</i> (GT)	<i>Lactobacillus</i>
U	Erm(U)	<i>erm</i> (U)	<i>lmr</i> (B)	<i>Streptomyces</i>
V	Erm(V)	<i>erm</i> (V)	<i>erm</i> (SV)	<i>Streptomyces</i>
W	Erm(W)	<i>erm</i> (W)	<i>myr</i> (B)	<i>Micromonospora</i>
X	Erm(X)	<i>erm</i> (X)	<i>erm</i> (CD), <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (CX)	<i>Corynebacterium</i>
Y	Erm(Y)	<i>erm</i> (Y)	<i>erm</i> (GM)	<i>Staphylococcus</i> <sup>(5)</sup>
Z	Erm(Z)	<i>erm</i> (Z)	<i>srm</i> (D)	
Sin clasificar			<i>clr</i>	<i>Streptomyces</i>

<sup>(1)</sup> Syrogiannopoulos *et al.*, 2001; <sup>(2)</sup> Portillo *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2000; <sup>(3)</sup> Reig *et al.*, 2001; <sup>(4)</sup> Jensen *et al.* 1999; <sup>(5)</sup> Matsuoka *et al.*, 2002.

En la tabla 3 se incluyen las clases de genes *erm*, así como su nomenclatura (anterior y nueva) y los géneros bacterianos en los que están presentes (Roberts *et al.*, 1999; Weisblum, 2000). En algunos casos, se han incluido algunos géneros más en los que, con posterioridad a los artículos referidos, se han detectado genes *erm*. Se señalan en negrita los dos géneros bacterianos en los que se centra esta tesis doctoral: *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Durante años, la resistencia MLS<sub>B</sub> fue atribuida comúnmente a genes pertenecientes a la clase *ermAM*, actualmente denominada *erm(B)* (Roberts *et al.*, 1999), tanto en neumococos (Trieu-Cuot *et al.*, 1990) como en estreptococos β-hemolíticos (Brantl *et al.*, 1994; Ceglowski and Alonso, 1994). Sin embargo, años más tarde, en cepas de *S. pyogenes* con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible se identificó un nuevo gen, denominado *erm(TR)*, que también codifica una metilasa y comparte un 82,5% de identidad con el gen *erm(A)* de *Staphylococcus aureus* (Sepälä *et al.*, 1998). Dicho gen *erm(TR)* se ha descrito posteriormente en estreptococos del grupo C y G, así como en *S. pneumoniae* (Kataja *et al.*, 1998b; Syrogiannopoulos *et al.*, 2001) y en otros géneros bacterianos (Reig *et al.*, 2001). Actualmente, los genes *erm(A)* y *erm(TR)*, por su alto grado de homología se incluyen en una misma clase de resistencia, denominada *erm(A)* (Roberts *et al.*, 1999). En la tabla 4 se muestran los genes *erm* que se han referido en la literatura en diferentes especies de *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Tabla 4.- Genes *erm* descritos en *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Clase <i>erm</i>	Genes incluidos	Especies bacterianas	Referencias
<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (A)	<i>S. agalactiae</i>	<b>Este trabajo</b>
		<i>E. faecium</i>	<b>Este trabajo</b> Schmitz <i>et al.</i> , 2000
	<i>erm</i> (TR)	<i>S. pyogenes</i>	Seppälä <i>et al.</i> , 1998
		SGC y SGG	Kataja <i>et al.</i> , 1998b
<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (AM)/ <i>erm</i> (B)	<i>S. agalactiae</i>	<b>Este trabajo</b>
		<i>S. pneumoniae</i>	Syrogianopoulos, 2001
		<i>S. sanguis</i>	Horinouchi <i>et al.</i> , 1980
		<i>S. pneumoniae</i>	Weisblum <i>et al.</i> , 1979 Ounissi <i>et al.</i> , 1981
	<i>erm</i> (B)	<i>S. pyogenes</i>	Weisblum <i>et al.</i> , 1979 Ounissi <i>et al.</i> , 1981 Gilmore <i>et al.</i> , 1982
		<i>S. agalactiae</i>	Gilmore <i>et al.</i> , 1982
	<i>erm</i> (B)	SGC	Seral <i>et al.</i> , 2000c
	<i>erm</i> (B)	<i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i>	<b>Este trabajo</b>
	<i>ermB</i> -like	<i>S. faecalis</i>	Shaw <i>et al.</i> , 1985
	<i>erm</i> (P)	<i>E. faecalis</i>	Weisblum <i>et al.</i> , 1979 Gilmore <i>et al.</i> , 1982 LeBlanc <i>et al.</i> , 1986
<i>erm</i> (AMR)	<i>E. faecalis</i>	Oh <i>et al.</i> , 1998	
<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C)	<i>E. faecium</i>	Jensen <i>et al.</i> , 1999

### Regulación de la resistencia MLS

La expresión de la resistencia  $MLS_B$  puede ser constitutiva o inducible. Cuando es constitutiva, las cepas son resistentes a todos los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B. Si la expresión es inducible, las cepas son resistentes a macrólidos de 14 átomos y 15 átomos; los macrólidos de 16 átomos, las lincosamidas y estreptograminas permanecen activos. Esta resistencia disociada se debe a diferencias en la capacidad inductora de los antibióticos MLS. Sólo los macrólidos de 14 y 15 átomos son inductores efectivos en la síntesis de metilasas (Weisblum, 1995). Este efecto puede observarse mediante el test de doble difusión con disco (Seppälä *et al.*, 1993).

El carácter inducible o constitutivo de la resistencia no está relacionado con la clase de determinante *erm*, sino que depende de la secuencia del dominio regulador situado delante de la región estructural que codifica la metilasa. Por ejemplo, la regulación del determinante *ermC* del plásmido pE194 de estafilococos ha sido muy estudiada y se explica mediante un mecanismo de **atenuación de la traducción** (Dubnau, 1984; Weisblum, 1985; Bechhofer, 1990). Junto al gen estructural *ermC* se cotranscribe, en el mismo ARNm, una secuencia denominada región reguladora, que codifica un péptido líder que se encuentra en todos los tipos de determinante *erm*. En ausencia de eritromicina, el ARNm presenta una estructura secundaria en forma de bucle en su extremo 5' que impide el acceso del ribosoma al sitio de unión SD2 (Shine-Dalgarno), y por tanto, impide la traducción de la metilasa. La unión en este punto es imprescindible para la síntesis de la metilasa de eritromicina, de modo que al no ser posible esta unión, no se traduce el gen que la codifica (Horinouchi, 1980). En presencia de eritromicina (o de otro macrólido inductor), ésta se une a los ribosomas. Dicha unión impide su translocación, lo que induce reorganizaciones conformacionales en el ARNm, que desplazan el *locus* SD2 hacia una zona externa a la estructura secundaria. Ello permite que el ribosoma se una a SD2, y por tanto, se traduzca la enzima (Dubnau, 1984). En este modelo, la regulación está mediada por la metilación (efecto de retroalimentación): cuando todos los ribosomas están metilados, es posible su translocación y las moléculas de ARNm vuelven a adoptar una conformación inactiva.

Otro mecanismo propuesto es el de la **atenuación de la transcripción**, que explica la regulación del determinante *erm(K)*. En este caso, la ausencia de eritromicina impide la síntesis completa del ARNm (Kwak *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1997).

La especificidad de la inducción varía según los casos. Así, los macrólidos de 14 y 16 átomos inducen la resistencia mediada por el gen *erm(AMR)* en *E. faecalis* (Oh *et al.*, 1998). Poco se sabe sobre las bases moleculares que diferencian antibióticos inductores de no inductores, excepto que algunos residuos del péptido líder son cruciales para inducir resistencia y que, mutaciones específicas en algunos aminoácidos provocan cambios apreciables en el fenotipo de resistencia inducible (Mayford *et al.*, 1989; Mayford *et al.*, 1990). En cuanto a la expresión constitutiva, se ha observado que cepas inducibles, es decir, dotadas de la información genética necesaria para sintetizar la metilasa Erm y el péptido líder, especialmente cuando se encuentran expuestas a concentraciones subinhibitorias de antibióticos no inductores (LS<sub>B</sub>), terminan expresando la enzima de forma constitutiva, debido a que se producen mutaciones (deleciones, duplicaciones, repeticiones) en la región reguladora que hacen que el *locus* SD2 esté siempre accesible. De este modo, la síntesis de la metilasa se produce independientemente del cambio conformacional inducido por la eritromicina en el ribosoma (Hahn *et al.*, 1982). Así, la expresión constitutiva de la resistencia MLS<sub>B</sub>, mediada por el plásmido pAMβ1 de *E. faecalis*, se ha relacionado con la deleción de la mayor parte de la región reguladora del gen *erm(AM)* (Martin *et al.*, 1987). En estudios más recientes, Rosato *et al.* (1998 y 1999) mostraron que una deleción similar era responsable de la expresión constitutiva del gen *erm* en cepas de *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* y *E. faecalis*. Por otra parte, Zhong *et al.* (1999) confirmaron que los niveles de metilación ribosomal en cepas de *S. pneumoniae* que presentaban el gen *erm(AM)* eran diferentes, lo que podría deberse a mutaciones en la región reguladora. Recientemente, Werckenthin and Schwarz (2000) encontraron, en el atenuador de la traducción del gen *erm(A)* de una cepa de *Staphylococcus intermedius*, dos mutaciones puntuales que podían ser las responsables del carácter constitutivo.

### 5.2.2 Eflujo activo del antibiótico

Los sistemas de eflujo activo de antibióticos en bacterias se clasifican en:

- ✓ Transportadores primarios, que son conocidos como transportadores ABC [*adenosine-triphosphate (ATP)-binding cassette*], e hidrolizan ATP como fuente de energía (Higgins *et al.*, 1986). Comentaremos más a fondo sus características en la discusión de esta tesis doctoral.
- ✓ Transportadores secundarios que, en general, utilizan protones o iones de sodio como fuente de energía. Un gran grupo de estos transportadores pertenece a la superfamilia MF (*major facilitator*) y, típicamente, consisten en una proteína integral de membrana con 12  $\alpha$ -hélices transmembrana (Pao *et al.*, 1998).

Por el momento, en cocos gram positivos, se han descrito **sistemas de eflujo de macrólidos** de dos tipos: de tipo MS y de tipo M. Ambos son importantes para determinar el grado de sensibilidad a un amplio rango de antibióticos MLS y tienen gran interés clínico.

**Eflujo de tipo MS:** Ross *et al.* (1989) estudiaron un grupo de cepas de *Staphylococcus epidermidis* cuyo fenotipo denominaron “MS”, por ser resistentes a macrólidos de 14 átomos y a estreptograminas de tipo B. Un año más tarde, aislaron y secuenciaron el gen responsable, que denominaron *msrA* (*macrolide streptogramin resistance*), en una de estas cepas. Dicho gen presenta dos dominios de unión a ATP homólogos a los de una familia de proteínas transportadoras de Gram-negativos y de células eucariotas (Ross *et al.*, 1990). El sistema parece ser multicomponente, abarcando los genes *msr(A)*, *smp* y/o *stp* para constituir una bomba de eflujo totalmente operativa. No está claro qué papel desempeña cada proteína en el sistema de eflujo, pero es evidente que Msr(A) debe estar presente para expresar el fenotipo MS (Ross *et al.*, 1995).

**Eflujo de tipo M:** Mediante el test de doble difusión con disco (eritromicina y clindamicina), se identificó un nuevo patrón de resistencia en algunas cepas de estreptococos (fenotipo M), caracterizado por sensibilidad a lincosamidas, incluso después de la inducción, a estreptograminas y a macrólidos de 16 átomos. Su expresión se debe a la presencia de una bomba de eflujo dependiente de energía (Sutcliffe *et al.*, 1996b). Los genes *mef(A)* (*macrolide efflux*) y *mef(E)* codifican el

eflujo de macrólidos en *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, respectivamente (Clancy *et al.*, 1996; Tait-Kamradt *et al.*, 1997). El análisis de la secuencia de aminoácidos mostró la presencia de 12 dominios transmembrana, y los ensayos de eflujo en presencia de arsenato sugirieron que Mef(A) y Mef(E) dependían de una fuerza motriz de protones (Clancy *et al.*, 1996; Tait-Kamradt *et al.*, 1997). Según la nomenclatura actual ambos se designan como *mef*(A) (Roberts *et al.*, 1999), ya que poseen un 90% de identidad. Los genes *mef* se han descrito en otros Gram-positivos, como *Enterococcus* spp., *Micrococcus luteus* y *Streptococcus* del grupo viridans (Arpin *et al.*, 1999a; Luna *et al.*, 1999), y también en Gram-negativos (*Acinetobacter junii* y *Neisseria gonorrhoeae*) (Luna *et al.*, 2000).

En su estudio, Tait-Kamradt *et al.* (1997) clonaron en *E. coli* un fragmento de *S. pneumoniae* de 3,7Kb que contenía el gen *mef*(E), de 1,2Kb, y afirmaron que éste era suficiente para conferir resistencia a eritromicina; sin embargo, el fragmento de ADN adicional no fue caracterizado. Recientemente, en cepas de *S. pneumoniae*, se ha encontrado que el gen *mef*(E) forma parte de un elemento de inserción genética, mega (*macrolide efflux genetic assembly*), asociado al aumento de la resistencia a macrólidos (Gay *et al.*, 2001). Mega contiene un operón en el cual dos genes (*mef* y otro, denominado *mel*) se cotranscriben, formando parte de un sistema de eflujo dual: *mef*(E), codifica un transportador dependiente de protones, tal y como fue descrito por Tait-Kamradt *et al.* (1997), y *mel*, codifica un transportador ABC, homólogo a *msr*(A) de estafilococos (Gay *et al.*, 2001). Según estos autores, parece que mega está relacionado con un transposón conjugativo. La relación de mega con el transposón defectivo *Tn1207.1*, que contiene el gen *mef*(A) en *S. pneumoniae* (Santagati *et al.*, 2000), apoya esta hipótesis (Gay *et al.*, 2001), aunque los tamaños de estos elementos genéticos difieren en ambos estudios (7,2 frente a 5,5Kb).

Un estudio recientemente publicado (DeI Grosso *et al.*, 2002) considera importante la distinción entre los genes *mef*(A) y *mef*(E) en *S. pneumoniae*, ya que ambos se encuentran en elementos genéticos diferentes, si bien es posible que procedan de un ancestro común. Mientras *mef*(E) se encuentra insertado en diferentes puntos del cromosoma y es transferible mediante transformación, *mef*(A) se integra en un sitio específico (*celB*) involucrado en la competencia, por lo que las cepas que portan dicho gen no presentan capacidad para ser transformadas.

Tabla 5.- Genes de eflujo de macrólidos en cocos Gram-positivos.

Nombre actual del gen	Genes incluidos	Fenotipo	Tipo de transportador	Especie bacteriana	Referencia
<i>msr(A)</i>	<i>msr(A)</i>	MS	Primario (ADC)	<i>S. epidermidis</i>	Ross <i>et al.</i> , 1990
				<i>S. coagulasa. neg.</i> y <i>S. aureus</i>	Lina <i>et al.</i> , 1999
	<i>msr(A)</i> <sup>(1)</sup>	M	ABC	<i>S. aureus</i>	Wondrack <i>et al.</i> , 1996 Cheng <i>et al.</i> , 39 <sup>th</sup> ICAAC
	<i>msr(A)</i>	MLS <sup>(2)</sup>		<i>S. pyogenes</i>	Adrián, 1997
				<i>S. pneumoniae</i>	Seral <i>et al.</i> , 2001a
	<i>msr(SA)</i> <sup>(4)</sup>	M ó MS <sup>(3)</sup>	ABC	<i>S. pneumoniae</i>	Seral <i>et al.</i> , 2001 <sup>a</sup>
				<i>S. aureus</i>	Matsuoka <i>et al.</i> , 1998 Matsuoka <i>et al.</i> , 2002
	<i>msr(B)</i>	MS	ABC	<i>S. xylosum</i>	Milton <i>et al.</i> , 1992
<i>mef(A)</i>	<i>mef(A)</i>	M	Secundario	<i>S. pyogenes</i>	Clancy <i>et al.</i> , 1996
				SGC	Kataja <i>et al.</i> , 1998b
	<i>mef(E)</i>	M	Secundario	<i>S. pneumoniae</i>	Tait-Kamradt, 1997
	<i>mef(A)</i> <sup>(5)</sup>	M		<i>S. pneumoniae</i>	Santagati <i>et al.</i> , 2000
	<i>mef(E)</i> y <i>mel</i>	M	Secundario ABC	<i>S. pneumoniae</i>	Gay <i>et al.</i> , 2001
	<i>mef(E)</i>	M		<i>S. agalactiae</i>	Arpin <i>et al.</i> , 1999c
	<i>mef(A/E)</i>	M		<i>S. agalactiae</i>	<b>Este trabajo</b> Betriu <i>et al.</i> , 2000
				<i>S. viridans</i>	Luna <i>et al.</i> , 1999
				<i>E. faecium</i>	Fraimow, 97 <sup>th</sup> GMASM
				<i>Enterococcus spp.</i> y <i>M. luteus</i>	Luna <i>et al.</i> , 1999

<sup>(1)</sup> *msr(A)* asociado a *mph(C)*; <sup>(2)</sup> *msr(A)* asociado a *erm(B)*; <sup>(3)</sup> *msr(A)* asociado a *mef(A)*; <sup>(4)</sup> *msr(A)* en un plásmido, asociado a *mph(C)* y *erm(Y)*; <sup>(5)</sup> *mef(A)* en un transposón defectivo Tn1207.1.

Según estos mismos autores (Del Grosso *et al.*, 2002), también resulta interesante el hecho de que los aislados que portaron el gen *mef(A)* (17 de 20 que expresaron fenotipo M) fueron sensibles a penicilina, tetraciclina y cloranfenicol, se incluyeron en un mismo serotipo, presentaron un origen clonal y el gen *mef(A)* se transfirió por

conjugación, mientras que los que contenían *mef(E)* (3 aislados de 20) fueron resistentes a varios de estos antibióticos, mostraron distintos serotipos, no presentaron relación clonal y *mef(E)* no se transfirió por conjugación.

Por otra parte, un estudio reciente demostró que el gen *mreA* (*macrolide resistance efflux*), inicialmente considerado un nuevo gen de eflujo de macrólidos de *S. agalactiae* (Clancy *et al.*, 1997), se localiza en el cromosoma y codifica una actividad enzimática (una flavoquinasa), si bien es cierto que confiere resistencia a macrólidos en *E. coli* por un mecanismo aún desconocido (Clarebout *et al.*, 2001).

Se han descrito dos genes, *vga* y *vga(B)*, en *S. epidermidis* y en *Staphylococcus haemolyticus*, albergados en plásmidos, que codifican proteínas de unión de ATP y actúan como **sistemas de eflujo de estreptograminas de tipo A** (Allignet *et al.*, 1992; Allignet *et al.*, 1997).

### **5.2.3 Modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o proteínas ribosomales**

Tras el descubrimiento de los genes *erm*, han sido identificados otros mecanismos de resistencia que conllevan una modificación de la estructura del ARNr. Así, recientemente y en condiciones de laboratorio se ha observado que, mutaciones o deleciones en los dominios V y II de la secuencia del ARNr 23S o en las proteínas ribosomales L4 y L22, que forman parte de los sitios de unión de los macrólidos, confieren resistencia a dichos antibióticos en *S. pneumoniae* (Tait-Kamradt *et al.*, 2000a; Tait-Kamradt *et al.*, 2000b; Depardieu and Courvalin, 2001; Canu *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2002b; Shortridge *et al.*, 2002).

### **5.2.4 Inactivación enzimática**

Otro mecanismo de resistencia es el constituido por genes que inactivan antibióticos MLS mediante la modificación de su estructura.

**Inactivación de macrólidos:** Wondrack *et al.* (1996) describieron una cepa de *S. aureus*, productora de esterasas, capaz de inactivar macrólidos de 14 y 16 átomos

(a diferencia de las estererasas halladas en *E. coli*, que inactivan macrólidos de 14 y 15 átomos), y que presentaba además un determinante de eflujo *msr(A)*. En estudios posteriores, se identificó en esa cepa el gen *mph(C)* (*macrolide phosphotransferase*), que codifica una fosforilasa que inactiva macrólidos de 14 átomos y se encuentra en el mismo operón que *msr(A)* (Cheng *et al.*, 39<sup>th</sup> ICAAC). Por otra parte, Matsuoka *et al.* (1998) describieron, en una cepa de *S. aureus*, la presencia de un plásmido que portaba tres genes de resistencia a macrólidos: *mph(BM)*, actualmente designado como *mph(C)* (Roberts *et al.*, 1999), que codifica una fosfotransferasa; *msr(SA)*, actualmente denominado *msr(A)* (Roberts *et al.*, 1999), que codifica una proteína de eflujo de macrólidos de tipo ABC y un gen *erm*, aún sin caracterizar en aquel momento. Muy recientemente, los mismos autores han identificado este último gen, situado detrás de *mph(C)* en el citado plásmido, como *erm(Y)* (Matusoka *et al.*, 2002). Por el momento, no se han descrito en enterococos ni en estreptococos enzimas inactivantes de macrólidos.

**Inactivación de lincosamidas:** En estafilococos (*S. haemolyticus* y *S. aureus*) y en enterococos (*E. faecium*) se ha referido la presencia de enzimas inactivantes de lincomicina (nucleotidiltransferasas), codificadas por los genes *lin* (Brisson-Noel *et al.*, 1986; Brisson-Noel *et al.*, 1988; Bozdogan *et al.*, 1999), actualmente designados *lnu(A)* (*lincomycin nucleotidyltransferase*) y *lnu(B)* (Roberts *et al.*, 1999). Un estudio reciente confirmó la presencia del gen *lnu(B)* en una cepa de *S. agalactiae* con fenotipo L (De Azavedo *et al.*, 2001). Éste es el primer caso en el que se describe un mecanismo de inactivación enzimática en estreptococos.

**Inactivación de estreptograminas:** Entre los mecanismos que confieren resistencia a estreptograminas, se han descrito enzimas que hidrolizan estreptograminas de tipo B, codificadas por los genes *vgb* y *vgb(B)* (*virginiamycin factor B hydrolase*) (Allignet *et al.*, 1988; Allignet *et al.*, 1998), así como acetiltransferasas que inactivan estreptograminas de tipo A, codificadas por los genes *vat* (*virginiamycin factor A acetylation*) (Allignet *et al.*, 1993; Allignet *et al.*, 1998) y *sat* (Rende-Fournier *et al.*, 1993) –ahora designados *vat*, según Roberts *et al.* (1999)– en estafilococos y enterococos.

Tabla 6.- Genes de inactivación de antibióticos MLS en cocos Gram-positivos.

Nombre actual del gen	Genes que incluye	Especificidad antibiótica	Actividad enzimática	Especie bacteriana	Referencia
<i>mph(C)</i>	<i>mph(C)</i> <sup>(1)</sup>	M	Fosforilasa	<i>S. aureus</i>	Wondrack <i>et al.</i> , 1996 Cheng <i>et al.</i> , 39 <sup>th</sup> ICAAC
	<i>mph(BM)</i>	M	Fosforilasa	<i>S. aureus</i>	Matsuoka <i>et al.</i> , 1998 Matsuoka <i>et al.</i> , 2002
<i>lnu(A)</i>	<i>lin(A)</i>	L	Transferasa	<i>S. haemolyticus</i>	Brisson-Noël <i>et al.</i> , 1988
	<i>lin(A)'</i>	L	Transferasa	<i>S. aureus</i>	Brisson-Noël <i>et al.</i> , 1988
<i>lnu(B)</i>	<i>lin(B)</i>	L	Transferasa	<i>E. faecium</i>	Bozdogan <i>et al.</i> , 1999
				<i>S. agalactiae</i>	De Azavedo <i>et al.</i> , 2001
<i>vgb(A)</i>	<i>vgb</i>	S <sub>B</sub>	Lactonasa	<i>S. aureus</i>	Allignet <i>et al.</i> , 1988
<i>vgb(B)</i>	<i>vgb(B)</i>	S <sub>B</sub>	Lactonasa	<i>S. cohnii</i>	Allignet <i>et al.</i> , 1998
<i>vat(A)</i>	<i>vat</i>	S <sub>A</sub>	Acetilasa	<i>S. aureus</i>	Allignet <i>et al.</i> , 1993
<i>vat(B)</i>	<i>vat(B)</i>	S <sub>A</sub>	Acetilasa	<i>S. aureus</i>	Allignet <i>et al.</i> , 1995
<i>vat(C)</i>	<i>vat(C)</i>	S <sub>A</sub>	Acetilasa	<i>S. cohnii</i>	Allignet <i>et al.</i> , 1998
<i>vat(D)</i>	<i>sat(A)</i>	S <sub>A</sub>	Acetilasa	<i>E. faecium</i>	Rende-Fournier, 1993
<i>vat(E)</i>	<i>sat(G)</i>	S <sub>A</sub>	Acetilasa	<i>E. faecium</i>	Werner and Witte., 1999

<sup>(1)</sup> *mph(C)* asociado a *msr(A)*; <sup>(2)</sup> *mph(C)* se encuentra en un plásmido, asociado a los genes *msr(A)* y *erm(Y)*.

## 6. CONSUMO DE MACRÓLIDOS Y SELECCIÓN DE RESISTENCIAS EN *Streptococcus*

El aumento del uso clínico de la eritromicina y sus derivados, en su mayoría para tratar infecciones del tracto respiratorio, se ha relacionado con un aumento de la resistencia a macrólidos en *S. pyogenes* (Seppälä *et al.*, 1995). Este problema fue particularmente importante en Japón, donde la resistencia a eritromicina en esta especie alcanzó niveles de más del 60% a mediados de los años 1970 (Maruyama *et al.*, 1979), y en Finlandia donde, a partir de 1988, se observó un inesperado aumento de la resistencia, pasando en sólo dos años de un 5 a un 13% de cepas resistentes en muestras faríngeas (Seppälä *et al.*, 1992). Brotes similares fueron descritos en distintos países, como Reino Unido (Spencer *et al.*, 1989) y Suecia (Holmstrom *et al.*, 1990).

A su vez, el problema se vio agravado por la resistencia cruzada que presentan los macrólidos (eritromicina, azitromicina y claritromicina), ya que el uso de cualquiera de ellos puede conducir a la resistencia de los tres agentes antimicrobianos (Seppälä *et al.*, 1997b; Seppälä *et al.*, 1993). Además, es posible que exista relación entre la prevalencia de los distintos fenotipos de resistencia a macrólidos y el consumo de este tipo de antibióticos (Jasir *et al.*, 2001). En esta misma línea, en España se han observado variaciones estacionales de la prevalencia de resistencia a eritromicina, con menor incidencia en verano (Orden *et al.*, 1996; Baquero *et al.*, 1999b), que pueden atribuirse a la variación en los patrones de consumo de antibióticos; otra posible explicación sería la variación clonal estacional de nuevos fenotipos con respecto a virulencia y sensibilidad a antibióticos.

El aumento de la prevalencia de cepas resistentes de *S. pyogenes* que se produjo en Japón fue atribuido a la presión ejercida por el uso excesivo de eritromicina en el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio (Maruyama *et al.*, 1979). Tal observación fue apoyada posteriormente por los datos obtenidos en Finlandia, donde el uso de eritromicina se triplicó en la década de 1980 y, probablemente en relación con ello, se incrementó el número de aislamientos resistentes en dicho país (Seppälä *et al.*, 1992; Seppälä *et al.*, 1995). Este hecho también se evidenció en Taiwan (Hsueh *et al.*, 1995), en Australia (Stingemore *et al.*, 1989) y en Italia (Cristiano *et al.*, 1996).

A partir de la publicación de hallazgos tan alarmantes en Japón, el uso de eritromicina se redujo en ese país y la resistencia disminuyó hasta situarse en torno al 1% (Mitsuhashi *et al.*, 1992; Bass *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1994). El aumento de cepas resistentes en Japón fue de origen monoclonal (Maruyama *et al.*, 1979), mientras que en Finlandia se debió a la diseminación de varios clones (Seppälä *et al.*, 1992), pero por fortuna, la resistencia disminuyó marcadamente en Finlandia dos años después de la reducción en el consumo de macrólidos (Seppälä *et al.*, 1997b). Los incrementos de la resistencia a eritromicina están vinculados, en todos los casos, a una serie de factores, entre los que destaca como decisivo el elevado consumo de macrólidos, ya que se utilizan con gran frecuencia como tratamiento empírico de infecciones del tracto respiratorio (Bryskier *et al.*, 1993), como profilaxis y como tratamiento de infecciones orales (Gialdroni-Grassi *et al.*, 1993). A ello hay que

añadir sus nuevas indicaciones terapéuticas, como son la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera péptica o su utilización en pacientes con inmunodeficiencia adquirida.

Estudios *in vitro* demuestran la aparición de resistencia en *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* cultivados en medios con concentraciones crecientes de eritromicina (Carsenti-Etesse *et al.*, 1996; Sutcliffe *et al.*, 1996b; Carsenti-Etesse *et al.*, 1999). Esta situación puede considerarse paralela a las circunstancias que se dan *in vivo*, cuando un paciente es tratado de forma crónica o frecuentemente con esos antimicrobianos. No obstante, el elevado grado de resistencia se ve influenciado también por otros factores, como son la presencia de reservorios humanos o de otras especies con microorganismos portadores de genes de resistencia (Reig *et al.*, 2001) y la existencia de una situación que favorezca la transmisión de bacterias, como puede ser el contacto en los colegios o en la familia (Cohen, 1992). Un estudio reciente (Pérez-Trallero *et al.*, 2001b) realizado en nuestro país señala que más del 90% de individuos portan en su faringe estreptococos comensales (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, entre otros) resistentes a eritromicina. Por el momento, se desconoce si este alto porcentaje de portadores de cepas comensales resistentes a eritromicina influye o no en el elevado número de cepas clínicas de *S. pneumoniae* y de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina en España, si bien es cierto que la transmisión de cepas resistentes de persona a persona es un hecho frecuente (Reichler *et al.*, 1992; Klugman *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1996; Yagupsky *et al.*, 1998).

En el caso de infecciones provocadas por *S. pneumoniae*, la eritromicina se ha utilizado como una alternativa terapéutica a la penicilina en casos de alergia a este antibiótico. En 1967 se describió por primera vez la resistencia a eritromicina y lincomicina en esta especie bacteriana en una cepa aislada de un paciente tratado con macrólidos en EE.UU. (Dixon, 1967). A partir de entonces, el número de cepas resistentes a este antibiótico ha ido en aumento y, después de numerosos estudios epidemiológicos, se cree que existen dos factores de riesgo fundamentales: el uso excesivo e innecesario del antimicrobiano y la presión selectiva que el consumo ejerce sobre el microorganismo (Pérez Trallero *et al.*, 1989; Baquero, 1999a). Se han estudiado otros posibles factores de riesgo, como la edad (Fenoll *et al.*, 1991) y la

hospitalización (Pallarés *et al.*, 1987) y se han puesto de manifiesto datos que parecen relacionarlos con la incidencia de la resistencia. Así, se ha observado que los portadores más frecuentes de cepas resistentes son niños menores de 5 años y las infecciones en adultos son causadas por los serotipos encontrados en niños. Por otra parte, la incidencia parece ser más elevada en pacientes hospitalizados. Sin embargo, no hay datos concluyentes sobre la influencia que ejercen estos posibles factores de riesgo. Además, como ya se ha comentado anteriormente, en la mayor parte de los casos, la resistencia a eritromicina supone resistencia cruzada a la mayoría de antimicrobianos de la familia de antibióticos MLS. Por este motivo, la resistencia de *S. pneumoniae* a MLS, tanto por sus altos niveles actuales como por su rápida evolución, constituye una causa de preocupación en el ámbito de la microbiología clínica y de la terapéutica antimicrobiana. Otro aspecto importante es la alta frecuencia con que se aíslan cepas resistentes a macrólidos, que son también resistentes a otros antimicrobianos, como tetraciclinas, cloranfenicol, cotrimoxazol, penicilinas y ciprofloxacina. Se ha descrito una alta incidencia de multirresistencia en estas cepas, lo que apoya la influencia de la presión antibiótica en el desarrollo de resistencias (Appelbaum, 1992). En Francia, varios grupos señalaron en *S. pneumoniae* una alta resistencia a macrólidos asociada con resistencia a penicilina (Angot *et al.*, 2000; Bingen *et al.*, 2000), que contrastó con la baja resistencia a eritromicina detectada en este país en cepas de *S. pyogenes* (Bingen *et al.*, 2000). En cambio, en España, en aquellas localidades con alta tasa de resistencia a eritromicina en *S. pneumoniae*, se detectó una alta tasa de resistencia a este fármaco en *S. pyogenes*; y del mismo modo, tasas bajas para uno de estos microorganismos implicaron tasas bajas para el otro (Gómez-Lus *et al.*, 1999; Pérez-Trallero *et al.*, 2001a). La asociación a escala poblacional entre resistencias codificadas por diferentes mecanismos (fenotipo MLS<sub>B</sub> para *S. pneumoniae* y fenotipo M para *S. pyogenes*), entre dos especies de un mismo género que ocupan dos nichos ecológicos distintos y procedentes de muestras de pacientes de edad muy diferente, hace sospechar la existencia de una causa extrínseca, tal como la presión selectiva ejercida por el consumo de antibióticos capaz de explicar la coselección geográfica de resistencias. En dos recientes publicaciones, Granizo *et al.* (2000a; 2000b) estudian la asociación entre el aumento del consumo de macrólidos en España y el

aumento paralelo de la prevalencia de la resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* (1986-1997) y en *S. pneumoniae* (1979-1997). En ambas especies parece que la prevalencia de la resistencia a la eritromicina se debe más al consumo de los nuevos macrólidos (claritromicina y azitromicina) con intervalos de dosificación ampliados, sin que exista relación estadística entre la evolución de la resistencia a la eritromicina y el consumo de este antibiótico.

## **7. DATOS REFERENTES A CONSUMO DE MACRÓLIDOS EN ESPAÑA**

Desde la introducción en clínica de la penicilina, hace sesenta años, las enfermedades infecciosas han sido consideradas como el paradigma de las enfermedades curables en los países desarrollados, apareciendo España como el país europeo donde existe una actitud más despreocupada y confiada hacia los antibióticos. Los antimicrobianos se han integrado en la cultura popular por su eficacia y seguridad, pero durante décadas se ha tenido escasa percepción de la problemática social que conlleva su uso y abuso. En la actualidad, varios estudios sugieren que un importante factor de riesgo en la diseminación de la resistencia bacteriana es el aumento del consumo de antibióticos (Baquero *et al.*, 1991; Seppälä *et al.*, 1995; Arason *et al.*, 1996; Melander *et al.*, 2000). Por este motivo, en los últimos años se viene observando un cierto proceso de racionalización en el uso de antibióticos para el tratamiento de procesos extrahospitalarios, con menor consumo de antibióticos parenterales y de asociaciones de antibióticos, y una mayor preocupación por el control de antibióticos orales como consecuencia de la voz de alarma dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y las sociedades científicas (“Sociedad Española de Quimioterapia”, entre otras) acerca del problema de la resistencia bacteriana.

Según datos recogidos por el Ministerio de Salud y Consumo, Ruiz Bremón *et al.* (2000) realizaron un seguimiento de los patrones de consumo de antibióticos en España en la década 1987-1997. Se encontró que en nuestro país las penicilinas de espectro ampliado fueron el grupo terapéutico que registró mayores ventas en ese periodo, seguido de macrólidos, quinolonas y cefalosporinas. Como indicador comparativo se empleó la DHD (DDD/1000 habitantes/día; siendo la DDD lo que se

conoce como “dosis definida diaria”). Los macrólidos fueron el grupo que registró mayor aumento de ventas en el periodo de estudio, pasando de 1,25 en 1987 a 3,63 diez años más tarde. A su vez, el porcentaje de DHD de los macrólidos respecto al consumo global de antibióticos aumentó en ese periodo de un 8 a un 18%. Otros estudios sobre consumo de macrólidos publicados en La Rioja (Siles Gutierrez *et al.*, 1998), Zaragoza (Goldaracena Tanco *et al.*, 1996) y Cataluña (Llop, 1997) demuestran que este grupo de antibióticos ha alcanzado un alto nivel de utilización dentro de la terapéutica antimicrobiana. Según datos del “Servicio de Marketing Internacional” de Madrid, el consumo de macrólidos por pacientes externos experimentó un incremento de más del 60% entre 1987-1996 (Alós *et al.*, 2000). Asimismo, un par de estudios recientes en España, muestran la asociación entre aumento de consumo e incremento de resistencia a macrólidos en cepas de estreptococos en los últimos años (Granizo *et al.*, 2000a; Granizo *et al.*, 2001b). En esta misma línea, un trabajo recientemente publicado en nuestro país (García-Rey *et al.*, 2002) refleja la variación local entre diferentes provincias españolas, tanto en las tasas de resistencia en *S. pneumoniae* a eritromicina (22-56%) y a penicilina (41-68%) como en consumo de antibióticos (DHD: 1,96-4,34 y 11,47-18,25 para macrólidos y  $\beta$ -lactámicos, respectivamente). Este estudio confirma que el consumo de macrólidos y  $\beta$ -lactámicos está relacionado con los niveles de resistencia a eritromicina y penicilina, si bien los macrólidos tienen mayor impacto que los  $\beta$ -lactámicos, a pesar de que su consumo global es cuantitativamente menor, quizás debido a su efecto bacteriostático y no bactericida.

El perfil de consumo por grupos de antibióticos en España difiere del de otros países europeos, como Reino Unido (Davey *et al.*, 1996) y Dinamarca (Frimodt-Moller *et al.*, 1997). Comparativamente con otros países de nuestro entorno, España muestra un mayor consumo de penicilinas semisintéticas de amplio espectro y de  $\beta$ -lactámicos en general, a pesar de la progresión de los macrólidos en la década de 1990. De igual modo, España es uno de los países con mayor tasa de automedicación y uno de los de mayor almacenamiento de antibióticos (SEQ, 2001). En concordancia con estos datos, se ha publicado recientemente un estudio sobre la variación en el uso de antibióticos en quince países de la Unión Europea (Otto Cars *et al.*, 2001), del que se desprende que España ocupa el segundo lugar, después de

Francia, en ventas de antibióticos. En nuestro país, a mediados de los años 90, los macrólidos fueron el segundo grupo de antibióticos en cuanto a volumen de ventas, con un 17-18% respecto al consumo total de antibióticos (Baquero *et al.*, 1996; Ruiz Bremón *et al.*, 2000). La misma tendencia se observó en Italia, Luxemburgo y Francia, con porcentajes de 21, 18 y 16%, respectivamente. En Austria los macrólidos fueron los antimicrobianos más consumidos (26%).

## 8. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS MLS EN ANIMALES

En los animales se han utilizado antibióticos con tres finalidades: terapéutica, profiláctica (como en humanos) y como promotores de crecimiento, especialmente en aves y cerdos, disminuyendo de este modo el coste de las producciones. El empleo de antibióticos como promotores de crecimiento en animales fue una práctica habitual desde la década de 1950, cuando se descubrió que pequeñas dosis de tetraciclina mejoraban el crecimiento (Stokstad *et al.*, 1950). En aquel momento se desestimó el efecto que el consumo de estos “factores nutricionales” pudiera tener sobre la resistencia. En 1969 se publicó el informe británico Swann (Swann, 1969), que recomendaba no utilizar en animales antibióticos que fuesen a ser utilizados posteriormente en humanos, o antibióticos que seleccionasen resistencias cruzadas. Así, en 1975 se inició el consumo de avoparcina (glicopéptido) para engorde y de otros antibióticos, como la tilosina (macrólido de 16 átomos) y la virginiamicina (estreptogramina). Lo que no se tuvo en cuenta entonces fue que el consumo de antibióticos estructuralmente relacionados podía seleccionar los mismos mecanismos de resistencia y que antimicrobianos que en aquella época tenían poca relevancia en medicina humana, podrían aplicarse en años posteriores con fines terapéuticos, debido a la aparición de bacterias multirresistentes.

El consumo veterinario de antibióticos en Europa prácticamente llegó a igualar al humano en los años 90 (Cuéllar, 1999). Del total de antibióticos empleados en veterinaria, el 69% se empleó con fines terapéuticos, en tanto que el 31% restante fue utilizado como aditivos para alimentación animal (promotores de crecimiento). De todos ellos, los **macrólidos** fueron los antibióticos más comúnmente empleados como promotores de crecimiento y ocuparon el segundo lugar, después de las

tetraciclinas, en cuanto a antimicrobianos utilizados con fines terapéuticos veterinarios.

En cuanto a los datos referentes al consumo de antibióticos en veterinaria en España, los datos disponibles no resultan demasiado fiables, debido a la extremada dispersión del sistema de distribución de los medicamentos veterinarios. En nuestro país, el consumo de macrólidos en veterinaria supuso, en 1996, un 10% del volumen de ventas de productos farmacológicos en sanidad animal (Díez *et al.*, 1997).

En la actualidad, está demostrado que los animales alimentados con antibióticos pueden servir como reservorios de bacterias resistentes y/o de genes de resistencia que pueden diseminarse entre la población humana, limitando así el valor médico de estos antimicrobianos (Witte, 1998; Aarestrup, 1999; Aarestrup, 2000b). Varios estudios ilustraron la influencia de macrólidos y estreptograminas (tilosina y virginiamicina) como promotores de crecimiento en la prevalencia de la resistencia en cepas de enterococos de origen animal (Linton *et al.*, 1985; Hinton *et al.*, 1986; Kaukas *et al.*, 1987; Kaukas *et al.*, 1988; Thal *et al.*, 1996). A su vez, Hummel *et al.* (1981) aislaron cepas de estafilococos resistentes a macrólidos de cerdos a los que se administraba tilosina con los alimentos y también aislaron esas mismas cepas resistentes de los empleados que trabajaban directamente con esos animales, pero no de sus familiares. Este estudio y otros similares pusieron en evidencia que los antibióticos administrados como aditivos alimentarios en animales, ejercían una presión selectiva no sólo sobre la microbiota de dichos animales, sino también sobre la microbiota de los humanos encargados de criarlos.

A lo largo de estos últimos años hemos asistido a la progresiva revocación de la autorización de determinados antibióticos como promotores de crecimiento. En Finlandia y Noruega se prohibió el uso de virginiamicina en 1990 y 1991, respectivamente. Un estudio llevado a cabo en Finlandia tras la prohibición de dicho antibiótico, mostró una disminución de un 20 a un 2% en los porcentajes de resistencia de cepas de *E. faecium* obtenidas de pollos y cerdos (DVL, 1998). En enero de 1998 se prohibió el uso de virginiamicina en animales en Dinamarca. Durante ese mismo año, las industrias danesas de alimentación animal decidieron voluntariamente, como medida de precaución, detener el uso de agentes antimicrobianos como promotores de crecimiento a finales del año 1999. Asimismo,

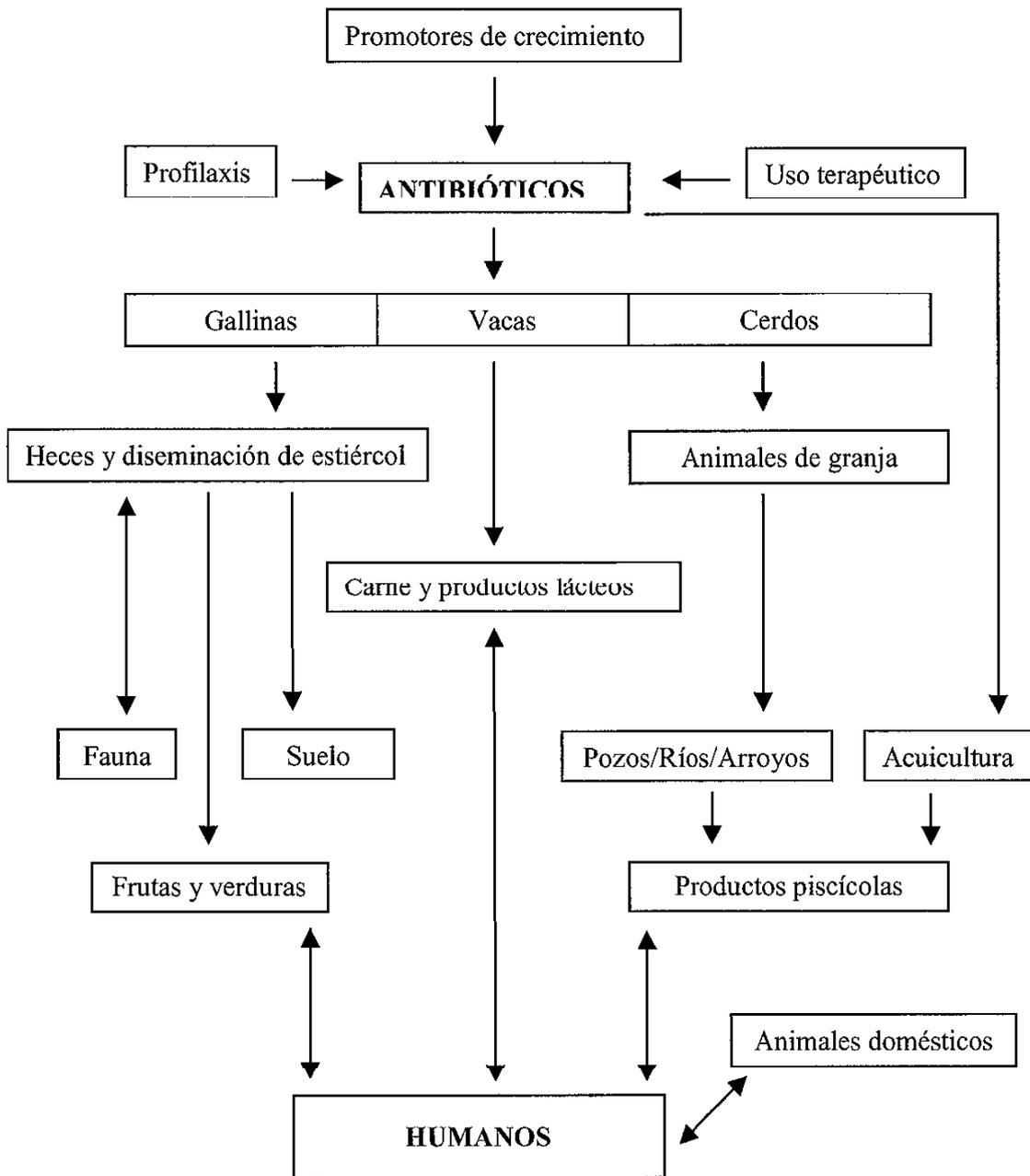
la Unión Europea revocó la autorización de espiramicina, tilosina y virginamicina en julio de 1999, por presentar resistencias cruzadas con otros antibióticos MLS de uso humano.

En un estudio recientemente publicado en Dinamarca (Aarestrup *et al.*, 2001), se mostró que era posible reducir los niveles de resistencia en cepas de enterococos aisladas de animales al eliminar la presión selectiva antibiótica de la cadena de alimentación animal. Sin embargo, también es cierto que, en algunas condiciones, la resistencia puede persistir, probablemente como consecuencia de la coselección (vancomicina-eritromicina), tal y como revelaron estudios recientes llevados a cabo en Dinamarca o en Grecia (Aarestrup, 2000a; Maniatis *et al.*, 2001).

Con todo lo expuesto, se concluye que es fundamental tomar medidas a gran escala respecto a los antimicrobianos empleados en producción animal, a fin de disminuir la incidencia de resistencia a antibióticos, especialmente a aquellos utilizados en medicina humana. Se han sugerido algunas alternativas al uso de antibióticos como promotores de crecimiento en ganadería, entre los que cabe destacar el empleo de microorganismos o enzimas probióticos, ciertos ácidos, minerales y vitaminas u otros fármacos.

En la figura 4 se recogen las repercusiones ecológicas del uso de antibióticos en animales, cualquiera que sea su finalidad.

Figura 4- Impacto ecológico del empleo de antibióticos en animales.



(Alliance for the Prudent Use of Antibiotics, 1999)

## OBJETIVOS



- Estudiar las tasas de resistencia a eritromicina y los fenotipos de resistencia a antibióticos MLS en distintas especies de *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas en La Rioja, así como su evolución a lo largo del tiempo.
- Analizar los mecanismos de resistencia a antibióticos MLS, relacionados con modificación de la diana o sistemas de eflujo de macrólidos, en las cepas de *Streptococcus* y *Enterococcus* del estudio.
- Estudiar la diversidad clonal de las cepas resistentes a antibióticos MLS y su evolución temporal.
- Estudiar el bombeo de eritromicina en cepas de *E. faecium* y caracterizar un nuevo gen, *msrC*, específico de dicha especie y relacionado con las proteínas transportadoras de tipo ABC.



## MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. ESTIRPES BACTERIANAS

**1.1 Aislamientos clínicos:** En este trabajo se han estudiado 1794 cepas de diferentes especies del género *Streptococcus* y *Enterococcus*, aisladas de muestras clínicas (un aislado por paciente) del Hospital San Millán de Logroño (La Rioja), durante el periodo 1996 – 2001. En total, se recogieron 355 cepas de *S. pyogenes*; 531 de *S. agalactiae*; 47 de SGG; 16 de SGC; 767 de *S. pneumoniae*, así como 78 cepas de *Enterococcus* de diferentes especies: 27 *E. faecalis*, 23 *E. faecium*, 8 *Enterococcus durans*, 6 *Enterococcus avium*, 9 *Enterococcus hirae*, 3 *Enterococcus gallinarum* y 2 *Enterococcus casseliflavus*.

**1.2 Identificación de especies microbianas:** La identificación de *S. pyogenes* y otros *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos se realizó por la morfología macroscópica de las colonias, tinción de Gram, catalasa, hemólisis, sensibilidad a bacitracina y test de aglutinación con sueros específicos (bioMérieux). Las cepas de *S. pneumoniae* fueron identificadas según la morfología macroscópica de las colonias en agar Müeller Hinton (MH) sangre, tinción de Gram y sensibilidad a optoquina. Las cepas de *Enterococcus* fueron identificadas por pruebas microbiológicas, bioquímicas y de biología molecular. Se realizó tinción de Gram, actividades catalasa, oxidasa, y bilis-esulina, tolerancia 6,5% al NaCl y presencia del antígeno D de Lancefield. Estas pruebas se completaron con las de fermentación de azúcares recomendadas por Flacklam y Collins (1989) y se utilizó además el sistema bioquímico API 20 STREP (bioMérieux). En casos dudosos se recurrió a su vez al empleo del sistema bioquímico API 32 STREP (bioMérieux). Para corroborar la identificación de las especies *E. faecalis* y *E. faecium* se llevaron a cabo reacciones de amplificación por PCR utilizando cebadores específicos (*ddl E. faecalis* y *ddl E. faecium*) para cada una de las dos especies anteriormente citadas (Dutka-Malen *et al.*, 1995) (Tabla 13). Por otra parte, para la identificación de las especies *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* se realizaron PCRs específicas para los genes *mur-2<sub>eds</sub>*, *mur-2*, *vanC1* y *vanC2/C3*, respectivamente (Chu *et al.*, 1992; Dutka-Malen *et al.*, 1995; Miele *et al.*, 1995; Robredo *et al.*, 1999) (Tabla 13).

**1.3 Cepas de referencia:** A lo largo del estudio se utilizaron las siguientes cepas como controles en los diferentes ensayos:

- ✓ *E. faecalis* JH2-2: receptora en experimentos de conjugación. No posee ningún plásmido y es resistente a rifampicina y ácido fusídico por mutación cromosómica (Jacob *et al.*, 1974).
- ✓ *E. faecalis* ATCC 29212: control en estudios de sensibilidad.
- ✓ *S. aureus* ATCC 24213: control en estudios de sensibilidad.
- ✓ *E. hirae* CECT 302: empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *mur-2<sub>ed</sub>*.
- ✓ *E. casseliflavus* CECT 969: empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *vanC1*.
- ✓ *E. gallinarum* CECT 970: empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *vanC2*.
- ✓ *S. pneumoniae* ATCC 49619: sensible a todos los antibióticos MLS, control en pruebas de sensibilidad.
- ✓ *M. luteus* ATCC 9341: utilizada para bioensayos de inactivación de eritromicina.
- ✓ *E. coli* BM694 (pAT63): empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *ere(A)*; cedida amablemente por la Dra. Joyce A. Sutcliffe.
- ✓ *E. coli* BM694 (pAT72): empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *ere(B)*; cedida amablemente por la Dra. Joyce A. Sutcliffe.
- ✓ *E. coli* L441D: empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *mph(A)*; cedida amablemente por la Dra. Joyce A. Sutcliffe.
- ✓ *E. coli* BM2506: empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *mph(B)*, cedida amablemente por la Dra. Joyce A. Sutcliffe.
- ✓ *S. aureus* 01A1032: empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *mph(C)*; cedida amablemente por la Dra. Joyce A. Sutcliffe.
- ✓ *E. coli* DH5 $\alpha$ : receptor para transformación.
- ✓ *S. pyogenes* 02C1064: empleada como control positivo para la amplificación por PCR del gen *mef(A)*; cedida amablemente por la Dra. Joyce A. Sutcliffe.

- ✓ *E. faecium* SE34: empleada en estudios de acumulación intracelular de eritromicina; cedida amablemente por la Dra. Barbara Murray.
- ✓ *E. faecium* F11 y *E. faecium* F12: cepas mutantes (*Knock out*) de *E. faecium* SE34 en las que el gen *msrC* se ha inactivado; cedidas amablemente por la Dra. Barbara Murray.
- ✓ *S. aureus* RN4220: empleada para electroporación y clonaje del gen *msrC*.

## 2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 2.1 Medios de cultivo

- ✓ Agar Columbia con 5% de sangre de cordero (bioMérieux): utilizado para el crecimiento de estreptococos.

- ✓ Infusión de cerebro y corazón (BHI) (Difco): utilizado para crecimiento de enterococos. Composición por litro:

Cerebro de ternera	200 g
Corazón de vaca	250 g
Bacto proteasa peptona	10 g
Bacto dextrosa	2 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	2,5 g
Medio sólido: agar	15 g

- ✓ Müller Hinton (MH) (Difco): utilizado para la determinación de la sensibilidad a antibióticos. Composición por litro:

Infusión de ternera	300 g
Bacto casaminoácidos	17,5 g
Almidón	1,5 g
Medio sólido: agar	15 g

- ✓ Luria Broth (LB) (Difco): utilizado para el crecimiento de *E. coli*. Composición por litro:

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	5 g
Medio sólido: agar	17 g

- ✓ Caldo de soja tripticada (TSB) (Difco): utilizado en estudios de clonaje.

Composición por litro:

Bacto triptona	17 g
Bacto soja	3 g
Bacto dextrosa	2,5 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Medio sólido: agar (TSA)	15 g

- ✓ S.O.C. (Life Technologies): empleado para la preparación de células competentes. Composición por litro:

Bacto triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	0,58 g
Cloruro potásico	0,19 g

Se ajusta a pH 6.8-7.0 con KOH 1M.

Inmediatamente antes de su utilización, se añade al medio:

Mg SO <sub>4</sub>	10 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
Glucosa	20 mM	Sólo para transformación

**2.2 Condiciones de cultivo:** Todos los medios se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante. Además, se suplementaron con antibióticos cuando el cultivo así lo requería. La esterilización se llevó a cabo en el autoclave durante 20 min a 120°C y 1 atmósfera de sobre-presión. Los cultivos de neumococos en medio sólido se incubaron a 37°C con una atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 18-24 h. Los cultivos en medio líquido se incubaron en agitador orbital.

**2.3 Conservación de cepas:** Las cepas se conservaron en una suspensión bacteriana en leche descremada estéril al 20% (Difco) congeladas a -20°C. Las células competentes se conservaron a -80°C.

### 3. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

**3.1 Método de difusión por disco o antibiograma:** Se realizó e interpretó siguiendo las normas recomendadas por el NCCLS (2000a). Para la preparación del

inóculo, se recogieron una o dos colonias de un cultivo puro de 24 h en agar nutritivo y se realizó una suspensión en un tubo con 3 ml de solución salina (SS) estéril (0,9% NaCl), hasta obtener una turbidez equivalente al 0,5 según la escala McFarland. Posteriormente, se procedió a la inoculación de la placa. Para ello, se introdujo un hisopo estéril de algodón en la suspensión bacteriana, eliminando el exceso por rotación sobre la pared interna del tubo por encima del nivel del fluido. Se inoculó, en su totalidad y homogéneamente, la superficie de una placa de agar MH. Seguidamente, se colocaron los discos de antibiótico comerciales con las cargas de antibiótico recomendadas por el NCCLS (2000a), presionando con suavidad la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37°C y se midieron los halos de inhibición (mm) una vez transcurridas 24 h. Para detectar la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos, se emplearon discos de alta carga, preparados añadiendo a discos estériles (Difco) los antibióticos correspondientes: estreptomicina (1000 µg), gentamicina (500 µg) y kanamicina (500 µg).

**Tabla 7.- Carga de los discos de antibióticos MLS empleados en antibiogramas, casa comercial y halos de inhibición del crecimiento bacteriano en cada caso.**

Antibiótico	Carga (µg)	Casa Comercial	Halos de inhibición (en mm)		
			S	I	R
Eritromicina	15	BioMérieux	≥21	16 - 20	≤15
Azitromicina	15	Becton Dickinson	≥18	14 - 17	≤13
Espiramicina	100	BioMérieux	≥22	16 - 22	<16
Clindamicina	2	BioMérieux	≥19	16 - 18	≤15
Virginiamicina	15	BioMérieux	>19	19	<19
Pristinamicina	15	BioMérieux	>19	19	<19

S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

Test de doble difusión por disco: En todas las cepas resistentes a eritromicina se realizó el test de doble difusión por disco (Seppälä *et al.*, 1993), que consiste en colocar en una placa de agar un disco de eritromicina (15 µg/ml) y un disco de clindamicina (2 µg/ml) a una distancia de 12- 15 mm. Si la resistencia es de tipo MLS<sub>B</sub> inducible, tras 18 h de incubación, se produce un achatamiento del halo de

inhibición de la clindamicina en la zona próxima a la eritromicina; transcurridas 24 h más, la clindamicina aparece como resistente. Si la resistencia es de tipo  $MLS_B$  constitutivo, se observa resistencia a eritromicina y a clindamicina, sin achatamiento de los halos, tras 18 h de incubación de la placa. Por último, el fenotipo M se caracteriza por resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina.

**3.2 Determinación de la CMI:** Se siguieron las recomendaciones del NCCLS (2000b).

**Tabla 8.- Antibióticos en polvo empleados en los estudios de sensibilidad, sus disolventes y distribuidores comerciales.**

ANTIBIÓTICO	DISOLVENTE	DISTRIBUIDOR
Eritromicina	Etanol 95%	Sigma Chemical
Azitromicina	Etanol 95%	Roussel Uclaf
Clindamicina	Agua	Sigma Chemical
Espiramicina	Etanol 95%	Sigma Chemical
Pristinamicina I	Etanol 95%	Rhône-Poulenc Rorer
Gentamicina	Agua	Sigma Chemical
Kanamicina	Agua	Sigma Chemical
Estreptomina	Agua	Sigma Chemical
Ampicilina	Agua	Sigma Chemical
Tetraciclina	Agua	Sigma Chemical
Espectinomicina	Agua	Upjohn
Cloranfenicol	Etanol 95%	Sigma Chemical
Rifampicina	Metanol	Sigma Chemical
Ácido fusídico	Agua	Sigma Chemical

**3.2.1 Método de dilución en agar:** Se prepararon diluciones seriadas 1:2 de cada antibiótico en agua estéril, partiendo de una solución 10x que contenía la máxima concentración de cada antibiótico a emplear en la determinación. Se añadieron a placas de Petri 2 ml de cada una de estas diluciones y 18 ml de agar MH, a una temperatura aproximada de 50°C, y se distribuyó la mezcla girando suavemente las placas en todas direcciones, dejándolas solidificar. Se prepararon dos placas (inicial y final) de agar sin antibiótico como controles. Por otra parte, para la preparación del inóculo, se resuspendió cada microorganismo en estudio en SS

estéril, hasta obtener una turbidez equivalente al 0,5 en la escala McFarland y se preparó una dilución 1:10, consiguiendo así una turbidez de  $10^7$  UFC/ml. Con esta solución se llenaron los pocillos del replicador de Steers. Se inocularon las placas con los diferentes antibióticos con un inóculo equivalente a  $10^4$  UFC/gota, desde las de menor a las de mayor concentración. Se incluyeron además dos placas control sin antibiótico, una al comienzo y otra al final de la replicación. Los microorganismos *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 24213, de susceptibilidad conocida, fueron incluidos como controles. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y se consideró como CMI la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo. Un velo muy débil o una colonia aislada se consideraron despreciables.

**3.2.2. Método de microdilución en caldo:** Se llevó a cabo para la determinación de la CMI de algunas cepas en caldo de cultivo MH, según se describe en el NCCLS (2000b).

**3.2.3 Epsilometría (E-test):** El método del E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) fue utilizado para la determinación cuantitativa de la susceptibilidad a eritromicina, penicilina y cefotaxima en cepas de estreptococos. El disco de antibiótico es sustituido por una tira de plástico que contiene un gradiente de concentración continuo y exponencial (15 valores) del antimicrobiano en una cara y en la otra, una escala de CMIs. Dicha tira se coloca sobre el agar tras sembrar el microorganismo y la CMI se lee directamente en una escala en la intersección de la elipse de inhibición más baja tras 24 h de incubación.

## 4. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

**4.1 Extracción de ADN genómico de estreptococos:** Se empleó la técnica descrita por Caparon y Scott (1991). La lisis bacteriana se consigue incrementando la sensibilidad de los estreptococos a la lisozima, llevando a cabo el crecimiento bacteriano en presencia de glicina, que presumiblemente actúa inhibiendo el grado de entrecruzamiento de la pared celular (Coleman, 1970).

Lavado de las células: A partir de un cultivo puro de 24 h a 37°C en caldo BHI suplementado con glicina 20mM, se recogieron las células por centrifugación (10000xg, 10 min) y se resuspendieron en 1 ml de tampón Tris (Tris/HCl 20mM, pH 8,2). Se centrifugó la suspensión bacteriana (10000xg, 10 min) y se eliminó el sobrenadante.

Lisis de las células: Se resuspendió el precipitado en 320µl de tampón Tris (Tris/HCl 20mM, pH 8,2) y se añadieron 700 µl de polietilenglicol 6000 al 24% esterilizado por filtración. Se mezcló cuidadosamente, se añadieron 350 µl de una solución de lisozima (20 mg/ml) y se dejó actuar 1 h a 37°C. Se centrifugó (10000xg, 10 min), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 570µl de tampón TE (Tris/HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8). Se añadieron 30µl de SDS al 20% y se incubó 15 min a 65°C.

Eliminación de proteínas: Se añadieron 20 µl de una solución de proteinasa K de 10mg/ml y se incubó a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo [fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)] seguidas de una extracción con cloroformo. En cada una de ellas, se agitó, se centrifugó durante 10 min a 8000xg y se recogió la fase acuosa. Con este paso, se desnaturalizaron y eliminaron proteínas.

Precipitación del ADN: Se añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M a la fase acuosa recogida de la extracción con cloroformo y, tras mezclar, se añadieron dos volúmenes de 98% etanol para precipitar el ADN. Se centrifugó a 8000xg durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1ml de 70% etanol. Se agitó y se dejó 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8000xg durante 5 min. El precipitado se secó con aire y se disolvió en tampón TE o en agua.

Eliminación de ARN: Se añadió 1µl de ARNasa y se incubó a 37°C durante 15 min. El ADN se conservó a -20°C.

#### **4.2 Extracción de ADN genómico de enterococos:**

Lavado de células: A partir de un cultivo puro en placa de agar BHI, se inoculó una colonia aislada en 5 ml de caldo BHI y, tras 18-24 h de incubación a 37°C, se recogió 1ml del cultivo en un tubo eppendorf estéril. Se centrifugó a 12000 rpm

durante 5 min para recoger las células, eliminando el sobrenadante y lavando las células de nuevo con 1 ml de agua destilada estéril.

Lisis de las células: Se resuspendieron las células en 200 µl de solución I (glucosa 50mM; EDTA 10mM; Tris/HCl 25mM, pH 8) a los que se añadió lisozima 5mg/ml, agitando con vórtex. Se incubó a 37°C durante una h. Posteriormente, se añadieron 40µl de una solución NaCl 5M y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente para provocar la lisis de los esferoplastos.

Eliminación de proteínas: Para eliminar las proteínas se adicionaron 400 µl de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente hasta mezclar las dos fases, que se separaron de nuevo al centrifugar 5 min a 12000 rpm. Se recogió la fase acuosa en un tubo eppendorf limpio y se repitió el paso anterior hasta que desapareció la interfase de proteínas.

Precipitación del ADN: Se añadieron a la fase acuosa 560 µl de isopropanol y se mezcló invirtiendo el tubo eppendorf varias veces para precipitar el ADN. El precipitado puede aumentar si se deja reposar la mezcla durante 30 min a -20°C. Tras centrifugar 5 minutos a 12000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de 70% etanol para eliminar las sales. Se dejó actuar 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó de nuevo a 12000 rpm durante 5 minutos. El precipitado se secó con aire caliente y se disolvió en tampón TE (Tris/HCl 10mM, pH 8; EDTA 1mM).

Eliminación del ARN: Se añadió 1 µl de ARNasa (disolución de 10mg/ml en Tris/HCl 10mM, pH7.5; NaCl 15mM hervida a 100°C durante 15 minutos) y se incubó a 37°C durante 15 min. El ADN se conservó a -20°C.

**4.3 Extracción de ADN genómico bacteriano amplificable por PCR:** La cantidad de ADN necesaria para llevar a cabo una reacción de PCR es mínima, por lo que para dicha técnica se utilizaron protocolos de extracción rápidos y sin inhibidores de la enzima Taq polimerasa, como el fenol/cloroformo.

**4.3.1 Protocolo InstaGene™ Purification Matrix (Bio-Rad):** Se resuspendieron una o dos colonias de un cultivo puro en placa en 1 ml de agua destilada estéril y se centrifugaron durante un minuto a 12000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 200µl de resina de extracción. Se

incubó a 56°C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, la muestra se agitó unos segundos con el vórtex y, posteriormente, se mantuvo en un baño de agua a 100°C durante 8 min. Se agitó de nuevo con vórtex brevemente y se centrifugó a 12000 rpm durante dos min. Para cada tubo de reacción de PCR se emplearon 10µl de este sobrenadante y el resto se conservó a -20°C.

**4.3.2 Método de extracción con β-mercaptoetanol:** A partir de un cultivo puro en placa de 24 h se recogió un asa de siembra de colonias y se resuspendió en 200µl de tampón de lisis (Tris 50 mM, pH8; β-mercaptoetanol 10mM) en un tubo eppendorf. Se agitó con vórtex y se dejó reposar durante 15 min. Se sometió a 100°C durante 10 min en un baño de agua hirviente. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm durante 6 min. El sobrenadante (ADN genómico) se recogió en un tubo limpio y se utilizaron 20µl para cada amplificación por PCR.

**4.3.3 Método de Ausubel *et al.* (1995):** En algunos casos, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de enterococos, siguiendo el protocolo de miniprep de ADN genómico bacteriano descrito por Ausubel *et al.* (1995), con dos pequeñas modificaciones: Tras resuspender el precipitado en tampón TE, se congeló a -70°C durante 30 min; seguidamente, se calentó a 65°C y se continuó con el método indicado. Por otra parte, se realizaron dos extracciones con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), y una extracción intermedia con fenol. El ADN así obtenido se empleó como molde para su amplificación por PCR, tras diluirlo, al menos, 1:100.

## 5. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

**5.1 Extracción del ADN plasmídico de estreptococos:** En este caso, el protocolo a seguir es el mismo descrito anteriormente para el ADN total de estreptococos hasta llegar a la etapa de ruptura bacteriana. Posteriormente se sigue la técnica de lisis alcalina, empleando las soluciones II y III previamente citadas.

**5.2 Extracción del ADN plasmídico de enterococos:** Para obtener ADN plasmídico se siguieron varias técnicas según el volumen de cultivo, la cantidad de plásmido que se deseaba obtener y el hospedador de dicho plásmido.

**5.2.1 Técnica de lisis alcalina:** consiste en llevar a cabo la lisis bacteriana en medio alcalino y en presencia de SDS, siguiendo la técnica de Ish-Horowicz modificada para enterococos (Sambrook *et al.*, 1989).

Lisis de las células: A partir de un cultivo puro en placa de agar BHI se recogieron las células y se resuspendieron en 500µl de tampón TE, agitando con vórtex. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50mM; EDTA 10mM; Tris/HCl, pH 8mM) con lisozima 5mg/ml, y se incubó a 37°C durante 1 h para conseguir la degradación de la pared celular. (Para extraer plásmidos de *S. aureus*, se incubó a 37°C durante 30 min con lisostafina 25 µg/ml). Se añadieron 400 µl de solución II [NaOH 0,2N; SDS 1% (p/V)] y se mezcló el contenido invirtiendo el tubo eppendorf. Se mantuvo en hielo durante 5 min.

Eliminación del ADN cromosómico: Se añadieron 300 µl de solución III (acetato potásico 3M; ácido acético glacial 2M), se mezcló el contenido invirtiendo el tubo y se colocó en hielo durante 5 min. De esta forma, se neutraliza y precipita el ADN cromosómico. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min.

Eliminación de proteínas: Se recogió el sobrenadante en un tubo eppendorf limpio y se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1 fenol saturado con Tris 10mM y cloroformo/alcohol isoamílico 24:1). Se agitó y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recogió en un tubo limpio sin tocar la interfase y este paso se repitió hasta conseguir la desaparición de la interfase proteica.

Precipitación del ADN plasmídico: Se recogió la fase acuosa y se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C. El contenido se agitó, invirtiéndolo, y se dejó reposar a -20°C durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 5 min a 12000 rpm y se lavó el precipitado con 1 ml de 70% etanol a -20°C para eliminar las sales precipitadas junto al ADN plasmídico. Se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y se secó el sedimento con aire caliente.

Eliminación del ARN: El precipitado se resuspendió en 50µl de tampón TE (Tris/HCl 10mM, pH 8; EDTA 1mM) y se añadió 1 µl de ARNasa, dejándolo actuar a 37°C durante 15 min. El ADN se conservó a 4°C.

**5.2.2 Empleo de kits comerciales:** Asimismo, se utilizaron kits comerciales (Qiagen) para purificación de plásmidos (mini, midi y maxi-preps), siguiendo en cada caso las instrucciones del proveedor.

Determinación espectrofotométrica de la concentración de ADN: Para determinar la concentración de ADN de una muestra, se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 260 y 280nm. A 260nm, una densidad óptica (D.O.) de una unidad arbitraria de absorbancia (u.a.a.) corresponde, aproximadamente, a 50µg/ml de ADN de doble hebra y a 20µg/ml, si el ADN es monocatenario. El valor del cociente de la lectura de absorbancias medidas a 260 y 280nm permite estimar la pureza de los ácidos nucleicos. Si este cociente oscila entre 1,8 y 2, el ADN de la muestra es puro y puede emplearse para su secuenciación, clonaje u otros ensayos (Sambrook *et al.*, 1989).

## 6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50µl, utilizando los componentes que se indican en la tabla 9.

**Tabla 9.- Componentes de una reacción de PCR, concentración y volumen de cada uno de ellos.**

Componentes	Concentración del stock	Cantidad por reacción (V <sub>final</sub> =50 µl)	Concentración final en la reacción
Cebador <i>forward</i>	50 pmol/µl	1µl	50 pmol
Cebador <i>reverse</i> (Pharmacia Biotech)	50 pmol/µl	1µl	50 pmol
BIOTAQ™ ADN polimerasa (Bioline)	5 U/µl	0,3µl	1,5 U
Tampón de reacción NH <sub>4</sub> (Bioline)	(10x)	5µl	(1x)
MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	50mM	3µl	3mM
4 dNTP mix (Promega)	10mM	1µl	0,2mM
ADN molde	0,1µg/µl	10µl	1µg
Agua miliQ estéril (Sigma)	---	Hasta completar 50µl	---

En todos los casos, se incluyó una muestra-control positivo y dos muestras-controles negativos (sin cebadores y sin ADN) para asegurar el buen funcionamiento de esta técnica. En ocasiones se recurrió a optimizar la cantidad de MgCl<sub>2</sub>, modificando su concentración en un rango entre 1-6mM. Las secuencias de los cebadores, las condiciones de amplificación y los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados en cada caso se describen en las tablas 10 – 15.

**Tabla 10.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de genes *erm*.**

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Fragmento (pb) Referencia
<b><i>erm</i> degenerados</b> GAA/GAT <sup>I</sup> *GGIIIIGGIAAA/GGGICA AAC/TTGA/GTTC/TTIGTA/GAA	95°C 3 min 1 ciclo 93°C 30 seg 37°C 2 min 35 ciclos 72°C 90 seg 72°C 5 min 1 ciclo	(530 pb) Arthur <i>et al.</i> , 1993
<b><i>erm</i>(A)</b> TCTAΛΛΛΛGCGATGTAΛΛΛAGAA CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	93°C 3 min 1 ciclo 93°C 1 min 52°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(645 pb) Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996a; 1996b
<b><i>erm</i>(TR)</b> ATAGAAAATTGGGTCAGGAAAAGG TTGATTTTTAGTAAAAAG	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 30 seg 42°C 1 min 35 ciclos 72°C 90 seg 72°C 5 min 1 ciclo	(530 pb) Kataja <i>et al.</i> , 1999
<b><i>erm</i>(B)</b> GAAAAGRTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	93°C 3 min 1 ciclo 93°C 1 min 52°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(639 pb) Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996a; 1996b
<b><i>erm</i>(C)</b> TCAAACATAATATAGATAAA GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	93°C 3 min 1 ciclo 93°C 1 min 52°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(642 pb) Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996a; 1996b

I: desoxiinosina.

**Tabla 11.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de genes de bombas de eflujo de macrólidos.**

Oligonucleótidos (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Fragmento (pb) Referencia
<i>mef(A/E)</i> AGTATCATTAATCACTAGTGC TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	93°C	3 min	1 ciclo	(348 pb)
	93°C	1 min		
	52°C	1 min	35 ciclos	Suteliffe <i>et al.</i> , 1996a
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>mef(A)</i> CTATGACAGCCTCAATGCG ACCGATTCTATCAGCAAAG	95°C	2 min	1 ciclo	(1400 pb)
	94°C	1 min		
	53°C	1 min	35 ciclos	Clancy <i>et al.</i> , 1996
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>mef(E)</i> AAAACCTGCAGGCGTTAAGATAAGCTGGC CCAATGCATCCTGCACCATTGCTCCTAC	95°C	2 min	1 ciclo	(1700 pb)
	94°C	1 min		
	59°C	1 min	35 ciclos	Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 1997
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>msr(A)</i> GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC ATCATGTGATGTAAACAAAAT	95°C	3 min	1 ciclo	(400 pb)
	93°C	30 seg		
	55°C	2 min	35 ciclos	Wondrack <i>et al.</i> , 1996
	72°C	90 seg		
	72°C	5 min	1 ciclo	

**Tabla 12.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de genes de inactivación de macrólidos.**

Oligonucleótidos (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Fragmento (pb) Referencia
<b><i>ere(A)</i></b> AACACCCTGAACCCAAGGGACG CTTCACATCCGGATTCGCTCGA	93°C 3 min 1 ciclo 93°C 1 min 52°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(420 pb) Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996a
<b><i>ere(B)</i></b> AGAAATGGAGGTTTCATACTTACCA CATATAATCATCACCAATGGCA	93°C 3 min 1 ciclo 93°C 1 min 52°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(546 pb) Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996a
<b><i>mph(A)</i></b> AACTGTACGCACTTGC GGTACTCTTCGTTACC	93°C 3 min 1 ciclo 93°C 1 min 52°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(837 pb) Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996a
<b><i>mph(B)</i></b> TTCACAAGTCGCTAGGCAGG AGTTGAAAATAAAGTCATGC	93°C 3 min 1 ciclo 93°C 1 min 52°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(338 pb) Noguchi <i>et al.</i> , 1995
<b><i>mph(C)</i></b> CAAAAGACCTTATTGCTTAC CCAGCTTTACCGTATGCTGT	93°C 3 min 1 ciclo 93°C 1 min 52°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(507 pb) Matsuoka <i>et al.</i> , 1998

**Tabla 13.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para identificación de especies de *Enterococcus* y condiciones de amplificación.**

Oligonucleótidos (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Fragmento (pb) Referencia
<b><i>ddl</i></b> <i>E. faecium</i> TAGAGACATTGAATATGC CTAACATCGTGTAAAGCT	94°C	2 min	1 ciclo	<i>E. faecium</i> * (550 pb)
	94°C	1 min		
	54°C	1 min	30 ciclos	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<b><i>ddl</i></b> <i>E. faecalis</i> ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	94°C	2 min	1 ciclo	<i>E. faecalis</i> * (941 pb)
	94°C	1 min		
	54°C	1 min	30 ciclos	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<b><i>mur-2<sub>ed</sub></i></b> AACAGCTTACTTGACTGGACGC GTATTGGCGCTACTACCCGTATC	94°C	2 min	1 ciclo	<i>E. durans</i> * (176 pb)
	94°C	1 min		
	55°C	2 min	40 ciclos	Robredo <i>et al.</i> , 1999
	72°C	3 min		
<b><i>mur-2</i></b> CGTCAGTACCCTTCTTTTGCAGAGTC GCATTATTACCAGTGTTAGTGGTTG	94°C	2 min	1 ciclo	<i>E. hirae</i> * (521 pb)
	94°C	1 min		
	55°C	2 min	40 ciclos	Chu <i>et al.</i> , 1992
	72°C	3 min		
<b><i>vanC1</i></b> GCTGAAATATGAAGTAATGACCA CGGCATGGTGTGATTTCGTT	94°C	3 min	1 ciclo	<i>E. gallinarum</i> * (811 pb)
	94°C	30 seg		
	58°C	2 min	40 ciclos	Miele <i>et al.</i> , 1995
	72°C	2 min		
	72°C	6 min	1 ciclo	
<b><i>vanC2/C3</i></b> CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	94°C	2 min	1 ciclo	<i>E. casseliflavus</i> * (439 pb)
	94°C	1 min		
	54°C	1 min	30 ciclos	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	

\*Se indica la especie de *Enterococcus* identificada con cada pareja de cebadores.

**Tabla 14.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen *aph(3')*, que confiere resistencia a kanamicina.**

Oligonucleótidos (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Fragmento (pb) Referencia
	Temperatura	Tiempo	Ciclos	
<i>aph(3')</i> GCCGATGTGGATTGCGAAAA GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	94°C 94°C 60°C 72°C 72°C	3 min 30 seg 45 seg 1 min 3 min	1 ciclo  35 ciclos  1 ciclo	(292 pb) Van de Klundert <i>et al.</i> , 1993

**Tabla 15.- Secuencia nucleotídica de otros cebadores utilizados en este estudio y condiciones de amplificación.**

Oligonucleótidos (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Fragmento (pb) Referencia
	Temperatura	Tiempo	Ciclos	
<i>rrs</i> GGATTAGATACCGTGGTAGTCC TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC	94°C 94°C 60°C 72°C 72°C	3 min 30 seg 45 seg 1 min 3 min	1 ciclo  35 ciclos  1 ciclo	(320 pb) Van de Klundert <i>et al.</i> , 1993
<i>mre(A)</i> GGTCTCAGAGCAAAAGCTG TGGAAATATAAACACCGTCTGC	94°C 94°C 51°C 72°C 72°C	3 min 1 min 1 min 1 min 3 min	1 ciclo  35 ciclos  1 ciclo	(330 pb) Clancy <i>et al.</i> , 1997
<i>msrC</i> (gen estructural) TTGTAGGCAATCTGTACCAC ACCAGAAAAGATCACTACG	94°C 48°C 72°C 72°C	1 min 1 min 1 min 10 min	 35 ciclos  1 ciclo	(1566 pb) <b>Este trabajo</b>
<i>msrC</i> (gen completo; incluye promotor y región reguladora) ACCAGAAAAGATCACTACG TTGTAGGCAATCTGTACCAC	94°C 94°C 51°C 68°C	30 seg 30 seg 30 seg 2 min	1 ciclo  35 ciclos	(1916 pb) <b>Este trabajo</b>

## 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para la visualización del ADN total o plasmídico y de los fragmentos de amplificación de PCR, se utilizó la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa, preparado con agarosa (Pronadisa) a una concentración en el rango 0,8-1,2% en tampón TBE [54g/l Tris(hidroximetil)aminometano; 27,5g/l ácido bórico; 20ml EDTA 0,5M, pH8] y bromuro de etidio (Bio-Rad), a una concentración final de 0,5 µg/ml. Cada muestra se preparó mezclando 10µl de ADN con 2 µl de tampón de carga [sacarosa 40% (p/V); azul de bromofenol 0,25% (p/V); xilene cianol 0,25% (p/V)]. Una vez cargadas las muestras en el gel, éste se sumergió completamente en tampón TBE en la cubeta de electroforesis. El ADN migró a 80-100 voltios desde el polo negativo al positivo durante el tiempo necesario para la separación adecuada de los fragmentos de interés. Cuando el frente de la carrera alcanzó el 75-100% de la longitud del gel, éste se visualizó en un transiluminador ultravioleta (U.V.) ULTRA-LUM a 340 nm, y se fotografió con un sistema captador de imágenes Sony-UVP.

## 8. HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ADN

**8.1 Preparación de la membrana para *dot blotting*:** Se utilizó una membrana de nitrocelulosa (Screen Plus Paper, New England Nuclear). Las muestras (producto de PCR) se incubaron en baño de agua a 95°C durante 5 min, con objeto de desnaturalizar el ADN, y se mantuvieron posteriormente en hielo, colocando en la membrana 5µl de cada una de ellas. Se dejó secar la membrana a temperatura ambiente, se envolvió en papel transparente y se colocó 5 min en el transiluminador U.V. para la fijación del ADN. Esta técnica puede emplearse también con extracciones de ADN genómico o plasmídico digerido con enzimas de restricción.

**8.2 Transferencia por presión positiva: preparación de la membrana para *southern blotting*:** Una vez realizada la electroforesis en un gel de agarosa, y habiendo comprobado que los fragmentos de ADN obtenidos presentaban los tamaños esperados, se fotografió el gel, colocando una regla graduada para medir las distancias desde cada banda a su pocillo correspondiente. Los resultados óptimos al transferir ADN desde un gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa se obtienen

empleando agarosa de concentración menor al 1% y con geles de espesor menor a 0,5 cm.

Pretratamiento del gel.

- i.* Depuración. El gel de agarosa se sumergió en una solución de HCl 0,25N durante 15 min con agitación suave. Transcurrido este tiempo, el azul de bromofenol viró a color verdoso y se lavó el gel con agua destilada.
- ii.* Desnaturalización. Se añadió la solución de desnaturalización (NaOH 0,5N; NaCl 1,5M), que se mantuvo durante 15 min con agitación suave. Se repitió de nuevo este paso y se lavó el gel con agua destilada.
- iii.* Neutralización. Se adicionó la solución de neutralización (Tris/HCl 1M, pH 7,5; NaCl 1,5M) durante 15 min con agitación suave. Este paso se repitió una segunda vez.

Preparación de la membrana. Se cortó la membrana de nitrocelulosa (Screen Plus Paper, New England Nuclear) y dos piezas de papel Whatman® 3MM de tamaño superior al del filtro en 1 ó 2 cm por cada lado. Se humedeció la membrana en agua destilada y, posteriormente, se sumergió en el tampón de transferencia estéril SSC 20x, pH 7 (citrato de sodio 0,3 M, pH 7; NaCl 3M) durante 5 min.

Montaje. Para la transferencia mediante presión positiva se empleó el sistema PosiBlot® 30-30 (Stratagene) y, evitando la formación de burbujas de aire, se colocaron los siguientes elementos en orden ascendente: soporte base, plataforma de soporte de la membrana, pieza de papel Whatman 3MM humedecida en agua destilada, membrana, pieza de plástico cuadriculada con la ventana en posición central y el gel de agarosa. Se señalaron los pocillos, haciendo una pequeña marca con un alfiler y se colocó sobre él la segunda pieza de papel Whatman 3 MM humedecido en agua destilada. En la parte superior se situó una esponja embebida en el tampón de transferencia (SSC 20x). Se cerró el sistema y se ajustó la presión a 70mm Hg. Se realizó la transferencia durante 30 min. Posteriormente, se secó la membrana, eliminando el exceso de tampón absorbido y se colocó, envuelta en papel transparente, en un transiluminador U.V. durante 5 min para la fijación del ADN. Hasta el momento de su utilización, la membrana se guardó a 4°C.

### 8.3 Hibridación con digoxigenina (*dot blotting* o *southern blotting*):

Obtención y marcaje de la sonda: La sonda se obtuvo en cada caso a partir de un producto de PCR del tamaño adecuado purificado utilizando el kit “*QIAquick PCR purification kit*” (Qiagen). Posteriormente, se determinó su D.O. a 260 nm. Se desnaturalizó hirviendo 10 min a 100°C en baño de agua y enfriando en hielo rápidamente. Se mantuvo en hielo y se diluyó hasta una concentración de 1-3µg de ADN en un volumen final de 19µl, añadiendo 2µl de una mezcla de hexanucleótidos, 2µl de dNTPs, 1µl de enzima Klenow y completando con agua miliQ estéril. Se centrifugó durante un min y se incubó a 37°C al menos 1 h. Se añadieron 2µl de EDTA 0,2 M, pH 8; 2,5µl de LiCl 4M y 75µl de etanol frío. Se mezcló bien y se mantuvo a -20°C durante, al menos, 2 h. Se centrifugó durante 15 min y se lavó el precipitado con 50µl de 70% etanol frío. Se centrifugó 5 min más y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se secó brevemente bajo vacío y se disolvió en 50µl de tampón TE.

Hibridación: Se precalentó el tampón de hibridación (*Dig Easy Hib*) (20ml para cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana) a la temperatura de hibridación (60°C) y se incubó la membrana 30 min con agitación suave. Se desnaturalizó la sonda marcada (50µl; 5-25ng/µl), hirviéndola 5 min y dejándola enfriar rápidamente en hielo. Se añadió la sonda desnaturalizada a 2,5ml de tampón de hibridación y se mezcló sin formar burbujas. Se eliminó la solución de prehibridación y se adicionó la mezcla (tampón de hibridación con la sonda) a la membrana. Se incubó a 60°C en un horno de hibridación al menos 6 h, con agitación suave.

Lavados post-hibridación: Se realizaron dos lavados de 5 min a temperatura ambiente con 100ml de SSC 2x; SDS 0,1% en el horno de hibridación, y otros dos lavados de 15 min a 68°C con SSC 0,1x; SDS 0,1% en constante agitación en el horno de hibridación.

Detección inmunológica: Se sacó la membrana del horno de hibridación y se lavó entre 1-5 min con 150ml de solución de lavado [solución tampón de ácido maleico (ácido maleico 0,1M; NaCl 0,15M, pH 7,5) + 3% Tween 20 (V/V)]. Se incubó 30 min en 100ml de la solución bloqueante (1% reactivo bloqueante en solución tampón de ácido maleico) y otros 30 min en la solución del anticuerpo preparada en el momento (2µl del conjugado *anti-Dig-AP* en 20ml de la solución bloqueante). Se

lavó dos veces de 15 min cada una con 100 ml de la solución de lavado. Se equilibró entre 2-5 min con 10ml de la solución de detección (Tris/HCl 0,1M; NaCl 0,1M; MgCl<sub>2</sub> 50mM, pH 9,5 a 20°C). A continuación, se incubó la membrana en una solución de color (200µl de solución stock *NBT/BCIP* + 10ml de solución de detección), preparada en el momento, y se mantuvo en la oscuridad durante al menos 18 h. La reacción se detuvo añadiendo 50 ml de tampón TE.

La sonda marcada disuelta en el tampón de hibridación puede conservarse a -20°C tras su utilización y volver a emplearse en sucesivas hibridaciones, desnaturalizándola previamente a 68°C. Asimismo, la membrana puede reutilizarse para posteriores hibridaciones con sondas diferentes. Si presenta marcas de color, es necesario someterla a un lavado con dimetilformamida caliente, hasta que desaparezca el color azul, y aclararla posteriormente con agua destilada. Si no presenta marcas de color, es suficiente realizar dos lavados de 20 min cada uno a 37°C con NaOH 0,2M; SDS 0,1% (para eliminar los restos de sonda marcada) y aclararla con SSC 2x.

#### **8.4 Hibridación radioactiva (*southern blotting*):**

Marcaje de la sonda: Las sondas empleadas en estos análisis se prepararon por PCR, según se ha descrito anteriormente. En la mezcla de reacción se emplearon 100 ng de ADN molde y se sustituyó el dATP por 0,32mM ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dATP (50 µCi). Los productos de PCR se purificaron empleando columnas cromatográficas Micro Bio-Spin (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. La radioactividad de las sondas se cuantificó en un contador de centelleo líquido Wallac 1410.

Hibridación: Se siguió el método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se incubó la membrana en la solución de prehibridación [SSC 6x; solución de Denhardt 5x: seroalbúmina bovina 2% (p/V); ficoll 2% (p/V); polivinilpirrolidona 2% (p/V); SDS 0,5%; ADN de esperma de salmón 100µg/ml]; durante 1 h a 55°C. A continuación se añadió la sonda de ADN radioactiva desnaturalizada a una concentración final de 106 cpm/ml y se incubó durante toda la noche a 55°C. Posteriormente, para eliminar la unión inespecífica de la sonda se realizaron tres lavados de 15 min a 55°C con la solución de lavado A (SSC 2x, SDS 0,1%) y otros tres en las mismas condiciones con la solución de lavado B (SSC 0,1x, SDS 0,5%). Para visualizar la hibridación, las

membranas se pusieron en contacto con una película radiográfica el tiempo necesario.

**8.5 Hibridación tras lisis de colonias:** Esta técnica se empleó para seleccionar colonias transformantes. Se sembraron, en forma de aspa, 50 colonias ordenadas en una placa de agar LB suplementado con el antibiótico de selección adecuado en cada caso. A partir de producto de PCR purificado (Qiagen) se preparó sonda marcada. El ADN se desnaturalizó a 95°C durante 10 min. Inmediatamente, se colocó en hielo y se añadieron en un tubo: 5µl de ADN, 11µl de agua y 4µl de *Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Enzo). La sonda se incubó a 37°C toda la noche. Por otro lado, se dejaron crecer las bacterias en placa durante 18 h. Se guardaron las placas a 4°C durante 1 h y, posteriormente, se colocaron discos de membranas de nailon sobre las colonias crecidas (5 min). Se quitaron las réplicas y se llevó a cabo la lisis celular, incubando las membranas circulares (con las colonias en la parte superior) durante 15 min a temperatura ambiente sobre papel Whatman 3MM humedecido con solución desnaturalizante (NaOH 0,5N; NaCl 1,5N). Posteriormente, se incubaron las membranas 15 min a temperatura ambiente sobre papel Whatman 3MM humedecido con la solución de neutralización (Tris/HCl 1M, pH 8; NaCl 1,5M). El ADN se fijó a la membrana con luz U.V. (2-3 min). Tras eliminar los restos de crecimiento celular de la superficie de las membranas, éstas se incubaron a 60°C 1 h con la solución de prehibridación [SSC 5x; 0,1% N-lauroylsarcosine; 0,02% SDS; 1% reactivo bloqueante para hibridación de ácidos nucleicos (p/V)]. Se renovó la solución de prehibridación y se incubaron las membranas a la misma temperatura durante 2 h más (20ml de tampón/100cm<sup>2</sup> de membrana). Se desnaturalizó la sonda, calentándola a 95°C durante 10 min, y se diluyó 1:5. Se añadieron 100µl de sonda en 50ml de solución de hibridación (de igual composición a la de la solución de prehibridación) y se incubaron en ella las membranas a 60°C durante toda la noche. Éstas se lavaron durante 5 min a temperatura ambiente (dos veces) con solución de lavado 2x (SSC 2x; 0,1% SDS) y, a continuación, durante 15 minutos a 60°C (dos veces) con solución de lavado 0,5x (SSC 0,5x; 0,1% SDS). Para la detección, se equilibraron las membranas 1 min en *Dig Wash and Block Buffer Set*. Se incubaron durante 1 h en agitación con la

solución bloqueante (25 ml Dig#3; 25ml de ácido maleico; 200ml de agua) y, posteriormente, durante 30 min con la solución del anticuerpo (solución bloqueante con el conjugado *anti-Dig-AP* y fragmentos *Fab*). Se lavaron durante 15 min (dos veces) con la solución de lavado y se añadió la solución de detección durante 5 min, seguida del sustrato quimioluminiscente (*Lumi-Phos 530*). Las membranas se protegieron con papel transparente y en oscuridad, se colocó sobre ellas una película autorradiográfica. Se mantuvieron durante 30 min a 37°C en una tablilla autorradiográfica, con el ADN orientado hacia la parte inferior. Después de todos estos pasos, se reveló la autorradiografía.

## 9. ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)

Preparación de los insertos: A partir de un cultivo puro de 24 h en placa de agar Columbia con 5% de sangre de cordero (bioMérieux), se realizó una suspensión en 3ml de SS estéril, hasta una turbidez de 1 en la escala McFarland. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 50µl de tampón de almacenamiento (Tris/HCl 10mM, pH 8; EDTA 10mM, pH 8) y la muestra se mantuvo a 52°C en baño de agua. A esa misma temperatura, en el baño de agua, se añadió a cada muestra 50µl de agarosa de alta pureza (Bio-Rad) disuelta al 1% en tampón de almacenamiento (0,1g de agarosa en 10ml de tampón de almacenamiento). La mezcla se resuspendió suavemente con la micropipeta y se rellenaron los moldes adecuados. Los insertos se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se guardaron a 4°C en tubos estériles con 10ml de tampón de almacenamiento. En estas condiciones, las células inmovilizadas en agarosa pueden conservarse durante una semana.

Lisis de la pared bacteriana: Los insertos se incubaron a 37°C durante al menos 2 h en 3ml de solución de lisis EC (Tris 6mM, pH8; NaCl 1M; EDTA 100mM, pH 8; 0,5% Brij58; 0,5% sarcosil; 0,2% ácido deoxicólico), esterilizada por filtración, y a la que se añadió en el momento lisozima 4mg/ml.

Ruptura de la membrana celular: Se eliminó la solución de lisis EC y se añadieron 3ml de solución ESP (EDTA 0,5M, pH 9-9,5; 1% sarcosil; 1mg/ml proteinasa K), incubando a 56°C durante toda la noche.

Lavados de los insertos: Para su utilización inmediata, se decantó la solución ESP y se realizaron los siguientes lavados:

-Tris 10mM pH8; EDTA 50 mM pH 8, a 56°C durante 15 min.

-Tris 10mM pH8; EDTA 50 mM pH 8, a temperatura ambiente durante 30 min con agitación (dos veces).

-Tris 10 mM pH 8 a temperatura ambiente, 30 min con agitación (dos veces).

Los insertos pueden guardarse tras los lavados en Tris 10mM, pH 8 a 4°C durante días. De esta manera, quedan preparados para la digestión con la enzima de restricción adecuada.

Digestión enzimática: Después de los lavados, el inserto (cortado en una pieza del tamaño del pocillo) se colocó en un tubo eppendorf y se sumergió durante 30 min a temperatura ambiente en 100µl del tampón de enzima de restricción adecuado.

Para las muestras de *S. pyogenes* se añadieron 5U de la enzima *SfiI* (BioLabs) en 100µl de su tampón a cada inserto y se dejó incubar a 50°C durante toda la noche. Se eligió esta enzima de restricción (y no *SmaI*) porque en cepas de *S. pyogenes* con fenotipo M, la presencia de un determinante *tet* puede estar asociada con la restricción por *SmaI* (Cocuzza *et al.*, 1997; Valisena *et al.*, 1999; Ripa *et al.*, 2001).

Los insertos de *S. agalactiae*, SGC y SGG fueron digeridos con la enzima de restricción *SmaI* (Farmacia). Para ello, se eliminó el tampón de la enzima y se añadió a cada inserto 10U de *SmaI* en 100µl de tampón fresco, incubándolo a 30°C durante 2 h; posteriormente, se añadieron otras 10U de *SmaI* en 100 µl de su tampón, dejando actuar la enzima a 30°C durante 24 h más.

Para eliminar los restos de enzima, los insertos se lavaron con 1 ml de TBE 0,5x y se incubaron a 52°C durante 8 min. Como marcador de peso molecular, se emplearon insertos de *Lambda ladder* (Bio-Rad).

Preparación del gel de agarosa: Se preparó un gel de agarosa D-5 (Pronadisa) al 1% (p/V) disuelta en TBE 0,5x (1g de agarosa en 100ml de TBE 0,5x). Se dejó solidificar y se introdujeron los insertos en los pocillos, que se sellaron con agarosa a 50°C, evitando dejar burbujas de aire.

Electroforesis de campos pulsados: Se añadieron, aproximadamente, 2l de TBE 0,5x en la cubeta de electroforesis de campos pulsados CHEF-DR II (Bio-Rad) y, cuando el tampón alcanzó la temperatura de 14°C, se sumergió el gel. Se emplearon

pulsos de 5 a 45 seg, a 5V/cm durante 22 h. La bomba de velocidad se fijó a 70 (0,75 L/min). Al comienzo de la electroforesis es importante comprobar que la intensidad oscila entre los valores adecuados para las condiciones programadas; en caso contrario, será necesario cambiar la solución de TBE.

Tinción del gel: El gel se tiñó en una solución acuosa de bromuro de etidio [5µl de bromuro de etidio (10mg/ml) en 100ml de agua destilada] durante 10 min y se fotografió en presencia de luz U.V. (Image Store 5000, UVP). En ocasiones, los resultados pueden mejorar tras mantener el gel en agua destilada con suave agitación durante 3 h, aproximadamente, eliminando así el exceso de bromuro de etidio.

**Análisis de los patrones de PFGE:** Los patrones de PFGE fueron analizados y comparados siguiendo las líneas directrices de Tenover *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Los fragmentos de ADN fueron comparados uno a uno para identificar patrones de los diversos perfiles obtenidos. Si entre dos patrones se apreciaban diferencias en una o dos bandas, éstos se consideraban estrechamente relacionados. Entre patrones relacionados, el que generaba mayor número de subclases se consideraba un tipo (designado con una letra mayúscula), y cada patrón relacionado, un subtipo (designado con la misma letra seguida de un número).

## 10. CONJUGACIÓN

Se realizó la transferencia por conjugación en filtro de los determinantes genéticos que codifican la resistencia a un antibiótico. A partir de una colonia aislada de cada cepa, se cultivaron las cepas donadoras [*S. agalactiae* con el gen *mef(A)*] y la receptora (*E. faecium* JH2-2) en 25ml de caldo BHI con el antibiótico de selección a 37°C durante 18-24 h. La cepa receptora es sensible a todos los antibióticos del grupo MLS y posee marcadores de resistencia cromosómica a rifampicina y ácido fusídico, a los cuales son sensibles las cepas donadoras. Al cultivo de la cepa donadora se le añadió antibiótico de selección (eritromicina) en concentración muy baja para evitar la pérdida de posibles plásmidos. Se mezclaron 200µl del cultivo de la cepa receptora con 20µl de la donadora en un tubo con 4ml de SS estéril. La mezcla se pasó a través de un filtro Millipore de 0,45µm, que se colocó en la superficie de una placa de agar BHI y se incubó a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se resuspendió el crecimiento

sobre el filtro en 1ml de caldo BHI, agitando con vórtex. Se sembraron 100µl de esta suspensión en placas con el antibiótico de selección adecuado, que llevaban a su vez rifampicina (50 µg/ml) y ácido fusídico (100 µg/ml). Las colonias de enterococos que crecieron tras 24-48 h de incubación, se analizaron mediante antibiograma y CMI. En los transconjugantes resistentes a eritromicina, rifampicina y ácido fuscídico se estudió la presencia del gen *mef(A)* mediante PCR, siguiendo el protocolo previamente descrito.

Para calcular la frecuencia de conjugación, se prepararon diluciones seriadas 1:10 de la suspensión, y se sembraron 100µl de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  en placas de agar BHI con el antibiótico en estudio, rifampicina (50 µg/ml) y ácido fusídico (100 µg/ml).

$$\text{Frecuencia de conjugación} = (\text{N}^\circ \text{ transconjugantes/ml}) / (\text{N}^\circ \text{ células receptoras/ml}).$$

## 11. VECTORES DE CLONAJE

11.1 **Vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy:** El vector utilizado para el clonaje de productos de PCR fue pGEM-T Easy (Promega), cuyo mapa se representa en la figura 5.

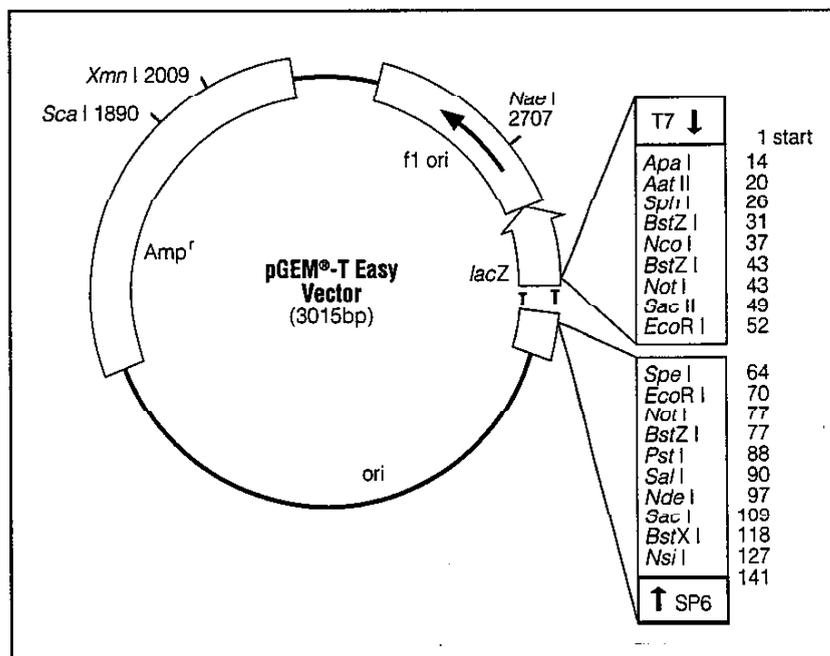
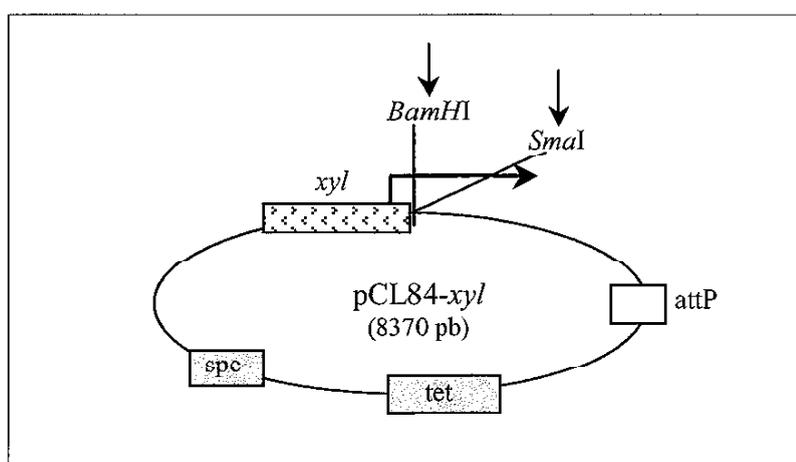


Figura 5.- Mapa del vector pGEM-T Easy.

Este vector se comercializa con una timidina (T) terminal en cada extremo 3' de las dos hebras originadas tras digestión con la enzima *EcoRV*. Las 3'-T monocatenarias que sobresalen en el sitio de inserción, aumentan la eficacia de ligación de los productos de PCR en el plásmido, ya que impiden la recircularización del vector y además proporcionan un extremo compatible con los productos de PCR generados por algunas polimerasas termoestables. Asimismo, pGEM-T Easy posee dos sitios de reconocimiento (*EcoRI* y *NotI*) que flanquean el sitio de inserción, por lo que, cualquier inserto clonado en este vector puede extraerse mediante digestión con una única enzima de restricción.

**11.2 Vector pCL84-*xyl*:** Vector de integración en *S. aureus*, que posee un promotor inducible por xilosa, capaz de regular la expresión de un gen clonado en este vector –en nuestro caso, del gen *msrC*. Presenta un marcador de selección para espectinomicina (*spc*) (50 µg/ml), y otro para tetraciclina (*tet*). Fue diseñado, y cedido amablemente, por el grupo *Microcide Pharmaceuticals* (California), a partir del vector pCL84 (Lee *et al.*, 1991).



**Figura 6.-** Mapa del vector pCL84-*xyl*.

**11.3 Vector pAM401:** Vector shuttle de *E. coli* y *E. faecalis* con marcadores de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y *tet* (Wirth *et al.*, 1986). Fue cedido amablemente por el Dr. Eric Baima, de los laboratorios de *Pfizer Global Research and Development* (Connecticut).

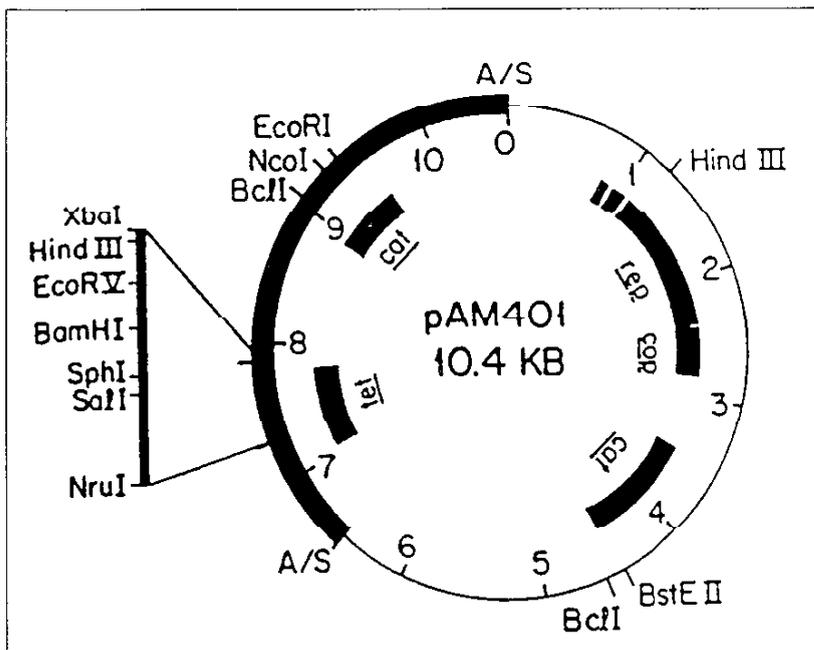


Figura 7.- Mapa del vector pAM401.

**11.4 Vector pMP278:** Vector *shuttle* de *E. coli* y *S. aureus* con marcadores de resistencia a tet y ampicilina (amp), y con un origen de replicación sensible a la temperatura. Fue cedido amablemente por el Dr. Jerry Buysse de *Microcide Pharmaceuticals* (California).

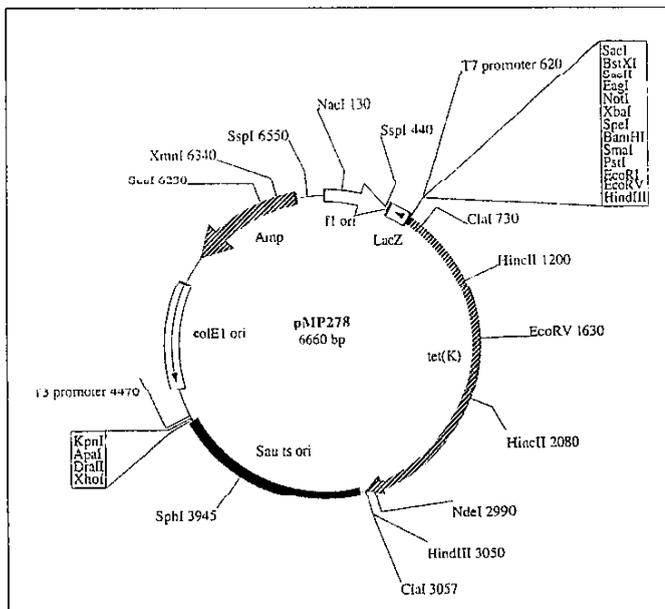


Figura 8.- Mapa del vector pMP278.

## 12. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

**12.1 Digestión e inactivación enzimática:** El vector se digirió con 8-10U de enzima (*Bam*HI, *Sma*I, ó *Eco*RI, según los casos) (Gibco BRL, Life Technologies) por cada  $\mu\text{g}$  de ADN, de modo que el volumen de la enzima no fuera mayor al 10% del volumen total. Se incubó a la temperatura recomendada por el fabricante (37 ó 30°C) y posteriormente, la enzima se inactivó con calor (a 80°C durante 20 min).

**12.2 Formación de extremos romos:** En ocasiones, con el fin de hacer romo un extremo de ADN 5'-protuberante para facilitar el clonaje, se procedió a rellenar los extremos con el fragmento Klenow (Gibco BRL, Life Technologies) de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Para ello, por cada  $\mu\text{g}$  de ADN se añadieron en hielo 4 $\mu\text{l}$  de dNTPs (0,5mM), 1 $\mu\text{l}$  de Klenow (0,5U/ $\mu\text{l}$ ) y 3 $\mu\text{l}$  del tampón de la enzima (10x) en un volumen final de 30 $\mu\text{l}$ , y se incubó en hielo durante 30 min. Para la inactivación se realizó extracción fenólica, se precipitó con 70% etanol y posteriormente, se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de tampón TE.

**12.3 Defosforilación:** Los vectores pAM401 y pMP278 ( $\cong$ 0,5 pmoles de ADN) se trataron durante 30 min a 37°C con 0,5U de fosfatasa alcalina (1U/ $\mu\text{l}$ ) (*shrimp alkaline phosphatase*, USB) en un volumen de 10 $\mu\text{l}$ . Así, se eliminaron los grupos fosfato en el extremo 5' del ADN, reduciendo las posibilidades de recircularización del vector. Posteriormente, la enzima se inactivó calentando a 65°C durante 15 min en tampón Tris, pH 8 - 8,5 y la mezcla se colocó en hielo para la transformación.

## 13. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

**13.1 Método del cloruro de rubidio para *E. coli* DH5 $\alpha$ :** Se inocularon una o dos colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  en 5ml de caldo S.O.C., cuya composición se ha descrito previamente. Cuando el cultivo alcanzó una D.O.<sub>550nm</sub>  $\cong$  0,5, se inoculó en 100ml de medio S.O.C., de manera que la D.O.<sub>550</sub> inicial fuese 0,015. Se incubó aproximadamente 3 h con agitación, hasta alcanzar una D.O.<sub>550</sub> de 0,48. En ese momento, se transfirió el cultivo a hielo. Se centrifugó a 4°C durante 5 min a 4K, retirando el sobrenadante en cámara fría. El precipitado se resuspendió suavemente

en 30ml de tampón TfbI (pH 5,8) esterilizado por filtración (RbCl 100mM; MnCl<sub>2</sub> 50mM; acetato potásico 30mM; CaCl<sub>2</sub> 10mM; 15% glicerol). Se centrifugó de nuevo a 4°C durante 5 min a 4K y se retiró el sobrenadante en cámara fría. Se resuspendió el precipitado en 4ml de tampón TfbII esterilizado por filtración (MOPs 10mM, pH 7; RbCl 10mM; CaCl<sub>2</sub> 75mM; 15% glicerol). Se prepararon alícuotas de 200µl y se congelaron a -80°C. Para realizar la transformación de células competentes en ese mismo día, se deberán congelar y descongelar posteriormente.

**13.2 Método del glicerol frío para *S. aureus* RN4220:** Se inocularon 500ml de caldo TSB con 0,5ml de un cultivo de células de *S. aureus* RN4220 crecidas a 37°C en caldo TSB durante toda la noche, hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub>=0,6. En ese momento, se colocó el cultivo en hielo y se dejó enfriar. Tras centrifugar, el precipitado de células se resuspendió en 10ml de agua fría. Este paso se repitió de 3 a 5 veces con 30ml de agua. Después de los lavados con agua, las células se resuspendieron en 10ml de 10% glicerol frío. Se centrifugó de nuevo, resuspendiendo finalmente el precipitado en 1ml de 10% glicerol frío. Se prepararon alícuotas de 50µl de células competentes que se conservaron a -80°C.

## 14. LIGACIÓN

Las reacciones de ligación se prepararon en hielo en un volumen final de 10µl, añadiendo 3U de la enzima T4 ADN ligasa (Promega) por cada 50 ng de vector. Tras varias pruebas, se optimizó la proporción inserto:vector en 3:1, teniendo en cuenta la molaridad de ambos, así como el tamaño del inserto (1,6 Kb, aproximadamente) frente al del vector (3 Kb, en el caso de pGEM-T EAsy). La mezcla se incubó a 12-14°C durante toda la noche e inmediatamente antes de la transformación, se calentó a 70°C durante 15 min.

## 15. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

**15.1 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5α mediante choque térmico:** Para la transformación de células competentes de *E. coli* DH5α, se dejaron descongelar en hielo. Tras mezclar con suavidad, se prepararon en hielo alícuotas de 50µl de células competentes en tubos de polipropileno previamente

enfriados. Se diluyeron a la mitad las reacciones de ligación con tampón TE (pH 8), hasta un volumen final de 20µl, y se añadió 1µl a cada alícuota de células competentes. La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min y, posteriormente, se sometió a un choque de calor a 42°C durante 45 seg en baño de agua. Sin agitar, se colocó de nuevo en hielo durante 2 min. En ese momento, se añadió 1ml de medio S.O.C. a temperatura ambiente, agitando a 225 rpm (37°C) durante 1 h. El contenido se añadió a placas de agar LB con el antibiótico de selección y se incubó a 37°C (ó a 30°C al emplear el vector pMP278) durante 24-48 h.

**15.2 Transformación de células competentes de *S. aureus* RN4220 mediante electroporación:** Los plásmidos aislados de células de *E. coli* se introdujeron en la cepa de *S. aureus* RN4220 mediante electroporación. Para ello, se colocó en hielo una alícuota de células competentes de *S. aureus* y se añadió el ADN plasmídico (>10µg en 1-3µl). La mezcla fría se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,1cm previamente enfriada y se mantuvo en hielo. Las condiciones del electroporador (Bio-Rad Gene Pulser) fueron las siguientes: 1,5kV, 25 µFD y 100 ohm. Los pulsos obtenidos deben ser de 2 miliseg, aproximadamente. Tras el pulso, se añadió inmediatamente 1ml de medio S.O.C., resuspendiendo con la micropipeta, y se pasó el contenido a un tubo eppendorf estéril. Se incubó a 30°C durante 1 h para lograr la expresión de la resistencia al antibiótico y se añadieron 100µl sobre la superficie de placas de TSA con antibiótico (tetraciclina 12µg/ml), que se incubaron 24-48 h a 30°C.

## 16. SELECCIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMANTES

El clonaje de los insertos en el vector pGEM-T Easy interrumpe la secuencia codificadora de la β-galactosidasa y los clones recombinantes pueden reconocerse mediante un cambio de color tras sembrar 100µl de la suspensión en placas indicadoras de agar LB suplementadas con ampicilina (100µg/ml), IPTG (0,5mM) y X-Gal (80µg/ml). Las colonias transformantes presentaron color blanco y las que no contenían el producto de PCR mostraron color azul.

En el caso del vector pAM401, las colonias transformantes de *E. coli* se seleccionaron en placas de agar LB suplementadas con cloranfenicol (25µg/ml) a 37°C, y en agar LB con ampicilina (50µg/ml) a 30°C cuando se utilizó pMP278 como vector de clonaje.

Las colonias transformantes de *S. aureus* con el vector pMP278 se seleccionaron en placas de TSA con tetraciclina (12 µg/ml) que se incubaron a 30°C durante 36 h.

## 17. ENSAYOS DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE ERITROMICINA

Los experimentos de acumulación intracelular de eritromicina se realizaron a partir de cultivos crecidos en fase exponencial, según el método de Wondrack *et al.* (1996). Se inocularon 200ml de caldo BHI (con 0,02µg/ml de eritromicina para las cepas resistentes o intermedias) a partir de un cultivo de células crecidas a 37°C durante toda la noche hasta alcanzar una D.O.<sub>660</sub> de 0,05. Cuando se alcanzó una D.O.<sub>660</sub>=0,35, el cultivo se dividió en dos partes iguales. Como desacoplante del gradiente de protones de la membrana, se añadió a una de ellas carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP) a una concentración 25µM, y a la otra, la misma cantidad de etanol. Se incubó durante 10 min más con suave agitación y, transcurrido ese tiempo, se añadieron a ambos cultivos (con y sin CCCP) 0,2µg de [<sup>14</sup>C]eritromicina. Se tomaron muestras de 3ml a determinados tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 min) y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, previamente humedecidos en SS con 1µg/ml de eritromicina. Los filtros se lavaron tres veces con la mezcla fría NaCl-eritromicina y se dejaron secar en lámpara de calor durante 1 h. La radiactividad retenida en los filtros se cuantificó en un contador de centelleo, añadiendo a cada filtro 3ml de líquido de centelleo. Los valores de acumulación de eritromicina se normalizaron, teniendo en cuenta la D.O.<sub>660</sub> del cultivo en cada muestra.

## 18. BIOENSAYOS DE INACTIVACIÓN DE ERITROMICINA

Se llevaron a cabo bioensayos para detectar si en las células tenía lugar algún mecanismo de inactivación de eritromicina, según el método descrito por Gots

(1945). Para ello, se incubó el cultivo a 37°C con agitación en caldo BHI con 40µg/ml de eritromicina durante 48 h. Tras centrifugar, se depositaron 25µl de sobrenadante sobre discos estériles en placas de agar MH en las que previamente se había sembrado en césped la cepa de *M. luteus* ATCC 9341, sensible a eritromicina. Las placas se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se midieron los halos alrededor de los discos, que indican la cantidad de antibiótico que queda en el medio de cultivo tras incubar con las células. Los halos se compararon con los obtenidos tras incubar el antibiótico solo o con una cepa sensible a eritromicina y sin mecanismos de inactivación frente a dicho antibiótico.



## RESULTADOS



## *Streptococcus pyogenes* EN LA RIOJA

### 1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

Se han aislado 355 cepas clínicas consecutivas de *S. pyogenes* en el Hospital San Millán de Logroño, desde enero de 1996 hasta abril de 2001. El origen de las muestras y las edades de los pacientes se recogen en las tablas 16 y 17.

**Tabla 16.- Origen de las muestras a partir de las cuales se aislaron las cepas de *S. pyogenes* en el periodo 1996 - 2001 en La Rioja.**

ORIGEN DE LAS MUESTRAS	<i>S. pyogenes</i> (n=355)	<i>S. pyogenes</i> Er <sup>S-I</sup> (n=271)	<i>S. pyogenes</i> Er <sup>R</sup> (n=84)
Tracto respiratorio superior:			
- Nasofaríngeo	149	114	35
- Ótico	44	30	14
- Esputo	9	5	4
- Traqueal	2	1	1
- Lingual	1	0	1
Vaginal	73	65	8
Heridas y úlceras	35	25	10
Sangre	9	8	1
Orina	8	5	3
Uretral	8	5	3
Rectal	7	7	0
Ocular	3	2	1
Pleural	1	1	0
Desconocido	6	3	3

Las cepas de *S. pyogenes* se aislaron en su mayoría de muestras pertenecientes al tracto respiratorio superior (58,7%), de exudados vaginales (20,9%) y de heridas y úlceras (10%).

**Tabla 17.- Edades de los pacientes a partir de los cuales se aislaron las cepas de *S. pyogenes* del estudio.**

<b>EDAD DE LOS PACIENTES (años)</b>	<b><i>S. pyogenes</i> (n=355)</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Er<sup>S-I</sup> (n=271)</b>	<b><i>S. pyogenes</i> Er<sup>R</sup> (n=84)</b>
<b>0 - 10</b>	207	157	50
<b>11 - 20</b>	17	16	1
<b>21 - 30</b>	14	10	4
<b>31 - 40</b>	35	28	7
<b>41 - 50</b>	11	10	1
<b>51- 60</b>	7	6	1
<b>61- 70</b>	12	5	7
<b>≥ 71</b>	11	9	2
<b>Desconocida</b>	41	30	11

Es de destacar el dato de que el 66% de las cepas de *S. pyogenes* de origen conocido fueron aisladas de niños menores de 10 años (Tabla 17).

## **2. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ERITROMICINA Y OTROS ANTIBIÓTICOS MLS**

### **2.1 Resistencia a eritromicina**

Se determinó la CMI a eritromicina mediante E-test en todas las cepas de *S. pyogenes* de la colección. En la Tabla 18 se presentan los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> obtenidos. El 23,7% de las cepas de *S. pyogenes* fueron resistentes a eritromicina. Si se tiene en cuenta el origen de las muestras, se detectó un 28,6% de resistencia a este macrólido en cepas aisladas de heridas y úlceras, un 26,8% en cepas procedentes del tracto respiratorio superior y un 11% en cepas de origen vaginal (Tabla 16). Analizando la resistencia a dicho antibiótico según la edad de los pacientes, los datos indican que el 58,3% de las cepas aisladas de individuos entre 61 y 70 años eran resistentes, al igual que un 24,1% de las cepas aisladas de niños menores de 11 años (Tabla 17).

El rango de CMI y la CMI<sub>50/90</sub> para eritromicina fue 0,008->256 µg/ml y 0,125/24 µg/ml, respectivamente (Tabla 18). Siete cepas, aisladas entre 1996 y 1998,

presentaron un fenotipo de resistencia intermedio para la eritromicina (CMI: 0,38-0,75 µg/ml).

**Tabla 18. Sensibilidad de 355 cepas clínicas de *S. pyogenes* a eritromicina, penicilina y cefotaxima (expresada en µg/ml) mediante E-test.**

Antibióticos	<i>S. pyogenes</i> (n=355)	<i>S. pyogenes</i> Er <sup>R</sup> (n=84)	<i>S. pyogenes</i> Er <sup>S-I</sup> (n=271)
<b>Eritromicina</b>			
Rango	0,008 - >256	2 - >256	0,008 - 0,75
CMI <sub>50</sub>	0,125	16	0,094
CMI <sub>90</sub>	24	>256	0,190
% R (CMI≥1)	23,7%	100%	0
% I (CMI: 0,38-0,75)	2,0%	0	2,6%
<b>Penicilina</b>			
Rango	≤0,002 - 0,023	0,004 - 0,023	≤0,002 - 0,023
CMI <sub>50</sub>	0,008	0,008	0,008
CMI <sub>90</sub>	0,012	0,008	0,012
% R-I (CMI≥0,25)	0	0	0
<b>Cefotaxima</b>			
Rango	≤0,002 - 0,094	0,006 - 0,023	≤0,002 - 0,094
CMI <sub>50</sub>	0,012	0,012	0,012
CMI <sub>90</sub>	0,016	0,016	0,016
% R-I (CMI≥1)	0	0	0

Asimismo, se determinó la CMI a penicilina y cefotaxima en las 355 cepas de *S. pyogenes* de la serie en estudio. Todas ellas permanecieron sensibles a penicilina y cefotaxima, y los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> para estos dos antibióticos fueron idénticos en las cepas sensibles y resistentes a eritromicina (Tabla 18).

## 2.2 Evolución de la resistencia a eritromicina

La distribución de cepas recogidas cada año y los porcentajes de resistencia a eritromicina se muestran en la tabla 19. Desde el comienzo de la recogida de muestras hasta nuestros días, ha tenido lugar una progresiva disminución de los niveles de resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* (desde un 35,1% de cepas resistentes en 1996, hasta un 20% en 2001). Curiosamente, durante el año 1999 dicha disminución fue muy brusca (8,6% de cepas resistentes), sin que se hayan podido determinar las causas.

**Tabla 19.- Número de cepas de *S. pyogenes* recogidas desde 1996 hasta el año 2001 y porcentaje de cepas resistentes a eritromicina.**

Año	Nº total cepas aisladas	Nº de cepas Er <sup>R</sup> (%)	Nº de cepas Er <sup>I</sup> (%)
1996	57	20 (35,1%)	2 (3,5%)
1997	69	18 (26,1%)	3 (4,3%)
1998	94	23 (24,5%)	2 (2,1%)
1999	58	5 (8,6%)	0
2000	62	15 (24,2%)	0
2001 (enero-abril)	15	3 (20%)	0
<b>1996-2001</b>	<b>355</b>	<b>84 (23,7%)</b>	<b>7 (2%)</b>

## 2.3 Fenotipos de resistencia a antibióticos MLS

Se determinó la sensibilidad de las 355 cepas de *S. pyogenes* a diferentes antibióticos del grupo MLS (eritromicina, clindamicina, espiramicina y virginiamicina) mediante antibiograma. Asimismo, en las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> se estudió el carácter constitutivo o inducible de la resistencia mediante el test de doble difusión con disco. Los resultados se muestran a continuación:

- ✓ 264 cepas fueron sensibles a eritromicina y al resto de los antibióticos del grupo MLS (fenotipo sensible).
- ✓ 7 presentaron resistencia intermedia a eritromicina y fueron sensibles a los antibióticos del grupo MLS.

- ✓ 84 fueron resistentes a eritromicina. De ellas, 67 cepas presentaron el fenotipo M de resistencia (79,8%). Las 17 cepas restantes mostraron un fenotipo de resistencia  $MLS_B$ , 13 de ellas (15,5%) de carácter constitutivo y 4 de carácter inducible (4,7%).

La distribución anual de estos tres fenotipos de resistencia se muestra en la tabla 20 y en la figura 9.

**Tabla 20.- Fenotipos de resistencia MLS en las 84 cepas de *S. pyogenes* Er<sup>R</sup> del estudio (1996 – 2001).**

Año aislamiento cepas	Nº cepas	Fenotipo
1996	19	M
	1	$MLS_B$ i
1997	16	M
	1	$MLS_B$ c
	1	$MLS_B$ i
1998	15	M
	7	$MLS_B$ c
	1	$MLS_B$ i
1999	4	M
	1	$MLS_B$ c
2000	11 (1†)	M
	3	$MLS_B$ c
	1	$MLS_B$ i
2001 (enero – abril)	2	M
	1	$MLS_B$ c

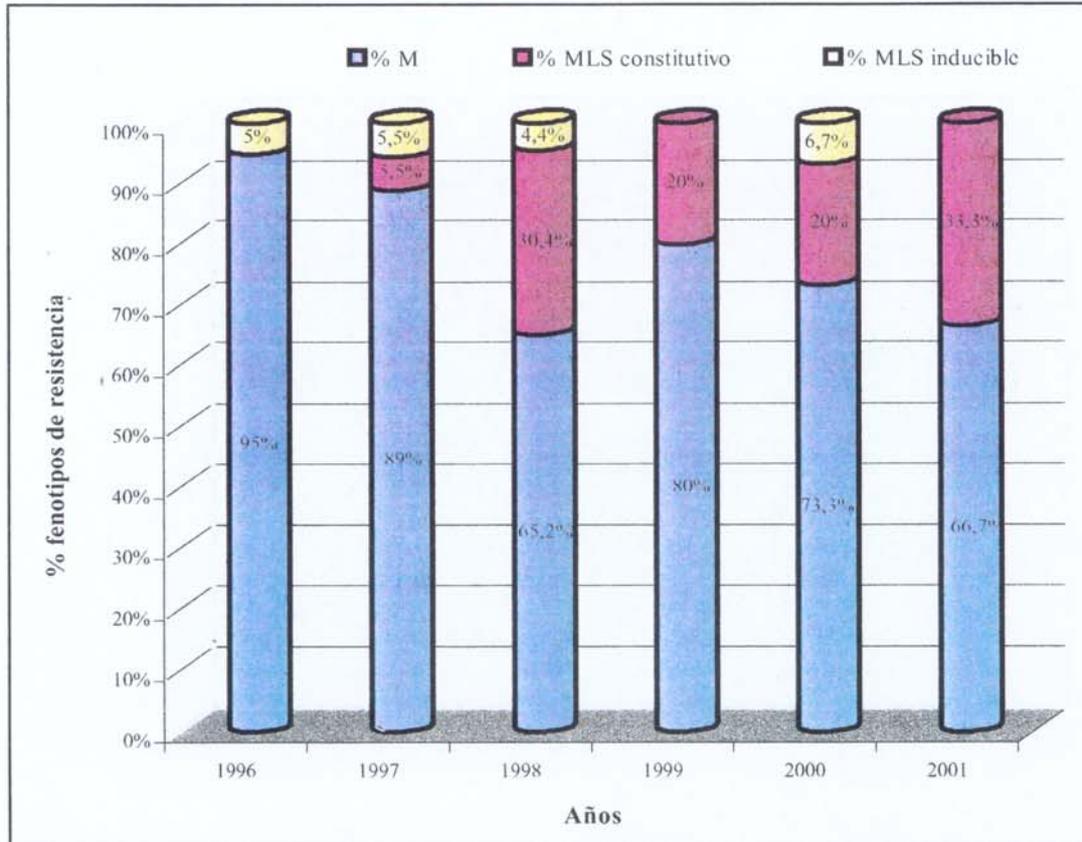


Figura 9.- Distribución anual (en %) de los distintos fenotipos de resistencia a antibióticos MLS en cepas de *S. pyogenes* aisladas entre 1996 y 2001.

En la figura 10 se muestra una cepa de *S. pyogenes* de nuestra colección con fenotipo M de resistencia.

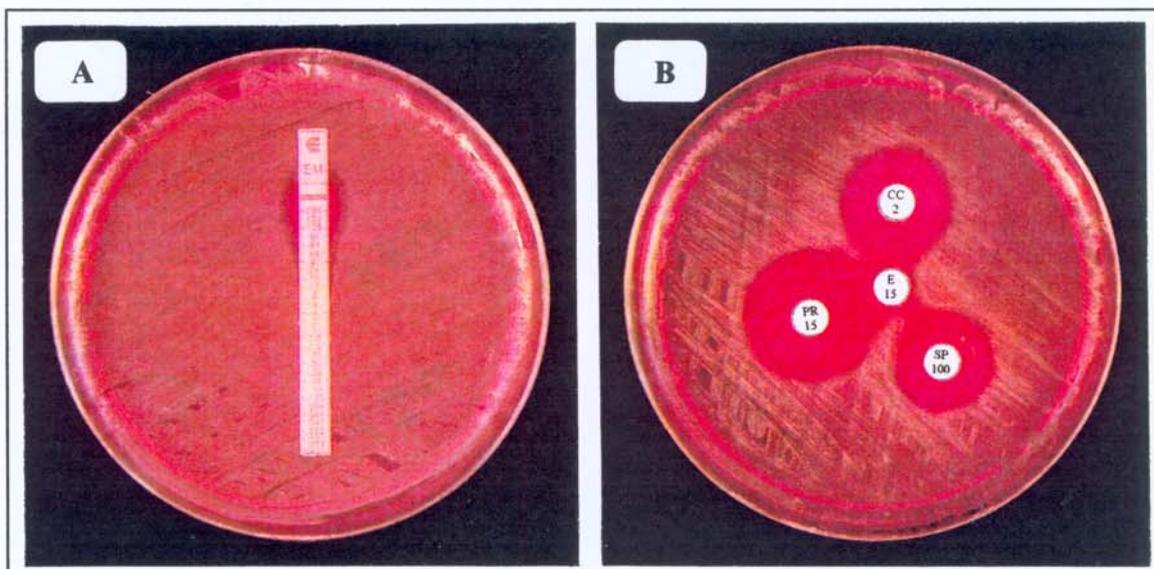


Figura 10.- Cepa *S. pyogenes* S1 con fenotipo M de resistencia. A) E-test; B) test de doble difusión con disco.

En la figura 11 se representa la distribución de CMI a eritromicina en función del fenotipo de resistencia a antibióticos MLS de las cepas estudiadas.

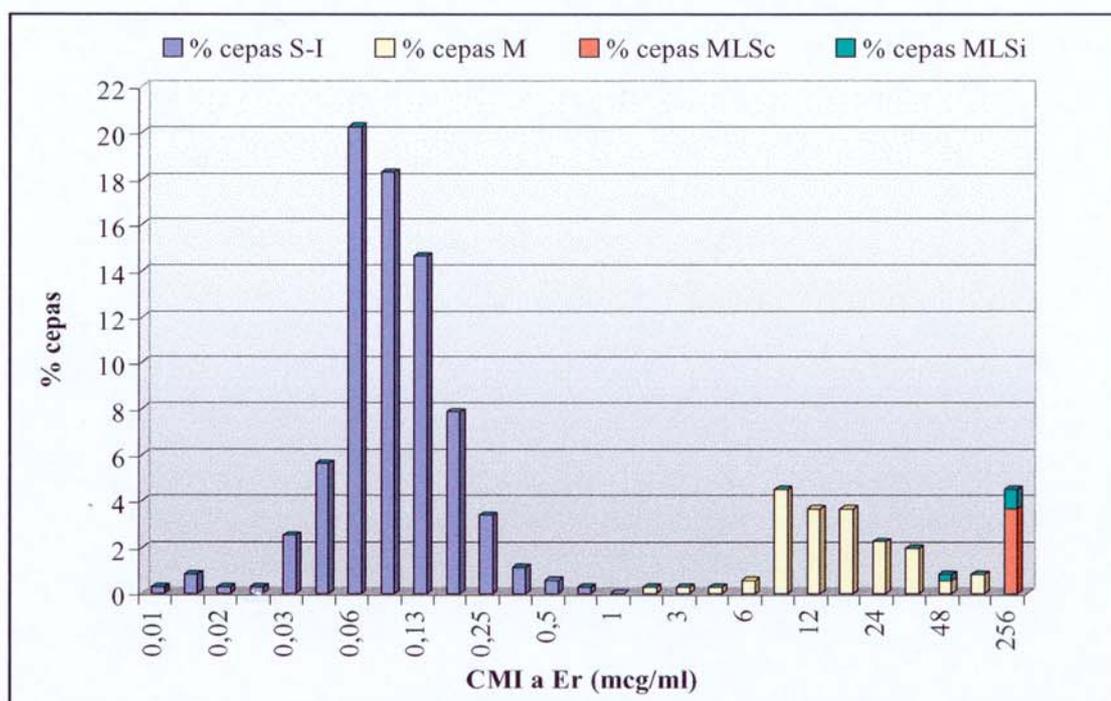


Figura 11.- Distribución de CMI a eritromicina (Er) de las 355 cepas de *S. pyogenes* según su fenotipo MLS de resistencia.

Con objeto de detectar la posible resistencia de *S. pyogenes* a otros antimicrobianos como los aminoglucósidos, se eligieron al azar 29 cepas de entre todas las resistentes a eritromicina (27 con fenotipo M y 2 con fenotipo MLS<sub>B</sub>) y se determinó la CMI a una serie de aminoglucósidos. Dos de las 29 cepas analizadas presentaron resistencia de alto nivel a kanamicina (CMI: >2000 µg/ml) y a estreptomina (CMI: 4000 µg/ml) y, posteriormente, en ambas se evidenció por PCR la presencia del gen *aph(3')*-III. Estas dos cepas mostraron un fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (CMI a eritromicina >64 µg/ml). En el resto de las cepas analizadas (todas ellas con fenotipo M) no se detectó resistencia de alto nivel a aminoglucósidos y sus rangos de CMI a eritromicina y clindamicina fueron 2 – 16 y ≤0,125 µg/ml, respectivamente.

### 3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MLS

Se estudiaron los mecanismos de resistencia a antibióticos MLS en 154 cepas clínicas de *S. pyogenes*, aisladas consecutivamente en dos periodos: enero 1996-enero 1998 (n = 40 Er<sup>R</sup> + 97 Er<sup>S</sup>) y enero 2000-abril 2001 (n = 17 Er<sup>R</sup>), a fin de analizar los posibles cambios en la prevalencia de genes de resistencia responsables de los fenotipos encontrados. Los resultados se encuentran detallados en la tabla 21. La detección de genes *erm* se llevó a cabo mediante PCR con los cebadores sintetizados según la secuencia común para los genes *erm* (Tabla 10). Asimismo, se emplearon cebadores específicos que amplifican los determinantes de resistencia *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* y *erm(TR)* (Tabla 10).

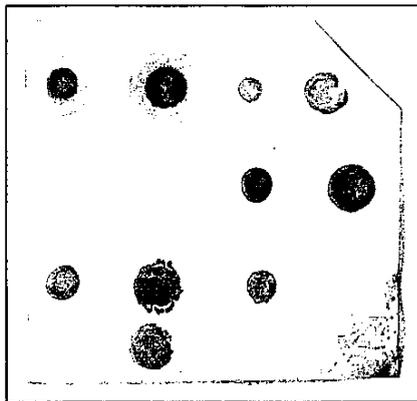
Se detectó, mediante PCR, la presencia de genes *erm* en seis cepas con fenotipo MLS<sub>Bc</sub> (CMI a eritromicina: >256 µg/ml) y en tres cepas con fenotipo MLS<sub>Bi</sub> (CMI a eritromicina: 48 y >256 µg/ml). Los genes detectados en estas cepas fueron *erm(B)* y/o *erm(TR)* (Tabla 21). Cabe destacar la presencia de tres cepas (una de carácter constitutivo y dos de carácter inducible) que presentaron simultáneamente dos determinantes *erm* de resistencia: *erm(B)* y *erm(TR)*. Curiosamente, en dos cepas con fenotipo MLS<sub>Bc</sub> no se encontró ninguno de los genes de resistencia *erm* estudiados (Tabla 21). La amplificación de genes *erm* fue negativa, tanto para las cepas con fenotipo M (n=48) como para las cepas sensibles a eritromicina estudiadas (n=97) (Tabla 21).

En las dos cepas de la colección, *S. pyogenes* S118 y *S. pyogenes* S124, con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo, en las que no se encontró ninguna metilasa de tipo Erm mediante PCR con los cebadores *erm* degenerados, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* y *erm(TR)*, se realizó una hibridación por *dot blotting* con digoxigenina. Como sondas se emplearon los fragmentos de amplificación purificados correspondientes a *erm(B)* y a *erm(TR)*, de 639 y 530 pb, respectivamente. Se incluyeron controles positivos y negativos adecuados. La hibridación resultó negativa en ambos casos, lo que nos lleva a pensar en la existencia de un nuevo mecanismo de resistencia, aún no descrito, presente en estas cepas (Figura 12).

Tabla 21. Sensibilidad a eritromicina (Er) y mecanismos de resistencia detectados en 154 aislados clínicos de *S. pyogenes*.

Fenotipo de resistencia a eritromicina	N° de cepas	CMI a Er (µg/ml)	Amplificación por PCR												
			<i>erm</i> degenerados	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (TR)	<i>mef</i> (A/E)	<i>mef</i> (A)	<i>mef</i> (A)	<i>mef</i> (A)				
M	48	3 - 64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLS <sub>BC</sub>	2	>256	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	>256	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	>256	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	>256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	>256	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MLS <sub>Bi</sub>	2	>256	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	48	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sensible	97	≤0,003 - 0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

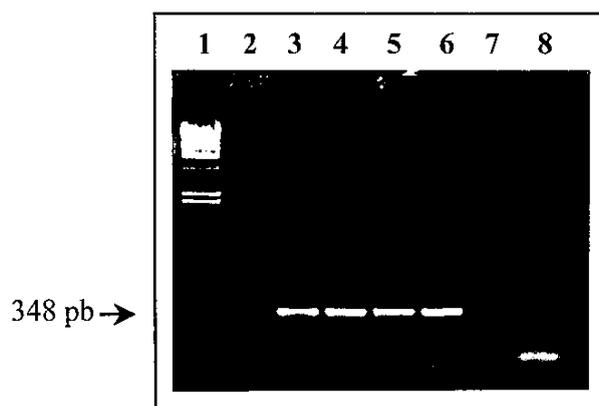
MLS<sub>Bc</sub>: fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo; MLS<sub>Bi</sub>: fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible.



**Figura 12.-** Hibridación por *dot blotting* usando una sonda *erm*(TR) marcada con digoxigenina. De izda. a dcha. y de arriba a abajo: 1: SGG S211 (control positivo); 2-4: *S. pyogenes* SPY1, SPY2 y SPY4; 5 y 6: *S. pyogenes* S118 y S124; 7 y 8: *S. pyogenes* S3 y S112; 9: *S. agalactiae* S393; 10: *S. pneumoniae* S64; 11: SGG S207; 12 y 13: *S. pyogenes* S1 y S8 (fenotipo M); 14: SGC S215; 15: *S. pyogenes* SPY18 [con *erm*(B)].

Para el estudio de los mecanismos de resistencia mediados por eflujo activo de eritromicina se utilizaron los cebadores *mef*(A/E), *mef*(A) y *msr*(A). Las condiciones de PCR y las secuencias de los cebadores se describen en la tabla 11. Los cebadores *mef*(A/E) amplifican indistintamente el gen *mef*(E) o el gen *mef*(A). En la actualidad ambos genes se denominan *mef*(A) (Roberts *et al.*, 1999).

Se analizaron por PCR 48 cepas con fenotipo M y todas ellas se caracterizaron por la presencia del gen *mef*(A), al resultar positiva la amplificación con los cebadores *mef*(A/E) (Figura 13) y *mef*(A). Los genes *mef*(A/E) y *mef*(A) no se detectaron en las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> ni en las cepas sensibles a eritromicina. En ningún caso se detectó la presencia del gen *msr*(A) en *S. pyogenes* (Tabla 21).



**Figura 13.-** Amplificación por PCR con los cebadores *mef*(A/E). Carriles: 1:  $\lambda$ /HindIII; 2: *S. pyogenes* Er<sup>S</sup>; 3: control positivo; 4: *S. pyogenes* S1; 5: *S. agalactiae* S385; 6: *S. pneumoniae* S100; 7: *S. pyogenes* S112 (fenotipo MLS<sub>B</sub>) y 8: control negativo, sin ADN.

El gen *mef*(A) es el responsable del eflujo activo de la eritromicina en cepas de *S. pyogenes* que presentan fenotipo M. Los genes *erm*(B) y *erm*(TR) codifican la resistencia a antibióticos MLS en *S. pyogenes* con fenotipo MLS<sub>B</sub> mediante un mecanismo de modificación de la diana mediado por una metilasa. Se cree que algún

gen o genes desconocidos hasta ahora pueden estar implicados en la resistencia a eritromicina en las dos cepas de *S. pyogenes* con fenotipo MLS<sub>B</sub> que no amplifican por PCR ninguno de los genes estudiados.

En la figura 14 se representa la distribución de 57 cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina en función de su CMI a este antibiótico y de los genes de resistencia detectados mediante PCR. Es de destacar que el 70,8% de las cepas que presentan el gen *mef(A)* tienen una CMI a eritromicina entre 8 - 16 µg/ml.

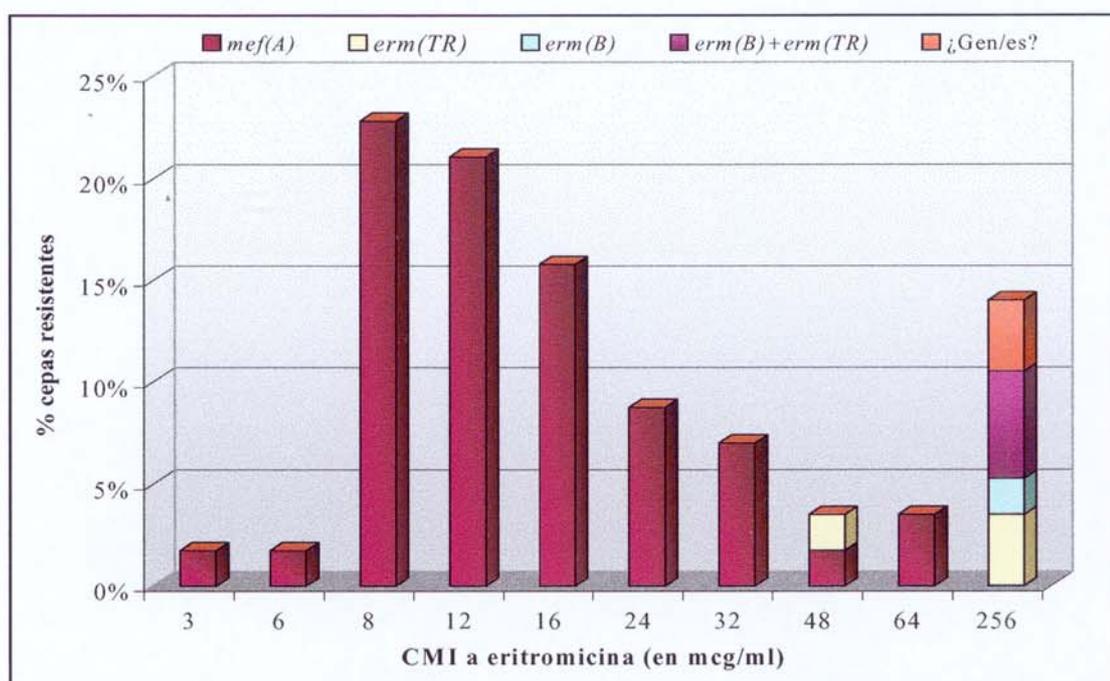


Figura 14.- Distribución de CMI (µg/ml) de 57 cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina y genes detectados mediante PCR.

#### 4. CARACTERIZACIÓN CLONAL DE LAS CEPAS DE *S. pyogenes* RESISTENTES A ERITROMICINA

Todos los aislados de *S. pyogenes* Er<sup>R</sup> recogidos entre enero de 2000 y abril de 2001 (n=17), se sometieron a la técnica de PFGE con el fin de determinar su posible relación clonal. Doce de los 17 aislados Er<sup>R</sup> (70,6%) presentaron el fenotipo M. Todos ellos pudieron tiparse mediante PFGE tras digestión del ADN genómico con la enzima *Sfi*I y dieron lugar a cuatro patrones diferentes (A, B, C y D) y uno

estrechamente relacionado (A, A1) (Tabla 22 y figura 15). Los cinco aislados con fenotipo  $MLS_B$  revelaron dos patrones de restricción diferentes con *Sfi*I. De éstos, los cuatro aislados con fenotipo constitutivo presentaron un patrón de restricción idéntico, lo que sugiere que provienen de la diseminación de un único clon resistente (F). Todos ellos provenían de muestras de distinto origen y de pacientes de edades diferentes (66, 33, 27 y 2 años, respectivamente) sin parentesco. En el aislado con fenotipo inducible, perteneciente a un exudado faríngeo de un niño de 8 años, se obtuvo un patrón de restricción distinto (H) (Tabla 22 y figura 15).

**Tabla 22.- Patrones de restricción de 30 aislados de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina (1996-98 y 2000-01).**

Patrones de PFGE	Fenotipo de resistencia	Nº de aislados (n=30)	Año de aislamiento
A	M	2	2000
		1	2001
A1	M	1	2001
B	M	1	1996
		8	1997
		4	2000
C	M	2	2000
D	M	2	2000
E	M	1	1998
F	$MLS_{BC}$	3	2000
		1	2001
G	$MLS_{BC}$	1	1997
		1	1998
H	$MLS_{Bi}$	1	2000
I	$MLS_{Bi}$	1	1997

Del mismo modo, de entre los 40 aislados de la serie de *S. pyogenes*  $Er^R$  recogidos entre enero de 1996 y 1998 e identificados por PCR, se seleccionaron 13 al azar como representantes de los tres fenotipos de resistencia (10 con fenotipo M, 2 con fenotipo  $MLS_{BC}$  y 1 con fenotipo  $MLS_{Bi}$ ) y se sometieron a esta técnica, empleando la misma enzima de restricción (*Sfi*I) y bajo las mismas condiciones. El objetivo fue comparar los clones existentes en los años 2000-2001 con los que confirmaron resistencia en el periodo 1996-1998. Curiosamente, 9 de los 10 aislados pertenecían

al mismo clon, que a su vez coincidía con el patrón B, encontrado en aislados de *S. pyogenes* recogidos durante el año 2000 (Tabla 22). El aislado restante mostró un patrón diferente (E), no encontrado durante 2000-2001. Los dos aislados con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo presentaron un patrón idéntico entre sí (G), pero distinto a los identificados en el periodo 2000-2001 (Tabla 22). Este clon presentó un mecanismo de resistencia no detectado por PCR con los cebadores descritos previamente (Tabla 21). El aislado con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible presentó también un patrón (I) diferente a los detectados desde enero de 2000 (Tabla 22).

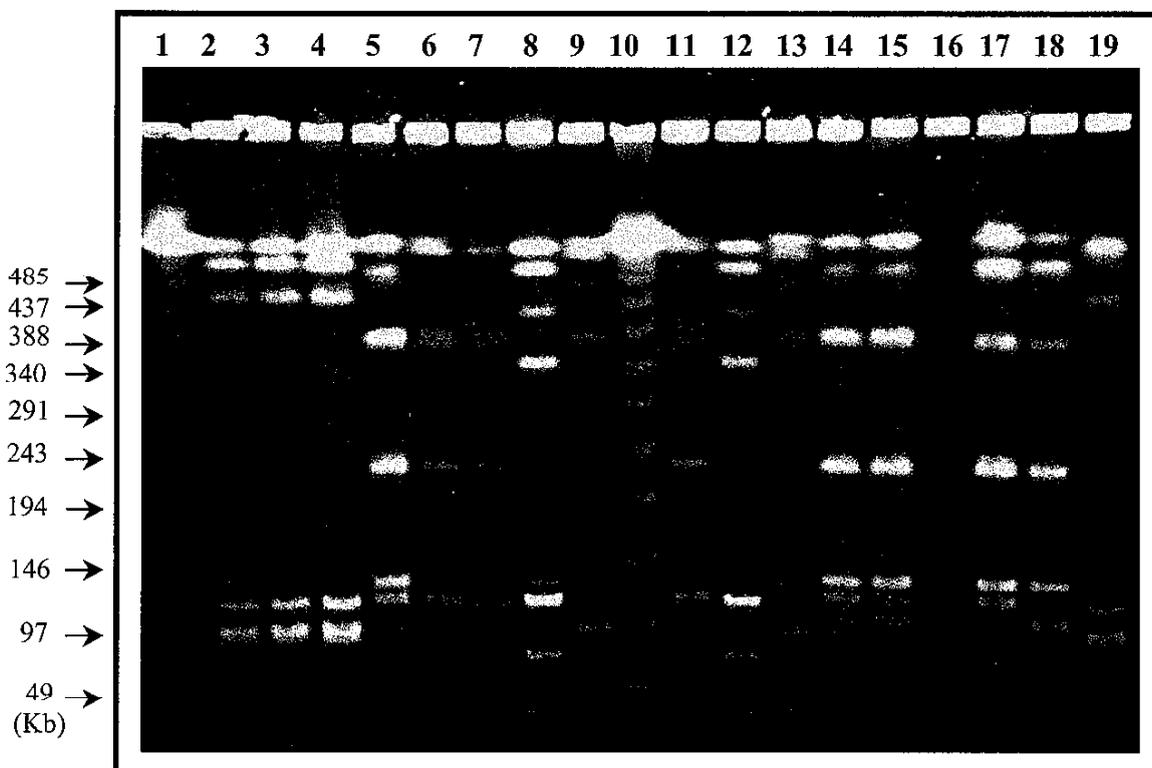


Figura 15.- Perfiles de PFGE de 17 aislados de *S. pyogenes* Er<sup>R</sup> (digestión con *Sfi*I). Carriles: 1, 10: marcador  $\lambda$  ladder; tipo A: 14, 15, 17; subtipo A1: 18; tipo B: 6, 7, 11, 16; tipo C: 8, 12; tipo D: 9, 13; tipo F: 2-4, 19 y tipo H: 5. (Los tamaños de banda del marcador se indican a la izquierda en pares de kilobases).



## *Streptococcus agalactiae* EN LA RIOJA

### 1.- ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

Se han aislado 531 cepas clínicas consecutivas de *S. agalactiae* en el Hospital San Millán de Logroño, desde enero de 1999 hasta octubre de 2001. El origen de las muestras y las edades de los pacientes se recogen en las tablas 23 y 24.

**Tabla 23.- Origen de las muestras a partir de las cuales se aislaron las cepas de *S. agalactiae* en el periodo 1999 - 2001 en La Rioja.**

ORIGEN DE LAS MUESTRAS	<i>S. agalactiae</i>		
	(n=531)	Er <sup>S-I</sup> (n=449)	Er <sup>R</sup> (n=82)
Orina	249	207	42
Vaginal	230	199	31
Heridas y úlceras	18	15	3
Tracto respiratorio superior:			
- Espudo	2	1	1
- Nasofaríngeo	6	5	1
- Ótico	7	6	1
- Traqueal	2	2	0
Uretral	5	4	1
Anal / Rectal	5	4	1
Sangre	3	2	1
Cutáneo	2	2	0
Bronco-aspirado	1	1	0
Ocular	1	1	0

Aproximadamente el 90% de las cepas de *S. agalactiae* se aisló a partir de muestras de orina (46,9%) y de exudados vaginales (43,3%) (Tabla 23). Entre las cepas aisladas de pacientes de edad conocida, el 68,6% pertenecía a pacientes de edades comprendidas entre 21 y 40 años y el 18,6% de las cepas se aisló a partir de muestras de pacientes en un rango de edad entre 41 y 70 años (Tabla 24).

**Tabla 24.- Edades de los pacientes del Hospital San Millán de Logroño de los cuales se aislaron las cepas de *S. agalactiae* del estudio.**

<b>EDAD DE LOS PACIENTES (años)</b>	<b><i>S. agalactiae</i> (n=531)</b>	<b><i>S. agalactiae</i> Er<sup>S-I</sup> (n=449)</b>	<b><i>S. agalactiae</i> Er<sup>R</sup> (n=82)</b>
<b>0 - 1</b>	14	12	2
<b>2 - 10</b>	4	4	0
<b>11 - 20</b>	13	10	3
<b>21 - 40</b>	291	250	41
<b>41 - 70</b>	79	62	17
<b>≥ 71</b>	23	17	6
<b>Desconocida</b>	107	94	13

## **2.- ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ERITROMICINA Y OTROS ANTIBIÓTICOS MLS**

### **2.1- Resistencia a eritromicina**

En todas las cepas de *S. agalactiae* se determinó, mediante el sistema E-test, la CMI a eritromicina. En la tabla 25 se presentan los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> obtenidos en la serie estudiada de esta especie de estreptococos y también los valores de CMI de las cepas, clasificadas en función de su sensibilidad a la eritromicina. El 15,4% de las cepas de *S. agalactiae* fue resistente a eritromicina. Analizando la resistencia a dicho antibiótico en función del origen de las muestras, se detectó un 16,9% de resistencia a eritromicina en cepas aisladas de orina, y un 13,5% en las cepas procedentes de exudados vaginales (Tabla 23). Considerando la edad de los pacientes, cabe destacar que en las cepas aisladas a partir de adultos mayores de 70 años, se observó un nivel de resistencia a eritromicina elevado (26,1%) (Tabla 24). El rango de CMI y la CMI<sub>50/90</sub> para eritromicina en las cepas de *S. agalactiae* fue 0,032->256 µg/ml y 0,094/>256 µg/ml, respectivamente. Ocho cepas presentaron el fenotipo de resistencia intermedia a eritromicina (CMI: 0,38 - 0,75 µg/ml).

Se determinó asimismo la CMI a penicilina y cefotaxima en las cepas de *S. agalactiae* (Tabla 25). No se observó ninguna cepa resistente a penicilina o cefotaxima, detectándose tan sólo una cepa con sensibilidad disminuida a penicilina (CMI=1 µg/ml), que presentó a su vez alta resistencia a eritromicina

(CMI>256 µg/ml). No se observaron diferencias en los valores de CMI a penicilina/cefotaxima entre cepas de *S. agalactiae* sensibles y resistentes a eritromicina (Tabla 25).

**Tabla 25.- Sensibilidad de 531 cepas clínicas de *S. agalactiae* a eritromicina, penicilina y cefotaxima (expresada en µg/ml) mediante E-test.**

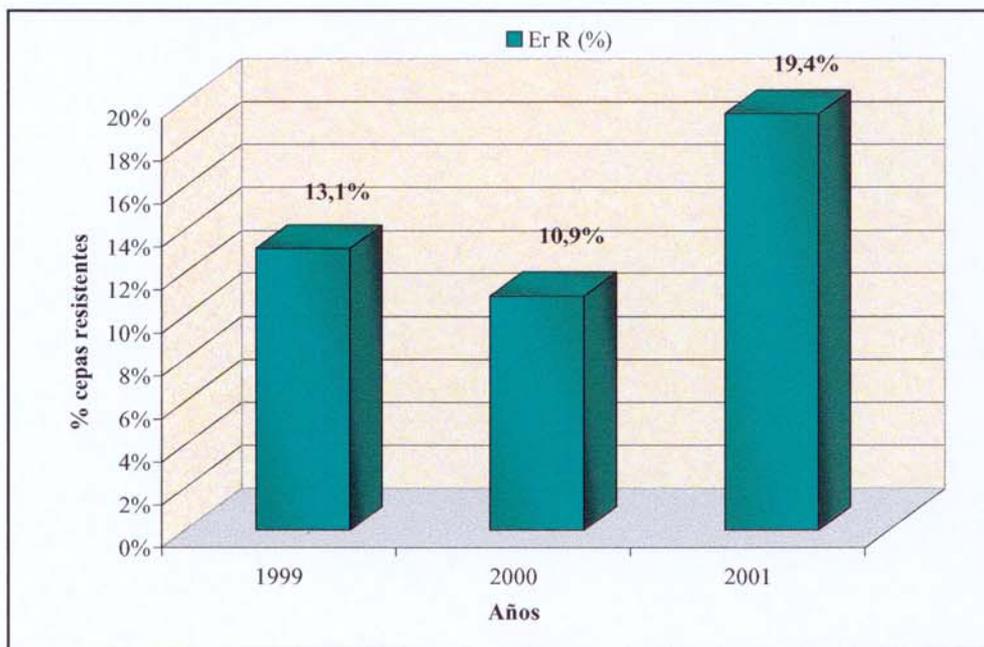
Antibióticos (µg/ml)	<i>S. agalactiae</i> (n=531)	<i>S. agalactiae</i> Er <sup>R</sup> (n=82)	<i>S. agalactiae</i> Er <sup>S-I</sup> (n=449)
<b>Eritromicina</b>			
Rango	0,032 - >256	1,5 - >256	0,032 - 0,75
CMI <sub>50</sub>	0,094	>256	0,094
CMI <sub>90</sub>	>256	>256	0,190
% R (CMI≥1)	15,4	100	0
% I (CMI: >0,25 - <1)	1,5%	0%	1,8%
<b>Penicilina</b>			
Rango	0,008 - 1	0,008 - 1	0,016 - 0,190
CMI <sub>50</sub>	0,047	0,047	0,047
CMI <sub>90</sub>	0,064	0,064	0,064
% R (CMI≥4)	0%	0%	0%
% I (CMI: 0,25-2)	0,2%	1,2%	0%
<b>Cefotaxima</b>			
Rango	0,012 - 0,125	0,012 - 0,094	0,016 - 0,125
CMI <sub>50</sub>	0,032	0,032	0,032
CMI <sub>90</sub>	0,047	0,047	0,047
% R (CMI≥2)	0%	0%	0%
% I (CMI=1)	0%	0%	0%

## 2.2- Evolución de la resistencia a eritromicina

La distribución de cepas recogidas cada año y los porcentajes de resistencia a eritromicina se muestran en la tabla 26 y en la figura 16. Llama la atención que en el último año de recogida de muestras, los niveles de resistencia a eritromicina en *S. agalactiae* en La Rioja aumentaron desde un 10,9% en el año 2000 hasta un 19,4% en el año 2001.

**Tabla 26.- Número de cepas de *S. agalactiae* recogidas entre 1999 - 2001 y porcentaje de cepas resistentes a eritromicina en función de los años de aislamiento.**

Año	Nº total cepas	Nº cepas Er <sup>R</sup> (%)	Nº cepas Er <sup>I</sup> (%)	Nº cepas Er <sup>S</sup> (%)
1999	122	16 (13,1%)	1 (0,8%)	105 (86,1%)
2000	156	17 (10,9%)	1 (0,6%)	138 (88,5%)
2001 (enero-octubre)	253	49 (19,4%)	6 (2,3%)	198 (78,3%)
<b>1999-2001</b>	<b>531</b>	<b>82 (15,4%)</b>	<b>8 (1,5%)</b>	<b>441 (83,1%)</b>



**Figura 16.- Evolución de la resistencia a eritromicina (Er) en *S. agalactiae* en La Rioja desde el año 1999 hasta el año 2001.**

### 2.3- Fenotipos de resistencia a antibióticos MLS

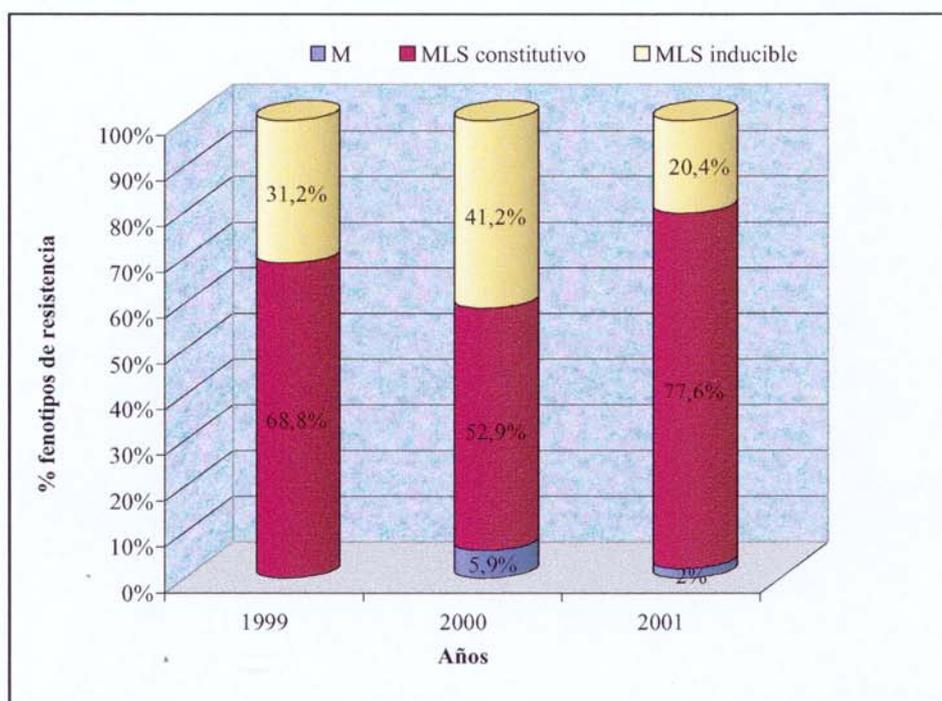
Se determinó la sensibilidad de las 531 cepas de *S. agalactiae* a diferentes antibióticos del grupo MLS (eritromicina, clindamicina, espiramicina y virginiamicina) mediante antibiograma. Asimismo, en las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> se estudió el carácter constitutivo o inducible de la resistencia mediante el test de doble difusión con disco. Los resultados se muestran a continuación:

- ✓ 441 cepas fueron sensibles a eritromicina y al resto de los antibióticos del grupo MLS (fenotipo sensible).
- ✓ 8 cepas presentaron resistencia intermedia a eritromicina y fueron sensibles al resto de antibióticos MLS.
- ✓ 82 cepas fueron resistentes a eritromicina. De ellas, solamente 2 presentaron el fenotipo M de resistencia (2,5%). Las 80 cepas restantes mostraron un fenotipo de resistencia MLS<sub>B</sub>, 58 de ellas (70,7%) de carácter constitutivo y 22 de carácter inducible (26,8%).

Los fenotipos de resistencia a antibióticos MLS de las cepas resistentes a eritromicina se representan en la tabla 27 y en la figura 17.

**Tabla 27.- Fenotipos de resistencia a antibióticos MLS en las 82 cepas de *S. agalactiae* Er<sup>R</sup> del estudio (1999 – 2001).**

Año de aislamiento de cepas	Nº cepas Er <sup>R</sup>	Fenotipo de resistencia
<b>1999</b>	11	MLS <sub>B</sub> c
	5	MLS <sub>B</sub> i
<b>2000</b>	9	MI S <sub>B</sub> c
	7	MLS <sub>B</sub> i
	1	M
<b>2001 (enero – octubre)</b>	38	MLS <sub>B</sub> c
	10	MLS <sub>B</sub> i
	1	M



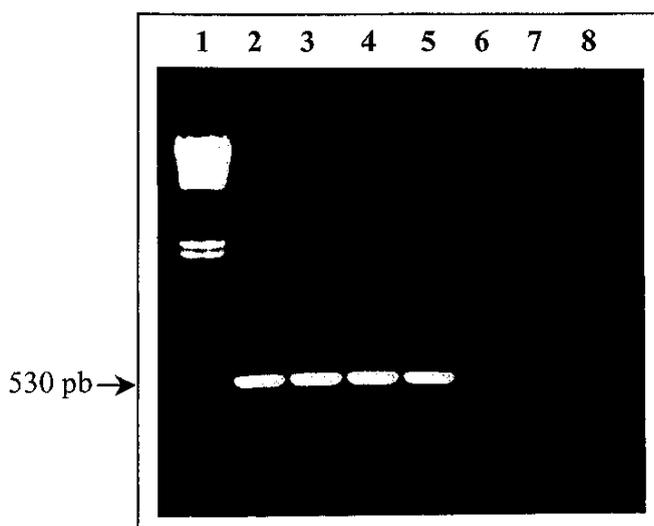
**Figura 17.- Distribución anual (en %) de los distintos fenotipos de resistencia a antibióticos MLS en cepas de *S. agalactiae* aisladas entre 1999 y 2001.**

### 3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MLS

Se investigaron los mecanismos de resistencia a antibióticos MLS en todas las cepas de nuestra serie de *S. agalactiae* resistentes a eritromicina que fueron aisladas entre enero de 1999 y marzo de 2001, así como en algunas cepas sensibles a este antibiótico (CMI: 0,032 – 0,38  $\mu\text{g/ml}$ ) elegidas al azar en ese mismo periodo (34 Er<sup>R</sup> + 10 Er<sup>S</sup> + 1 Er<sup>I</sup>). Los resultados se encuentran detallados en la tabla 28. Se emplearon los cebadores utilizados para el estudio de genes *erm* en otras especies de estreptococos: *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) y *erm*(TR). El gen *erm*(B) fue el responsable de la resistencia a eritromicina en 18 cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (CMI a eritromicina: 2 - >256  $\mu\text{g/ml}$ ) y en dos cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (CMI a eritromicina: >256  $\mu\text{g/ml}$ ). El gen *erm*(TR) se detectó en 10 cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (CMI a eritromicina: 4 - >256  $\mu\text{g/ml}$ ) y en una cepa con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (CMI a eritromicina: >256  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 18). Estos resultados fueron confirmados con los obtenidos mediante *dot blotting* utilizando una sonda *erm*(TR) marcada con digoxigenina (Figura 12).

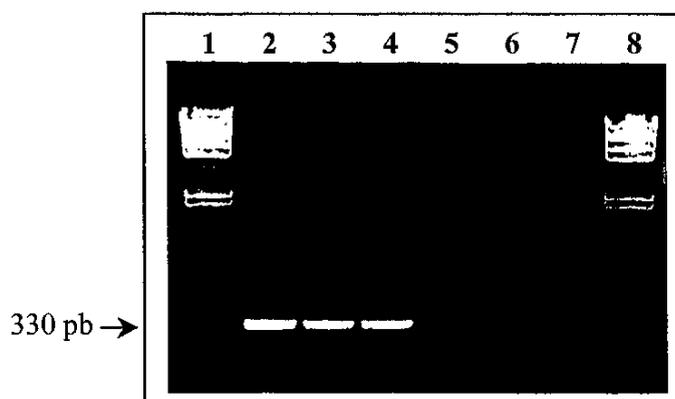
Tabla 28.- Sensibilidad a eritromicina (Er) y mecanismos de resistencia detectados en 45 aislados clínicos de *S. agalactiae*.

Fenotipo de resistencia a eritromicina	Nº de cepas	CMI a Er (µg/ml)	Amplificación por PCR						
			<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (TR)	<i>mef</i> (A/E)	<i>mst</i> (A)	<i>nre</i> (A)
Sensible - Intermedio	11	0,032 – 0,38	-	-	-	-	-	-	+
M	1	2	-	-	-	-	+	-	+
MLS <sub>B</sub> constitutivo	16	>256	-	+	-	-	-	-	+
	1	>256	-	+	-	+	-	-	+
	1	>256	-	-	-	+	-	-	+
	2	2 - 8	-	+	-	-	-	-	+
MLS <sub>B</sub> inducible	7	>256	-	-	-	+	-	-	+
	2	>256	-	+	-	-	-	-	+
	1	16	+	-	-	+	-	-	+
	3	4 - 12	-	-	-	+	-	-	+

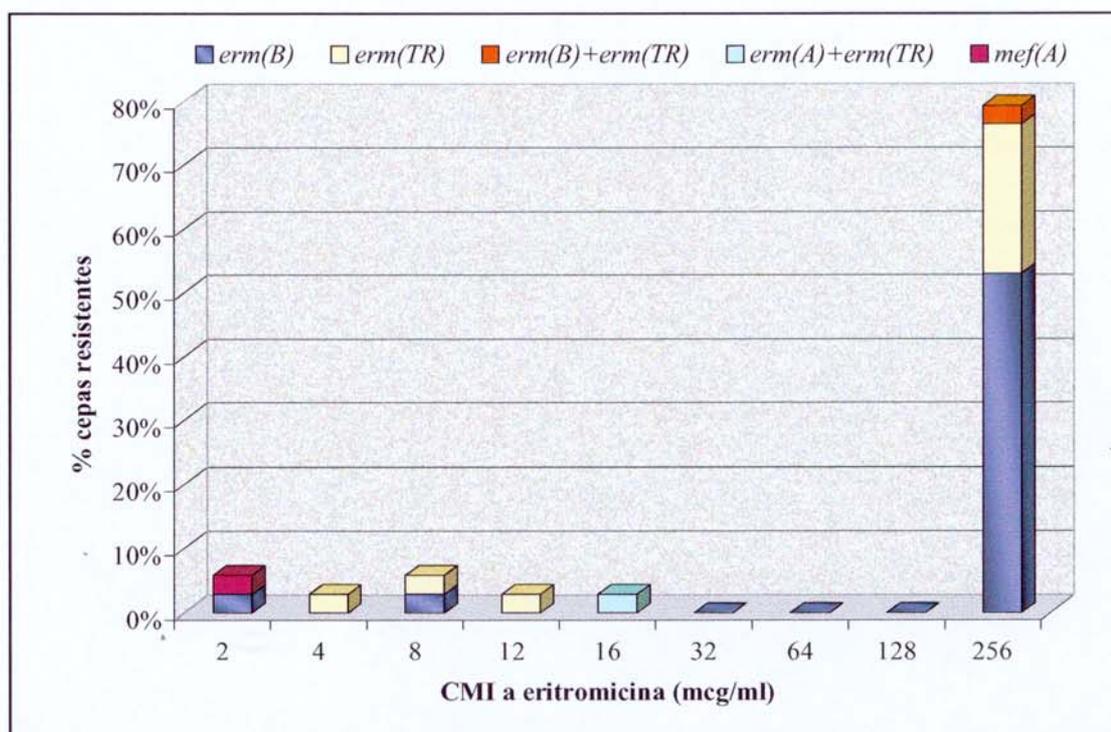


**Figura 18.- Amplificación por PCR con los cebadores *erm*(TR).** Carriles: 1:  $\lambda$ /HindIII; 2: control positivo; 3: *S. agalactiae* S401; 4: SGG S212; 5: SGC S215; 6: *S. agalactiae* S379 [con *erm*(B)]; 7 y 8: controles negativos, sin cebadores y sin ADN, respectivamente.

Curiosamente, dos cepas de *S. agalactiae* presentaron simultáneamente dos determinantes *erm* de resistencia: en una cepa con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (CMI a eritromicina: 16  $\mu$ g/ml) se encontró el gen *erm*(TR) asociado al gen *erm*(A), mientras que una cepa con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (CMI a eritromicina: >256  $\mu$ g/ml) presentó los genes *erm*(TR) y *erm*(B) (Tabla 28). En estas dos cepas, la presencia de ambos genes se comprobó mediante secuenciación de los productos de PCR. En lo que respecta a los genes de eflujo de macrólidos, cabe destacar que en la única cepa con fenotipo M (CMI a eritromicina: 2  $\mu$ g/ml) aislada en ese periodo, se detectó el gen *mef*(A) (Figura 13). En ningún caso se detectó la presencia de los genes *msr*(A) ni *erm*(C) en *S. agalactiae* (Tabla 28). En cambio, todas las cepas de *S. agalactiae* analizadas, independientemente de su fenotipo de resistencia a eritromicina, amplificaron el gen *mre*(A), que se empleó como control interno (Figura 19). El resto de PCRs fueron negativas en las cepas sensibles o con sensibilidad disminuida a eritromicina analizadas (n=11).



**Figura 19.- Amplificación por PCR con los cebadores *mre*(A).** Carriles: 1 y 8:  $\lambda$ /HindIII; 2: *S. agalactiae* S373 Er<sup>S</sup>; 3: *S. agalactiae* S385 (fenotipo M); 4: *S. agalactiae* S366 (fenotipo MLS<sub>B</sub>); 5: *S. pneumoniae* S69 (control negativo); 6 y 7: controles negativos, sin cebadores y sin ADN, respectivamente.



**Figura 20.- Distribución de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) en 34 cepas de *S. agalactiae* resistentes a eritromicina y genes detectados mediante PCR.**

En la figura 20 se representa la distribución de CMI a eritromicina de las 34 cepas de *S. agalactiae* Er<sup>R</sup> en función de los genes de resistencia detectados mediante amplificación por PCR. En *S. agalactiae*, el fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo, mediado generalmente por el gen *erm(B)*, fue el más frecuentemente encontrado en La Rioja. El gen *erm(TR)*, descrito inicialmente para *S. pyogenes*, también se puso de manifiesto en esta especie de estreptococos, correspondiendo en la mayoría de los casos al fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible. La aparición del fenotipo M, asociado al gen *mef(A)*, fue escasa en el periodo de estudio.

#### **4.- TRANSFERENCIA POR CONJUGACIÓN DEL GEN *mef(A)* EN *S. agalactiae***

Se transfirió por conjugación, según el protocolo anteriormente explicado, el gen *mef(A)* desde la única cepa de *S. agalactiae* con fenotipo M de la serie estudiada entre enero de 1999 y abril de 2001. Como receptor se utilizó la cepa de

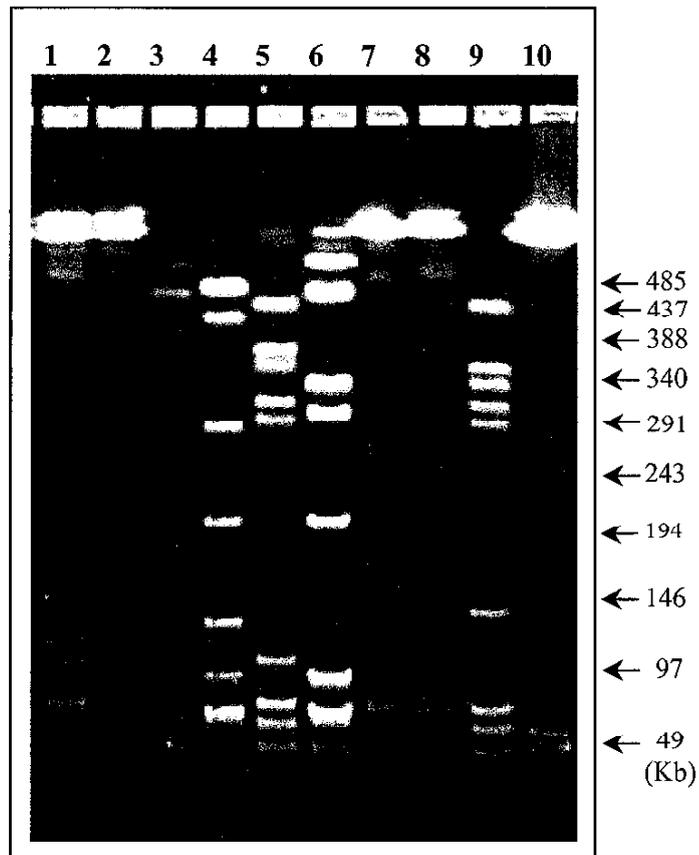
*Enterococcus faecalis* JH2-2. Los transconjugantes obtenidos presentaron un valor de CMI a eritromicina > 32 µg/ml y, mediante PCR, se demostró la presencia del gen *mef(A)*.

#### 5.- CARACTERIZACIÓN CLONAL DE LAS CEPAS DE *S. agalactiae* RESISTENTES A ERITROMICINA

Todos los aislados de *S. agalactiae* Er<sup>R</sup> recogidos entre enero de 1999 y abril de 2001 (n=34) se sometieron a la técnica de PFGE con el fin de determinar su posible relación clonal. La enzima de restricción utilizada para la digestión del ADN cromosómico fue *Sma*I. De los 33 aislados con fenotipo MLS<sub>B</sub>, 17 de ellos dieron lugar a 17 patrones diferentes (un patrón por aislado), designados cada uno con una letra mayúscula, desde la A hasta la O (Tabla 29). Ocho aislados, recogidos en diferentes años del muestreo, revelaron cuatro patrones distintos (P, Q, R y S) y uno estrechamente relacionado (S, S1). Los ocho aislados restantes no pudieron tiparse mediante PFGE, tras digestión del ADN genómico con la enzima *Sma*I. En el único aislado con fenotipo M analizado, perteneciente a un exudado vaginal de una paciente de 61 años, se obtuvo un patrón de restricción diferente a los anteriores (Tabla 29).

**Tabla 29.- Patrones de restricción de 25 aislados de *S. agalactiae* con fenotipo MLS<sub>B</sub> de resistencia (enero 1999 – abril 2001).**

Patrones de PFGE	Nº de aislados con fenotipo MLS <sub>B</sub>	Fecha de aislamiento
A→O (17 patrones diferentes)	17 (un aislado por patrón)	1999 – 2001
P	2	1999
Q	2	2001
R	1	1999
	1	2000
S	1	1999
S1	1	2001



**Figura 21.-** Perfiles de PFGE de 9 aislados de *S. agalactiae* Er<sup>R</sup>. Carriles: 1 y 2: tipo P; 3: tipo A; 4: tipo B; 5: tipo C; 6: D; 7: tipo E; 8: tipo F; 9: tipo G y 10: marcador  $\lambda$  ladder. (Los tamaños de las bandas del marcador se indican a la derecha en pares de kilobases).



## *Streptococcus* $\beta$ -HEMOLÍTICOS DEL GRUPO G Y GRUPO C EN LA RIOJA

### 1.- ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

Se han aislado 47 y 16 cepas clínicas consecutivas de SGG y SGC, respectivamente, en el Hospital San Millán de Logroño, desde noviembre de 1996 hasta octubre de 2001. El origen de las muestras y las edades de los pacientes se recogen en las tablas 30 y 31.

**Tabla 30.- Origen de las muestras a partir de las cuales se aislaron las cepas de SGG y SGC en el periodo 1996 - 2001 en La Rioja.**

ORIGEN DE LAS MUESTRAS		<i>Streptococcus</i> grupo G (n=47)			<i>Streptococcus</i> grupo C (n=16)		
		Er <sup>S-I</sup> (n=41)	Er <sup>R</sup> (n=6)		Er <sup>S-I</sup> (n=12)	Er <sup>R</sup> (n=4)	
T.R.S.	Espuito	1	1	0	1	1	0
	Nasofaríngeo	8	8	0	6	3	3
	Ótico	3	3	0	0	0	0
	Traqueal	0	0	0	1	0	1
Heridas y úlceras		12	9	3	3	3	0
Vaginal		8	6	2	1	1	0
Sangre		6	6	0	0	0	0
Uretral		1	1	0	1	1	0
Cutáneo		1	1	0	0	0	0
Bronco-aspirado		1	1	0	1	1	0
Sinovial		1	1	0	0	0	0
Orina		0	0	0	1	1	0
Desconocido		5	4	1	1	1	0

Aproximadamente, el 29% de las cepas de SGG se aisló a partir de muestras del tracto respiratorio superior y un porcentaje similar de cepas de esta misma especie se obtuvo a partir de exudados de heridas y úlceras (Tabla 30). En el caso de SGC, el

53% de las cepas se aisló a partir de muestras del tracto respiratorio superior (Tabla 30). Entre las cepas de SGG aisladas de pacientes de edad conocida, el 36,7% pertenecía a individuos mayores de 70 años (Tabla 31). Con respecto a los SGC, el 69,2% de las cepas se aisló de pacientes de edad inferior a 20 años o superior a 70 años (Tabla 31).

**Tabla 31.- Edades de los pacientes del Hospital San Millán de Logroño de los cuales se aislaron las cepas de SGG y SGC del estudio.**

EDAD DE LOS PACIENTES (años)	Nº de cepas de <i>Streptococcus</i> grupo G		Nº de cepas de <i>Streptococcus</i> grupo C	
	Total (n=47)	Er <sup>R</sup> (n=6)	Total (n=16)	Er <sup>R</sup> (n=4)
0 – 10	2	0	3	2
11 – 20	4	0	3	0
21 – 40	7	0	2	0
41 – 70	6	1	2	0
≥ 71	11	3	3	2
Desconocida	17	2	3	0

## 2.- ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ERITROMICINA Y OTROS ANTIBIÓTICOS MLS

### 2.1- Resistencia a eritromicina

En todas las cepas de SGG y SGC se determinó la CMI a eritromicina mediante el sistema E-test. En la tabla 32 se presentan los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> obtenidos en las series estudiadas. El 12,8% de las cepas de SGG fueron resistentes a eritromicina. Analizando la resistencia a dicho antibiótico en SGG en función del origen de las muestras, se detectó un 25% de resistencia a eritromicina en cepas procedentes de exudados vaginales y de heridas (Tabla 30). En las cepas aisladas de pacientes mayores de 70 años, se detectó un 27% de resistencia, mientras que en ninguna de las cepas de SGG procedentes de pacientes menores de 40 años se observó dicha resistencia (Tabla 31). Respecto a SGC, el 25% de las cepas fue resistente a eritromicina y se detectó un 50% de resistencia en cepas aisladas a partir del tracto respiratorio superior (Tabla 30). El 66,7% de las cepas aisladas de pacientes menores

de 10 años y un porcentaje similar de las cepas procedentes de enfermos mayores de 70 años fueron resistentes a eritromicina (Tabla 31).

**Tabla 32. Sensibilidad de 47 cepas de SGG y 16 cepas de SGC a eritromicina, penicilina y cefotaxima (expresada en  $\mu\text{g/ml}$ ) mediante E-test.**

Antibióticos ( $\mu\text{g/ml}$ )	Streptococos grupo G (n=47)	Streptococos grupo C (n=16)
<b>Eritromicina</b>		
Rango	0,064 - >256	0,032 - >256
CMI <sub>50</sub>	0,125	0,190
CMI <sub>90</sub>	>256	32
% R (CMI $\geq$ 1)	12,8	25
% I (CMI: 0,38-0,5)	2,1	6,2
<b>Penicilina</b>		
Rango	0,008 – 0,047	0,006 – 0,094
CMI <sub>50</sub>	0,012	0,012
CMI <sub>90</sub>	0,023	0,032
% I - R (CMI $\geq$ 0,25)	0	0
<b>Cefotaxima</b>		
Rango	0,012 – 0,190	0,012 – 0,064
CMI <sub>50</sub>	0,023	0,023
CMI <sub>90</sub>	0,064	0,047
% I - R (CMI $\geq$ 1)	0	0

El rango de CMI y la CMI<sub>50/90</sub> para eritromicina en las cepas de SGG estudiadas fue 0,064->256  $\mu\text{g/ml}$  y 0,125/>256  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Una sola cepa de SGG presentó el fenotipo intermedio para la eritromicina (CMI: 0,38  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tabla 32). Para los SGC, el rango de CMI y la CMI<sub>50/90</sub> para eritromicina fue 0,032->256  $\mu\text{g/ml}$  y 0,190/32  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Tan sólo una cepa presentó sensibilidad disminuida a eritromicina (CMI: 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tabla 32).

Se determinó asimismo por E-test la CMI a penicilina y cefotaxima en las cepas de SGG y SGC. Todas las cepas de SGG y SGC fueron sensibles a penicilina y cefotaxima, mostrando valores de CMI<sub>90</sub> para estos antibióticos de 0,023 y 0,064 µg/ml en el caso de SGG; y 0,032 y 0,047 µg/ml para los SGC (Tabla 32).

## 2.2- Evolución de la resistencia a eritromicina y fenotipos de resistencia a antibióticos MLS

La distribución de cepas resistentes a eritromicina recogidas cada año, así como los fenotipos de resistencia encontrados se resumen en la tabla 33.

**Tabla 33.- Número de cepas de SGG y SGC resistentes a eritromicina en función de los años de aislamiento y fenotipos de resistencia encontrados.**

Año	<i>Streptococcus</i> grupo G			<i>Streptococcus</i> grupo C		
	Nº total de cepas aisladas	Nº de cepas Er <sup>R</sup>	Fenotipos de resistencia	Nº total de cepas aisladas	Nº de cepas Er <sup>R</sup>	Fenotipos de resistencia
1996 (noviembre-diciembre)	4	0	-----	0	0	-----
1997	5	1	MLS <sub>B</sub> c	3	0	-----
1998	12	1	MLS <sub>B</sub> i	3	1	MLS <sub>B</sub> i
1999	7	1	MLS <sub>B</sub> c	2	0	-----
2000	11	1	MLS <sub>B</sub> i	7	3	MLS <sub>B</sub> c
2001 (enero-octubre)	8	2	MLS <sub>B</sub> c	1	0	-----
<b>1996-2001 (% Er<sup>R</sup>)</b>	<b>47</b>	<b>6 (12,8%)</b>		<b>16</b>	<b>4 (25%)</b>	

Se determinó la sensibilidad de las 47 cepas de SGG y de las 16 de SGC a diferentes antibióticos del grupo MLS (eritromicina, clindamicina, espiramicina y virginiamicina) mediante antibiograma. Asimismo, en las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> se estudió el carácter constitutivo o inducible de la resistencia mediante el test de doble difusión con disco. Los resultados se muestran a continuación:

- ✓ 40 cepas de SGG y 11 cepas de SGC fueron sensibles a eritromicina y al resto de los antibióticos del grupo MLS (Figura 22 A).
- ✓ 2 cepas (una de cada grupo) presentaron resistencia intermedia a eritromicina y fueron sensibles al resto de antibióticos MLS.
- ✓ 6 cepas de SGG y 4 cepas de SGC fueron resistentes a eritromicina. Todas mostraron un fenotipo de resistencia  $MLS_B$ . En el caso de SGG, 4 de ellas mostraron resistencia de carácter constitutivo (66,7%) y 2 de carácter inducible (33,3%). De las cepas de SGC con fenotipo  $MLS_B$ , 3 mostraron un fenotipo  $MLS_B$  constitutivo (75,0%) y 1, inducible (25,0%) (Figura 22 B,C). Ninguna cepa presentó fenotipo M (Tabla 33).

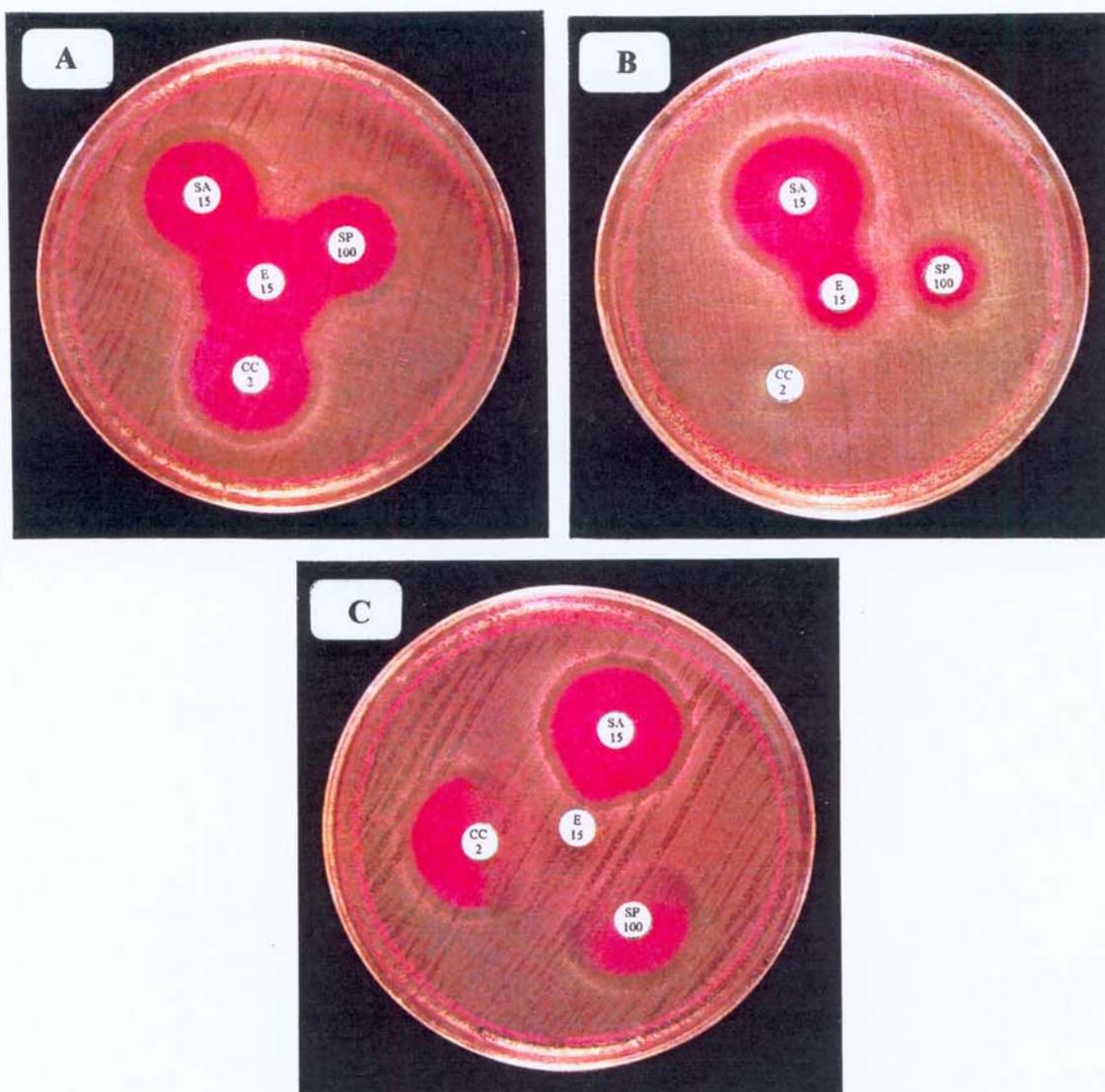


Figura 22.- Fenotipos  $MLS$  de cepas de SGG A) Sensible; B)  $MLS_B$  constitutivo; C)  $MLS_B$  inducible.

### 3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MLS

Se realizó el estudio de los genes de resistencia a antibióticos MLS en todas las cepas de nuestra serie de SGG (4 Er<sup>K</sup> + 36 Er<sup>S</sup> + 1 Er<sup>I</sup>) y SGC (4 Er<sup>K</sup> + 11 Er<sup>S</sup> + 1 Er<sup>I</sup>) que fueron aisladas entre noviembre de 1996 y marzo de 2001. Los resultados se encuentran detallados en la tabla 34.

Para SGG, el gen *erm*(TR) fue el responsable de la resistencia a eritromicina en todos los casos, tanto en las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (n= 2; CMI a eritromicina: >256 µg/ml) como en las de fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (n=2; CMI a eritromicina: 3 - >256 µg/ml) (Tabla 34 y figura 18). Asimismo, estas cuatro cepas dieron amplificación débil al emplear los cebadores *erm*(A). La secuenciación de los productos de PCR obtenidos con las dos parejas de cebadores, *erm*(TR) y *erm*(A), en una de estas cepas resistentes a eritromicina (S211) rindió, en ambos casos, la secuencia del gen *erm*(TR).

Con respecto a SGC, el gen *erm*(TR) fue también el responsable de la resistencia a eritromicina en todos los casos, tanto en las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (n=3; CMI a eritromicina: 3 - 32 µg/ml) como en la de fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (n=1; CMI a eritromicina: >256 µg/ml) (Figura 18). Los resultados obtenidos mediante *dot blotting* con una sonda *erm*(TR) marcada con digoxigenina, al incluir cepas de ambas especies, corroboraron los datos anteriores (Figura 12). Los genes de eflujo *mef*(A) y *msr*(A) no se detectaron en ninguna de las cepas de SGG y SGC estudiadas. Todas las PCRs fueron negativas en las cepas sensibles o con sensibilidad disminuida a eritromicina analizadas (n=49) (Tabla 34).

Tabla 34.- Sensibilidad a eritromicina (Er) y mecanismos de resistencia detectados en 41 y 16 aislados clínicos de SGG y SGC, respectivamente.

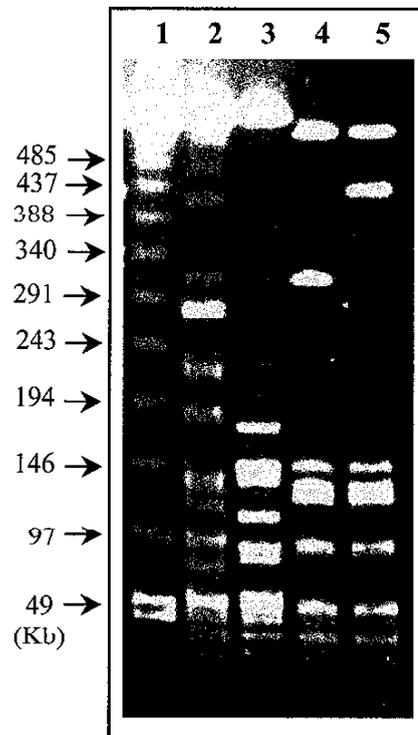
Fenotipo de resistencia a eritromicina	N° de cepas	CMI a Er (µg/ml)	Amplificación por PCR					
			<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (TR)	<i>mef</i> (A/E)	<i>msr</i> (A)
<b><i>Streptococcus</i> grupo G</b>								
Sensible - Intermedio	37	0,064 – 0,38	-	-	-	-	-	-
ML <sub>S<sub>B</sub></sub> constitutivo	2	>256	-	-	-	+	-	-
ML <sub>S<sub>B</sub></sub> inducible	1	>256	-	-	-	+	-	-
	1	3	-	-	-	+	-	-
<b><i>Streptococcus</i> grupo C</b>								
Sensible - Intermedio	12	0,032 – 0,5	-	-	-	-	-	-
ML <sub>S<sub>B</sub></sub> constitutivo	3	3 - 32	-	-	-	+	-	-
ML <sub>S<sub>B</sub></sub> inducible	1	>256	-	-	-	+	-	-

#### 4.- CARACTERIZACIÓN CLONAL DE LAS CEPAS DE SGG Y SGC RESISTENTES A ERITROMICINA

Todos los aislados recogidos entre noviembre de 1996 y marzo de 2001 de SGG (n=4) y de SGC (n=4) resistentes a eritromicina se sometieron a la técnica de PFGE, empleando la enzima de restricción *Sma*I, con el fin de determinar su posible relación clonal. Los 4 aislados de SGG, recogidos en diferentes años del muestreo (Tabla 35), dieron lugar a 4 patrones distintos (designados desde A hasta D; un patrón por aislado), lo que indica que entre ellos no existe relación clonal. Los 4 aislados de SGC, también recogidos en distintos momentos del muestreo (Tabla 35), dieron lugar a 3 patrones diferentes (E, F y G) y uno estrechamente relacionado (G, G1). Estos dos últimos aislados de SGC procedían de muestras del tracto respiratorio superior de pacientes de edad avanzada ( $\geq 71$  años).

**Tabla 35.- Patrones de restricción de 8 aislados de SGG y SGC con fenotipo  $MLS_B$  de resistencia (noviembre 1996 – marzo 2001).**

Patrones de PFGE	Nº de aislados con fenotipo $MLS_B$	Fecha de aislamiento
<b><i>Streptococcus</i> grupo G</b>		
A	1	1997
B	1	1998
C	1	1999
D	1	2000
<b><i>Streptococcus</i> grupo C</b>		
E	1	1997
F	1	2000
G	1	2000
G1	1	2000



**Figura 23.-** Perfiles de PFGE de 4 aislados de SGC  $Er^R$  (digestión con *SmaI*).

**Carriles:** 1: marcador  $\lambda$  ladder; 2: tipo E; 3: tipo F; 4: tipo G y 5: tipo G1. (Los tamaños de las bandas del marcador se indican a la izquierda en pares de kilobases).



## *Streptococcus pneumoniae* EN LA RIOJA

### 1.- ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

Se han aislado 767 cepas clínicas consecutivas de *S. pneumoniae* en el Hospital San Millán de Logroño, desde septiembre de 1996 hasta octubre de 2001. El origen de las muestras y las edades de los pacientes se recogen en las tablas 36 y 37.

**Tabla 36.- Origen de las muestras a partir de las cuales se aislaron las cepas de *S. pneumoniae* en el periodo 1996 - 2001 en La Rioja.**

ORIGEN DE LAS MUESTRAS	<i>S. pneumoniae</i>		
	(n=767)	Er <sup>S-I</sup> (n=351)	Er <sup>R</sup> (n=416)
Tracto respiratorio superior:			
- Esputo	175	85	90
- Nasofaríngeo	194	60	134
- Ótico	112	30	82
- Traqueal	7	3	4
Fluidos estériles:			
- Sangre	96	66	30
- LCR	6	5	1
- Ascítico/peritoneal	5	3	2
- Pleural	3	2	1
Bronco-aspirado	62	35	27
Conjuntival	53	26	27
Ocular	22	13	9
Heridas y úlceras	14	8	6
Vaginal	6	4	2
Orina	4	3	1
Desconocido	8	8	0

Las cepas de *S. pneumoniae* se aislaron en su mayoría a partir de muestras pertenecientes al tracto respiratorio superior (64,3%) y de fluidos estériles (14,5%) (Tabla 36). El 45,1% de las muestras fueron aisladas de pacientes con una edad

inferior a 10 años y el 21,9% de las cepas se aislaron de pacientes de edad superior a 70 años (Tabla 37).

**Tabla 37.- Edades de los pacientes a partir de los cuales se aislaron las cepas de *S. pneumoniae* del estudio.**

EDAD DE LOS PACIENTES (años)	<i>S. pneumoniae</i> (n=767)	<i>S. pneumoniae</i> Er <sup>S-I</sup> (n=351)	<i>S. pneumoniae</i> Er <sup>R</sup> (n=416)
0 - 10	309	89	220
11 - 20	11	7	4
21 - 30	13	8	5
31 - 40	61	34	27
41 - 50	29	21	8
51 - 60	34	26	8
61 - 70	78	42	36
≥ 71	150	83	67
Desconocida	82	41	41

## 2.- ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ERITROMICINA Y OTROS ANTIBIÓTICOS MLS

### 2.1- Resistencia a eritromicina

En todas las cepas de *S. pneumoniae* se determinó la CMI a eritromicina mediante el sistema E-test. El rango de CMI y la CMI<sub>50/90</sub> para eritromicina en las cepas de *S. pneumoniae* fue 0,004->256 µg/ml y >256/>256 µg/ml, respectivamente. Sólo dos cepas, ambas con un valor de CMI para la eritromicina de 0,5 µg/ml, presentaron un fenotipo de resistencia intermedia (Tabla 38). El 54,2% de las cepas de *S. pneumoniae* fueron resistentes a eritromicina. Analizando la resistencia a dicho antibiótico en función del origen de las muestras, se detectó un 30,4% de resistencia a eritromicina en cepas aisladas de sangre y LCR, y un 63,5% en las cepas procedentes del tracto respiratorio superior (Tabla 36). Si se tiene en cuenta la edad de los pacientes, es de destacar que en las cepas aisladas de niños con edad inferior a 10 años, el nivel de resistencia a eritromicina fue muy elevado (71,2%), mientras que

en cepas procedentes de pacientes con edades comprendidas entre 31 y 70 años, se detectaron valores inferiores de resistencia a este macrólido (39,1%) (Tabla 37).

**Tabla 38. Sensibilidad de 767 cepas clínicas de *S. pneumoniae* a eritromicina (expresada en µg/ml) mediante E-test.**

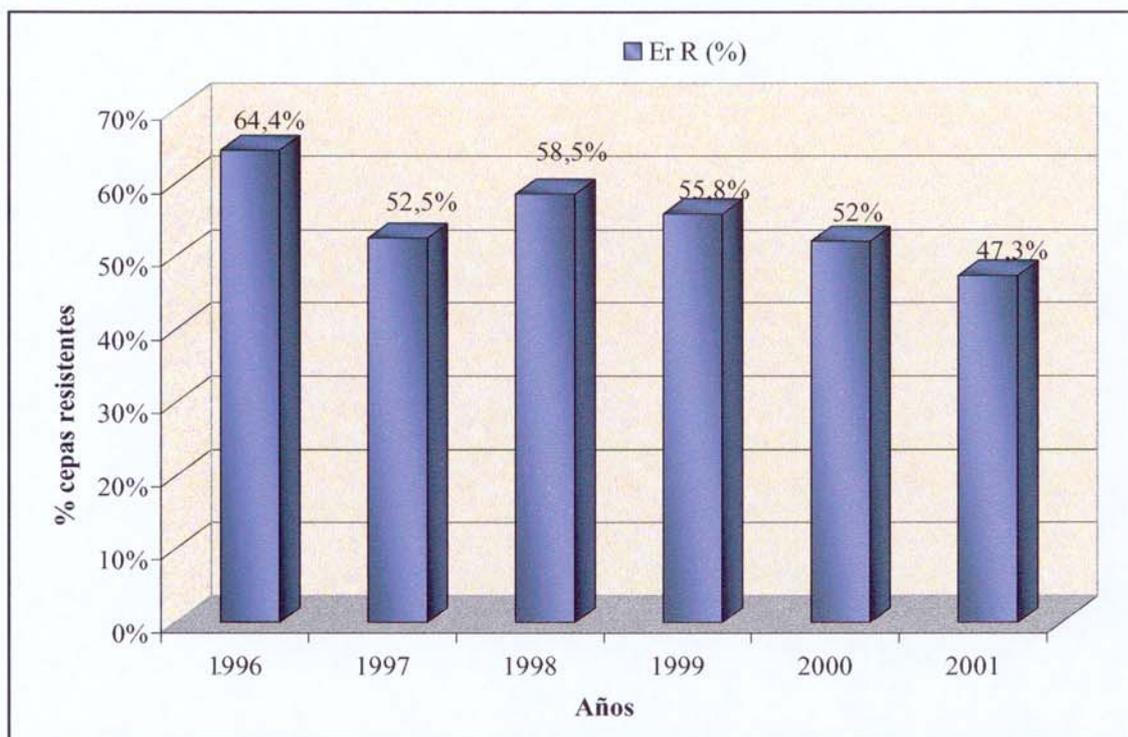
Eritromicina (µg/ml)	<i>S. pneumoniae</i> (n=767)
Rango	0,004 - >256
CMI <sub>50</sub>	>256
CMI <sub>90</sub>	>256
% R (CMI≥1)	54,2%
% I (CMI=0,5)	0,3%

## 2.2- Evolución de la resistencia a eritromicina

La distribución de cepas recogidas cada año y los porcentajes de resistencia a eritromicina se muestran en la tabla 39 y en la figura 24.

**Tabla 39.- Número de cepas de *S. pneumoniae* recogidas entre 1996 - 2001 y porcentaje de cepas resistentes a eritromicina en función de los años de aislamiento.**

Año	Nº total cepas aisladas	Nº cepas Er <sup>R</sup> (%)	Nº cepas Er <sup>I</sup> (%)
1996 (septiembre-diciembre)	45	29 (64,4%)	0
1997	162	85 (52,5%)	1 (0,6%)
1998	164	96 (58,5%)	0
1999	138	77 (55,8%)	1 (0,7%)
2000	148	77 (52%)	0
2001 (enero-octubre)	110	52 (47,3%)	0
<b>1996-2001</b>	<b>767</b>	<b>416 (54,2%)</b>	<b>2 (0,3%)</b>



**Figura 24.- Evolución de la resistencia a eritromicina (Er) en *S. pneumoniae* en La Rioja desde el año 1996 hasta el año 2001.**

Desde el comienzo de la recogida de muestras hasta la actualidad los niveles de resistencia a eritromicina en *S. pneumoniae* han experimentado una suave disminución (desde un 64,4% de cepas resistentes en el último trimestre de 1996 hasta un 47,3% en el año 2001).

### 2.3- Fenotipos de resistencia a antibióticos MLS

Se determinó la sensibilidad de las 767 cepas de *S. pneumoniae* a diferentes antibióticos del grupo MLS (eritromicina, clindamicina, espiramicina y virginiamicina) mediante el método antibiograma. Asimismo, en las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> se estudió el carácter constitutivo o inducible de la resistencia mediante el test de doble difusión con disco. Los resultados se muestran a continuación:

- ✓ 349 cepas fueron sensibles a eritromicina y al resto de los antibióticos del grupo MLS (fenotipo sensible) (Figura 25 A).
- ✓ 2 cepas presentaron resistencia intermedia a eritromicina y fueron sensibles al resto de antibióticos MLS.

- ✓ 416 cepas fueron resistentes a eritromicina. De ellas, tan sólo el 1,2% (5 cepas) presentaron el fenotipo M de resistencia, caracterizado por resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina, espiramicina y virginiamicina (Figura 25 B). Las 411 cepas restantes mostraron un fenotipo de resistencia MLS<sub>B</sub>, caracterizado por resistencia a eritromicina, clindamicina, espiramicina y estreptogramina del grupo B. El 98,3% de estas cepas (407) presentaron fenotipo MLS<sub>B</sub> de carácter constitutivo (Figura 25 C) y el 1% (4 cepas), de carácter inducible.

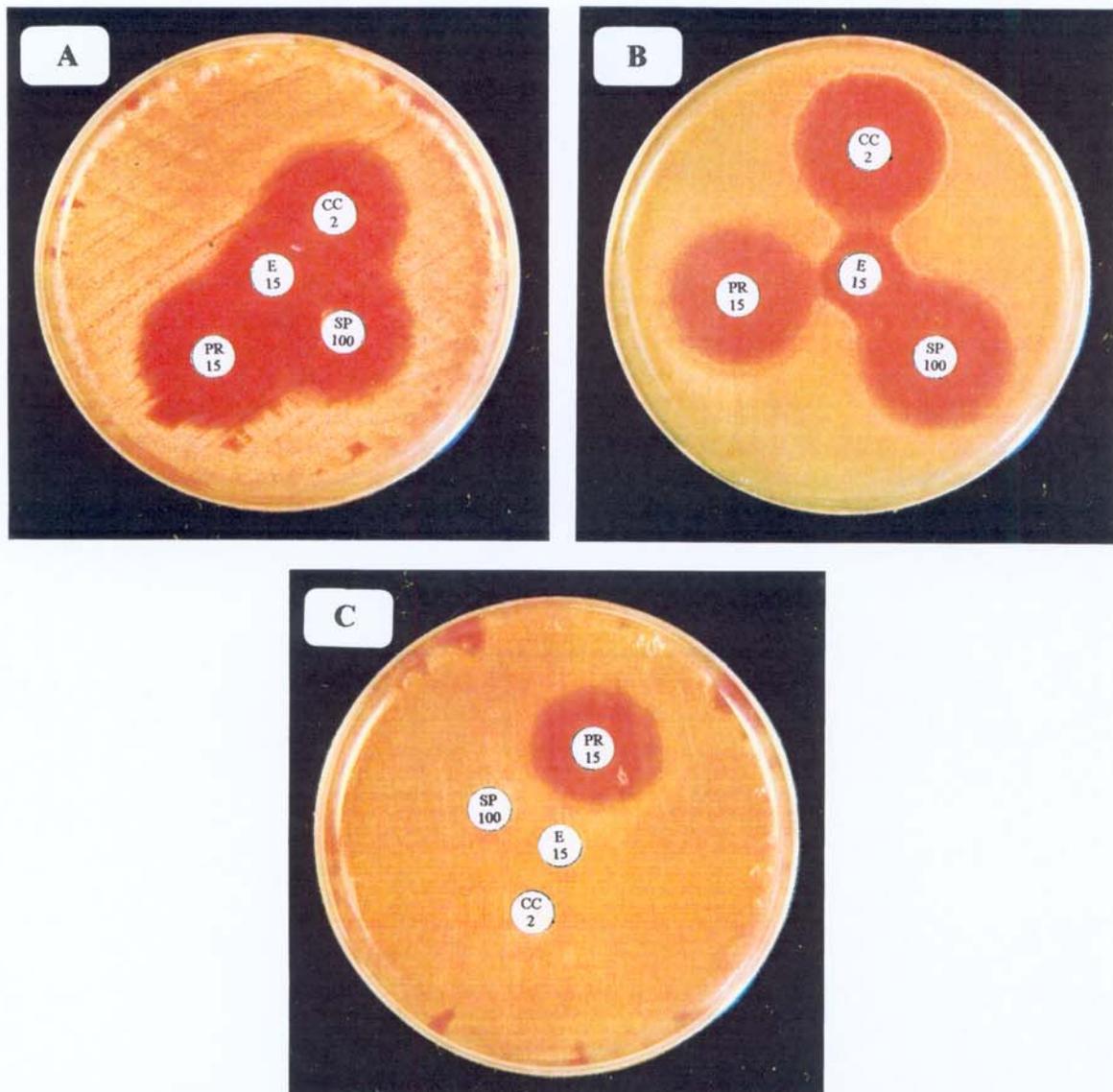


Figura 25.- Fenotipos MLS de cepas de *S. pneumoniae*: A) Sensible; B) M; C) MLS<sub>B</sub> constitutivo.

Los fenotipos de resistencia a antibióticos MLS de las cepas resistentes a eritromicina se representan en la tabla 40 y en la figura 26. Como se observa, las escasas cepas con fenotipo M se han detectado en diferentes años de muestreo.

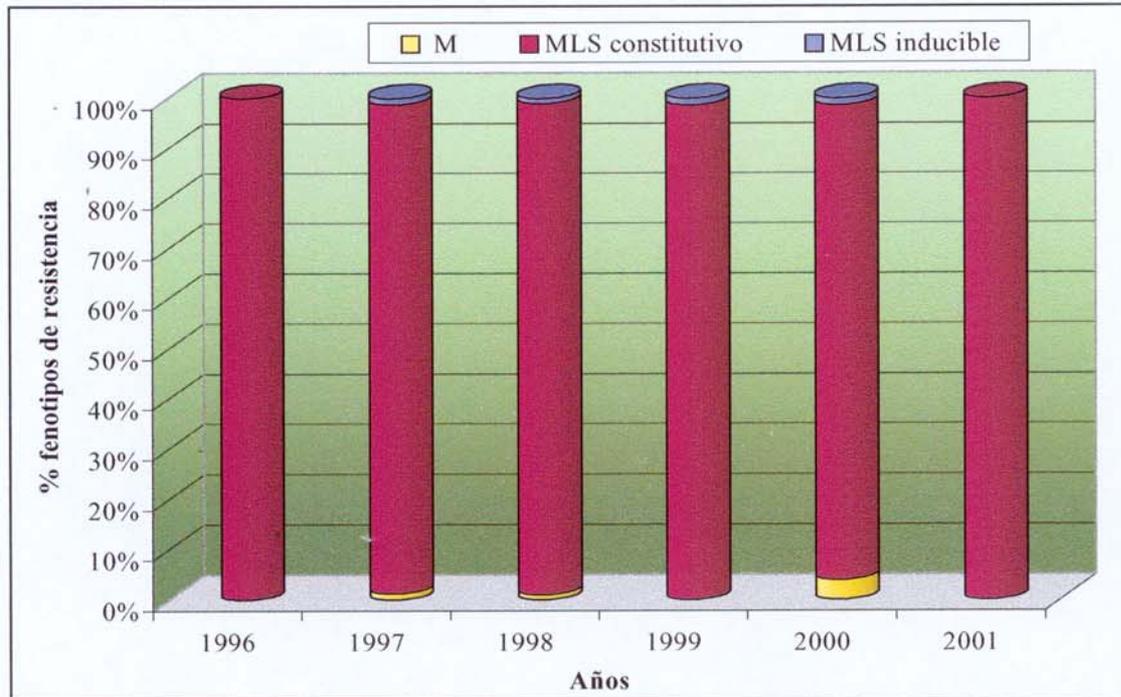


Figura 26.- Distribución anual (en %) de los distintos fenotipos de resistencia a antibióticos MLS en cepas de *S. pneumoniae* aisladas entre 1996 y 2001.

Tabla 40.- Fenotipos de resistencia a antibióticos MLS en las 416 cepas de *S. pneumoniae* Er<sup>R</sup> del estudio (1996 – 2001).

Año de aislamiento de cepas	Nº cepas	Fenotipo de resistencia
1996 (septiembre - diciembre)	29	MLS <sub>B</sub> c
1997	83	MLS <sub>B</sub> c
	1	MLS <sub>B</sub> i
	1	M
1998	94	MLS <sub>B</sub> c
	1	MLS <sub>B</sub> i
	1	M
1999	76	MLS <sub>B</sub> c
	1	MLS <sub>B</sub> i
2000	73	MLS <sub>B</sub> c
	1	MLS <sub>B</sub> i
	3	M
2001 (enero – octubre)	52	MLS <sub>B</sub> c

Con objeto de detectar la posible resistencia de *S. pneumoniae* a otros antimicrobianos como los aminoglucósidos, se eligieron al azar 11 cepas de entre todas las resistentes a eritromicina (10 con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo y 1 con fenotipo M) y se determinó la CMI a diferentes aminoglucósidos. Entre las cepas de *S. pneumoniae* con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo, 7 presentaron resistencia de alto nivel a estreptomina (>1000 µg/ml), y una de ellas presentó resistencia de alto nivel a kanamicina y estreptomina (>1000 µg/ml) y en este último caso, se detectó por PCR la presencia del gen *aph(3')*-III. En el resto de las cepas analizadas (2 con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo y 1 con fenotipo M), no se detectó resistencia de alto nivel a aminoglucósidos y los valores de CMI para gentamicina, kanamicina y estreptomina fueron ≤125 µg/ml.

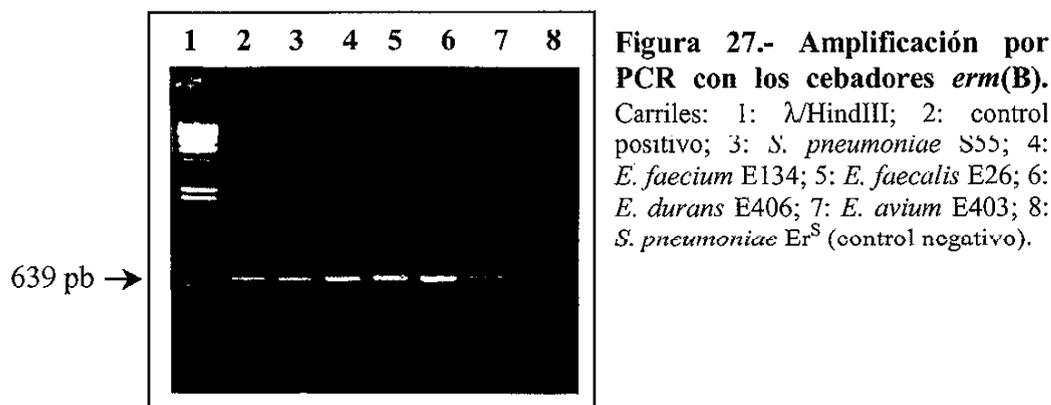
### 3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MLS

Se estudiaron los mecanismos de resistencia a antibióticos MLS en 137 cepas clínicas de *S. pneumoniae* de nuestra serie, aisladas entre septiembre de 1996 y diciembre de 1997 (49 Er<sup>R</sup> + 87 Er<sup>S</sup> + 1 Er<sup>I</sup>), a fin de detectar los genes de resistencia responsables de los fenotipos encontrados. Los resultados se encuentran detallados en la tabla 41. Se emplearon los cebadores *erm* degenerados, y los específicos *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* y *erm(TR)*. Se detectó mediante PCR la presencia de genes *erm* en 47 cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (CMI a eritromicina: 32 - >256 µg/ml) y en una cepa con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (CMI a eritromicina: >256 µg/ml). En todas las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo se amplificó el gen *erm(B)* (Figura 27) y en la cepa con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible fue detectado el gen *erm(TR)*. Este último dato se confirmó mediante *dot blotting*, empleando una sonda *erm(TR)* marcada con digoxigenina (Figura 12). Ninguna cepa de *S. pneumoniae* presentó simultáneamente dos determinantes *erm* de resistencia (Tabla 41). En lo que respecta a los genes de eflujo de macrólidos, cabe destacar que en una cepa con fenotipo M (CMI a eritromicina: 32 µg/ml) se detectó el gen *mef(E)*, al resultar positiva la amplificación con los cebadores *mef(A/E)* (Figura 13) y *mef(E)* y negativa para cualquiera de los genes *erm* analizados. Los genes *mef(A/E)* y *mef(E)* no se detectaron en las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub>.

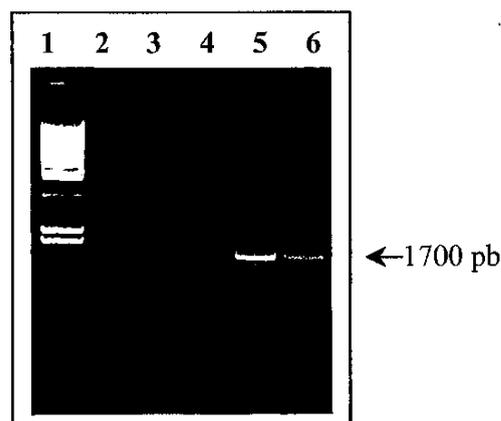
Tabla 41.- Sensibilidad a eritromicina (Er) y mecanismos de resistencia detectados en 137 aislados clínicos de *S. pneumoniae*.

Fenotipo de resistencia a eritromicina	N° de cepas	CMI a Er (µg/ml)	Amplificación por PCR									
			<i>erm</i> degenetados	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (TR)	<i>mef</i> (A/E)	<i>mef</i> (E)	<i>mst</i> (A)		
MLS <sub>B</sub> constitutivo	1	32	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	46	>256	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MLS <sub>B</sub> inducible	1	>256	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M	1	32	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Sensible - Intermedio	88	≤0,016 - 0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En ningún caso se detectó la presencia del gen *msr(A)* en *S. pneumoniae* (Tabla 41). Todas las PCRs fueron negativas en las cepas sensibles o con sensibilidad disminuida a eritromicina estudiadas (n=88).

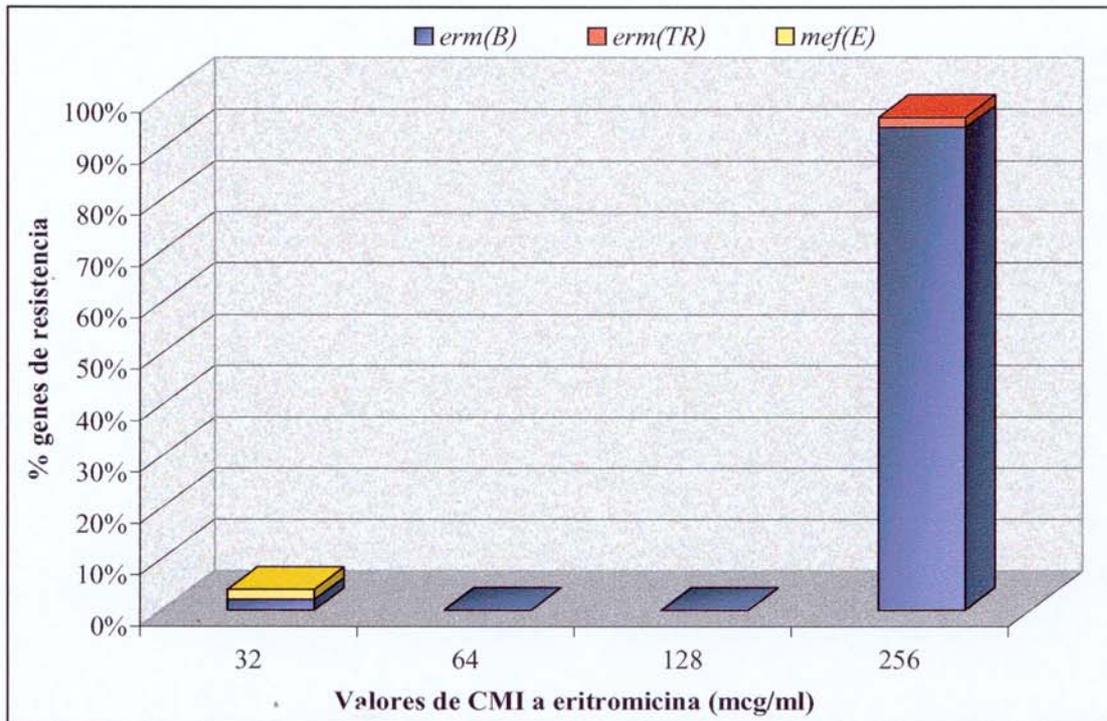


**Figura 28.- Amplificación por PCR con los cebadores *mef(E)*.** Carriles: 1:  $\lambda$ /HindIII; 2: *S. pneumoniae* S55 [con *erm(B)*] (control negativo); 3 y 4: controles negativos, sin ADN y sin cebadores, respectivamente; 5: control positivo; 6: *S. pneumoniae* S100.



En *S. pneumoniae* el fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo, mediado por el gen *erm(B)*, fue el más frecuente en nuestra área, aunque también se detectaron los genes *mef(E)* y *erm(TR)*, responsables del fenotipo M y MLS<sub>B</sub> inducible, respectivamente.

En la figura 29 se presentan los valores de CMI de las cepas Er<sup>R</sup> en relación con los genes de resistencia detectados.



**Figura 29.- Distribución de CMI (µg/ml) de 49 cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina y genes detectados mediante PCR.**

#### 4.- RESISTENCIA A PENICILINA Y CEFOTAXIMA

Se determinó la CMI a penicilina y cefotaxima mediante E-test en todas las cepas de *S. pneumoniae* del estudio. En la tabla 42 se presentan los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> obtenidos, así como los porcentajes de resistencia. El 4,9% de las cepas de *S. pneumoniae* fue resistente a penicilina (CMI<sub>50</sub> ≥ 2 µg/ml) y el 48,1% de las cepas presentó valores de CMI en el rango 0,125 – 1 µg/ml. Los valores de CMI a penicilina/cefotaxima fueron más elevados en las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina (CMI<sub>50</sub>: 0,38/0,25 µg/ml) que en las sensibles (CMI<sub>50</sub>: 0,016/0,012 µg/ml). Del mismo modo, se observó un mayor porcentaje de resistencia a penicilina en las cepas resistentes a eritromicina (7,7%) que en las sensibles (1,7%) (Tabla 42). Se detectó resistencia a cefotaxima (CMI: 1,5 - 2 µg/ml) en tres cepas (0,4%), dos de ellas aisladas en 1997 y 2001 de muestras del tracto respiratorio superior, y una obtenida de un bronco-aspirado en 1999. Todas procedían de pacientes en edad adulta (77 y 47 y 30 años, respectivamente) y presentaron a su vez resistencia a eritromicina (CMI > 256 µg/ml) y a penicilina (CMI: 1,5 - 2 µg/ml).

**Tabla 42.- Sensibilidad de 767 cepas clínicas de *S. pneumoniae* a penicilina y cefotaxima (expresada en µg/ml) mediante E-test.**

Antibióticos (µg/ml)	<i>S. pneumoniae</i> (n=767)	<i>S. pneumoniae</i> Er <sup>R</sup> (n=416)	<i>S. pneumoniae</i> Er <sup>S-I</sup> (n=351)
<b>Penicilina</b>			
Rango	0,002 – 3	0,003 – 3	0,002 – 2
CMI <sub>50</sub>	0,125	0,38	0,016
CMI <sub>90</sub>	1	1	0,5
% R (CMI≥2)	4,9%	7,7%	1,7%
% I (CMI: 0,125-1)	48,1%	69,9%	22,2%
<b>Cefotaxima</b>			
Rango	≤0,002 – 2	0,004 – 2	≤0,002 – 1
CMI <sub>50</sub>	0,125	0,25	0,012
CMI <sub>90</sub>	0,5	0,75	0,38
% R (CMI≥2)	0,4%	0,7%	0%
% I (CMI=1)	6,4%	9,9%	2,3%

#### 4.1- Evolución de la resistencia a penicilina y cefotaxima

La distribución de cepas de *S. pneumoniae* recogidas cada año en función de la resistencia a penicilina y cefotaxima se muestra en la tabla 43, así como en las figuras 30 - 33.

**Tabla 43.- Número de cepas de *S. pneumoniae* recogidas entre 1996 - 2001 y porcentaje de cepas resistentes a penicilina (Pn) y cefotaxima (Ctx) en función de los años de aislamiento.**

Año	Nº de cepas de <i>S. pneumoniae</i>				
	Total	Pn <sup>R</sup> (%)	Pn <sup>I</sup> (%)	Ctx <sup>R</sup> (%)	Ctx <sup>I</sup> (%)
1996 <sup>(a)</sup>	45	4 (8,9%)	23 (51,1%)	0	7 (15,6%)
1997	162	11 (6,8%)	86 (53,1%)	1 (0,6%)	17 (10,5%)
1998	164	1 (0,6%)	83 (50,6%)	0	6 (3,7%)
1999	138	12 (8,7%)	56 (40,6%)	1 (0,7%)	10 (7,3%)
2000	148	3 (2%)	75 (50,7%)	0	4 (2,7%)
2001 <sup>(b)</sup>	110	7 (6,4%)	46 (41,8%)	1 (0,9%)	5 (4,6%)
<b>1996-2001</b>	<b>767</b>	<b>38 (5%)</b>	<b>369 (48,1%)</b>	<b>3 (0,4%)</b>	<b>49 (6,4%)</b>

<sup>(a)</sup> septiembre-diciembre; <sup>(b)</sup> enero-octubre.

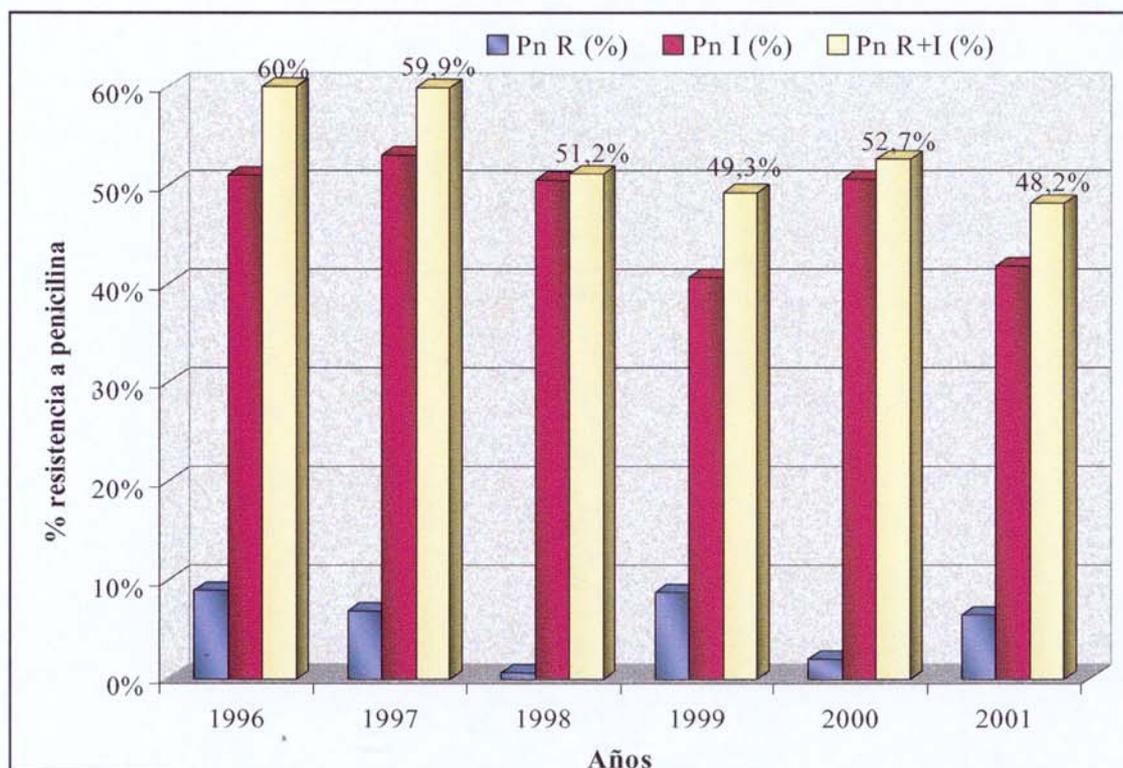


Figura 30.- Evolución de la resistencia a penicilina (Pn) en cepas de *S. pneumoniae* aisladas en la Rioja desde 1996 hasta 2001.

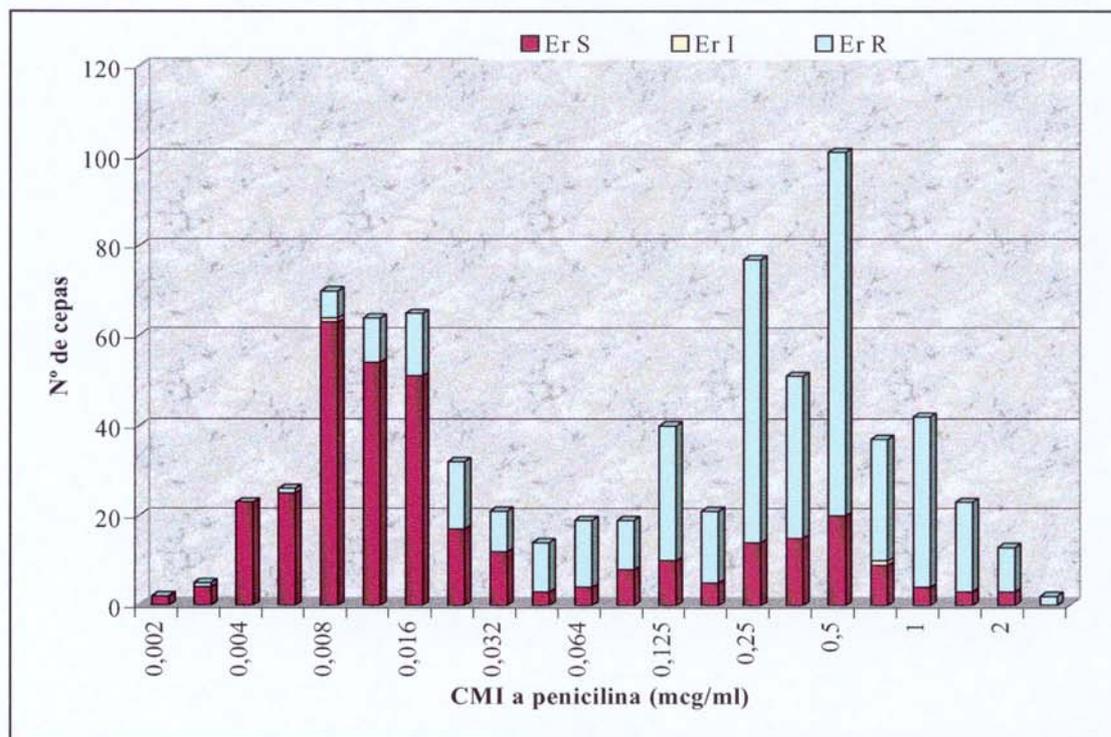


Figura 31.- Distribución de valores de CMI a penicilina ( $\mu\text{g/ml}$ ) en cepas de *S. pneumoniae* sensibles y resistentes a eritromicina (Er).

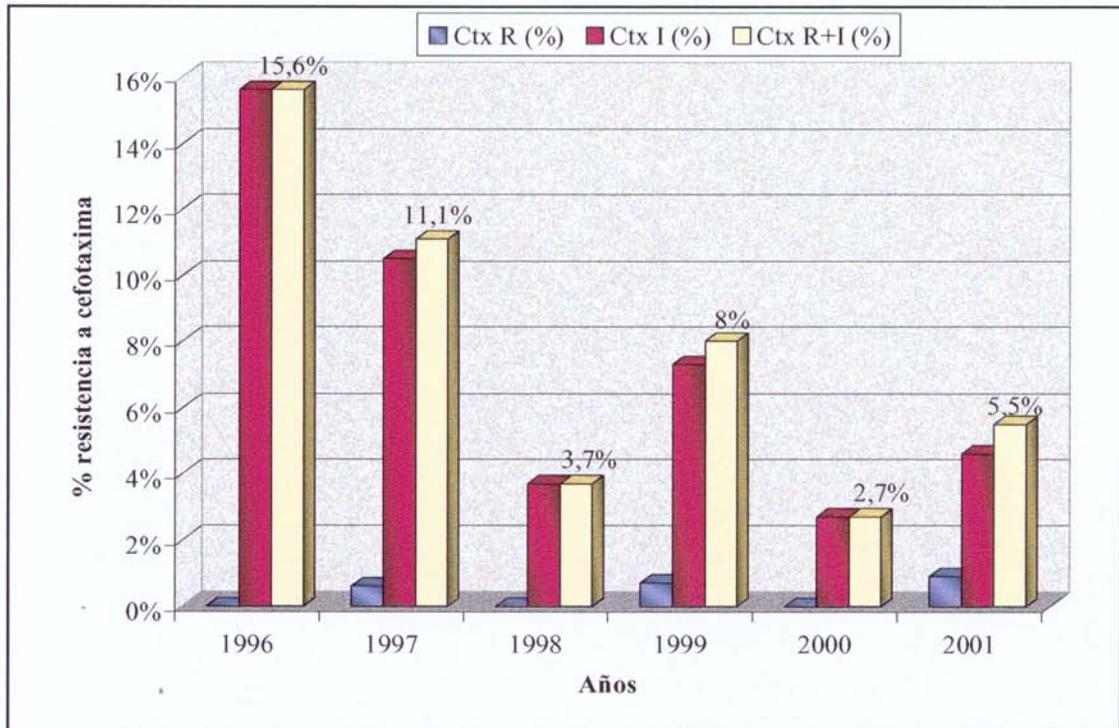


Figura 32.- Evolución de la resistencia a cefotaxima (Ctx) en cepas de *S. pneumoniae* aisladas en La Rioja desde 1996 a 2001.

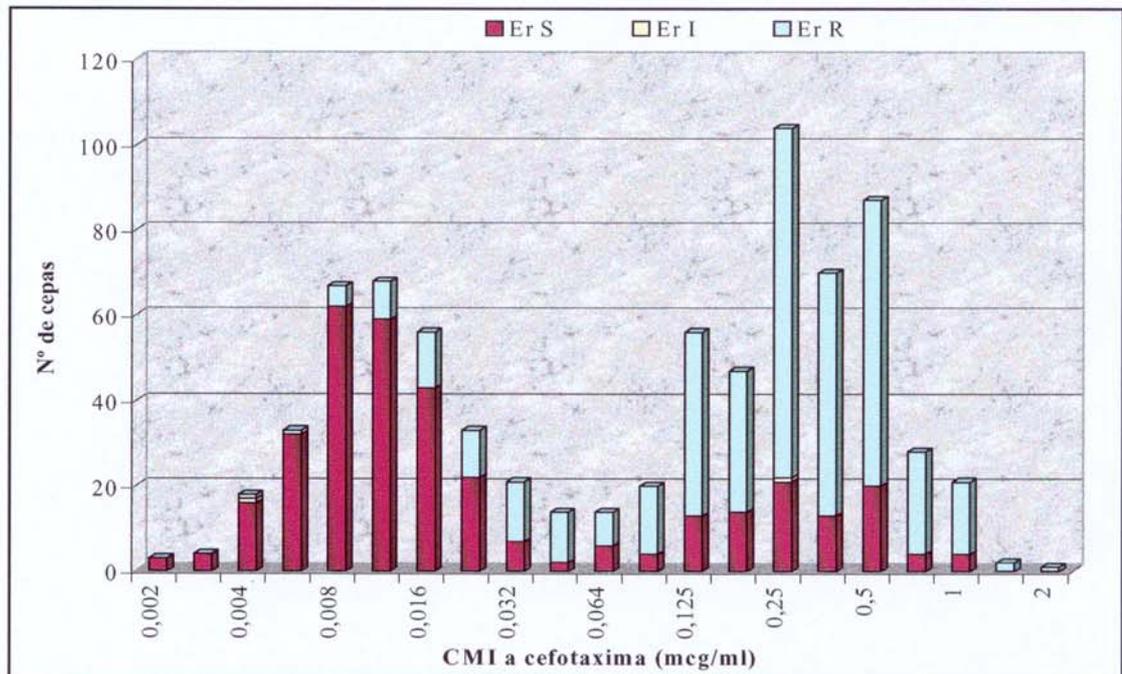


Figura 33.- Distribución de valores de CMI a cefotaxima ( $\mu\text{g/ml}$ ) en cepas de *S. pneumoniae* sensibles y resistentes a eritromicina (Er).

Desde el comienzo de la recogida de muestras hasta la actualidad, los niveles de resistencia a penicilina en *S. pneumoniae* han experimentado altibajos (desde un 8,9% de cepas resistentes en el último trimestre de 1996 hasta un 6,4% en el año 2001, pasando por un 0,6% en 1998), mientras que la resistencia a cefotaxima es prácticamente nula en el mismo periodo (0,4%).

## *Enterococcus* spp.

### 1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MLS

Los antibióticos MLS pueden constituir una terapia alternativa para el tratamiento de infecciones por enterococos. Por este motivo, y con objeto de determinar los genes relacionados con la resistencia a antibióticos MLS en el género *Enterococcus*, se seleccionaron una serie de cepas de distintas especies de este género bacteriano, tanto sensibles como resistentes a eritromicina. En la tabla 44 se muestra la serie de cepas incluidas en este estudio y su procedencia. La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas (API 20 STREP) y moleculares (PCRs especie-específicas) (Tabla 13).

**Tabla 44.- Procedencia de las distintas especies de *Enterococcus* spp. del estudio de genes de resistencia a antibióticos MLS.**

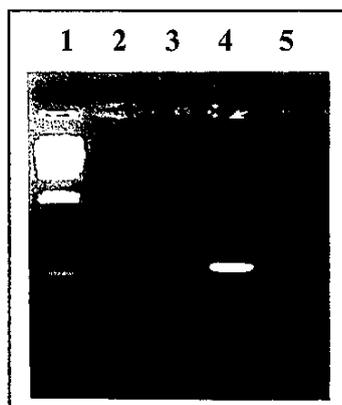
Cepas	Nº de cepas (n=78)	Procedencia
<i>E. faecalis</i>	27	Hospital San Millán
<i>E. faecium</i>	21	Hospital San Millán
	2	Origen animal
<i>E. durans</i>	8	Hospital San Millán
<i>E. avium</i>	6	Hospital San Millán
<i>E. hirae</i>	8	Origen animal
	1	CECT 302
<i>E. gallinarum</i>	2	Origen animal
	1	CECT 970
<i>E. casseliflavus</i>	1	Hospital San Millán
	1	CECT 969

Se procedió a la determinación de la CMI mediante dilución en agar para los antibióticos eritromicina, azitromicina, espiramicina y pristinamicina I, y se estudió por PCR la presencia de los genes de resistencia a antibióticos MLS: *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *mef(A/E)* y *msr(A)*. En la tabla 45 se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, 40 cepas de *Enterococcus* presentaron un fenotipo de alta resistencia a eritromicina (CMI >128 µg/ml), 9 cepas presentaron un

fenotipo de baja resistencia (CMI: 8-32  $\mu\text{g/ml}$ ), y las 29 cepas restantes de la colección presentaron una CMI a eritromicina en el rango  $\leq 0,125-4 \mu\text{g/ml}$  (categoría sensible e intermedia, según criterio del NCCLS).

### 1.1 Detección de genes *erm*

Independientemente de la especie analizada, las 40 cepas de la serie con alto nivel de resistencia a eritromicina (CMI  $>128 \mu\text{g/ml}$ ) presentaron a su vez valores de CMI para azitromicina, espiramicina y pristinamicina I de  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$  (Tabla 45), y en todas ellas se detectó la presencia de un determinante *erm* de resistencia. En 39 de éstas (12 *E. faecium*, 14 *E. faecalis*, 2 *E. durans*, 2 *E. avium*, 8 *E. hirae* y 1 *E. gallinarum*) se detectó el gen *erm(B)* (Figura 27). La cepa restante de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a eritromicina poseía el gen *erm(A)* (Figura 34 y tabla 45). Dicho amplicón *erm(A)* fue secuenciado y se encontró una identidad del 100% con el gen *erm(A)* descrito previamente para *Staphylococcus aureus*. Según nuestro conocimiento, éste fue el primer caso en el que el gen *erm(A)* fue encontrado en el género *Enterococcus*.



**Figura 34.- Amplificación por PCR con los cebadores *erm(A)*.** Carriles: 1:  $\lambda$ HindIII; 2: *E. faecium* E134 [con *erm(B)*]; 3: *E. faecalis* E53 Er<sup>B</sup>; 4: *E. faecium* E307; 5: control negativo sin ADN.

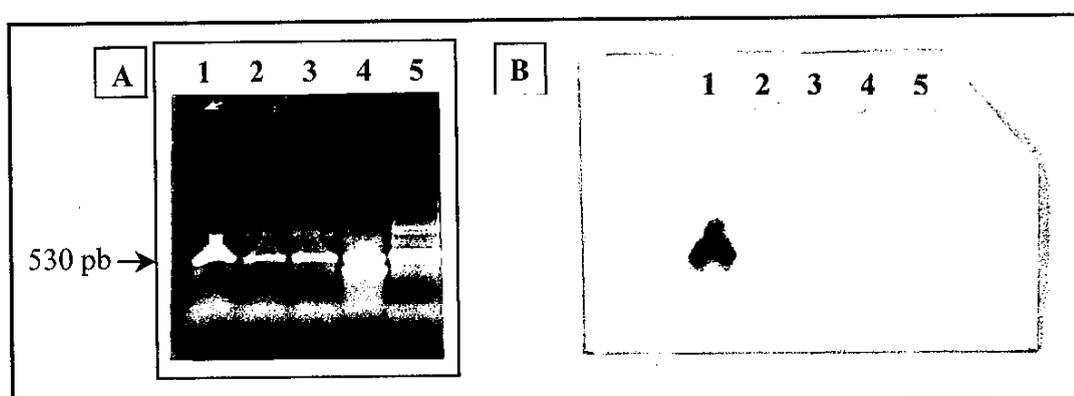
En las cepas de enterococos con CMI a eritromicina  $\leq 32 \mu\text{g/ml}$  (10 *E. faecium*, 13 *E. faecalis*, 6 *E. durans*, 4 *E. avium*, 1 *E. hirae*, 2 *E. gallinarum* y 2 *E. casseliflavus*) no se encontraron determinantes *erm* de resistencia, al emplear los cebadores diseñados para la amplificación específica de los genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* y los cebadores degenerados para genes *erm*. Asimismo, se investigó mediante PCR la presencia del gen *erm(TR)* en las 78 cepas. En 19 cepas con

Tabla 45.- Genes de resistencia a macrólidos en cepas de *Enterococcus* sp. con diferentes fenotipos de resistencia MLS.

Especies de <i>Enterococcus</i>	N° de cepas (n=78)	Rango de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>				Amplificación por PCR						
		Er	Az	Sp	Pr I	<i>mst</i> (A)	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (C)	<i>mef</i> (A/E)	<i>ereA</i> , <i>ereB</i>	<i>mphA</i> , <i>mphB</i> , <i>mphC</i>
<i>E. faecium</i>	12	>128	>128	64 - >128	64 - >128	+	-	-	-	-	-(1)	-(1)
	1	>128	>128	>128	>128	+	+	-	-	-	ND	ND
	1	32	64	0,5	1	+	-	-	-	<sup>b</sup>	-	-
	9	$\leq 0,125 - 16$	$\leq 0,125 - 64$	0,5 - 4	1 - 2	+	-	-	-	-	-(4)	-(4)
<i>E. faecalis</i>	14	>128	>128	>128	64 - >128	-	-	+	-	-	-(1)	-(1)
	13	$\leq 0,125 - 8$	$\leq 0,125 - 32$	$\leq 0,25 - 2$	1 - 4	-	-	-	-	-	-(2)	-(2)
<i>E. dirans</i>	2	>128	>128	>128	$\geq 128$	-	-	+	-	-	-(1)	-(1)
	6	$\leq 0,125 - 0,25$	$\leq 0,125$	0,25 - 2	$\leq 0,125 - 1$	-	-	-	-	-	-(1)	-(1)
<i>E. avium</i>	2	>128	>128	>128	$\geq 128$	-	-	+	-	-	-(1)	-(1)
	4	0,25 - 16	2 - 64	1 - 4	0,5 - 2	-	-	-	-	-	-(3)	-(3)
<i>E. hirae</i>	8	>128	>128	>128	4 - 16	-	-	+	-	-	-(1)	-(1)
	1	$\leq 0,5$	0,5	4	1	-	-	-	-	-	ND	ND
<i>E. gallinarum</i>	1	>128	>128	>128	>128	-	-	+	-	-	-	-
	2	$\leq 0,5 - 1$	2	4	1	-	-	-	-	-	-(1)	-(1)
<i>E. casseliflavus</i>	2	4	32	1	2 - 4	-	-	-	-	-	-(1)	-(1)

<sup>a</sup> Er: eritromicina, Az: azitromicina, Sp: espiamicina, Pr I: pristinamicina I. <sup>b</sup> Se obtuvo un producto de PCR de 450 pb, superior al esperado. ( ): n° cepas. ND: no determinado.

distintos niveles de resistencia a eritromicina (7 *E. faecium*, 4 *E. faecalis*, 4 *E. avium*, 3 *E. durans* y 1 *E. gallinarum*), al emplear los cebadores específicos del gen *erm*(TR), se obtuvieron varios fragmentos inespecíficos de amplificación de ADN, algunos de ellos de tamaño similar al esperado (figura 35 A). Por este motivo, se analizó la homología de dichos amplicones con el gen *erm*(TR) mediante *southern blotting* a una temperatura de 50°C. Se utilizó una sonda específica *erm*(TR), procedente de la cepa de SGG S211 de la colección de la Universidad de La Rioja. En condiciones en las que el control positivo dio una señal intensa de hibridación, ninguno de estos amplicones hibridó con la sonda (Figura 35 B). Estos resultados indican que, a pesar de los análisis de PCR, las cepas de enterococos no contenían secuencias homólogas a la del gen *erm*(TR).



**Figura 35.- A) Amplificación por PCR con los cebadores *erm*(TR). Carriles: 1: SGG S211 (control positivo); 2: *E. avium* E401 (Er<sup>I</sup>); 3: *E. faecium* E413 (Er<sup>R</sup>); 4: *E. avium* E402 (Er<sup>R</sup>); 5: *E. faecalis* E6 (Er<sup>K</sup>). B) *Southern blotting* del gel correspondiente con una sonda *erm*(TR) marcada con digoxigenina.**

### 1.2. Detección de genes relacionados con inactivación de macrólidos

Tras el análisis de los genes *erm*, se procedió a analizar en las cepas de enterococos la posible presencia de un mecanismo de resistencia mediante inactivación de eritromicina. Para ello, se seleccionaron 19 cepas de *Enterococcus* de las 7 especies distintas estudiadas y con distintos fenotipos de resistencia a eritromicina, y se llevó a cabo el análisis por PCR de tres genes que codifican fosforilasas de macrólidos: *mph*(A), *mph*(B) y *mph*(C), y de dos genes codificantes de esterases de macrólidos: *ere*(A) y *ere*(B). No se detectó la presencia de estos genes en ninguna de las cepas estudiadas (Tabla 45).

En las 19 cepas anteriores, se amplió el estudio de dicho mecanismo mediante un bioensayo de inactivación (test de Gots), siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos. Los resultados se presentan en la tabla 46.

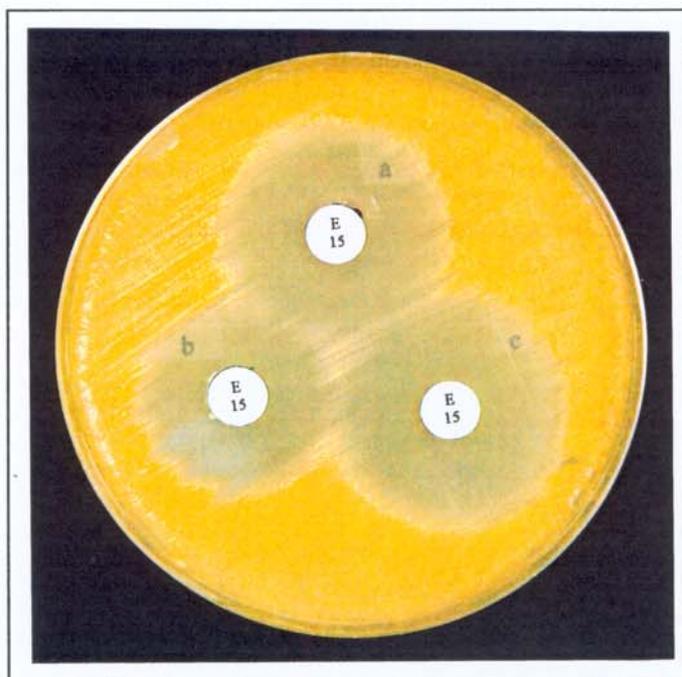
**Tabla 46.- Resultados de los halos de inhibición de *Micrococcus luteus* para eritromicina en presencia del sobrenadante de 19 cepas de *Enterococcus* spp.**

Cepas de enterococos <sup>a</sup>	CMI a Er de enterococos (µg/ml)	Halos de inhibición de <i>M. luteus</i> (en mm)
--- (control negativo) <sup>b</sup>	---	35
<i>E. faecium</i> E413	>128	30
<i>E. faecium</i> E136	32	30
<i>E. faecium</i> E209	16	30
<i>E. faecium</i> E289	8	30
<i>E. faecium</i> AR10	0,5	35
<i>E. faecium</i> E415	≤0,125	34
<i>E. faecalis</i> E6	>128	29
<i>E. faecalis</i> E170	8	31
<i>E. faecalis</i> E102	≤0,125	33
<i>E. durans</i> E406	>128	26
<i>E. durans</i> E407	≤0,125	30
<i>E. avium</i> F402	>128	30
<i>E. avium</i> E400	8	30
<i>E. avium</i> E401	4	26
<i>E. avium</i> E405	0,25	29
<i>E. hirae</i> P9	>128	30
<i>E. gallinarum</i> AR45	>128	27
<i>E. gallinarum</i> AR78	≤0,5	29
<i>E. casseliflavus</i> c85	4	32

<sup>(a)</sup> cepas de *Enterococcus* cuyos sobrenadantes se añaden a discos de Er; <sup>(b)</sup> disco de Er sin sobrenadante.

De este modo, se pretendía observar si la adición del sobrenadante de un cultivo de *Enterococcus* sobre un disco de Er provocaba una disminución en los halos de inhibición de un cultivo de *M. luteus*. Para ello, se compararon los halos de inhibición obtenidos con Er y con Er + sobrenadante de cada uno de los aislados de enterococos. No se observaron diferencias significativas al medir los halos de *M. luteus* para eritromicina en presencia del sobrenadante de las cepas sensibles, como *E. faecium* AR10 (35 mm), o resistentes, como *E. faecium* E413 (30 mm), ni tampoco al compararlos bajo las mismas condiciones con los halos de *M. luteus* en

presencia de eritromicina sin crecimiento previo de enterococos (35mm) (Tabla 46 y figura 36).



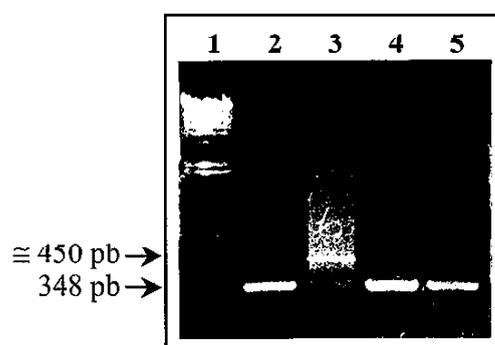
**Figura 36.- *Micrococcus luteus* sensible a Er y ensayo de inactivación de Er con sobrenadante de *Enterococcus*.** a) sobrenadante de *E. faecium* AR10 ( $Er^S$ ); b) sobrenadante de *E. faecium* E413 ( $Er^R$ ); c) control negativo sin sobrenadante de enterococos en el disco de Er.

Posteriormente, la Dra. Lillian Wondrack, de los laboratorios *Pfizer Global Research and Development* en Connecticut, llevó a cabo en las cepas *E. faecium* E136 y *E. faecium* AR10, ensayos de inactivación con eritromicina marcada radioactivamente y los resultados obtenidos fueron también negativos (comunicación personal de la Dra. Lillian Wondrack). Por tanto, se puede concluir que las cepas de *Enterococcus* analizadas no expresan un mecanismo detectable de inactivación a eritromicina.

### 1.3. Detección de genes relacionados con bombas de eflujo de macrólidos

Por otro lado, la presencia de genes de eflujo de eritromicina en *Enterococcus* se analizó también mediante PCR, utilizando los cebadores específicos para los genes *mef(A)* y *mef(E)* (Tabla 45). No se detectó amplificación específica de estos genes en

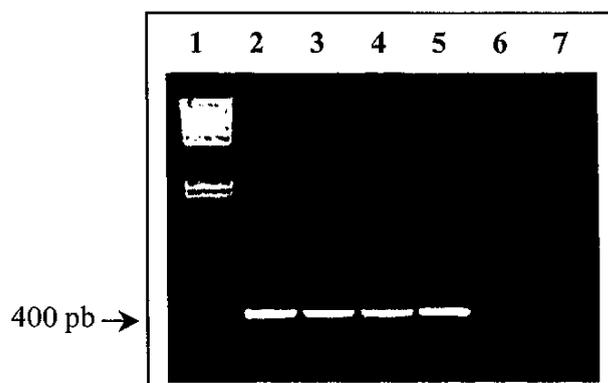
ninguna de las 78 cepas del estudio. En la cepa *E. faecium* E136 que, curiosamente, fue la única que presentó una CMI a eritromicina de 32 µg/ml, se amplificó un producto de PCR de tamaño superior al esperado ( $\cong$  450 pb frente a las 348 pb esperadas) (Figura 37) y se analizó su homología mediante *southern blotting* a 50°C con una sonda específica *mef*( $\Lambda$ ), obtenida de la cepa de *S. pyogenes* S2 de la colección de la Universidad de La Rioja. Los resultados obtenidos mediante PCR e hibridación llevaron a pensar en una posible relación de esta secuencia con el gen *mef*. Se realizaron varios intentos infructuosos de secuenciación del amplicón de 450 pb, pero la poca nitidez de la banda no permitió la asignación de una secuencia.



**Figura 37.- Amplificación por PCR con los cebadores *mef*(A/E).**

Carriles: 1:  $\lambda$ /HindIII; 2: *S. pyogenes* S2 (control positivo); 3: *E. faecium* E136; 4: *S. pyogenes* S1, 5: *S. pneumoniae* S100.

Posteriormente, se realizaron análisis para la detección del gen *msr*(A) en las 78 cepas de *Enterococcus* y se obtuvieron resultados inesperados. Con los cebadores específicos de *msr*(A), todas las cepas de *E. faecium* estudiadas, independientemente de su fenotipo de resistencia a antibióticos MLS, dieron lugar a un producto de PCR del tamaño esperado que en un primer momento, sin conocer aún su secuencia, se denominó *msr*(A)-like (Figura 38). En cambio, este gen no se encontró en ninguna de las cepas de las otras seis especies de *Enterococcus* analizadas (Tabla 45).



**Figura 38.- Amplificación por PCR con los cebadores *msr*(A).**

Carriles: 1:  $\lambda$ /HindIII; 2: control positivo; 3: *E. faecium* E134; 4: *E. faecium* E136; 5: *E. faecium* AR10; 6 y 7: controles negativos, sin cebadores y sin ADN, respectivamente.

Por hibridación en *dot blotting* a 50°C de temperatura se encontraron resultados similares al utilizar como sonda el fragmento de amplificación *msr(A)*-like de la cepa de *E. faecium* E134: la hibridación fue positiva para todas las cepas analizadas de la especie *E. faecium* y negativa para las cepas del resto de especies de *Enterococcus*.

## 2. GEN *msrC*

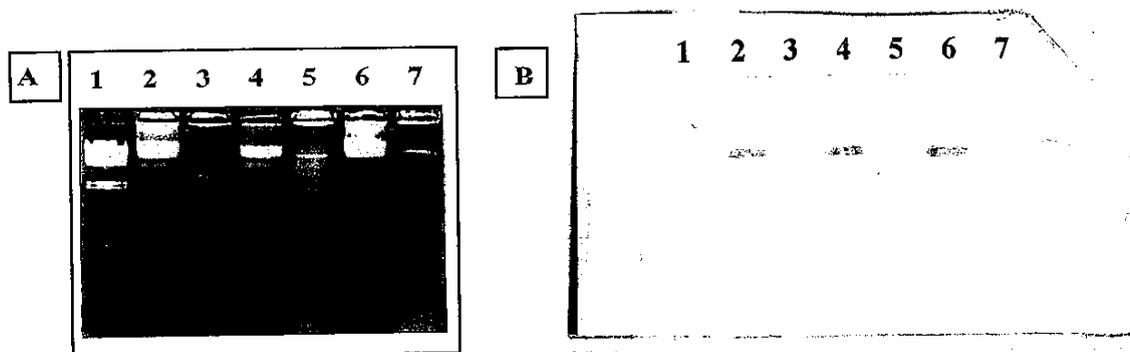
### 2.1 Caracterización del gen *msrC*

Ante estos sorprendentes resultados, se seleccionaron tres cepas de *E. faecium* representantes de los tres niveles de resistencia a eritromicina en esta especie: *E. faecium* AR10 (CMI=0,5 µg/ml), *E. faecium* E136 (CMI=32 µg/ml) y *E. faecium* E134 (CMI>128 µg/ml), y se secuenciaron los fragmentos de PCR *msr(A)*-like obtenidos en estas tres cepas. Curiosamente, la secuencia de los tres fragmentos de 405 pb resultó ser idéntica. Sin embargo, al compararla con la secuencia original de *msr(A)* descrita en *Staphylococcus epidermidis* (Ross *et al.*, 1990), sí aparecieron diferencias. Considerando la secuencia de ADN, el nuevo gen mostró un 62% de identidad con *msr(A)*, y una similitud del 72% al comparar la secuencia proteica, con una superposición de 135 aminoácidos. Fue entonces cuando decidimos designar este nuevo gen como *msrC* (número de acceso de GenBank: AJ243209), al estar ya descritos previamente en la literatura los genes *msr(A)* y *msr(B)* (Milton *et al.*, 1992) en el género *Staphylococcus*. La homología fue extremadamente alta para las regiones que contenían los motivos de unión de nucleótidos y la secuencia señal incluida en el dominio transportador ABC, descrita para otros determinantes de eflujo MLS de bacterias Gram-positivas (eritromicina, tilosina, carbomicina, pristinamicina y virginamicina). Este análisis sugirió que el gen *msrC* pertenecía a una familia de genes de bombas de eflujo.

La figura 39 muestra los motivos de unión de nucleótidos del gen *msrC*: el motivo A, que corresponde al lazo P, y el motivo B que, junto con la secuencia señal para esta clase de transportadores ABC, se localiza entre los motivos A y B del centro de unión de ATP.



plasmídico, lo que indica que este gen *msrC* es ubicuo y se localiza en el cromosoma de *E. faecium*. La presencia del citado determinante, que codifica una bomba de eflujo de la familia de los transportadores ABC en *E. faecium*, indica que no se ha adquirido como respuesta a la presión selectiva de antibiótico, sino que es un gen intrínseco que puede constituir una ventaja para la especie.



**Figura 40.- A) Extracción de ADN de *Enterococcus* (genómico y plasmídico, respectivamente). Carriles 1:  $\lambda$ HindIII; 2 y 3: *E. faecium* E134; 4 y 5: *E. faecium* E136; 6 y 7: *E. faecium* AR10. B) *Southern blotting* del gel mostrado con una sonda *msrC* marcada con digoxigenina.**

Mediante una estancia en el Centro Nacional de Biotecnología de Madrid y con la ayuda del Dr. José Luis Martínez, se llevaron a cabo unos ensayos preliminares de acumulación de eritromicina en *E. faecium*. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la presencia de algún tipo de bomba de eflujo del antibiótico, tanto en la cepa de baja resistencia *E. faecium* E136 como en la sensible *E. faecium* AR10. Ante estos resultados, surgió la posibilidad de continuar la caracterización molecular del gen *msrC* en los Laboratorios de *Pfizer Global Research and Development* en Groton (Connecticut, USA), bajo la supervisión de la Dra. Joyce A. Sutcliffe. Una vez allí, se buscaron mutaciones puntuales en la secuencia del gen *msrC*, incluyendo una región (350pb) “aguas arriba” de la región codificante, que pudieran explicar los niveles variables de resistencia a eritromicina entre las cepas de *E. faecium*. Inicialmente, nuestro estudio se centró en las cepas *E. faecium* E136 y *E. faecium* AR10, teniendo en cuenta que ninguna de estas dos cepas portaba determinantes de resistencia a eritromicina conocidos. Por otra parte, George Weinstock, un investigador del *Baylor College of Medicine* (USA), estaba secuenciando el genoma

completo de *E. faecium* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbial/efaecium/>), en colaboración con el Ministerio de Defensa. La secuencia de un fragmento de ADN (no publicada en aquel momento) que incluía el gen *msrC*, fue extraída de dicha secuencia incompleta y aún sin descifrar. A partir de ella, diseñamos varias parejas de cebadores de PCR para amplificar específicamente la región codificante del gen *msrC*, así como la región reguladora completa y la secuencia del promotor. Los 11 cebadores diseñados aparecen sombreados en la secuencia de *E. faecium* (Figura 41).

Para optimizar las condiciones de PCR se realizaron pruebas con distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (1, 2, 3, 4 y 6 mM), distintas temperaturas de hibridación, así como diferentes concentraciones de ADN molde. Los cebadores *msrC*-1 y *msrC*-5 amplificaron la región estructural del gen *msrC*, dando lugar a un amplicón de 1566 pb (Tabla 15); la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> fue 3mM. De esta forma se secuenció (por duplicado) la región codificante de la cepa de *E. faecium* AR10.

Con los cebadores *msrC*-9 y *msrC*-5 se obtuvo un producto de PCR de 1916 pb, que incluía la región codificante de *msrC* y 350 pb más en el extremo 5' del gen (región reguladora y promotor) (Tabla 15). Para garantizar una secuenciación más precisa y dado el tamaño relativamente grande del producto de amplificación, se utilizó como enzima polimerasa la elongasa (Life Technologies) que, a diferencia de la Taq polimerasa empleada habitualmente, es capaz de corregir errores en la incorporación de nucleótidos. Los productos de PCR obtenidos por duplicado para las tres cepas de *E. faecium* en estudio (AR10, E136 y E134) fueron purificados y secuenciados. Curiosamente, y en contra de lo que se pensó en un principio, no se detectaron diferencias en la región reguladora de *msrC* entre estas tres cepas. La región codificante, de 1479 pb, fue idéntica para la cepa intermedia (*E. faecium* E136) y la de alta resistencia a eritromicina (*E. faecium* E134). En cambio, al comparar la secuencia proteica (492 aminoácidos) de la cepa sensible *E. faecium* AR10 con la de la cepa *E. faecium* E136 (y también con la de *E. faecium* E134), se encontraron dos mutaciones, en las posiciones 167 y 398: treonina→serina y valina→fenilalanina, respectivamente (Figura 42). Por otra parte, la secuencia codificante del gen *msrC* de nuestras cepas (1479 pb) mostró un 53% de identidad con *msr(A)* (1467 pb) y a su vez, la proteína MsrC mostró un 54,6% de similitud con Msr(A) (488 aminoácidos). Además, el contenido en C-G del gen *msrC* fue del 37%.

```

1 aaacaaatcc aattaccaga aacatttaac ttacataaaa accattatat tcaattatt
61 attttatcaa taggaaaagc ggtagaagaa ggttacgagt ctggtcggtt agcaccagaa
121 msrC-9 aagatcaacta cgttcgaata aaaggttttc agttactatt cagtagctat tgettttttt
181 gaatcgtgtg tggtaaccta ataaaaaagg aggtcggaaa aatgactgca tcatgaaat
241 tacgtttcga acttttgaat aacaactaaa taaattcaaa agacatgtat aaacaacaat
301 ttcattgatg gagtatgtcc attttttcga acgacagtag aataggtgaa agctatgaca
361 gatttggatg ttttagtcata gttatttcgt tcagagtagg aaaagatgtg atgcagtttt
421 tttgcaaaca gattttttct ctctttttta gtatogataa tttgttgttt msrC-1 tacatgaaat
481 msrC-11 aggagtgtaa aacatattga aattttttagc gtaactatca caaatotaca agteagettt
541 ggcaaccagc tagaactatc tattgattct ctctgtgtct atcagcaaga tcatataggg
601 atcataggag aaaatggtgt cggtaaatcg actttgctca aactaatagc cggatgaactt
661 tttcccgatc atgggaaaat ccaaacagag atcaccttca actacctgcc tcaattaacc
721 tatctcgtcg aagcaaagga cctaaatttg gaattagcca gtcatttcca gttaaagactg
781 gaagaaactt cagagcggaa atggagcggg ggggaagaac gaaagatcga gttgatcgt
841 msrC-2 ctcttttctt cttagaaca agggatgctt cttagcagc caacaacca tctagataga
901 msrC-8 aaaagtattg atcgactgat tgaagagctt cgttattatt atggtagcct ggtttttgtt
961 agtcatgacg gctattttct agatgagcta gcacgaaaa tctgggaagt aaaagacgga
1021 gaaatccgag agttttcggg gaattatagt gctatctca ctcaaaagga attggagaaa
1081 aagactcagc tacgagaagc agagtcgatc atgaaagaga aaaaacgatt gaaaaaatcg
1141 atccaagaaa agaaaaaaca agcggaaaag ttggaaaaag tgtccagtaa aaagaaaaag
1201 caacaaatca gaccggatcg gttgtcttcc tctaaacaaa aagacagtgt msrC-3 acaaaaagcc
1261 msrC-7 atcaaaaaga atgcaaaaac attagagaga agactccaaa caataggaga acaaaccaag
1321 ccgcagcaga tgaacaaaat cgtttttcca gtacaaaat ctcttgaact ccacagccgc
1381 tatccatca tgggacaaaa tgtccaattg gaaagaagtg ggagaacatt actggtaat
1441 ggtgatttcc agttttcttt aggtaaaaaa atcgcgattg tccgtgaaaa tggttcaggt
1501 aagacaacct tattggaaca tatccgcaa caaggagaag gaatccttct ctctccgaaa
1561 gtaagcttcc aagtctatca gcaaaaaggat msrC-4 tatcaaatga catctgaaga atccgtcatt
1621 cgttttgta tgagacaaac agagttttca gaatcgcttg tccgcagttt gctgaatcac
1681 msrC-6 ttagggtttg ctacggaaac tttgacgaaa ccgttgtgta cgttaagtgg gggagaagcg
1741 acccglltga tgaltyctt gcttttact aagccaagta atgtyltyct yllagalyaa
1801 ccgactaatt tcattgatat ggcaacgac gaagctttag agaagctgat gcaagtatat
1861 ccgggaacga ttttgtttac ttctcatgat tcttactttg tcgagcgtac ggtgatgaa
1921 msrC-10 gtttatgaaa taaaaggca gaaaataaaa aaagtaacta cgagaaattt ttaaagtgc
1981 msrC-5 tacgatgatt ttcgtgaca atttaagga ggggtacaga ttgctacaa ataa

```

Figura 41.- Secuencia de *E. faecium* a partir de la cual se diseñaron los cebadores de *msrC*. (Los cebadores *msrC*-11, *msrC*-2, *msrC*-3, *msrC*-4, *msrC*-6, *msrC*-7, *msrC*-8 y *msrC*-10 se emplearon como cebadores internos para la secuenciación).

AR10	MENLAVNITNLQVSFGNQLELSIDSLRVYQQDRIGIIGENGVGKSTLL
E136	MENLAVNITNLQVSFGNQLELSIDSLRVYQQDRIGIIGENGVGKSTLL
AR10	KLIAGELFPDHGKIQTEITFNYPQLTYLAEAKDLNLELASHFQLRLE
E136	KLIAGELFPDHGKIQTEITFNYPQLTYLAEAKDLNLELASHFQLRLE
AR10	ETSERKWSGGEERKIELIRLLSSYEQGMLLDEPTTHLDRKSIDRLIEE
E136	ETSERKWSGGEERKIELIRLLSSYEQGMLLDEPTTHLDRKSIDRLIEE
AR10	LRYYYGTLVVFVSHDRYFLDELA <b>T</b> KIWEVKDGEIREFSGNYSAYLTQ
E136	LRYYYGTLVVFVSHDRYFLDELA <b>S</b> KIWEVKDGEIREFSGNYSAYLTQ
AR10	KELEKKTQLREAESIMKEKKRLEKSIQEKKKQAEKLEKVSSKKKKQ
E136	KELEKKTQLREAESIMKEKKRLEKSIQEKKKQAEKLEKVSSKKKKQ
AR10	QIRPDLSSSKQKDSVQKAIQKNAKTLERRLQKIGETTKPQQMKQIR
E136	QIRPDLSSSKQKDSVQKAIQKNAKTLERRLQKIGETTKPQQMKQIR
AR10	FPVPKSLELHSRYPIMGQNVQLERSGRTLLVNGDFQFSLGKKIAIVGE
E136	FPVPKSLELHSRYPIMGQNVQLERSGRTLLVNGDFQFSLGKKIAIVGE
AR10	NGSGKTTLEHIRKQGEGILLSPKVSFQVYQQKGYQMTSEESIIRFVM
E136	NGSGKTTLEHIRKQGEGILLSPKVSFQVYQQKGYQMTSEESIIRFVM
AR10	RQTEFSESLVRSLLNHLG <b>V</b> AQETLTKPLCTLSGGEATRLTIALLFTKP
E136	RQTEFSESLVRSLLNHLG <b>F</b> AQETLTKPLCTLSGGEATRLTIALLFTKP
AR10	SNVLLLDEPTNFIDMATIEALEKLMQIYPGTILFTSHDSYFVERTADE
E136	SNVLLLDEPTNFIDMATIEALEKLMQIYPGTILFTSHDSYFVERTADE
AR10	VYEIKGQKIKKVLTRNF*
E136	VYEIKGQKIKKVLTRNF*

**Figura 42.- Comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína MsrC de la cepa *E. faecium* AR10 versus *E. faecium* E136. (La cepa E134 presentó la misma secuencia que E136).**

En este momento, tuvimos noticias de que la Dra. Barbara Murray (Medical School at Houston, Universidad de Texas, USA) estaba llevando a cabo una investigación sobre el mismo tema. En su caso, a partir de una cepa de *E. faecium*

aislada de un voluntario sano (*E. faecium* SE34, con CMI a eritromicina: 0,25-0,75 µg/ml), consiguieron dos cepas mutantes (*E. faecium* F11 y *E. faecium* F12) en las que el gen *msrC* estaba inactivado y los valores de CMI para eritromicina oscilaban entre 0,06 y 0,09 µg/ml. Por acuerdo mutuo, decidimos avanzar llevando a cabo una investigación conjunta, y así, las tres cepas de *E. faecium* anteriormente citadas (SE34, F11 y F12) fueron cedidas a los laboratorios de Pfizer en Groton (USA). De esta forma, pudimos comparar la secuencia de la proteína MsrC de la cepa parental *E. faecium* SE34 y de las tres cepas de la colección de la Universidad de La Rioja (*E. faecium* AR10, *E. faecium* E136 y *E. faecium* E134). La identidad entre las secuencias de estas proteínas fue del 99%.

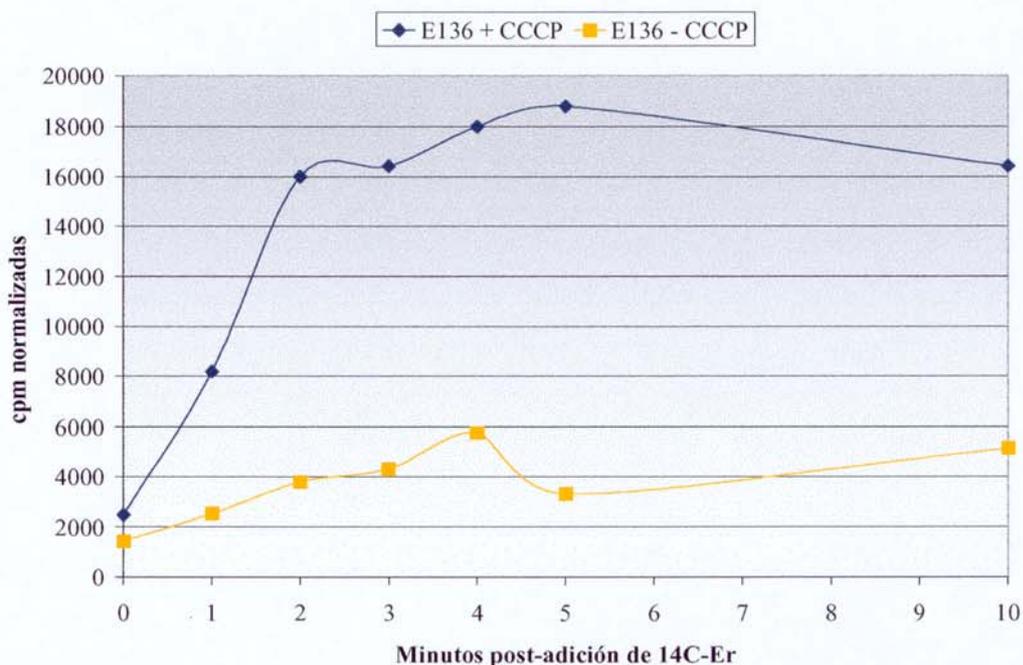
Con respecto a las dos mutaciones encontradas en la secuencia aminoacídica de la cepa sensible *E. faecium* AR10 (Figura 42), y en contra de lo que en un principio cabría esperar, la secuencia de la cepa *E. faecium* SE34 (también sensible a eritromicina) presentó en las posiciones 167 y 398, los aminoácidos serina y fenilalanina respectivamente, al igual que las cepas *E. faecium* E136 (de resistencia intermedia) y *E. faecium* E134 (altamente resistente a eritromicina). Según estos resultados, la resistencia a eritromicina observada en las cepas *E. faecium* E136 y *E. faecium* E134 no podía explicarse por los dos cambios en la secuencia de la proteína MsrC de *E. faecium* AR10.

## 2.2 Acumulación intracelular de eritromicina

De forma paralela, se realizaron ensayos de eflujo de macrólidos mediante la monitorización del consumo de eritromicina marcada radioactivamente en células de enterococos en fase de crecimiento exponencial. Se empleó CCCP, que es un agente desacoplante del potencial de membrana, con efecto sobre transportadores primarios y secundarios, y se siguió el protocolo descrito en el capítulo de Material y Métodos. Debido a que las células se encontraban en fase de crecimiento activo, el consumo de eritromicina radioactiva tuvo que ser normalizado, teniendo en cuenta los valores de D.O.<sub>660</sub> de los cultivos celulares inicial, final y en cada momento de la toma de muestras, así como el volumen de muestra recogido. Las cepas sometidas a este tipo de análisis fueron las siguientes: *E. faecium* E136, *E. faecium* AR10, *E. faecium* SE34, *E. faecium* F11 y *E. faecium* F12 y *E. faecalis* E9. Esta última cepa, con un

valor de CMI para eritromicina de 0,125  $\mu\text{g/ml}$ , se seleccionó para investigar la posible presencia de sistemas de eflujo en cepas de enterococos con fenotipo sensible a eritromicina y que no presentaron el gen *msrC*, es decir de una especie distinta a *E. faecium* (control negativo). Este experimento no se pudo llevar a cabo en la cepa *E. faecium* E134, ya que ésta presentaba el gen *erm(B)*, un metilasa *erm*, que modifica el ribosoma. El ensayo se basa en que si no existe un sistema de bombeo, la cantidad de eritromicina incorporada debe ser la misma en presencia y en ausencia de CCCP. Sin embargo, si existe un sistema de eflujo, debe haber mayor acumulación de eritromicina radioactiva (más cpm) en la célula en presencia de CCCP.

Como se observa en las figuras 43 - 45, las cepas *E. faecium* E136, *E. faecium* AR10, e incluso la cepa *E. faecalis* E9 -que no posee el gen *msrC*- acumularon más eritromicina en presencia del protonóforo CCCP. Estos resultados podrían indicar la presencia de una o múltiples bombas de eflujo en *Enterococcus* con especificidad para eritromicina, algunas de ellas sin identificar y con función desconocida por el momento.



**Figura 43.-** Ensayo de acumulación de eritromicina marcada radioactivamente en la cepa de *E. faecium* E136.

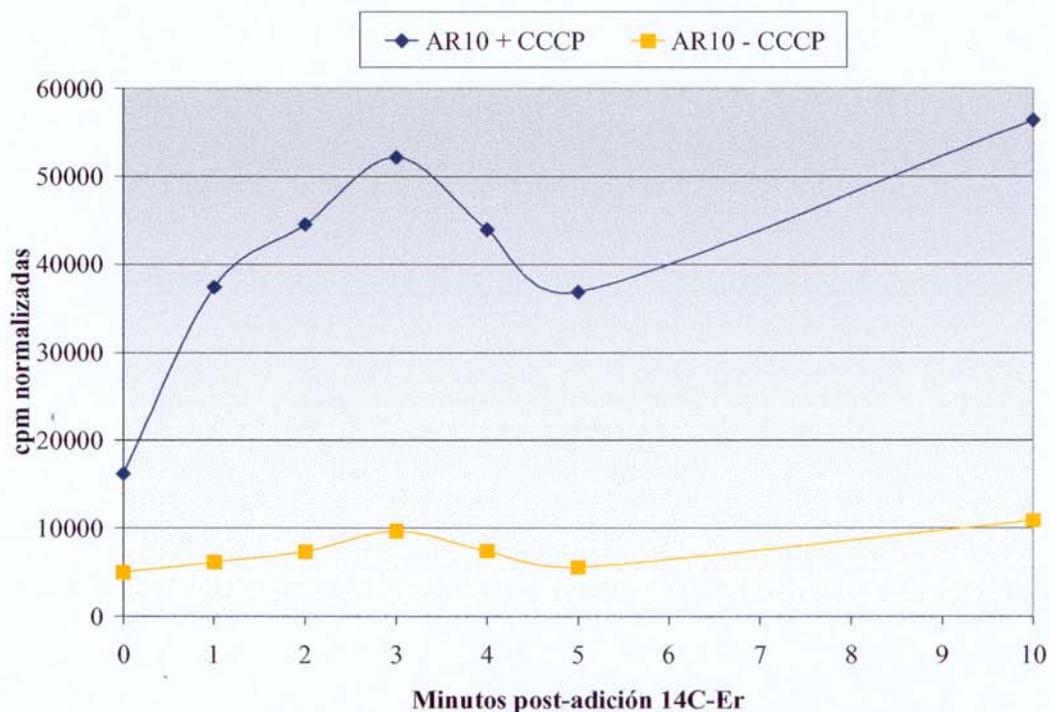


Figura 44.- Ensayo de acumulación de eritromicina marcada radioactivamente en la cepa de *E. faecium* AR10.

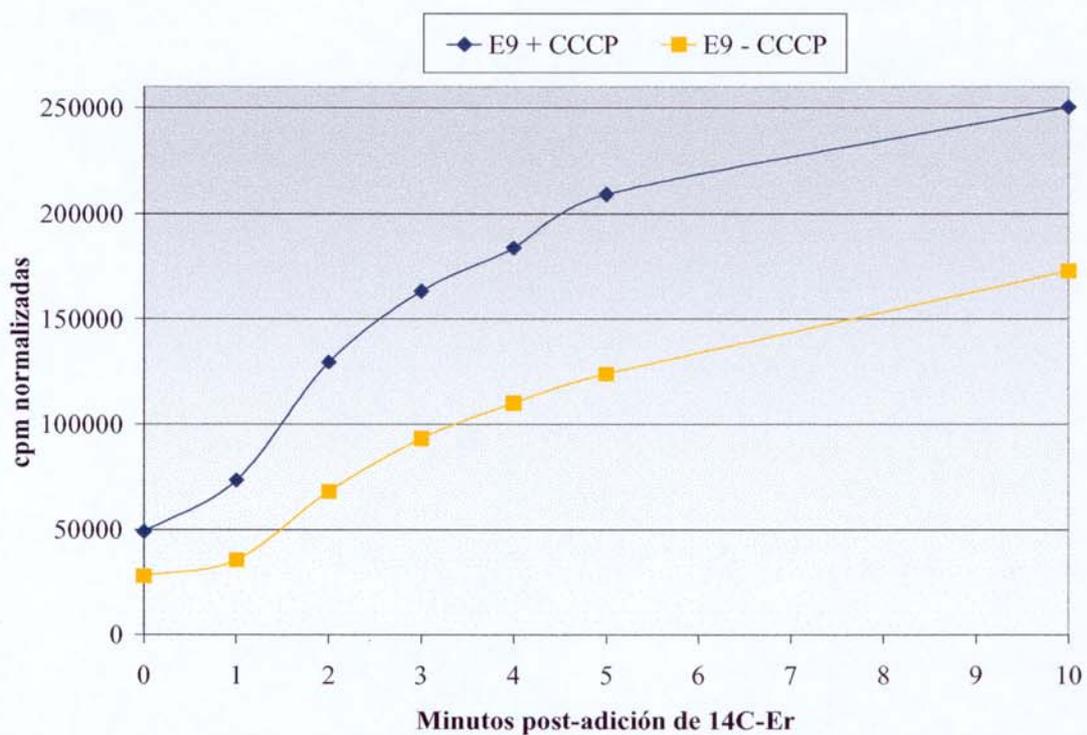
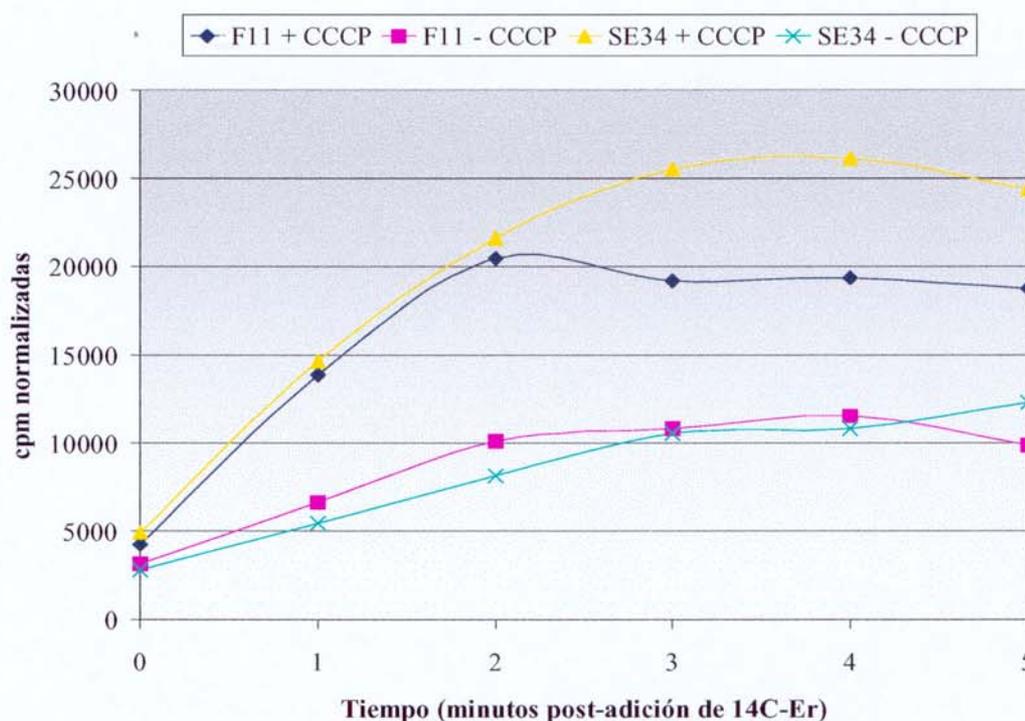


Figura 45.- Ensayo de acumulación de eritromicina marcada radioactivamente en la cepa de *E. faecalis* E9.

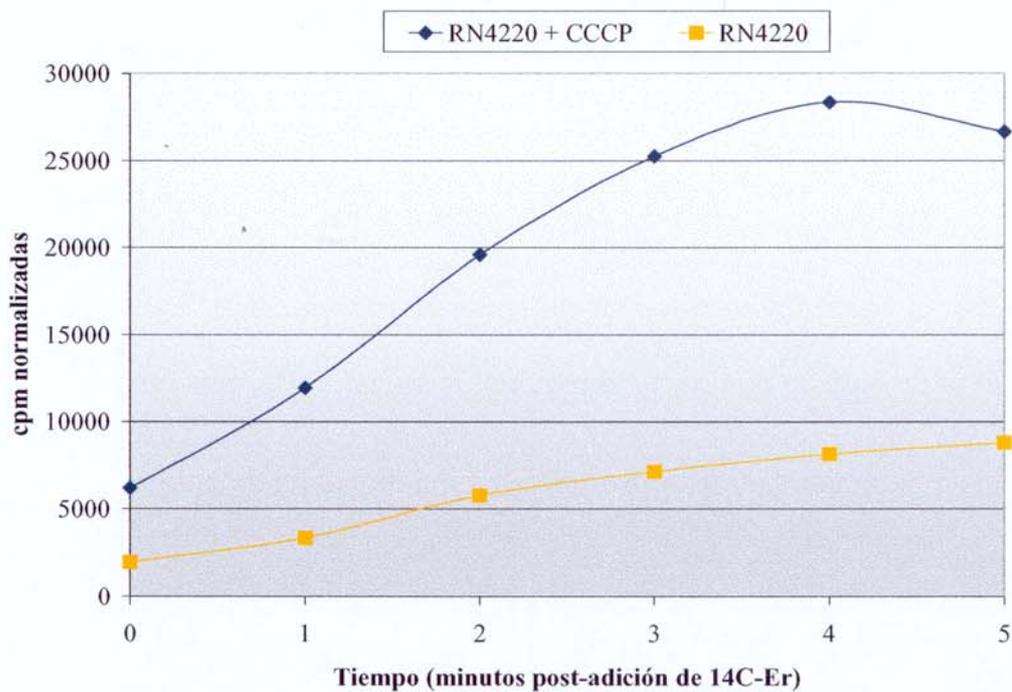
En la figura 46 se representa el consumo de eritromicina, en presencia y ausencia de CCCP, de la cepa *E. faecium* SE34 (cepa parental que contiene el gen *msrC*) frente a *E. faecium* F11 (cepa mutante en la que *msrC* se encuentra inactivado). Como puede observarse, las dos cepas parecen capaces de expulsar eritromicina. En presencia de CCCP, la tasa inicial de consumo de eritromicina en ambas cepas es indistinguible. Sin embargo, la acumulación de eritromicina en la cepa *E. faecium* F11 alcanza una meseta a menor concentración de antibiótico que en *E. faecium* SE34. Aunque las cepas son isogénicas, la presencia de kanamicina en el medio de cultivo y/o el hecho de presentar una mutación de resistencia a kanamicina podría repercutir en la acumulación total de eritromicina en la cepa mutante *E. faecium* F11. El comportamiento de la cepa mutante *E. faecium* F12 fue idéntico al de *E. faecium* F11.



**Figura 46.- Comparación del sistema de bombeo para eritromicina entre la cepa parental *E. faecium* SE34, que presenta el gen *msrC*, y la cepa mutante *E. faecium* F11, en la cual el gen *msrC* está inactivado.**

Las especies *Staphylococcus* y *Enterococcus* están filogenéticamente relacionadas, por lo que se pensó que una cepa de *S. aureus* que no portase el gen *msr(A)* podría comportarse como un buen receptor para el clonaje del gen *msrC*. Por

este motivo, se llevaron a cabo ensayos de acumulación intracelular de eritromicina en tres cepas de *S. aureus* de la colección de Pfizer: SAM1100, RN4220 [ambas sensibles a eritromicina y sin el gen *msr(A)*] y SA1 [cepa RN4220 modificada con el gen *msr(A)*], para comparar su comportamiento cinético. Como puede observarse en las figuras 47 - 50, tanto en presencia como en ausencia del determinante *msr(A)*, las cepas presentaron mecanismos de bombeo para la eritromicina; no obstante, se seleccionó la cepa de *S. aureus* RN4220 como cepa receptora para el clonaje del gen *msrC*.



**Figura 47.-** Ensayo de acumulación de eritromicina marcada radioactivamente en la cepa de *S. aureus* RN4220.

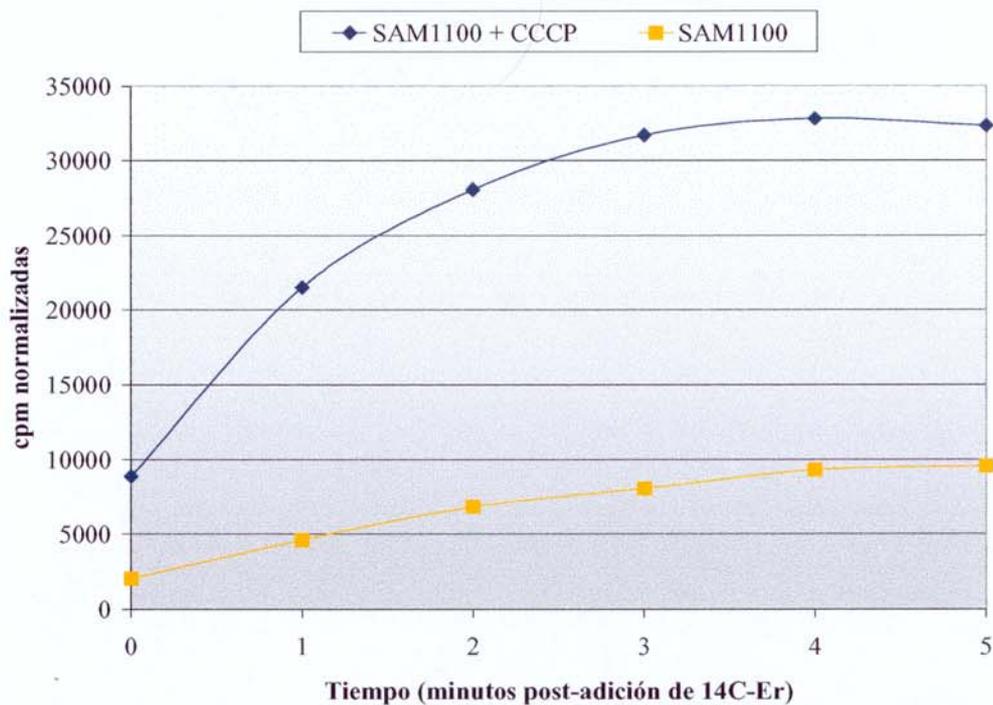


Figura 48.- Ensayo de acumulación de eritromicina marcada radioactivamente en la cepa de *S. aureus* SAM1100.

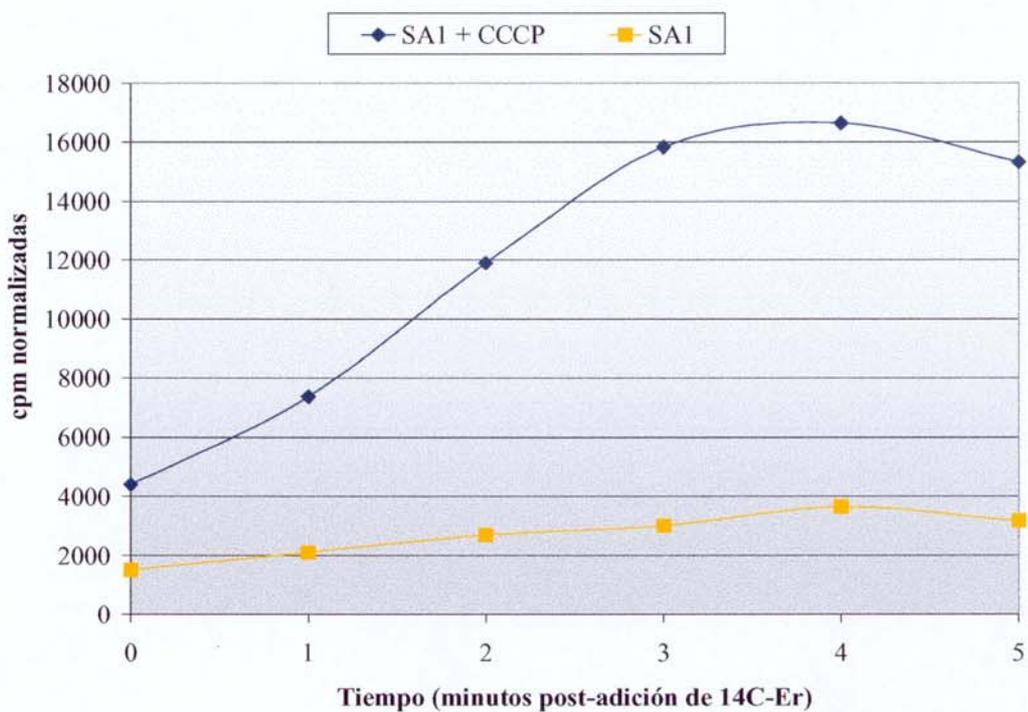
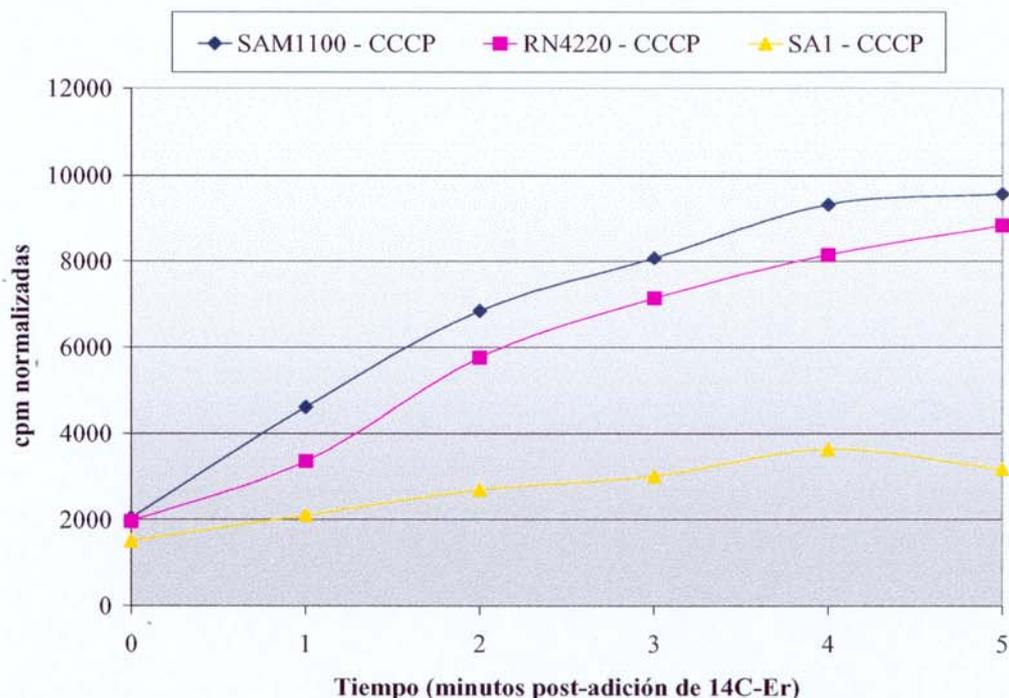


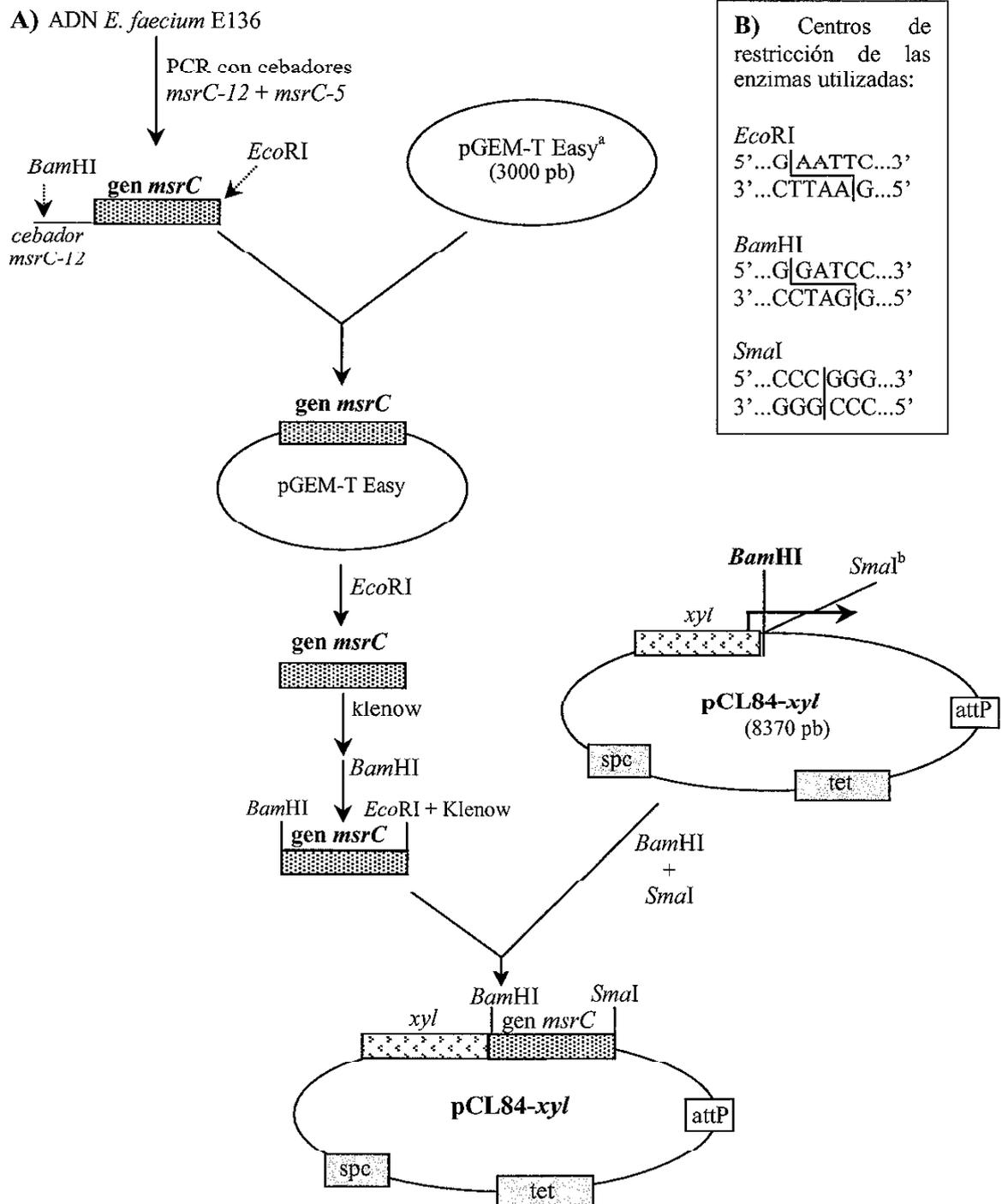
Figura 49.- Ensayo de acumulación de eritromicina marcada radioactivamente en la cepa de *S. aureus* SA1.



**Figura 50.- Bombeo de eritromicina marcada radioactivamente en ausencia de CCCP de las cepas *S. aureus* SAM1100 y RN4220 [que no portan el gen *msr(A)*] frente a la cepa *S. aureus* SA1, que presenta *msr(A)*.**

### 2.3 Clonaje

Con las cepas *E. faecium* AR10 y E136 se continuó con los estudios de clonaje del gen *msrC*, a fin de averiguar su función y su posible relación con la resistencia a antibióticos y con la expulsión fuera de la célula de otras moléculas. Nuestro objetivo fue el clonaje del gen *msrC* en la cepa *S. aureus* RN4220 y, finalmente, en la propia cepa mutante de *E. faecium* F11 con el gen *msrC* inactivado, para observar posibles diferencias en la expresión del gen que se manifestasen en distintos niveles de resistencia a Er. Esto se llevaría a cabo determinando los valores de CMI a diferentes antibióticos y mediante estudios de acumulación intracelular de eritromicina en bacterias transformadas con estas construcciones. Se pusieron en marcha diferentes estrategias de clonaje. Para la primera de ellas, detallada en la figura 51, se seleccionó el vector pCL84-*xyl* (vector de integración en *S. aureus*), que presenta un promotor inducible por xilosa capaz de regular la expresión del gen *msrC* (Figura 6). Debido a su diseño, dicho vector debía digerirse con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sma*I, cuyos puntos de corte se encontraban situados tras el promotor.



**Figura 51.- A) Estrategia de clonaje de *msrC* con pGEM-T Easy y pCL84-*xyl*.**

<sup>a</sup> Ver mapa de pGEM-T easy en figura 5; <sup>b</sup> *Sma*I genera extremos romos, que se unen a los extremos cohesivos generados por *Eco*RI tras rellenarlos con la enzima klenow. **B) Centros de restricción de las enzimas utilizadas (*Eco*RI, *Bam*HI y *Sma*I).**

Tras comprobar que nuestro gen no presentaba puntos de corte para las enzimas *Bam*HI, *Sma*I y *Eco*RI en la región codificante, se diseñó el cebador msrC-12, situado en el extremo 5' de dicha región, que contenía un centro de restricción para *Bam*HI. Su secuencia, en dirección 5'→3', fue la siguiente:

+ msrC-12: TTGGATCCTTGGAAAATTTAGCAGTAAATATAAC (en parte coincidente con la secuencia del cebador msrC-11) (Figura 41).

Se amplificó la región codificante de *msrC* en *E. faecium* E136 y *E. faecium* AR10 mediante PCR con los cebadores msrC-12 y msrC-5. Las condiciones de amplificación optimizadas fueron las siguientes: 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 44°C durante 1 minuto, elongación a 72°C durante 1 minuto) seguidos de un ciclo de elongación final a 72°C durante 10 minutos; la concentración de MgCl<sub>2</sub> óptima fue 6mM (Figura 52).



**Figura 52.- Amplificación por PCR con los cebadores msrC-5 y msrC-12.** Carriles: 1: "1Kb DNA Ladder" (Biolabs); 2 y 3: *E. faecium* E136; 4 y 5: *E. faecium* AR10.

Tras purificar los amplicones con un kit comercial (Qiagen), se clonaron los productos de PCR en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) (Figura 5). Se llevó a cabo la reacción de ligación (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y, posteriormente, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , preparadas siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de Material y Métodos. Se eligieron al azar 8 colonias blancas como posibles transformantes, obtenidas con los plásmidos recombinantes que contenían las secuencias de *E. faecium* E136 y *E. faecium* AR10, y se realizó extracción de plásmidos (midi-preps). Se comprobó mediante secuenciación (empleando cebadores específicos del vector pGEM-T Easy) que todas las colonias portaban el gen *msrC*. El vector pGEM-T Easy sólo es capaz de

replicarse en *E. coli* (se necesitan células competentes con una eficiencia de transformación de, al menos,  $1 \times 10^8$  UFC/ $\mu$ g de ADN). Por este motivo, el clonaje en el vector pGEM-T Easy en células de *E. coli* fue un paso intermedio para conseguir suficiente concentración de inserto.

El vector pGEM T Easy que contenía *msrC* se digirió con *EcoRI* y tras rellenar los extremos originados (cohesivos) con el fragmento Klenow, se sometió a digestión con *BamHI*. Por otra parte, el vector pCL84 *xyl* se digirió con *SmaI* y después con *BamHI*. Tras comprobar en un gel de electroforesis que los fragmentos presentaban el tamaño esperado, se llevó a cabo la reacción de ligación. Posteriormente, células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas y sembradas en placas de LB suplementadas con espectinomicina 50  $\mu$ g/ml como antibiótico de selección (se comprobó previamente que las cepas de *E. faecium* del estudio crecían en presencia de este antibiótico). La selección de los posibles transformantes se realizó mediante hibridación en colonias con una sonda *msrC*. Tras innumerables intentos, en ningún caso se consiguió clonar *msrC* en el vector pCL84-*xyl*.

Ante estos resultados, se puso en marcha otra estrategia de clonaje, empleando en experimentos paralelos los vectores pAM401 y pMP278 (descritos en el capítulo de Material y métodos). En estos dos casos, debido a que estos vectores no contenían promotor, se intentó clonar el gen *msrC* completo (1,9 Kb) de las cepas *E. faecium* E136 y *E. faecium* AR10, obtenido por PCR con los cebadores *msrC*-9 y *msrC*-5 en las condiciones previamente descritas. Se purificaron dichos fragmentos y se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Tras la reacción de ligación, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se eligieron al azar 4 colonias blancas de cada cepa y se comprobó mediante extracción de plásmidos (mini-preps) y PCR que todas las colonias portaban el gen *msrC*.

A partir de este momento, esta doble estrategia parecía más simple que la anterior. La digestión de ambos vectores (pAM401 y pMP278) y de los insertos clonados en pGEM-T Easy se realizó con la enzima *EcoRI*. Los vectores se trataron con fosfatasa alcalina, se llevaron a cabo las reacciones de ligación de cada vector con los insertos correspondientes a *msrC* de *E. faecium* E136 y *E. faecium* AR10 y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las posibles transformantes se examinaron mediante hibridación en colonias. Después de varios intentos, se consiguió

transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  con el vector pMP278 que contenía el gen *msrC* de la cepa *E. faecium* E136. Se comprobó mediante digestión con *EcoRI* que los insertos tenían el tamaño esperado y se llevó a cabo la extracción plasmídica en gran cantidad (maxi-prep) con el objetivo de clonar *msrC* en la cepa de *S. aureus* RN4220. Se prepararon células competentes de *S. aureus* RN4220 y se electroporaron en presencia del vector pMP278 que contenía *msrC*, tal y como se describe en Material y métodos. Una vez clonado *msrC* en *S. aureus* RN4220, se comprobó la secuencia del gen *msrC* mediante secuenciación. En el mejor de los casos, se encontraron tres mutaciones en la secuencia de ADN y un cambio en la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia original del gen. Por este motivo, actualmente nos encontramos repitiendo el protocolo de clonaje en pMP278, a fin de conseguir clonar en *S. aureus* el gen *msrC* cuya secuencia no presente mutaciones. Asimismo, se están realizando pruebas preliminares para optimizar las condiciones de electroporación de las células mutantes de *E. faecium* con *msrC* inactivado (cepas *E. faecium* F11 y *E. faecium* F12).

## DISCUSIÓN



## *S. pyogenes*

La adquisición, relativamente rápida, de la resistencia a macrólidos en un número cada vez mayor de aislados de *S. pyogenes* ha sido un fenómeno preocupante durante la década de 1990 en varios países del mundo, como Italia (Cornaglia *et al.*, 1996; Borzani *et al.*, 1997; Cocuzza *et al.*, 1997a; Cornaglia *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 1998; Bassetti *et al.*, 2000), Finlandia (Kataja *et al.*, 1998a), Taiwan (Hsueh *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 2000), y Argentina (Lopardo *et al.*, 1997; Soriano *et al.*, 2000), entre otros. En España, también hemos sufrido este problema. La primera descripción de un aislamiento de *S. pyogenes* resistente a eritromicina en nuestro país tuvo lugar a finales de la década de 1980 (Pérez-Trallero *et al.*, 1989), y desde entonces se han realizado estudios en distintas áreas que indican un aumento de la resistencia a macrólidos en esta especie bacteriana, especialmente en la primera mitad de la década de 1990 (García-Bermejo *et al.*, 1998; Muñoz Bellido *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1998; Pérez Trallero *et al.*, 1998; Baquero *et al.*, 1999b). Ante esta alarmante situación, nos planteamos analizar los niveles de resistencia a macrólidos en aislados hospitalarios de *S. pyogenes* recogidos en La Rioja entre 1996 y 2001. Durante 1996, la tasa de resistencia a eritromicina alcanzó en La Rioja el 35,1% (Tabla 19). En ese mismo año, el nivel de resistencia fue ligeramente inferior en Vitoria (31,6%) (Pérez-Trallero *et al.*, 1999), y se observaron aún mayores diferencias al comparar nuestros datos con los obtenidos en la Comunidad de Madrid: 17,6% (García Bermejo *et al.*, 1998) y 22% (Orden *et al.*, 1998). La variabilidad de la prevalencia de cepas de *S. pyogenes* resistentes a macrólidos en diferentes áreas geográficas, incluso próximas entre sí, es un hecho contrastado en la bibliografía (Cocuzza *et al.*, 1997b; Gobernado *et al.*, 1997; García-Bermejo *et al.*, 1998; Varaldo *et al.*, 1999; Ripa *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2001a). Según refleja nuestra investigación, el porcentaje de resistencia en La Rioja ha ido disminuyendo progresivamente cada año del periodo que comprende el estudio -salvo una disminución brusca en 1999-, hasta llegar a un 20% en el año 2001 (Tabla 19). A pesar de que aún no se dispone de datos tan actuales en la literatura, esta misma tendencia se ha observado en Guipúzcoa, donde la resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* aumentó desde el 1,2% a finales de 1990 hasta el 35% en 1995 (Pérez-

Trallero *et al.*, 1998), pero disminuyó hasta un 14-15% entre 1997-1999 (Pérez-Trallero *et al.*, 1999; Pérez-Trallero *et al.* 2001a). En Zaragoza, Seral *et al.* (2000a), analizaron la evolución de la resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* entre 1997-99: en su caso, los porcentajes aumentaron desde el 23% en 1997 hasta un 25,5% en 1998, y disminuyeron en 1999 a un 22%. En otros países también se ha observado una tendencia similar. Así, por citar un ejemplo, en Turín (Italia), los niveles de resistencia a eritromicina aumentaron desde un 10% en 1983 hasta un 51% en 1997, y descendieron a un 38,5% en 1998 (Avanzini *et al.*, 2000).

Por el contrario, durante esta última década, la prevalencia de cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina puede considerarse baja en otros países. Así, en EE.UU. (Barry *et al.*, 1994; Coonan *et al.*, 1994; Gerber, 1995; Barry *et al.*, 1997), Canadá (De Azavedo *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 2001a), Chile (Palavecino *et al.*, 2001) e Israel (Weiss *et al.*, 1997) los niveles de resistencia no superaron el 5,4%; y en Irán, fueron inferiores al 1% (Jasir *et al.*, 2000). Contemporáneamente en algunos países de Europa, los índices de resistencia a macrólidos en *S. pyogenes* fueron moderados: en Alemania, los porcentajes oscilaron entre 8-13% (Arvand *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 2001); en Bélgica, se situaron en torno al 6,5% (Descheemaeker *et al.*, 2000); en Francia, fueron inferiores al 10% (Varon *et al.*, 1997; Bingen *et al.*, 2000), mientras que en Grecia se detectaron valores ligeramente superiores (15%) (Tzelepi *et al.*, 1999). Según datos de aislados de *S. pyogenes* recogidos durante el periodo 1999-2000 en diez países de Europa Central y Europa del Este, las tasas de resistencia a macrólidos oscilaron entre 5-18% (Nagai *et al.*, 2002b). Tanto en España como en otros países (Reino Unido, Italia, Finlandia y Corea, por citar algunos de ellos), varios autores concuerdan al afirmar que la resistencia a macrólidos en *S. pyogenes* puede ser consecuencia de un consumo excesivo de estos antibióticos (Phillips *et al.*, 1990; Baquero *et al.*, 1996; Cornaglia *et al.*, 1996; Romero Vivas *et al.*, 1997; Seppälä *et al.*, 1997b; Pérez-Trallero *et al.*, 1998; Cha *et al.*, 2000). Hay estudios que muestran una asociación entre el aumento de la resistencia a macrólidos y el aumento del consumo de macrólidos para el tratamiento de infecciones respiratorias (Hsueh *et al.*, 1995; Seppälä *et al.*, 1995; Cizman *et al.*, 1999; Cizman *et al.*, 2001), así como una asociación entre el descenso de resistencia y la disminución en la prescripción (Bass *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1994). El hecho

de que en Francia la resistencia a eritromicina en cepas de *S. pyogenes* no alcance el 7% puede estar relacionado con el consumo estable de macrólidos desde 1980 en este país (Guillemot *et al.*, 1998).

A su vez, es posible que el amplio uso de la eritromicina esté relacionado con la emergencia de cepas con valores de CMIs elevados. El aumento de los niveles de resistencia a eritromicina en España se debe, en parte, al aumento del número de cepas de *S. pyogenes* altamente resistentes: 6,1% de las cepas recogidas en 1996-97 tenían CMIs  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  (Baquero *et al.*, 1999b), frente al 1% en 1991-92 (Betriu *et al.*, 1993). En esta misma línea, Carsenti-Etesse *et al.* (1999) llevaron a cabo un estudio en el que por primera vez se puso de manifiesto que en cepas de *S. pyogenes*, la resistencia a eritromicina mediada por un mecanismo de eflujo puede obtenerse por múltiples pasos en presencia de concentraciones subinhibitorias de este antibiótico. En contra de lo expuesto anteriormente, Weiss *et al.* (2001a) se atrevieron a dudar de la asociación entre consumo de macrólidos y resistencia a eritromicina en *S. pyogenes*, ya que, según datos preliminares de Canadá, el consumo aumentó en ese país entre 1996-98 y, en cambio, las cepas resistentes fueron muy raras o incluso no se detectaron en ciertas áreas. En su opinión, la alta prevalencia de resistencia en centros urbanos podría deberse a otros factores, como la elevada densidad de población, un gran número de niños en guarderías y los viajes, cada vez más frecuentes. El mismo fenómeno se observó asimismo en Canadá para *S. pneumoniae* (Green *et al.*, 2000).

Por otra parte, todas las cepas de *S. pyogenes* de nuestra colección permanecieron sensibles a penicilina y cefotaxima (Tabla 18), lo que concuerda con datos previamente publicados (Esposito *et al.*, 1998; De Azavedo *et al.*, 1999; Arvand *et al.*, 2000; Bassetti *et al.*, 2000; Soriano *et al.*, 2000, entre otros). La resistencia a penicilina no se ha identificado todavía en cepas clínicas de *S. pyogenes*, e incluso la existencia de cepas tolerantes parece dudosa (Orrling *et al.*, 1996). La razón por la cual, a pesar del amplio consumo de antibióticos beta-lactámicos, la resistencia a penicilina no ha emergido en esta especie se desconoce (Horn *et al.*, 1998).

En nuestro estudio, el 42,7% de las cepas de *S. pyogenes* se aislaron de muestras nasofaríngeas, y el porcentaje se elevó al 58,7% al considerar las cepas de muestras pertenecientes al tracto respiratorio superior (Tabla 16). Estudios previos sugieren

que la nasofaringe es el principal reservorio de *S. pyogenes* que causan infecciones severas (Florentino *et al.*, 1997; Kiska *et al.*, 1997). Por otra parte, se desconoce si el gran número de individuos, sanos y enfermos, portadores de estreptococos comensales resistentes a eritromicina en la faringe (94%) influye en el elevado porcentaje de cepas clínicas de *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* encontrado en España (Pérez-Trallero *et al.*, 2001b). En varias ocasiones se han observado mayores índices de resistencia en cepas de *S. pyogenes* aisladas de pacientes con infecciones severas que en aquellos con enfermedades de tipo respiratorio (Seppälä *et al.*, 1992; York *et al.*, 1999). No obstante, otros autores destacan que no existe relación entre virulencia de las cepas y resistencia antimicrobiana (Kaplan, 1997). En nuestro estudio, no se han observado diferencias significativas en las tasas de resistencia a macrólidos entre las cepas del tracto respiratorio superior (26,8%) y las procedentes de heridas y úlceras (28,6%) (Tabla 16).

En cuanto a lo que se refiere a la edad de los pacientes, en nuestro estudio, el 58,3% de las cepas aisladas de pacientes de entre 61 y 70 años fueron resistentes a eritromicina, frente al 24,1% de las cepas de niños menores de 11 años (Tabla 17). Publicaciones previas mostraron que la resistencia a eritromicina parece estar negativamente correlacionada con la edad de los pacientes (Seppälä *et al.*, 1997a; Orden *et al.*, 1998; Arvand *et al.*, 2000), probablemente como resultado de una mayor prescripción de antibióticos para niños, unida a un mayor riesgo de colonización cruzada en niños que en adultos.

Como confirman numerosos autores (Seppälä *et al.*, 1993; Pérez-Trallero *et al.*, 1998; Baquero *et al.*, 1999b; Kataja *et al.*, 1999; Palavecino *et al.*, 2001), las cepas con fenotipo M presentan valores de CMI para eritromicina inferiores a los observados en cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub>. En contraste, según datos de Tzelepi *et al.* (1999) recogidos en Grecia, las CMIs de macrólidos para cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (CMI<sub>90</sub>: 8 µg/ml) fueron inferiores a los de las cepas con fenotipo M (CMI<sub>90</sub>: 32 µg/ml). En nuestro caso, tan sólo una cepa con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible presentó una CMI de 48 µg/ml, inferior a la de algunas cepas con fenotipo M que alcanzaron una CMI de 64 µg/ml (Figura 11).

La distribución de fenotipos entre las cepas resistentes de *S. pyogenes* varía en los distintos países. En Argentina, en 1998 todas las cepas resistentes a eritromicina

mostraron el fenotipo M (Soriano *et al.*, 2000). En España, hasta ese mismo año el porcentaje de cepas de *S. pyogenes* con fenotipo M fue uno de los más altos del mundo, con valores en torno al 90-95% (García-Bermejo *et al.*, 1998; Orden *et al.*, 1998; Pérez-Trallero *et al.*, 1998; Baquero *et al.*, 1999b; García de Lomas *et al.*, 1999; Pérez-Trallero *et al.*, 1999; Portillo *et al.*, 1999b; Alós *et al.*, 2000; Pérez-Trallero *et al.*, 2001a). Así, en La Rioja, en 1996-97 el 92% de las cepas resistentes presentó el fenotipo M (Tabla 20 y figura 9). Durante los años sucesivos de nuestro estudio, dicho fenotipo experimentó una disminución, aunque continuó siendo predominante, y en el año 2001, el porcentaje fue del 66,7% (Tabla 20 y figura 9). Curiosamente, en Suecia, a partir de 1994, se observó también un cambio en el predominio de fenotipos de resistencia a eritromicina en cepas de *S. pyogenes*, desde un 90% de cepas con fenotipo M (Jasir *et al.*, 1998) al clásico fenotipo MLS<sub>B</sub>, paralelo a una disminución del consumo de macrólidos y de la resistencia a eritromicina en esta especie (desde un 12 a un 1,8%) (Jasir *et al.*, 2001). El fenómeno contrario tuvo lugar en Finlandia, donde la tasa de cepas con fenotipo M pasó del 38% en 1990 (Seppälä *et al.*, 1993), a un 82% en 1994 (Kataja *et al.*, 1998a). Este mismo proceso se observó en Canadá en un periodo de tiempo relativamente corto (Dixon *et al.*, 1974; De Azavedo *et al.*, 1999) y en Italia (Avanzini *et al.*, 2000) donde, entre 1996 y 1998, el fenotipo M desplazó al fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo. Kataja *et al.* (1999) sostienen que podría deberse al carácter transferible por conjugación del gen *mef(A)*.

En Taiwan el fenotipo M fue el predominante en las cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina, con valores del 88 y 91% en 1997 y 1998, respectivamente (Yan *et al.*, 2000), y el gen *mef(A)* reemplazó en poco tiempo a los genes *erm* como el mecanismo más común responsable de la resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* (Yan *et al.*, 2000). En Bélgica y en Chile se encontraron también porcentajes elevados de cepas resistentes con fenotipo M (en torno al 86%) (Descheemaeker *et al.*, 2000; Palavecino *et al.*, 2001). En EE.UU. también se han descrito cepas de *S. pyogenes* con fenotipo M (75%, entre 1993-95) (Sutcliffe *et al.*, 1996b), pero hay poca información sobre prevalencia de genes *erm* y *mef*. Asimismo, el fenotipo M se expresó de forma predominante en cepas resistentes aisladas en algunas áreas de Italia (Borzani *et al.*, 1997; Cocuzza *et al.*, 1997b; Bassetti *et al.*, 2000; Rondini *et*

*al.*, 2001). En Grecia, en 1996-97 la distribución del fenotipo M fue similar a la del fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (Tzelepi *et al.*, 1999).

Según nuestros datos, en La Rioja, el fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo sufrió altibajos, desde un 0% en 1996 hasta un 33,3% en el año 2001; por otra parte, el fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible se mantuvo en una tasa baja a lo largo de estos seis años, con valores que no superaron el 7% (figura 9). En otros países, como Portugal (Melo-Cristino *et al.*, 1999); o Francia (Schlegel *et al.*, 2001), el fenotipo MLS<sub>B</sub> fue mayoritario.

En Alemania, según la zona predominó el fenotipo MLS<sub>B</sub> (90% en Berlín) (Arvand *et al.*, 2000), o el fenotipo M (70,6% en Aachen – cerca de Bonn) (Brandt *et al.*, 2001). Estas diferencias según las áreas analizadas dentro de un mismo país también se observaron en Italia (Cocuzza *et al.*, 1997b) y en Canadá (De Azavedo *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 2001a).

En La Rioja se analizó la presencia de genes de resistencia responsables de los fenotipos MLS anteriormente citados. El gen *mef(A)* se detectó en todas las cepas de *S. pyogenes* con fenotipo M analizadas (Tabla 21), lo que concuerda con los datos de otras investigaciones (Sutcliffe *et al.*, 1996a; Orden *et al.*, 1998; Pérez-Trallero *et al.*, 1998; Kataja *et al.*, 1999 y Pérez-Trallero *et al.*, 1999). Por otra parte, en La Rioja el gen *erm(TR)* se detectó en cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible y constitutivo (Tabla 21). De igual forma, otros autores señalaron que el gen *erm(TR)* podía ser responsable de la expresión inducible o constitutiva en cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> (De Azavedo *et al.*, 1999; Giovanetti *et al.*, 1999; Kataja *et al.*, 1999). En nuestras muestras, el gen *erm(B)* fue asociado a cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (Tabla 21). Algunos autores encontraron que dicho gen fue el predominante en cepas de *S. pyogenes* con fenotipo MLS<sub>B</sub> (Bemer-Melchior *et al.*, 2000). Curiosamente, en nuestra colección detectamos tres cepas de *S. pyogenes* que expresaron un fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo o inducible, y que presentaron a la vez los genes *erm(TR)* y *erm(B)* (Tabla 21); este hecho ha sido descrito previamente en otros estudios (Betriu *et al.*, 2000; Bingen *et al.*, 2000). En ninguna de nuestras cepas de *S. pyogenes* se puso de manifiesto la presencia concomitante de genes *mef* y *erm* (Tabla 21), aunque se han descrito algunos casos en la literatura (Giovanetti *et al.*, 1999; Kataja *et al.*, 1999; Bingen *et al.*, 2000; Kataja *et al.*, 2000; Jasir *et al.*, 2001). Como dato

interesante, señalar que encontramos dos cepas de *S. pyogenes* que expresaron un fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo pero no amplificaron los genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(TR)*, *mef(A)* ni *msr(A)* (Tabla 21). Nuestro caso no es el único en el que parece probable que la resistencia se deba a un nuevo mecanismo aún por identificar en esta especie de estreptococos, ya que se han descrito cepas de *S. pyogenes* con fenotipo MLS<sub>B</sub> que no presentaron ninguno de estos genes en España (Alós *et al.*, 2000; Pérez-Trallero *et al.*, 2001b), en Francia (Schlegel *et al.*, 2001), en Suecia (Jasir *et al.*, 2001) o en Chile (Palavecino *et al.*, 2001). El mecanismo de resistencia podría deberse a mutaciones en el ARNr 23S o en proteínas ribosomales, tal y como se ha descrito para *S. pneumoniae* (Tait-Kamradt *et al.*, 2000a; Tait-Kamradt *et al.*, 2000b).

Como puede observarse en la tabla 22 y en la figura 15, en La Rioja el fenotipo M está representado por unos cuantos clones predominantes que aparecen en diferentes años del estudio. En concordancia con nuestros datos, varios autores hablan de diseminación policlonal de determinantes de resistencia a eritromicina en cepas de *S. pyogenes* con fenotipo M (Seppälä *et al.*, 1992; Hsueh *et al.*, 1995; Cocuzza *et al.*, 1997a; Valisena *et al.*, 1999; Descheemaeker *et al.*, 2000; Savoia *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000). En varios estudios recientes (Kataja *et al.*, 1998a; Pérez-Trallero *et al.*, 1999; Ripa *et al.*, 2001) se habla de la naturaleza policlonal de los aislados de *S. pyogenes* circulantes resistentes a eritromicina, teniendo presente la clara predominancia de unos pocos de estos clones que causan epidemias de carácter regional. En La Rioja, según nuestros datos, hay poca heterogeneidad de las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> (Tabla 22 y figura 15). Otros autores pusieron de manifiesto la presencia de un mismo origen clonal en la mayoría de las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> en Japón (Murase *et al.*, 2000), en Taiwan (Yan *et al.*, 2000) o en Quebec (Weiss *et al.*, 2001a) Estos resultados concuerdan con estudios que indican que los determinantes *erm* se localizan generalmente en el cromosoma, aunque a menudo están asociados a transposones conjugativos (Heraud *et al.*, 1991). Asimismo, en ocasiones se habla de heterogeneidad de cepas resistentes a eritromicina, con una buena correspondencia entre patrón genético y fenotipo de resistencia (Savoia *et al.*, 2000; Ripa *et al.*, 2001). Este hecho también se puso de manifiesto con nuestras

cepas ya que, en ningún caso cepas con fenotipos de resistencia diferentes revelaron la presencia de un mismo patrón de PFGE.

### *S. agalactiae*

En nuestro estudio, se analizó la resistencia a antibióticos MLS en cepas clínicas de *S. agalactiae* recogidas en La Rioja en el trienio 1999-2001. El porcentaje de resistencia a eritromicina en este periodo fue del 15,4% (Tabla 26). Nuestros datos concuerdan con los obtenidos en Madrid en un estudio reciente (Betriu *et al.*, 2000), según el cual, la tasa de resistencia se cifró en un 15%. Estos mismos autores registraron un nivel de resistencia similar en esta especie de estreptococos en un estudio anterior (14% en 1992) (Betriu *et al.*, 1994); en cambio, en nuestra área se ha experimentado un aumento de la resistencia en *S. agalactiae* en el último año (desde un 10,9% a un 19,4% en el periodo 2000-2001) (Tabla 26 y figura 16). De acuerdo con estudios publicados en la literatura, la resistencia a eritromicina en *S. agalactiae*, descrita por primera vez en EE.UU. en 1962 (Eickhoff *et al.*, 1964), ha emergido durante la última década en Norte América y en otros lugares. Este hecho podría estar relacionado con la implantación de las líneas directrices americanas que recomiendan la profilaxis con antibióticos frente a la infección con *S. agalactiae* durante el parto (American Academy of Pediatrics, 1997): eritromicina y clindamicina son los antibióticos alternativos recomendados en mujeres embarazadas alérgicas a penicilina. Por este motivo, en varios países se han llevado a cabo estudios de vigilancia epidemiológica, a fin de detectar los niveles de resistencia a estos antimicrobianos en *S. agalactiae*. A finales de los años 80 y comienzos de los 90, el porcentaje de resistencia a eritromicina en *S. agalactiae* se cifró entre 9-12% en diferentes lugares del mundo (Von Recklinghausen *et al.*, 1989; Berkowitz *et al.*, 1990; Tsakris *et al.*, 1993). (Las tasas de resistencia han tenido que ser reinterpretadas, debido a la modificación de los puntos de corte para la eritromicina establecidos por el NCCLS). En estudios posteriores realizados en EE.UU. a lo largo de la década de 1990, la tasa de resistencia a eritromicina en esta especie bacteriana osciló entre 7,4 y 25%, y a clindamicina entre 3,4 y 15% (Fernández *et al.*, 1998;

Pearlman *et al.*, 1998; Rouse *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Silverman *et al.*, 2000; Bland *et al.*, 2001). En un estudio comparativo realizado con cepas de origen vaginal, la tasa de resistencia a eritromicina se situó en un 1,2% entre 1980-1993, frente a un 18% entre 1997-98 (Morales *et al.*, 1999). Asimismo y de acuerdo con datos recientes, se registró un aumento de la resistencia a eritromicina en cepas clínicas de *S. agalactiae* (desde un 12% entre 1990-95 hasta un 20% entre 1995-2000), y la clindamicina en esa década experimentó un incremento paralelo, desde un 4% hasta un 10% (Murdoch *et al.*, 2001). Y, curiosamente, las tasas de resistencia a estos dos antibióticos registradas en cepas de *S. agalactiae* aisladas de estudiantes sanos de ambos sexos en Michigan (EE.UU.) fueron dos veces superiores a las registradas en la misma zona dos años antes en mujeres embarazadas (Pearlman *et al.*, 1998; Manning *et al.*, 2001).

Al igual que hemos comentado al referirnos a otras especies de estreptococos, los niveles de resistencia a antibióticos en *S. agalactiae* varían según la localización geográfica. Así, en el periodo 1995-98, se registraron altos niveles de resistencia en California (32 y 12% a eritromicina y clindamicina, respectivamente), mientras en Florida fueron más bajos (8,5 y 2,1%, respectivamente) (Lin *et al.*, 2000). Estas variaciones de prevalencia de resistencia se observaron también entre distintos países. Según datos de 1997-99 del estudio de vigilancia SENTRY, en cepas de *S. agalactiae* aisladas de muestras de sangre de neonatos, las tasas de resistencia a eritromicina fueron del 25% en EE.UU y del 14% en Canadá, con un 7% de resistencia a clindamicina; mientras que en países de América Latina, no se detectaron cepas resistentes a estos antibióticos (Andrews *et al.*, 2000). En 1996, un estudio de cepas invasivas de *S. agalactiae* recogidas en distintas provincias de Canadá, reveló que el 6,7% fue resistente a eritromicina y el 4,4% fue resistente a clindamicina (Tyrrell *et al.*, 2000). Según datos obtenidos por De Azavedo *et al.* (2001) también en Canadá, la tasa de resistencia a eritromicina en cepas de *S. agalactiae* procedentes de sepsis neonatal aumentó desde un 5% en 1995-96 a un 13% en 1998-99, lo que coincidió con un aumento del consumo de macrólidos en ese periodo. En cepas aisladas del tracto rectal y vaginal durante 1999, los porcentajes de resistencia a eritromicina y clindamicina fueron del 18% y del 8%, respectivamente.

El incremento de cepas de *S. agalactiae* resistentes a eritromicina también se registró en Europa. Así, en París, se detectó un aumento del 16 al 18% entre 1997-2000 (Fitoussi *et al.*, 2001b), sin que se produjese un cambio significativo en el consumo de macrólidos en los últimos cinco años (según datos de E. Bingen no publicados). Según datos de un estudio multicéntrico, el porcentaje de resistencia a eritromicina en Francia fue ligeramente superior (21,4% en 1999) (De Mouy *et al.*, 2001). En Alemania, entre 1997 y 1999, la resistencia a eritromicina se duplicó en cepas de *S. agalactiae* procedentes de mujeres adultas (de un 6 a un 12%) (Ruess *et al.*, 2000).

El continente asiático también se ha visto afectado por el mismo problema en los últimos años. En Taiwan, los niveles de resistencia a macrólidos en *S. agalactiae* fueron superiores a los registrados en otros países. Así, la resistencia a eritromicina aumentó desde un 19% a un 46% entre 1994-97 y se mantuvo estable en el periodo 1997-2000, observándose un incremento paralelo en los niveles de resistencia a clindamicina (Hsueh *et al.*, 2001). Al comparar estos datos con un estudio anterior realizado en Taiwan en 1993-94 (Wu *et al.*, 1997) se confirmó la emergencia reciente de la resistencia a macrólidos y a clindamicina en *S. agalactiae*, debido al aumento de la proporción de cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub>. Resulta interesante destacar que en los 3 ó 4 últimos años en Taiwan, bajo una presión selectiva de antibióticos similar, las tasas de resistencia a eritromicina en *S. agalactiae* y en *S. pyogenes* parecen haber alcanzado una meseta (40-50%), mientras que en *S. pneumoniae* continúa creciendo (hasta más del 90%) (Hsueh *et al.*, 1996; Hsueh *et al.*, 1999; Hsueh *et al.*, 2000; datos no publicados de Hsueh *et al.*). En Corea, un estudio reciente demostró la emergencia de cepas de *S. agalactiae* resistentes a eritromicina: de un 0% entre 1990-95, se pasó a un 26% en 1996 y a un 40% en 1998, debido principalmente al rápido aumento en la incidencia de algunos serotipos asociados a fenotipos multi-resistentes (Ull *et al.*, 2001). Sorprendentemente, en Japón entre 1985-86 y 1999-2000, en cepas de *S. agalactiae* no se han observado diferencias significativas en la incidencia de la resistencia a 14 antibióticos, entre ellos, eritromicina y clindamicina, con tasas del 3 y 1%, respectivamente (Matsubara *et al.*, 2001).

Las referencias sobre este tema en el continente africano son muy escasas, pero, según un estudio realizado en Marruecos entre 1992-97 en cepas de *S. agalactiae*

aisladas de neonatos, se detectó un nivel de resistencia a eritromicina inferior al 2% (Aitmhand *et al.*, 2000).

Por otra parte, merece la pena comentar que en algunos casos se han descrito cepas de *S. agalactiae* sensibles a eritromicina, pero resistentes a clindamicina (fenotipo L) (Pearlman *et al.*, 1998; De Azavedo *et al.*, 2001; Murdoch *et al.*, 2001), y se ha puesto de manifiesto la presencia del gen *linB* en estas cepas (De Azavedo *et al.*, 2001), ahora denominado *lnu(B)* (Roberts *et al.*, 1999), previamente descrito en *E. faecium* (Bozdogan *et al.*, 1999).

Todos estos resultados llevan a pensar que la eritromicina y la clindamicina no deben ser los antibióticos de elección en la terapia frente a infecciones severas provocadas por *S. agalactiae*, ni deben recomendarse como profilaxis durante el parto.

En lo referente al origen de las muestras, en nuestro caso, se detectó un 16,9% de resistencia a eritromicina en cepas de *S. agalactiae* aisladas de muestras de orina, y un 13,5% en las cepas procedentes de exudados vaginales (Tabla 23). Estos porcentajes variaron en los diferentes estudios. Según datos de Hsueh *et al.* (2001), la resistencia a eritromicina fue más frecuente en cepas de secreciones respiratorias (69%), seguidas de las que se aislaron del tracto genital (57%), de orina (44%) y de sangre (34%). Otros autores destacaron que la resistencia a eritromicina fue más frecuente entre serotipos, generalmente asociados a cepas invasivas (Fitoussi *et al.*, 2001b).

Según nuestra experiencia, en cepas de *S. agalactiae* procedentes de pacientes de edad avanzada, el nivel de resistencia a eritromicina fue elevado (26,1%) (Tabla 24). Según un estudio reciente (Hsueh *et al.*, 2001), el 61% de las cepas de *S. agalactiae* obtenidas de pacientes de entre 21 y 40 años de edad *versus* el 27% de las cepas aisladas de niños menores de 10 años, fueron resistentes a eritromicina. En cambio, en nuestro estudio, no se detectaron diferencias significativas (14,1% *versus* 11,1%, respectivamente) (Tabla 24). Por otra parte, en un estudio con niños sanos realizado en Las Palmas de Gran Canaria, no se encontraron cepas de *S. agalactiae* resistentes a eritromicina (González-Lama *et al.*, 1999).

En La Rioja, el fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo fue mayoritario en cepas de *S. agalactiae* resistentes a eritromicina (70,7%), seguido del MLS<sub>B</sub> inducible

(26,8%) y, tan sólo el 2,5% de las cepas presentó el fenotipo M (Tabla 27 y figura 17). Porcentajes muy similares se registraron recientemente en Madrid (Betriu *et al.*, 2000). Es interesante que esta distribución fenotípica en *S. agalactiae* parece ser la más común en distintas partes del mundo, como Canadá, Francia y Taiwan (De Azavedo *et al.*, 2001; De Mouy *et al.*, 2001; Hsueh *et al.*, 2001). Por el contrario, en EE.UU., el fenotipo M fue el mayoritario (72%) en cepas de *S. agalactiae* (Morales *et al.*, 1999).

Curiosamente, al comparar la distribución del fenotipo M de resistencia en cepas de nuestra colección de diferentes especies de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos (*S. pyogenes* y *S. agalactiae*), se observó que nuestros datos apoyaban lo expuesto por otros autores: En La Rioja, la mayor parte de las cepas de *S. pyogenes* expresaron un fenotipo M, mientras que en *S. agalactiae* el fenotipo MLS<sub>B</sub> fue el más frecuente (Portillo *et al.*, 1999b; Portillo *et al.*, 2001). Igualmente, dentro de una misma área geográfica como puede ser Madrid, las diferencias en la proporción del fenotipo M fueron apreciables entre *S. pyogenes* (84,9%) y *S. agalactiae* (6,3%) (Betriu *et al.*, 2000). En Francia, según estudios recientes, ocurrió también un fenómeno similar: el 45,2% de las cepas resistentes a eritromicina de *S. pyogenes* expresaron un fenotipo M (Bingen *et al.*, 2000), frente a un 6-7,4% en cepas de *S. agalactiae* (De Mouy *et al.*, 2001; Fitoussi *et al.*, 2001b). Por otra parte, y también en consonancia con nuestra experiencia, tanto en Francia como en España, el fenotipo M fue muy escaso entre las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a macrólidos (<0,1-1,9%) (Arpin *et al.*, 1999b; Portillo *et al.*, 1999a; Betriu *et al.*, 2000; Fitoussi *et al.*, 2001a). Fuera de Europa, estudios en Norte América y Asia confirmaron la distinta distribución fenotípica de acuerdo con la especie de estreptococos. Así, en Canadá, la baja prevalencia del fenotipo M en *S. agalactiae* (12,5%) contrastó con el 70% de cepas resistentes de *S. pyogenes* y el 55% de cepas de *S. pneumoniae* que presentaron dicho fenotipo (Johnston *et al.*, 1998; De Azavedo *et al.*, 1999; De Azavedo *et al.*, 2001). En el caso de Taiwan, las diferencias extremas en la distribución del fenotipo M de resistencia entre las cepas de *S. pyogenes* (>90%), *S. pneumoniae* (30-40%) y *S. agalactiae* (14%) resultaron sorprendentes (Hsueh *et al.*, 1995; Hsueh *et al.*, 1999; Hsueh *et al.*, 2000; Hsueh *et al.*, 2001; datos no publicados de Hsueh *et al.*).

En La Rioja, los genes *erm*(B) o *erm*(TR) se detectaron indistintamente en cepas de *S. agalactiae* con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible y constitutivo; las escasas cepas con fenotipo M presentaron el gen *mef*(A/E) (Tabla 28). Nuestros resultados coinciden con otros publicados en España recientemente (Betriu *et al.*, 2000). De forma similar, en Francia, entre 1999-2000, los genes *erm*(B) y, en menor grado, *erm*(TR) estuvieron ampliamente distribuidos en las cepas de *S. agalactiae* resistentes a eritromicina que expresaron un fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible o constitutivo (De Mouy *et al.*, 2001; Fitoussi *et al.*, 2001b). Fue en este país donde el gen *mef*(E) se describió por primera vez en *S. agalactiae* (Arpin *et al.*, 1999c), aunque, según estudios posteriores, su proporción fue baja (De Mouy *et al.*, 2001; Fitoussi *et al.*, 2001b). De esta forma se confirmaron los estudios preliminares que indicaban que los genes *mef* podrían estar diseminados en otras especies de estreptococos distintas a *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, incluyendo *S. agalactiae* (Tait-Kamradt *et al.*, 1997). En Canadá, según datos recientes publicados por De Azavedo *et al.* (2001), el gen *erm*(TR) fue predominante en las cepas de *S. agalactiae* resistentes a eritromicina (65,6%), y se detectó en cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible o constitutivo, mientras que el gen *erm*(B) sólo estuvo presente en cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (21,9%) (De Azavedo *et al.*, 2001). En Taiwan, el gen *erm*(AM), actualmente denominado *erm*(B) (Roberts *et al.*, 1999), estuvo presente en el 88,7% de las cepas de *S. agalactiae* con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo y en la única cepa analizada con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible; por otra parte, el 64,7% de las cepas con fenotipo M presentaron los genes *mef*(E) y *mef*(A) (Hsueh *et al.*, 2001).

El gen *mre*(A), inicialmente considerado como un nuevo gen de eflujo de macrólidos (Clancy *et al.*, 1997), fue empleado en varios estudios como control interno (De Azavedo *et al.*, 2001; Fitoussi *et al.*, 2001b). De hecho, este gen estuvo presente en todas nuestras cepas de *S. agalactiae*, tanto sensibles como resistentes a eritromicina (Portillo *et al.*, 2001), y se ha descrito recientemente que puede tener una función metabólica en dicha especie, codificando una flavoquinasa (Clarebout *et al.*, 2001). Como dato curioso, la presencia simultánea de dos metilasas diferentes en *S. agalactiae* se ha descrito en dos cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> (inducible o constitutivo) en La Rioja (Tabla 28). Casos similares, también en cepas de *S. agalactiae* con dicho fenotipo, se han registrado en España y en Francia (Betriu *et*

*al.*, 2000; De Mouy *et al.*, 2001). Por otra parte, en cepas de *S. agalactiae* aisladas en La Rioja, no se ha detectado por el momento la presencia simultánea de dos mecanismos de resistencia distintos (por ejemplo, una metilasa Erm y un gen de eflujo) en una misma cepa. Por el contrario, en Francia, De Mouy *et al.* (2001) encontraron dos cepas de *S. agalactiae* con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo que portaron a la vez los genes *erm*(B) y *mef*(A), y en Canadá, De Azavedo *et al.* (2001) refirieron una cepa de *S. agalactiae* con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo que presentó simultáneamente los genes *erm*(TR) y *mef*. Aunque todas las cepas de *S. agalactiae* de nuestra colección resistentes a macrólidos presentaron determinantes de resistencia conocidos (Tabla 28), varios autores han referido cepas de esta especie en las que los genes comúnmente responsables de este tipo de resistencia no han sido detectados (De Mouy *et al.*, 2001; Fitoussi *et al.*, 2001b; Hsueh *et al.*, 2001). La resistencia en estos casos podría relacionarse con mutaciones en el ARN ribosomal 23S o en proteínas ribosomales, tal y como se ha descrito recientemente para *S. pneumoniae* (Tait-Kamradt *et al.*, 2000a; Tait-Kamradt *et al.*, 2000b; Depardieu and Courvalin, 2001; Canu *et al.*, 2002).

En lo que se refiere a otros antimicrobianos estudiados, todas nuestras cepas de *S. agalactiae* fueron sensibles a penicilina y cefotaxima (Tabla 25). Estos estreptococos continúan considerándose uniformemente sensibles a penicilina (Berkowitz *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1998; Pearlman *et al.*, 1998; Aitmhand *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Ruess *et al.*, 2000; Tyrrell *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2001; Matsubara *et al.*, 2001; Murdoch *et al.*, 2001), aunque se ha descrito tolerancia a penicilina ligada al fracaso terapéutico en pacientes con infecciones serias por *S. agalactiae* (Betriu *et al.*, 1994). Sin embargo, y de acuerdo con nuestros resultados (Tablas 18 y 25), algunos autores observaron que los valores de CMI a penicilina eran entre 4 y 8 órdenes superiores en *S. agalactiae* que en *S. pyogenes* (Farley, 2001). En nuestro estudio, los valores de CMI<sub>50/90</sub> en *S. agalactiae* fueron 0,047 / 0,064, respectivamente, frente a 0,008 / 0,012 en *S. pyogenes* (Tablas 18 y 25). Aunque no fue nuestro caso, sí se han descrito cepas de *S. agalactiae* intermedias a penicilina (Wu *et al.*, 1997; Bland *et al.*, 2001; De Azavedo *et al.*, 2001; Hsueh *et al.*, 2001). Por otro lado, la cefotaxima es una potencial alternativa para el tratamiento de neonatos y niños con sospecha de

meningitis, aunque es preferible emplear la penicilina por su menor costo y eficacia. En numerosas estudios epidemiológicos se afirmó la sensibilidad de las cepas de *S. agalactiae* a cefotaxima (Fernández *et al.*, 1998; Aitmhand *et al.*, 2000; Ruess *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2001). Sin embargo, en un estudio reciente en Taiwan, se describió una cepa de *S. agalactiae* con una CMI de 2 µg/ml a penicilina y resistencia a cefotaxima (CMI: 4 µg/ml) (Hsueh *et al.*, 2001).

En *S. agalactiae* y de acuerdo con nuestros resultados, tras realizar la técnica de PFGE mediante digestión con *Sma*I, la diversidad clonal fue una característica común entre los aislados resistentes a eritromicina. Como se observa en la tabla 29, de entre 25 aislados que pudieron tiparse con esta enzima, se obtuvieron 22 patrones diferentes, dos de ellos estrechamente relacionados. En consonancia con nuestros datos, en numerosos estudios previos se ha puesto de manifiesto que los aislados de *S. agalactiae* son genéticamente diversos (Gordillo *et al.*, 1993; Elliott *et al.*, 1998; Rolland *et al.*, 1999; Benson *et al.*, 2001).

### ***Streptococcus* β-hemolíticos del grupo G y grupo C**

Hay pocas referencias sobre la resistencia a macrólidos en SGG y SGC. En La Rioja y de acuerdo con los datos de nuestro estudio, en el periodo 1996-2001, los porcentajes de resistencia a eritromicina en cepas clínicas de SGG y SGC fueron 12,8 y 25%, respectivamente (Tabla 33). En Zaragoza, según confirmaron los datos de Seral *et al.* (2000c), entre 1997-98, las tasas de resistencia a eritromicina en SGG y SGC fueron más elevadas (47 y 36,1% y respectivamente). En Francia entre 1996-97, los porcentajes de resistencia a eritromicina en estas dos especies bacterianas fueron inferiores al 20% (Quentin, C. Comunicación personal a Arpin, C.). Más bajas fueron las tasas de resistencia registradas en Finlandia, donde las proporciones de cepas de SGG y de SGC resistentes a eritromicina (3,5 y 3,6%, respectivamente) y a clindamicina (0,3 y 1%, respectivamente) fueron similares en el periodo 1992-95 (Kataja *et al.*, 1998b). En Inglaterra, a mitad de la década de 1980, la resistencia de SGG y SGC fue inferior al 2% (Barnham and Cole, 1.886). Por otra parte, en un estudio de sensibilidad a antibióticos realizado en EE.UU. entre 1991-96 en cepas de

SGG y de SGC - procedentes en su mayoría de pacientes con bacteriemia -, los niveles de resistencia a eritromicina fueron del 7,4 y 20% y respectivamente (Zaoutis *et al.*, 1999). En otra investigación llevada a cabo en Taiwan entre 1993-94, el 23,5% de cepas de SGG fueron resistentes a eritromicina y el porcentaje fue del 41,7% para SGC (Wu *et al.*, 1997). Al igual que en otras especies de *Streptococcus* descritas en capítulos anteriores, se pone de manifiesto que la variación geográfica de la prevalencia de la resistencia a macrólidos en cepas de SGG y SGC es un hecho documentado.

De acuerdo con nuestra experiencia, el fenotipo MLS<sub>B</sub> fue el único detectado en La Rioja en cepas clínicas de SGG y de SGC resistentes a eritromicina (Tabla 33). No se detectó ninguna cepa con fenotipo M, lo que contrasta con lo descrito para otros grupos de *Streptococcus* β-hemolíticos. Nuestros datos concuerdan con lo descrito en otras zonas de España para estos microorganismos (Seral *et al.*, 2000c). En el caso de los SGG, en nuestra área, el 66,7% expresó un fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo y el resto, inducible. Por otra parte, el 75% de las cepas de SGC mostró un fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo y el 25% fue de carácter inducible. Asimismo, en Francia, entre 1996-97, el fenotipo MLS<sub>B</sub> fue predominante en cepas de SGG y SGC, y tan sólo se detectó una cepa de SGC con fenotipo M (<0,1%) (Arpin *et al.*, 1999b). Sin embargo, en Finlandia, se encontraron grandes diferencias en la distribución fenotípica entre estas dos especies de estreptococos: el fenotipo MLS<sub>B</sub> fue mayoritario en cepas de SGG (97%), mientras que la gran mayoría de cepas de SGC expresaron un fenotipo M (95%) (Kataja *et al.*, 1998b).

En La Rioja, todas las cepas de SGG y SGC resistentes a eritromicina, con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible o constitutivo, presentaron el gen *erm*(TR). No se detectó en nuestras cepas la presencia de ningún otro determinante de resistencia conocido (Tabla 34). Del mismo modo, según datos recientes de Seral *et al.* (2000c), el 90% de las cepas de estas dos especies analizadas en Zaragoza presentó también el gen *erm*(TR); tan sólo en una cepa de SGC con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo se detectó el gen *erm*(B). Estos datos concordaron a su vez con los de Kataja *et al.* (1998b) en lo que se refiere a los SGG: en dicha especie, el gen *erm*(TR) fue mayoritario (94%) y se detectó en todas las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible y en algunas con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo; otras cepas con este último fenotipo presentaron ocasionalmente

el gen *erm(B)*. En cambio, según estos mismos autores, el 95% de las cepas de SGC resistentes a eritromicina portaron el gen *mef(A)* (Kataja *et al.*, 1998b). En nuestro estudio, de acuerdo con los resultados obtenidos, ninguna cepa de SGG ni de SGC de nuestra colección presentó dos determinantes *erm* de resistencia, ni dos mecanismos de resistencia diferentes de forma simultánea (Tabla 34). Sin embargo, en Zaragoza, se detectó una cepa de SGG (con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible) que presentó a la vez los genes *erm(B)* y *erm(TR)*, y se aisló una cepa de SGC (con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo) que presentó simultáneamente tres determinantes de resistencia: *erm(B)*, *erm(TR)* y *mef(A)* (Seral *et al.*, 2000c).

En nuestro caso, todas las cepas de SGG y SGC fueron sensibles a penicilina, lo que concuerda con datos previamente publicados por otros autores (Kataja *et al.*, 1998b; Zaoutis *et al.*, 1999; Seral *et al.*, 2000c), y a cefotaxima (Tabla 32).

Por otra parte, los resultados obtenidos por nuestro grupo tras someter las cepas de SGG y SGC resistentes a eritromicina a la técnica de PFGE, revelaron una gran diversidad clonal en ambas especies de estreptococos (Tabla 35). La capacidad de esta técnica para demostrar el polimorfismo en cepas de SGG y SGC se ha demostrado en estudios anteriores (Bert *et al.*, 1997).

## *S. pneumoniae*

Innumerables publicaciones confirman que la resistencia a eritromicina y otros macrólidos en *S. pneumoniae* está aumentando durante la última década en Europa, Asia, África y América (Geslin *et al.*, 1992; Marchese *et al.*, 1995; Ducoffre, 1998; Geslin, 1998; Baquero *et al.*, 1999c; Hsueh *et al.*, 1999; Jacobs *et al.*, 1999a; Schito *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1999; Huebner *et al.*, 2000; Lagrou *et al.*, 2000; Hyde *et al.*, 2001). En nuestro estudio se analizó la tasa de resistencia a eritromicina en cepas de *S. pneumoniae* recogidas en La Rioja entre 1996 y 2001. Según nuestros datos, durante 1996 se alcanzó un 64,4% de resistencia, y se observó una progresiva disminución a lo largo del periodo de estudio, hasta llegar a un 47,3% en el año 2001 (Tabla 39). La tasa de resistencia en nuestra comunidad fue superior a la que se detectó en otras zonas próximas, como en Zaragoza, donde los porcentajes oscilaron

entre un 30% y un 42% en el trienio 1997-99 (Seral *et al.*, 2000a). Curiosamente, el suave descenso en la resistencia a eritromicina observado en La Rioja durante los seis años de estudio fue similar al descrito en Italia por Marchese *et al.* (2001) entre 1998-99 (desde un 31,7% hasta un 25,5%), pero contrario a la tendencia general observada en España. Varias publicaciones señalan que en nuestro país la resistencia a eritromicina aumentó de forma continua en la década de 1990 desde un 10% en 1990 a un 35%-42% en 1999, según las regiones (Fenoll *et al.*, 1998; Baquero *et al.*, 1999c; Morosini *et al.*, 2001; Oteo *et al.*, 2001; Pérez-Trallero *et al.*, 2001a; Seral *et al.*, 2001a).

Al igual que ocurre entre diferentes provincias españolas, la prevalencia de la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* en todo el mundo varía considerablemente. Según datos del año 1998, la tasa de resistencia fue alta en China (80-81,5%), Japón (73%), Francia (47,3%) e Italia (42%), intermedia en EE.UU. (21-22%) y Reino Unido (18,4%), y menor en Canadá (7,5%) (Jacobs *et al.*, 39<sup>th</sup> ICAAC; Thornsberry *et al.*, 1999b; Sahm *et al.*, 2000; Schito *et al.*, 2000; Ip *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2001b). Las diferencias observadas en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* entre distintos países pueden estar relacionadas con la distinta política de antibióticos y son numerosas las citas bibliográficas que hacen referencia a este problema. Por ejemplo, un estudio llevado a cabo durante 1999-2000 en países de Europa Central y Europa del Este reflejó estas variaciones: las tasas de resistencia a eritromicina en *S. pneumoniae* fueron bajas en Latvia, República Checa, Eslovenia y Lituania (4,2-5,4%), probablemente debido al consumo limitado de antibióticos en estos países, mientras que en Hungría se alcanzó un 35% de resistencia (Nagai *et al.*, 2002a). En cepas de *S. pneumoniae* recogidas entre 1993-96 y en 1997 en América Latina y el Caribe, se observó que la tasa de resistencia a eritromicina era moderada (6,4-12,9%), probablemente como reflejo del tipo de antibióticos utilizado (Tomasz *et al.*, 1998; Jacobs and Appelbaum, 2000). En cambio, la situación fue más preocupante en EE.UU., donde, de acuerdo con tres estudios multicéntricos, a mediados de 1990 la tasa de resistencia alcanzó el 10%, se situó en un 19,2% entre 1997-98 y aumentó a un 25,7% entre 1999-2000 (Doern *et al.*, 1996; Doern *et al.*, 1998; Doern *et al.*, 2001). Datos recogidos por Hyde *et al.* (2001) mostraron que, en EE.UU., el porcentaje de resistencia a eritromicina en cepas invasivas de *S.*

*pneumoniae* se duplicó entre 1995-99, de forma simultánea al aumento del consumo de macrólidos, especialmente en niños menores de 5 años. De igual modo, el aumento de la resistencia a eritromicina en neumococos experimentado en Italia podría ser consecuencia de una mayor presión selectiva generada por el aumento del consumo de macrólidos en medicina (Oster *et al.*, 1999), como se demostró para *S. pyogenes* (Seppälä *et al.*, 1995). Por el contrario, según estudios del mismo tipo llevados a cabo en Canadá entre 1997-2000, el porcentaje de resistencia a eritromicina se mantuvo en ese país en torno al 8%, a pesar del aumento del consumo de macrólidos, especialmente de azitromicina y claritromicina (Zhanel *et al.*, 1999; Hoban *et al.*, 2001). Por este motivo, también en Canadá, Green *et al.* (2000) sugirieron que la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* podría no estar correlacionada con el consumo de éstos. Este fenómeno podría atribuirse a que, entre 1995 y 1999, el consumo global de antibióticos disminuyó en Canadá un 14% (Zhanel *et al.*, 40<sup>th</sup> ICAAC). Por otra parte, el aumento de la resistencia en *S. pneumoniae* puede deberse en parte al aumento del número de cepas con altos niveles de resistencia, lo que, a su vez, puede estar relacionado con el aumento del consumo de macrólidos (Liñares *et al.*, 1992; Baquero *et al.*, 1999c; Gay *et al.*, 2000). En este sentido, Hyde *et al.* (2001) observaron un aumento de los valores de CMI<sub>50</sub> a eritromicina en cepas de *S. pneumoniae* con fenotipo M. En algún caso se ha conseguido inducir *in vitro* la resistencia a eritromicina en *S. pneumoniae* mediante pases sucesivos en presencia de antibiótico (Carsenti-Etesse *et al.*, 1996).

Según nuestros resultados, el 63,5% de las cepas de *S. pneumoniae* de este trabajo aisladas del tracto respiratorio superior fue resistente a eritromicina, frente a un 30,4% en cepas aisladas de sangre y LCR (Tabla 36). Esto concuerda con datos previamente publicados que indican que la resistencia a macrólidos fue mayor entre las cepas de *S. pneumoniae* no invasivas, especialmente en las aisladas del tracto respiratorio superior (Doern *et al.*, 1996; Baquero *et al.*, 1999c; Doern *et al.*, 1999; Hsueh *et al.*, 1999; Thornsberry *et al.*, 1999a; Marco *et al.*, 2000). Por el contrario, en Italia en 1999, los porcentajes de resistencia a macrólidos en cepas de *S. pneumoniae* aisladas de sangre fueron comparables a los encontrados en cepas de origen respiratorio ( $\cong 25\%$ ) (Marchese *et al.*, 2001).

En La Rioja, el 71,2% de las cepas de *S. pneumoniae* aisladas de niños menores de 10 años fue resistente a eritromicina, mientras que en adultos de edad comprendida entre 31 y 70 años, el porcentaje de resistencia no alcanzó el 40% (Tabla 37). Aunque en algunos casos, no hubo diferencias significativas en términos de resistencia a macrólidos entre pacientes de estos dos grupos de edad (Hsueh *et al.*, 1999; Marco *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2001b), son varios los estudios que confirman nuestros datos, afirmando que en *S. pneumoniae* la frecuencia de resistencia a macrólidos fue mayor en cepas aisladas de pacientes pediátricos que de pacientes adultos (Doern *et al.*, 1996; Doern *et al.*, 1999; Thornsberry *et al.*, 1999a; Gay *et al.*, 2000; Marchese *et al.*, 2001). Estas diferencias podrían atribuirse al elevado uso de antimicrobianos en pediatría y a la transmisión de cepas resistentes en guarderías. En Grecia, entre 1997-99, Syrogiannopoulos *et al.* (2000) detectaron que el 18% de las cepas de *S. pneumoniae* aisladas de la nasofaringe de niños menores de dos años fueron resistentes a eritromicina, observando correlación entre la colonización con cepas resistentes a eritromicina y la terapia previa con macrólidos. Según estudios epidemiológicos similares realizados en España, el porcentaje fue más elevado (23-36%) (García de Lomas *et al.*, 1997; del Castillo *et al.*, 1998) y aún mucho mayor en muestras nasales de niños en China (72%) (Li *et al.*, 2001).

La prevalencia de cepas de *S. pneumoniae* con un determinado mecanismo de resistencia varía geográficamente. En La Rioja, entre 1996-2001 y de acuerdo con nuestros datos, el fenotipo de resistencia MLS<sub>B</sub> constitutivo fue el predominante (98,3%) entre las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina (Tabla 40 y figura 26). Una situación similar fue observada en toda Europa. Por citar algunos casos, diremos que en Italia (Marchese *et al.*, 1999; Oster *et al.*, 1999), en España (Baquero *et al.*, 1999c; Portillo *et al.*, 1999a; Pérez-Trallero *et al.*, 2001a), en Francia (Arpin *et al.*, 1999b; Fitoussi *et al.*, 2001a; Marchandin *et al.*, 2001) y en Bélgica (Descheemaeker *et al.*, 2000; Lagrou *et al.*, 2000) el fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo fue el más frecuente, con tasas en torno al 90%. En Grecia y en varios países de Sudamérica, el fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo también fue predominante, aunque con unos porcentajes ligeramente inferiores (67,9 y 71,4%, respectivamente) (Syrogiannopoulos *et al.*, 2000; Tomasz *et al.*, 1998, respectivamente). Por el contrario, el fenotipo M en *S. pneumoniae* fue mayoritario en Canadá (55,8%)

(Johnston *et al.*, 1998), en EE.UU. (61-85%) (Sutcliffe *et al.*, 1996b; Corso *et al.*, 1998; Barry *et al.*, 1998; Shortridge *et al.*, 1999; Doern *et al.*, 2001; Hyde *et al.*, 2001) y en Reino Unido (61,4%) (Farrell *et al.*, 2001). En nuestro caso, este fenotipo apenas representó un 1,2% del total de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a macrólidos (Tabla 40 y figura 26). Hipotéticamente, la rareza del fenotipo M en Francia (Arpin *et al.*, 1999b) podría explicarse por el consumo en dicho país de macrólidos de 16 átomos y por la selección de cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> (Angot *et al.*, 2000). Sin embargo, en otros países europeos, como Italia o Bélgica, donde los macrólidos de 16 átomos no están comercialmente disponibles, la resistencia mediante eflujo tampoco es común (Marchese *et al.*, 1999; Oster *et al.*, 1999; Lagrou *et al.*, 2000; Descheemaeker *et al.*, 2000; Del Grosso *et al.*, 2002). Por el contrario, en Japón, donde los macrólidos de 16 átomos sí están comercialmente disponibles, el 40,3% de las cepas resistentes de *S. pneumoniae* presentaron el fenotipo M (Nishijima *et al.*, 1999). A la vista de estos datos, parece que la distribución de patrones de resistencia a macrólidos probablemente esté relacionada con la diseminación clonal de cepas resistentes, seleccionadas por factores diferentes al consumo de macrólidos, y con la diseminación epidémica de genes de resistencia a macrólidos (Angot *et al.*, 2000). Asimismo, en algunos casos, dentro de un mismo país también se han puesto de manifiesto las variaciones geográficas en la distribución de fenotipos. Así, según estudios llevados a cabo en China en *S. pneumoniae*, el 73% de las cepas resistentes presentó el fenotipo M en Hong Kong (Ip *et al.*, 2001), mientras que en Beijing, el 89% expresó un fenotipo MLS<sub>B</sub> (McGee *et al.*, 2001). Por otra parte, entre las cepas de *S. pneumoniae* recogidas en nuestra comunidad y de acuerdo con el test de doble difusión por disco, un escaso porcentaje expresó un fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (1%) (Tabla 40 y figura 26). En cambio, en Japón, a mediados de la década de 1990, el fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible fue predominante, representando un 59,7% de las cepas resistentes (Nishijima *et al.*, 1999). Conviene resaltar el hecho de que en neumococos, la expresión inducible de la resistencia MLS<sub>B</sub> es aún una cuestión abierta (Rosato *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1999), dependiendo de los antibióticos utilizados en el test (eritromicina y clindamicina con o sin rokitamicina) (Montanari *et al.*, 2001), e incluso del medio de cultivo (Jones *et al.*, 1996). Agouridas *et al.* (1997) se basaron en las CMIs a

rokitamicina para distinguir entre el carácter inducible o constitutivo de la resistencia MLS<sub>B</sub> en *S. pneumoniae*, tomando  $\leq 1$  y  $> 4$   $\mu\text{g/ml}$  como los puntos de corte para las cepas resistentes inducibles y constitutivas, respectivamente. Por otra parte, Giovanetti *et al.* (2000) destacaron que el carácter inducible de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina no fue detectado mediante el test de doble disco; sin embargo, mediante el método de CMI a rokitamicina todas las cepas excepto una fueron inducibles. El significado de la resistencia MLS inducible parece diferente en *S. pneumoniae* que en *S. pyogenes*.

En La Rioja, al realizar los análisis mediante PCR, el gen *erm(B)* estuvo presente en todas las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina que expresaron un fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (CMI a eritromicina: 32- $\rightarrow$ 256  $\mu\text{g/ml}$ ). En la cepa analizada con fenotipo M (CMI a eritromicina: 32  $\mu\text{g/ml}$ ), se detectó el gen *mef(E)* (Tabla 41). Típicamente, las cepas de *S. pneumoniae* que presentan el gen *mef* tienen valores de CMI<sub>90</sub> para eritromicina  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  (Sutcliffe *et al.*, 1996a; Marchese *et al.*, 1998; Marchese *et al.*, 1999; Shortridge *et al.*, 1999; Lagrou *et al.*, 2000), aunque se han referido cepas con una CMI de hasta 32  $\mu\text{g/ml}$  que expresan el fenotipo M (Hoban *et al.*, 2000), como fue nuestro caso (Tabla 41). Asimismo, en algunas ocasiones, se ha descrito un pequeño porcentaje de cepas con el gen *erm(B)* y con bajo nivel de resistencia a eritromicina (Pérez-Trallero, 2000; Morosini *et al.*, 2001), aunque la mayoría expresa alta resistencia.

De acuerdo con nuestros resultados (Figura 29), se ha descrito en varios estudios que, aunque la proporción entre los genes *mef(E)* y *erm(B)* varía geográficamente, más del 97% de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a macrólidos presentan uno de estos dos genes (Johnston *et al.*, 1998; Klugman *et al.*, 1998; Shortridge *et al.*, 1999; Gay *et al.*, 2000; Syrogiannopoulos *et al.*, 2000; Waites *et al.*, 2000; Morosini *et al.*, 2001). Como ocurrió con las cepas de nuestra colección, el determinante *erm(B)* [o *erm(AM)*] se detectó en cepas de *S. pneumoniae* con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo en diferentes países (Marchese *et al.*, 1998; Marchese *et al.*, 1999; Shortridge *et al.*, 1999; Angot *et al.*, 2000; Descheemaeker *et al.*, 2000). Un reciente estudio, llevado a cabo en nuestro país por Morosini *et al.* (2001), reveló que la incidencia de este determinante es mayor en España (94,9% de cepas resistentes) que en otras áreas del mundo, incluyendo países mediterráneos y Norteamérica. En

EE.UU. y Canadá, la mayoría de las cepas de *S. pneumoniae* presentaron el gen *mef(E)* y expresaron bajo nivel de resistencia a macrólidos (Corso *et al.*, 1998; Johnston *et al.*, 1998; Shortridge *et al.*, 1999). Según datos de tres estudios multicéntricos (Doern *et al.*, 1996; Doern *et al.*, 1998; Doern *et al.*, 2001), el porcentaje relativo de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina que presentaron el gen *mef(A)* o el gen *erm(B)* apenas varió en EE.UU. entre 1994 y 1999. Por el contrario, dos estudios llevados a cabo en Atlanta (EE.UU.), (Gay *et al.*, 2000; Hyde *et al.*, 2001) confirmaron que el porcentaje de cepas invasivas de *S. pneumoniae* resistentes a macrólidos asociadas al gen *mef(E)* casi se triplicó en esos mismos años, mientras que la proporción de cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> se mantuvo estable. Las diferencias pueden deberse a que estos últimos estudios se limitaron al área geográfica de Atlanta y sólo fueron analizadas cepas invasivas. El aumento de cepas de *S. pneumoniae* que contenían el gen *mef(E)* se ha descrito asimismo en Sudáfrica (Widdowson *et al.*, 1998; Huebner *et al.*, 2000), en Canadá (Johnston *et al.*, 1998) y en Hong Kong (Ip *et al.*, 2001). Según estos autores, la rápida diseminación del gen *mef(E)* podría explicarse mediante la expansión de clones multi-resistentes de *S. pneumoniae* y por la transferencia horizontal de elementos genéticos entre neumococos. Este mismo fenómeno fue observado en *S. pyogenes* (De Azavedo *et al.*, 1999).

Por otra parte, la cepa de *S. pneumoniae* de nuestro estudio con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible presentó el gen *erm(TR)* (Tabla 41). La primera identificación de resistencia a eritromicina en *S. pneumoniae* atribuida únicamente a la presencia del gen *erm(A)* [subclase *erm(TR)*] se llevó a cabo en Grecia en cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (Syrogiannopoulos *et al.*, 2001). En un estudio anterior (Betriu *et al.*, 2000), se había encontrado una cepa de *S. pneumoniae* que portaba simultáneamente el gen *erm(A)* [subclase *erm(TR)*] y el gen *erm(B)*. En otros casos, en cepas de *S. pneumoniae* con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible se detectó el gen *erm(B)* (Nishijima *et al.*, 1999; Angot *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2002a).

En La Rioja no detectamos ninguna cepa de *S. pneumoniae* con un doble mecanismo de resistencia (Tabla 41 y figura 29). Sin embargo, la adquisición de una metilasa *erm(B)* y de un mecanismo de eflujo *mef(A/E)* en la misma cepa se ha descrito en neumococos en muchas ocasiones en la literatura (Corso *et al.*, 1998;

Johnston *et al.*, 1998; Angot *et al.*, 2000; Gay *et al.*, 2000; Farrell *et al.*, 2001; Hoban *et al.*, 2001; Marchandin *et al.*, 2001; McGee *et al.*, 2001; Morosini *et al.*, 2001; Seral *et al.*, 2001a). Curiosamente, Lagrou *et al.* (2000) detectaron los genes *mef(E)* y *erm(AM)* en tres cepas con fenotipo M y bajo nivel de resistencia a eritromicina; a pesar de la presencia del gen *erm(AM)*, la resistencia a clindamicina no se expresó constitutivamente y tampoco pudo ser inducida. Por otra parte, en Japón, Nishijima *et al.* (1999) detectaron los genes *erm(B)* y *mef(E)* en diez cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible. De acuerdo con nuestros resultados, ninguna cepa de *S. pneumoniae* analizada en La Rioja presentó el gen *msr(A)* (Tabla 41). Seral *et al.* (2001a) detectaron por primera vez el gen *msr(A)* en *S. pneumoniae*, asociado al gen *erm(B)* en una cepa con fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo, y al gen *mef(A)* en una cepa con fenotipo M (ó MS). Aunque en nuestro caso no encontramos ninguna cepa de *S. pneumoniae* sin mecanismo de resistencia MLS conocido, son abundantes las referencias en la literatura en las que, en cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina y con actividad variable de clindamicina, no se han detectado los genes *mef(E)* ni *erm(B)* [o *erm(AM)*], ni otros determinantes conocidos de resistencia a macrólidos (Corso *et al.*, 1998; Johnston *et al.*, 1998; Shortridge *et al.*, 1999; Gay *et al.*, 2000; Waites *et al.*, 2000; Hoban *et al.*, 2001). Probablemente, en estas cepas existan otro u otros mecanismos de resistencia relacionados con mutaciones en el ARN ribosomal 23S o en las proteínas ribosomales L4 y L22 (Tait-Kamradt *et al.*, 2000a; Tait-Kamradt *et al.*, 2000b; Depardieu and Courvalin, 2001; Canu *et al.*, 2002), tal y como confirman los datos de Shortridge *et al.* (2002). Un reciente estudio mostró que la prevalencia del mecanismo de resistencia mediado por mutaciones de la proteína L4 en cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina fue del 15% (Nagai *et al.*, 2002a).

La primera cepa de *S. pneumoniae* resistente a penicilina fue descrita en Boston a mediados de la década de los 60; en la actualidad, la resistencia a este betalactámico en *S. pneumoniae* es prevalente y con frecuencia está asociada con la resistencia a otros antimicrobianos (Appelbaum, 1992; Klugman, 1990). La asociación entre consumo de macrólidos y resistencia a penicilina y entre consumo de betalactámicos y resistencia a eritromicina (selección de corresponsencia) desempeña un papel importante en *S. pneumoniae* (Granizo *et al.*, 2000b; García-Rey *et al.*, 2002).

Como también confirman nuestros datos (Tabla 42), en multitud de estudios de vigilancia epidemiológica se observó que la resistencia a macrólidos fue más frecuente en cepas resistentes a penicilina que en las sensibles (Geslin *et al.*, 1992; Marton *et al.*, 1992; Doern *et al.*, 1996; Barry *et al.*, 1997; Tomasz *et al.*, 1998; Baquero *et al.*, 1999c; Thornsberry *et al.*, 1999a; Green *et al.*, 2000; Benbachir *et al.*, 2001; Marchese *et al.*, 2001; Morosini *et al.*, 2001; Oteo *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001); en cambio este fenómeno no se observó para cefotaxima (Baquero *et al.*, 1999c). En nuestro estudio el porcentaje de resistencia a eritromicina fue mayor entre las cepas con resistencia intermedia a penicilina que en las resistentes (69,9% frente a 7,7%, respectivamente) (Tabla 42). Por el contrario, en otros casos, el porcentaje de resistencia a eritromicina fue menor en las cepas intermedias a penicilina que en las altamente resistentes (Doern *et al.*, 1996; Tomasz *et al.*, 1998) o incluso, según otros autores, no se detectaron diferencias (Baquero *et al.*, 1999c; Oteo *et al.*, 2001). La resistencia a cefotaxima en *S. pneumoniae* fue muy escasa en nuestro periodo de estudio (0,4%) (Tabla 42) y todas las cepas resistentes a cefotaxima (n=3) fueron a su vez resistentes a penicilina. El hallazgo en EE.UU. de cepas de *S. pneumoniae* con alta resistencia a cefotaxima y baja resistencia a penicilina y la confirmación de que esa resistencia podía adquirirse en un solo paso de transformación, causó la alarma entre los microbiólogos (Muñoz *et al.*, 1992), pero por fortuna este tipo de resistencia es muy rara fuera de ese país. Fenoll *et al.* (1998) encontraron sólo tres cepas con ese fenotipo entre más de 9000 cepas analizadas y, en su caso, el porcentaje de resistencia a cefotaxima fue de un 2,5%.

Según nuestros datos, en La Rioja entre 1996 y 2001 disminuyó la ausencia de sensibilidad (cepas altamente resistentes y con resistencia intermedia) a penicilina (desde un 60 a un 48,2%) y a cefotaxima (desde un 15,6 a un 5,5%) en *S. pneumoniae* (Tabla 43 y figuras 30 y 32). Del mismo modo, Cercenado *et al.* (41<sup>st</sup> ICAAC) documentaron recientemente un descenso en España de la incidencia de la resistencia a penicilina y a cefotaxima en esta especie.

Por otra parte, una de las 11 cepas de *S. pneumoniae* en las que analizamos la resistencia a aminoglucósidos expresó resistencia de alto nivel a kanamicina (CMI >1000 µg/ml), presentando el gen *aph(3')-III*; dicha cepa mostró un fenotipo de resistencia MLS<sub>B</sub> constitutivo. Fue en 1991 cuando se describió en *S. pneumoniae*

un elemento genético de 25,3 Kb, llamado Tn1545, que contenía los determinantes *tet(M)*, *erm(B)*, así como un determinante de resistencia para kanamicina (*aph3'*-III) (Poyart-Salmeron *et al.*, 1991). En un estudio reciente realizado en España por Seral *et al.* (2000b; 2001b) se encontró que el 4,8% de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina con el gen *erm(B)* contenían también el gen *aph3'*-III. En cambio, en EE.UU., parece que aislados clínicos de *S. pneumoniae* pertenecientes a los clones 23F y 6B han perdido el gen *aph3'*-III (Muñoz *et al.*, 1991).

### ***Enterococcus spp.***

Los resultados obtenidos con la serie de 78 cepas de *Enterococcus spp.* analizadas pusieron de manifiesto la presencia de distintos mecanismos de resistencia a antibióticos MLS que se discuten a continuación.

En La Rioja, el gen *erm(B)* fue el más frecuentemente encontrado en las cepas de *Enterococcus* altamente resistentes a antibióticos MLS<sub>B</sub>, independientemente de la especie (39/40) (Tabla 45). Nuestros datos concuerdan con otros estudios en los que el gen *erm(B)* fue mayoritario, con porcentajes que oscilaron entre el 85 y el 93% de las cepas de *Enterococcus* resistentes a eritromicina (Jensen *et al.*, 1999; Aarestrup *et al.*, 2000c; Schmitz *et al.*, 2000). Este determinante de resistencia se encuentra ampliamente distribuido en estreptococos y enterococos, a menudo integrado en transposones, como Tn917 (Tomich *et al.*, 1980) y Tn1545 (Courvalin *et al.*, 1986), cuya transferencia horizontal se ve altamente favorecida. Tres estudios recientes refieren que los genes *vat* [*vat(E)* ó *vat(D)*], relacionados con la resistencia a estreptograminas de tipo A, se transfieren junto al gen *erm(B)* en cepas de *E. faecium* (Jensen *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2000; Hammerum *et al.*, 2001), y cabe la posibilidad de que, en algunas ocasiones, *erm(B)*-*vat(D)* se encuentren integrados en un mismo transposón. Con respecto a otros determinantes *erm* de resistencia, de entre todas las cepas de enterococos de nuestra colección, tan sólo una, perteneciente a la especie *E. faecium*, presentó el gen *erm(A)* (Tabla 45). Un estudio publicado simultáneamente confirmó, también con una frecuencia muy escasa, la presencia de este determinante de resistencia en *E. faecium* (Schmitz *et al.*, 2000). A su vez,

Jensen *et al.* (1999) detectaron el gen *erm(C)* en una cepa de *E. faecium* de origen animal; sin embargo, dicho gen no fue encontrado en ninguna de nuestras cepas. De igual modo, en nuestra colección de cepas de enterococos, no se detectó la presencia simultánea de dos determinantes *erm* de resistencia; en cambio, Schmitz *et al.* (2000) demostraron la asociación de *erm(B)* y *erm(A)* en dos cepas de *E. faecium* resistentes a eritromicina. Se han referido en la literatura cepas de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a eritromicina sin un mecanismo de resistencia conocido hasta la fecha (Schmitz *et al.*, 2000), lo que implica que otros mecanismos contribuyen en la resistencia a macrólidos en esta especie. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, en La Rioja no se detectó ninguna cepa de estas características.

Debido a la escasez de referencias en la literatura sobre sistemas de bombeo de macrólidos en enterococos, decidimos investigar en nuestras cepas la presencia de genes de resistencia a macrólidos relacionados con bombas de eflujo descritos para otros géneros de bacterias Gram-positivas. En un estudio preliminar, Fraimow *et al.* (97<sup>th</sup> GMASM) documentaron la presencia de los determinantes de eflujo *mefA/E* en el 42% de las cepas de *E. faecium* analizadas –aunque estos datos nunca fueron publicados- y, en otro estudio, se confirmó la presencia de genes *mef* en siete cepas de *Enterococcus* spp. con bajo nivel de resistencia a eritromicina (Luna *et al.*, 1999). En nuestra serie de *Enterococcus* no se detectaron los genes *mef*. En cambio, la amplificación por PCR utilizando los cebadores publicados para el gen *msr(A)* descrito en estafilococos, produjo resultados sorprendentes (Figura 38): Todas las cepas de *E. faecium* analizadas, independientemente de su fenotipo de resistencia MLS, dieron un resultado positivo, al contrario de lo que ocurrió, sin excepción, con las cepas del resto de especies estudiadas (*E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*). Se confirmó que la secuencia nucleotídica del amplicón de tres cepas de *E. faecium* con diferente patrón de resistencia a eritromicina era idéntica y que, a su vez, mostraba un alto porcentaje de identidad con el gen *msr(A)* de estafilococos. Por este motivo, y dado que los genes *msr(A)* y *msr(B)* habían sido previamente publicados (Ross *et al.*, 1990; Milton *et al.*, 1992), decidimos designar este nuevo gen como *msrC* (GenBank accesión n° AJ243209). A su vez, se comprobó mediante hibridación (*southern blotting*) que dicho gen se encuentra localizado en el cromosoma de *E. faecium*, al contrario de *msr(A)* y

*msr(B)*, que son de origen plasmídico. El carácter cromosómico de *msrC*, unido a su presencia en todas las cepas de *E. faecium*, pero no en cepas de otras especies del mismo género, nos indujo a pensar que se trataba de un gen intrínseco. Nuestros datos concuerdan con los posteriormente publicados por Singh *et al.* (2001b). Según los resultados de nuestro grupo y los obtenidos por Singh *et al.* (2001b), el gen *msrC* se detectó en las 256 cepas de *E. faecium* investigadas (todas de origen humano, excepto dos cepas aisladas de animales), mientras que en ninguna de las otras especies de enterococos analizadas se encontró dicho gen, lo que corroboraba nuestra hipótesis inicial de que *msrC* era un gen intrínseco en la especie *E. faecium*. Por el contrario, cuando Werner *et al.* (2001) analizaron la presencia del gen *msrC* por hibridación en 139 cepas de *E. faecium* de diferentes orígenes (aguas residuales, animal –cerdos y pollos-, alimentario y humano), sensibles y resistentes a eritromicina, encontraron que el 10,8% (n=15) fueron negativas para *msrC* (10 de 32 procedentes de muestras de pollos, 1 de 21 de aguas residuales, y 4 de 70 de origen humano). Estos nuevos datos sugirieron que *msrC* podría no ser un gen intrínseco en cepas de *E. faecium*. En cualquier caso, teniendo en cuenta los tres estudios combinados (Portillo *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2001b; Werner *et al.*, 2001), la presencia del gen *msrC* se ha documentado (mediante PCR y/o hibridación) en el 98,7% de, aproximadamente, 320 cepas de *E. faecium* aisladas de humanos. Ante esto, podríamos preguntarnos si la sonda de *msrC* utilizada por Werner *et al.* (2001), es capaz de abarcar el gen completo o si puede que éste no se detecte en algunos casos en los que haya sufrido una delección parcial. Aún con todo, parece que sólo en un pequeño porcentaje de cepas de *E. faecium* no se detecta el gen *msrC* con los cebadores establecidos por Werner *et al.* (2001).

Por otra parte, parece que el gen *msrC* sí es específico de *E. faecium* (ya que en ningún caso se ha encontrado en cepas de enterococos de una especie diferente), pero no es lo suficientemente sensible como para identificar todas las cepas de esta especie. Ésta puede ser una limitación a tener en cuenta en cualquier método de identificación de especies basado en un solo gen, sobre todo si se trata de un gen no esencial, como en el caso que nos ocupa. Mutantes con el gen *msrC* inactivado no experimentaron diferencias en su cinética de crecimiento con respecto a la cepa parental (Singh *et al.*, 2001b).

Quedaría aún por determinar si el gen *msrC* fue adquirido horizontalmente por *E. faecium* en el pasado, o si se trata de un gen intrínseco que se ha perdido durante la evolución de esta especie en un pequeño porcentaje de cepas. Si lo primero es cierto, la detección de *msrC* en más del 95% de las cepas sugiere que, o bien fue adquirido muy pronto en la historia de esta especie, o bien su presencia ofrece una ventaja sustancial. Se sabe que este gen no es esencial para la supervivencia *in vitro* de *E. faecium*; por este motivo, parece que su función, cualquiera que sea, es secundaria para la supervivencia de la célula y/o podría ser asumida por otro componente celular. Asimismo, la secuenciación de las regiones que rodean *msrC* puede revelar la presencia de elementos que hagan pensar en una transferencia horizontal de dicho gen entre cepas de *E. faecium*, o alternativamente, pueden encontrarse restos de *msrC*, que sugieran la delección de un gen que fue intrínseco en esta especie. Estos estudios y otros similares posiblemente nos ayudarían a descubrir cómo han evolucionado las distintas especies de enterococos.

Por otra parte, la secuenciación de los productos de PCR de tres cepas de *E. faecium* de nuestra colección y la posterior comparación de su secuencia de AA con otras existentes en el banco de genes (MsrA y MsrB, entre otras), puso de manifiesto que, al igual que ellas, MsrC era una proteína de la familia de los transportadores ABC (Figura 39). Dicho término fue acuñado en 1990 (Hyde *et al.*, 1990), basándose en el reconocimiento general de la importancia de esta familia de proteínas, evolutivamente relacionadas pero funcionalmente diversas, que hidrolizan ATP como fuente de energía. En general, cada transportador ABC tiene cierta especificidad de sustrato, y, esencialmente, existe un transportador ABC para cada tipo de molécula que debe atravesar una membrana celular. Así, se conocen sistemas de este tipo específicos de iones inorgánicos, azúcares, aminoácidos, proteínas y polisacáridos complejos, aunque muchos son multi-específicos. También es cierto que muchos de ellos parecen haberse diversificado en cuanto a sus funciones. En un primer momento fueron identificados como sistemas de incorporación de nutrientes, pero en la actualidad se sabe que un gran número son exportadores; sin embargo, en otros casos, actúan como simples canales o incluso como reguladores (Higgins, 2001). Desde un punto de vista estructural, la unidad básica de un transportador ABC

está formada por cuatro dominios: Dos de ellos son los denominados dominios transmembrana (TM), que atraviesan la membrana varias veces mediante  $\alpha$ -hélices (típicamente, 12 por cada transportador) y determinan la especificidad mediante sitios de unión de sustrato. Los otros dos dominios son los denominados sitios de unión de ATP o de nucleótidos (NBD), que son hidrofílicos y se asocian periféricamente a la cara citoplasmática de la membrana. Estos dominios NBD están compuestos por, aproximadamente, 215 AA del dominio ABC. Cabe destacar que la conservación del dominio ABC es importante para definir y delimitar esta familia de proteínas (Higgins *et al.*, 1986). En nuestro caso, la homología de MsrC con las regiones que contenían motivos NBD y la secuencia señal del dominio ABC descrito para otros determinantes de eflujo de antibióticos MLS (eritromicina, tilosina, carbomicina, pristinamicina y virginamicina) en Gram-positivos, fue alta (Figura 39).

Una vez estudiado este fragmento del gen *msrC*, secuenciamos el gen completo, de 1479 pb -un tamaño similar al de *msr(A)*- de las tres cepas de *E. faecium* de nuestra colección. La identidad encontrada entre las secuencias de *msrC* y *msr(A)* fue del 43%, y la similitud entre proteínas fue del 54,6%. Al mismo tiempo, Singh *et al.* completaron dicha secuencia de una de sus cepas de *E. faecium* y la depositaron en el banco de genes (n° de acceso: AY004350). Ésta mostró la máxima identidad (95%) con el fragmento de 405 pb previamente publicado por nuestro grupo y un 53% con la de *msr(A)* (Singh *et al.*, 2001b). Según se ha descrito en la literatura, la proteína MsrA tiene dos motivos NBD, separados entre sí por un interdominio flexible, rico en glutamina y otros aminoácidos hidrofílicos, y con un patrón específico de aminoácidos hidrofóbicos (*Q-linker*) (Ross *et al.*, 1990). En MsrC se encontró que la región correspondiente a ésta era también más rica en glutamina que el resto de la secuencia (Singh *et al.*, 2001b).

Por otra parte, el contenido en C-G del gen *msrC* de nuestras cepas (37%) comparado al del total del genoma de *E. faecium* (37-40%) es un aspecto más que podría llevarnos a pensar en el posible carácter no adquirido, sino intrínseco de este gen.

El gen *msr(A)*, que presenta en su secuencia un porcentaje de identidad relativamente elevado con *msrC*, confiere en estafilococos resistencia a macrólidos

de 14 y 15 átomos y a estreptograminas de tipo B, tras inducción con eritromicina (Ross *et al.*, 1990). Por otra parte, se ha observado que, en general, la especie *E. faecium* es menos sensible a macrólidos que otras especies de *Enterococcus* o *Streptococcus* (Neu, 1993). Por este motivo, se realizaron ensayos de acumulación intracelular de eritromicina, a fin de estudiar la posible relación entre *msrC* y la menor sensibilidad a eritromicina en *E. faecium*. Las cepas de *E. faecium* investigadas (todas con *msrC*) presentaron un sistema de eflujo de eritromicina (Figuras 43 y 44). Del mismo modo, este efecto fue observado en una cepa de *E. faecalis* (sensible a eritromicina y sin *msrC*) (Figura 45), lo que puso en evidencia la posible presencia de múltiples bombas de eflujo en enterococos, muchas de ellas sin identificar y cuya función hasta ahora se desconoce. Posteriormente, realizamos ensayos similares con la cepa de *E. faecium* SE34 -cedida por la Dra. Bárbara Murray (Universidad de Texas)- y dos mutantes, obtenidos a partir de ésta, en los que el gen *msrC* había sido inactivado (Singh *et al.*, 2001b). A pesar de que en los mutantes se observó una disminución de los valores de CMI a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos y a estreptograminas de tipo B de entre 2 y 8 unidades (Singh *et al.*, 2001b), en las tres cepas mencionadas detectamos un sistema de bombeo y no observamos diferencias significativas entre ellas (Figura 46). Estos resultados nos hacen plantearnos varias posibilidades:

1. La menor sensibilidad de *E. faecium* a macrólidos podría deberse a la acción combinada de varias bombas, incluyendo MsrC, que reconocerían eritromicina como sustrato. De este modo, la inactivación de *msrC* no produciría una disminución significativa en la expulsión de eritromicina al exterior de la célula, aunque sí podría provocar ligeros cambios en la sensibilidad a macrólidos, tal y como han observado Singh *et al.* (2001b).
2. El gen *msrC* podría codificar un sistema de eflujo que no bombee macrólidos. En contra de esta posibilidad está el hecho de que la inactivación del gen *msrC* provoca una disminución en la CMI a eritromicina.

De manera general, se sabe que en una célula bacteriana, aproximadamente el 10% de los genes codifican proteínas de transporte (ver lista de genomas de procariotas en la base de datos de TIGR: <http://www.tigr.org/>). La función de este

nuevo gen *msrC*, aún hoy en día desconocida, puede ser otra diferente a la de resistencia a macrólidos, aunque los resultados obtenidos por el momento parecen indicar que afecta al eflujo de eritromicina. Este efecto indirecto se ha descrito en otros casos, como el de la flavoquinasa MreA de *S. agalactiae*, que confiere resistencia a macrólidos en *E. coli* mediante un mecanismo desconocido por el momento (Clancy *et al.*, 1997; Clarebout *et al.*, 2001).

La presencia de múltiples posibles transportadores ABC en el genoma de *E. faecalis*, como ABC16 (relacionado con la resistencia a eritromicina, azitromicina y claritromicina) y ABC23 (implicado en la resistencia a virginiamicina y quinupristín-dalfopristín) (Davis *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 41<sup>st</sup> ICAAC), y de otros en la secuencia preliminar de *E. faecium* ([www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbial/efaecium](http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbial/efaecium)), sugiere que puede haber otros candidatos con una función similar a la de *msrC*.

Aunque no son muchas las referencias existentes en la literatura, también se ha afirmado que la resistencia intrínseca de enterococos a ciertos antibióticos puede deberse en parte a genes que codifican bombas de eflujo de multi-resistencia (sistemas MDR), que expulsan al exterior cloranfenicol, tetraciclina, norfloxacino y/o diferentes compuestos tóxicos, como bromuro de etidio (Midgley, 1994; Lynch *et al.*, 1997; Jonas *et al.*, 2001), pero algunos de estos sistemas no han sido aún identificados.

**CONCLUSIONES**



1. Se detectaron altas tasas de resistencia a eritromicina en aislados de *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos de los grupos C y G obtenidos en la Rioja, con valores que oscilaron entre un 13 y un 25%. Un porcentaje superior fue detectado en aislados de *S. pneumoniae* (54%).
2. Se observó una disminución en el porcentaje de aislados resistentes a eritromicina en las especies *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* a lo largo del periodo analizado (1996-2001), desde un 35 a un 20% en el caso de *S. pyogenes*, y desde un 64 a un 47% en *S. pneumoniae*.
3. Entre los aislados resistentes a eritromicina, el fenotipo M de resistencia fue el más frecuente en *S. pyogenes* (80%); por el contrario, el fenotipo MLS<sub>B</sub> fue exclusivo en aislados de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos de los grupos C y G y apareció como mayoritario entre los aislados de *S. agalactiae* y *S. pneumoniae* (>97%). Asimismo, en la mayor parte de los aislados con fenotipo MLS<sub>B</sub>, se detectó expresión constitutiva (entre un 67 y un 100%, en función de la especie). Los valores de CMI a eritromicina fueron menores en los aislados con fenotipo M que en aquellos con fenotipo MLS<sub>B</sub>.
4. En todos los aislados de *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. pneumoniae* con fenotipo M de resistencia, se detectaron los genes *mef(A)* o *mef(E)*.
5. Los genes *erm(B)* y *erm(TR)* se detectaron exclusivamente en las cepas de *Streptococcus* con fenotipo MLS<sub>B</sub>. El gen *erm(B)* fue predominante en *S. pneumoniae*, mientras que todos los aislados de *Streptococcus* del grupo C y grupo G presentaron el gen *erm(TR)*. En el grupo de aislados de *S. pyogenes* y *S. agalactiae*, los dos genes anteriormente citados se encontraron en la misma proporción, siendo su presencia simultánea en algunos casos.

6. Se detectó moderada diversidad clonal entre los aislados de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina (30 aislados, 9 clones), poniéndose en evidencia la presencia de aislados de un mismo clon en diferentes años del estudio. Se observó una gran diversidad clonal en los aislados de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos de los grupos B, C y G.
7. El gen *erm(B)* fue encontrado en todas las cepas de *Enterococcus* con alto nivel de resistencia a eritromicina (CMI > 128  $\mu$ g/ml), con la excepción de una cepa de *E. faecium* en la que se detectó el gen *erm(A)*. Los genes *erm(C)*, y *mef(A/E)* no fueron detectados en ninguna de las cepas estudiadas.
8. En todas las cepas de *E. faecium*, con independencia de su fenotipo de resistencia a eritromicina, se detectó un nuevo gen que fue denominado *msrC*. El resto de especies de *Enterococcus* analizadas no presentaron dicho gen.
9. El gen *msrC*, descrito en *E. faecium*, contiene 1479 pb y posee una identidad de un 53% con el gen *msr(A)*, descrito en *Staphylococcus* y relacionado en dicho género bacteriano con la resistencia a macrólidos y estreptograminas de tipo B.
10. El gen *msrC* codifica una proteína de 492 aminoácidos que presenta una similitud del 54% con *Msr(A)* y contiene los motivos A y B típicos de los transportadores ABC. Se observaron mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos de *MsrC* en cepas de *E. faecium* con diferentes niveles de resistencia a eritromicina.
11. Se evidenció un sistema de bombeo de eritromicina, dependiente de energía, en cepas de *E. faecium* con diferentes niveles de resistencia a dicho macrólido. La bomba de eflujo *MsrC* podría estar relacionada con este bombeo de eritromicina.

## BIBLIOGRAFÍA



1. **Aarestrup, F.M.** (1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 12: 279-285.
2. **Aarestrup, F.M.** (2000a). Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J. Clin. Microbiol.* 38 (7): 2774-2777.
3. **Aarestrup, F.M.** (2000b). Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion in Denmark. *APMIS.* 108 (Suppl.101): 3-48.
4. **Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., and Jensen, L.B.** (2000c). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37 (2): 127-137.
5. **Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S., and Bager, F.** (2001). Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (7): 2054-2059.
6. **Adrián, F.** (1997). Caracterización de los mecanismos de metilación y eflujo implicados en la resistencia de *Streptococcus* spp. a macrólidos. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza.
7. **Agouridas, C., Bonnefoy, A., and Chantot, J.F.** (1997). Antibacterial activity of RU 64004 (HMR 3004), a novel ketolide derivative active against respiratory pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2149-2158.
8. **Aitmhand, R., Moustou, N., Belabbes, H., Elmdaghri, N., and Benbachir, M.** (2000). Serotypes and antimicrobial susceptibility of group B *Streptococcus* isolated from neonates in Casablanca. *Scand. J. Infect. Dis.* 32 (3): 339-340.
9. **Allignet, J., and El Solh, N.** (1995). Diversity among the gram-positive acetyltransferases inactivating streptogramin A and structurally related compounds and characterization of a new staphylococcal determinant, *vatB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2027-2036.
10. **Allignet, J., and El Solh, N.** (1997). Characterization of a new staphylococcal gene, *vgaB*, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Gene.* 202: 133-138.

11. **Allignet, J., Liassine, N., and El Solh, N.** (1998). Characterization of a staphylococcal plasmid related to pUB110 and carrying two novel genes, *vatC* and *vgb*, encoding resistance to streptogramins A and B and similar antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1794-1798.
12. **Allignet, J., Loncle, V., and El Solh, N.** (1992). Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene.* 117: 45-51.
13. **Allignet, J., Loncle, V., Mazodier, P., and El Solh, N.** (1988). Nucleotide sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vgb*, encoding a hydrolase inactivating the B components of virginiamycin-like antibiotics. *Gene.* 117: 45-51.
14. **Allignet, J., Loncle, V., Simenel, C., Delepierre, M., and El Solh, N.** (1993). Sequence of a staphylococcal gene, *vat*, encoding an acetyltransferase inactivating the A-type compounds of virginiamycin-like antibiotics. *Gene.* 130: 91-98.
15. **Alós, J.I., Aracil, B., Oteo, J., Torres, C. Gómez-Garcés, J.L., and the Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting.** (2000). High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 605-609.
16. **American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn.** (1997). Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) infection. *Pediatrics.* 99: 489-496.
17. **Andrews, J.I., Diekema, D.J., Hunter, S.K., Rhomberg, P.R., Pfaller, M.A., Jones, R.N., and Doern, G.V.** (2000). Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection: antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the Western Hemisphere. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183 (4): 859-862.
18. **Angot, P., Vergnaud, M., Auzou, M., and Leclercq, R., Observatoire de Normandie du Pneumocoque.** (2000). Macrolide resistance phenotypes and genotypes in French clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 755-758.
19. **Appelbaum, P.C.** (1992). Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* 15: 77-83.
20. **Arason, V., Kristinsson, K., Sigurdsson, J., Stefansdottir, G., Molstad, S., and Gudmundsson, S.** (1996). Do antimicrobials increase the carriage rate of penicillin resistant pneumococci in children? Cross-sectional prevalence study. *British Med. J.* 313: 387-391.

21. Arpin, C., Canron, M.H., Maugein, J., and Quentin, C. (1999a). Incidence of *mefA* and *mefE* genes in viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2335-2336.
22. Arpin, C., Canron, M.H., Noury, P., and Quentin, C. (1999b). Emergence of *mefA* and *mefE* in beta-haemolytic streptococci and pneumococci in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 133-134.
23. Arpin, C., Daube, H., Tessier, F., and Quentin, C. (1999c). Presence of *mefA* and *mefE* genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 944-946.
24. Arthur, M., Brisson-Noël, A., and Courvalin, P. (1987). Origin and evolution of genes specifying resistance to macrolides, lincosamide and streptogramin antibiotics: data and hypotheses. *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 783-802.
25. Arthur, M., Molinas, C., and Mabilat, C. (1993). PCR detection of *erm* erythromycin resistance genes by using degenerate oligonucleotide primers. *In: Diagnostic Molecular Microbiology.* (Persing *et al.* eds.), pp. 534-538. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
26. Arvand, M., Hoeck, M., Hahn, H., and Wagner, J. (2000). Antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* in Berlin. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 621-623.
27. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology.* A compendium of methods from *Current Protocols in Molecular Biology.* 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc.
28. Avanzini, C., Bosio, K., Volpe, G., Dotti, G., and Savoia, D. (2000). *Streptococcus pyogenes* collected in Torino (Northwest Italy) between 1983 and 1998: survey of macrolide resistance and trend of genotype by RAPD. *Microb. Drug Resistance.* 6 (4): 289-295.
29. Baquero, F. (1999a). Evolving resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*: a link with long-acting macrolide consumption? *J. Chemother.* 11 (Suppl. 1): 35-43.
30. Baquero, F., and the Task Force of the General Direction for Health Planning of the Spanish Ministry of Health. (1996). Antibiotic resistance in Spain: what can be done? *Clin. Infect. Dis.* 23: 819-823.
31. Baquero, F., García-Rodríguez, J.A., de Lomas, J.G., and Aguilar, L. (1999b). Antimicrobial resistance of 914 beta-hemolytic streptococci isolated from pharyngeal swabs in Spain: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. The Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1): 178-180.
32. Baquero, F., García-Rodríguez, J.A., García de Lomas, J.G., Aguilar, L., and The

- Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens.** (1999c). Antimicrobial resistance of 1113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: Results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 357-359.
33. **Baquero, F., Martínez-Beltrán, J., and Loza, E.** (1991). A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 28 (Suppl. C): 31-38.
34. **Barnham, M., and Cole, G.** (1986). Erythromycin-resistant beta-haemolytic streptococci in North Yorkshire. *J. Infect.* 13: 200-202.
35. **Barrière, J.C., Berthaud, N., Beyer, D., Dutka-Malen, S., Paris, J.M., and Desnottes, J.F.** (1998). Recent developments in streptogramin research. *Curr. Pharm. Des.* 4: 155-180.
36. **Barrière, J.C., Bouanchaud, D.H., Paris, J.M., Rolin, O., Harris, N.V., and Smith, C.** (1992). Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* of semisynthetic injectable streptogramins: RP 59500 and related compounds. *J. Antibiot. Chemother.* 30 (Supl A): 1-8.
37. **Barry, A.L., Fuchs, P.C., and Brown, S.D.** (1997). Macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolates from out-patients in the USA. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 139-140.
38. **Barry, A.L., Fuchs, P.C., and Brown, S.D.** (1998). Antipneumococcal activities of a ketolide (HMR 3647), a streptogramin (quinupristin-dalfopristin), a macrolide (erythromycin) and a lincosamide (clindamycin). *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 945-946.
39. **Barry, A.L., Pfaller, M.A., Fuchs, P.C., and Packer, R.R.** (1994). *In vitro* activities of 12 orally administered antimicrobial agents against four species of bacterial respiratory pathogens from U.S. medical centers in 1992 and 1993. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (10): 2419-2425.
40. **Bass, J.W., Weisse, M.E., Plymyer, M.R., Murphy, S., and Eberly, B.J.** (1994). Decline of erythromycin resistance of group A beta-hemolytic streptococci in Japan. Comparison with worldwide reports. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 148: 67-71.
41. **Bassetti, M., Manno, G., Collidà, A., Ferrando, A., Gatti, G., Ugolotti, E., Cruciani, M., and Bassetti, D.** (2000). Erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 6 (2): 180-183.
42. **Bayer, A.S., and Lam, K.** (1983). *In vitro* susceptibility of group G streptococci to ten antimicrobial agents with broad Gram-positive spectra. *Clin. Ther.* 5: 391-397.

43. **Bechhofer, D.H.** (1990). Triple post-transcriptional control. *Mol. Microbiol.* 4: 1419-1423.
44. **Bemer-Melchior, P., Juvén, M.E., Tassin, S., Bryskier, A., Schito, G.C., and Drugeon, H.B.** (2000). *In vitro* activity of the new ketolide telithromycin compared with those of macrolides against *Streptococcus pyogenes*: influences of resistance mechanisms and methodological factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (11): 2999-3002.
45. **Benbachir, M., Benredjeb, S., Boye, C.S., Dosso, M., Belabbes, H., et al.** (2001). Two-year surveillance of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in four African cities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2): 627-629.
46. **Benno, Y., S.K., S.K., Narisawa, K., Bruce, W.R., and Mitsuoka, T.** (1986). Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol. Immunol.* 30: 521-532.
47. **Benson, J.A., and Ferrieri, P.** (2001). Rapid pulsed-field gel electrophoresis method for group B *Streptococcus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3006-3008.
48. **Berenguer, J., Sampedro, I., Cercenado, E., Baraia, J., Rodríguez-Crèixems, M., Bouza, E.,** (1992). Group C beta-hemolytic streptococcal bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 151-155.
49. **Berkowitz, K., Regan, J.A., and Greenberg, E.** (1990). Antibiotic resistance patterns of group B streptococci in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 28 (1): 5-7.
50. **Bert, F., Branger, C., and Lambert-Zechovsky, N.** (1997). Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminant than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Current Microbiol.* 34: 226-229.
51. **Betriu, C., Gómez, M., Sánchez, A., Cruceyra, J.R., and Picazo, J.** (1994). Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2183-2186.
52. **Betriu, C., Redondo, M., Palau, M.L., Sánchez, A., Gómez, M., Culebras, E., Boloix, A., and Picazo, J.J.** (2000). Comparative *in vitro* activities of linezolid, quinupristin-dalfopristin, moxifloxacin, and trovafloxacin against erythromycin-susceptible and -resistant streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1838-1841.
53. **Betriu, C., Sánchez, A., Gómez, M., Cruceyra, A., and Picazo, J.J.** (1993). Antibiotic susceptibility of group A streptococci: A 6-years follow up study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1717-1719.
54. **Bingen, E., Fitoussi, F., Doit, C., Cohen, R., Tanna, A., George, R. et al.** (2000).

- Resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* in France in pediatric patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (6): 1453-1457.
55. **Bland, M.L., Vermillion, S.T., Soper, D.E., and Austin, M.** (2001). Antibiotic resistance patterns of group B streptococci in late third-trimester rectovaginal cultures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184 (6): 1125-1126.
  56. **Borzani, M., De Luca, M., and Varotto, F.** (1997). A survey of susceptibility to erythromycin among *Streptococcus pyogenes* isolates in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 457-458.
  57. **Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J., and Leclercq, R.** (1999). A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 925-929.
  58. **Brandt, C.M., Honscha, M., Truong, N.D., Holland, R., Hövener, B., Bryskier, A., Lütticken, R., and Reinert, R.R.** (2001). Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates from throat infections in the region of Aachen, Germany. *Microb. Drug Resist.* 7 (2): 165-170.
  59. **Brantl, S., Kummer, C., and Behnke, D.** (1994). Complete nucleotide sequence of plasmid pGB3631, a derivative of the *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501. *Gene.* 142: 155-156.
  60. **Bright, G.M., Nagel, A.A., Bordner, J., Desai, K.A., Dibrino, J.N., Nowakoska, J., Vincent, L., et al.** (1988). Synthesis, *in-vitro* and *in-vivo* activity of novel 9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A derivatives, a new class of macrolide antibiotics, the azalides. *J. Antibiot.* 41: 1029-1047.
  61. **Brisson-Noël, A., Delrieu, P., Samain, D., and Courvalin, P.** (1988). Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. *J. Biol. Chem.* 263: 15880-15887.
  62. **Bryskier, A., Agouridas, E., and Chantot, J.F.** (1997). Ketolides: new semisynthetic 14-membered-ring-macrolides. *In Expanding Indications for the New Macrolides, Azalides, and Streptogramins*, (Zinner, S.H., Young, L.S., Acar, J.F., and Neu, H.C., eds.), pp. 39-50. Marcel Dekker Inc., New York, NY.
  63. **Bryskier, A.J., Butzler, J.P., Neo, H.C., and Tulkens, P.M., eds.** (1993). *Macrolides. Chemistry, pharmacology and clinical uses.* Arnette Blackwell, Paris.
  64. **Buu-Hoï, A., Le Bouguenec, C., and Horaud, T.** (1990). High-level chromosomal gentamycin resistance in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 985-988.
  65. **Canu, A., Malbruny, B., Coquemont, M., Davies, T.A., Appelbaum, P.C., and**

- Leclercq, R.** (2002). Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (1): 125-131.
66. **Carmeli, Y., and Ruoff, K.L.** (1995). Report of cases and taxonomic considerations for large colony forming Lancefield group C streptococcal bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 33: 270-280.
67. **Carsenti-Etesse, H., Roger, P.M., Dunais, B., Durgeat, S., Mancini, G., Bensoussan, M., and Dellamonica, P.** (1999). Gradient plate method to induce *Streptococcus pyogenes* resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 439-443.
68. **Carsenti-Etesse, H., Roger, P.M., Mancini, G., Thabaut, A., and Dellamonica, P.** (1996). *In vitro* development of resistance of *Streptococcus pneumoniae* by spiral method in subinhibitory concentrations of  $\beta$ -lactams and macrolides. *Current Therapeutic Research.* 57: 735-746.
69. **Ceglowski, P., and Alonso, J.C.** (1994). Gene organization of the *Streptococcus pyogenes* plasmid pDB101: sequence analysis of the *orfH-orfS* region. *Gene.* 145: 33-39.
70. **Celmer, W.D., Els, H., Murai, K.** (1958). Oleandomycin derivatives. Preparation and characterization. *Antibiot. Ann., 1957-1958,* 476-483.
71. **Centers for Disease Control and Prevention.** (1993) Nosocomial enterococci resistant to vancomycin--United States, 1989-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 42: 597-599.
72. **Cercenado, E., Gómez, J.A., and Bouza, E.** (2001). Is incidence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* decreasing in Spain? 41<sup>st</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. C2-2101.
73. **Cha, S., Lee, H., Lee, K., Hwang, K., Bae, S., and Lee, Y.** (2001). The emergence of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Seoul, Korea. *J. Infect. Chemother.* 7: 81-86.
74. **Chabbert, Y.A., and Courvalin, P.** (1971). Synergie des composants des antibiotiques du groupe de la streptogramine. *Pathol. Biol.* 19: 613-619.
75. **Champney, W.S.** (1999). Macrolide antibiotic inhibition of 50S ribosomal subunit formation in bacterial cells. *Recent Res. Devel. in Antimicrob. Agents and Chemother.* 3: 39-58.
76. **Cheng, J., Grebe, T., Wondrack, L., Courvalin, P., and Sutcliffe, J.** (1999). Characterization of genes involved in erythromycin resistance in a clinical strain of *Staphylococcus aureus*. 39<sup>th</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 837.
77. **Chenoweth, C., and Schaberg, D.** (1990). The epidemiology of enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 80-89.

78. **Choi, S.S., Kim, S.K., Oh, T.G., and Choi, E.C.** (1997). Role of mRNA termination in regulation of *ermK*. *J. Bacteriol.* 179: 2065-2067.
79. **Chu, C., Kariyama, R., Daneo-Moore, L., and Shockman, G.D.** (1992). Cloning and sequence analysis of the Muramidase-2 gene from *Enterococcus hirae*. 174: 1619-1625.
80. **Cizman, M., Pokorn, M., Seme, K., Orazem, A., and Paragi, M.** (2001). The relationship between trends in macrolide use and resistance to macrolides of common respiratory pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 475-477.
81. **Cizman, M., Pokorn, M., Seme, K., Paragi, M., and Orazem, A.** (1999). Influence of increased macrolide consumption on macrolide resistance of common respiratory pathogens. *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* 18: 522-524.
82. **Clancy, J., Dib-Hajj, F., Petitpas, J., and Yuan W.** (1997). Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, *mreA*, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (12): 2719-2723.
83. **Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A.V., Bergeron, J., and Retsema, J.A.** (1996). Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistant determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 22 (5): 867-879.
84. **Clarebout, G., Villers, C., and Leclercq, R.** (2001). Macrolide resistance gene *mreA* of *Streptococcus agalactiae* encodes a flavokinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (8): 2280-2286.
85. **Cocito, C.** (1983). Properties of virginiamycin-like antibiotics (synergimycins), inhibitors containing synergistic components. *In: Antibiotics* (Corcoran, J.W., Hahn, F.E., ed.). Berlin, Springer Verlag, VI: 296-332.
86. **Cocuzza, C.E., Blandino, G., Mattina, R., Nicoletti, F., and Nicoletti, G.** (1997b). Antibiotic susceptibility of group A streptococci in two Italian cities: Milano and Catania. *Microb. Drug Resist.* 3: 379-384.
87. **Cocuzza, C.E., Mattina, R., Mazariol, A. et al.** (1997a). High incidence of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Monza (North Italy) in untreated children with symptoms of acute pharyngo-tonsillitis: An epidemiological and molecular study. *Microb. Drug Resist.* 3: 371-378.
88. **Cohen, M.E.L.** (1992). Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. *Science.* 257: 1050-1055.
89. **Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn.** (1992). Guidelines for prevention of group B streptococcal (GBS) infection by chemoprophylaxis. *Pediatrics.* 90: 775-778.

90. **Coonan, K.M., and Kaplan, E.L.** (1994). *In vitro* susceptibility of recent North American group A streptococcal isolates to eleven oral antibiotics. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13: 630-635.
91. **Cornaglia, G., Ligozzi, M., Mazzariol, A. et al.** (1998). Resistance of *Streptococcus pyogenes* to erythromycin and related antibiotics in Italy. *Clin. Infect. Dis.* 27 (suppl. 1): S87-S92.
92. **Cornaglia, G., Ligozzi, M., Mazzariol, A., Valentini, M., Orefici, G., Fontana, R.** (1996). Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993-1995. *Emerg. Infect. Dis.* 2 (4): 339-342.
93. **Corso, A., Severina, E.P., Petruk, V.F., Mauriz, Y.R., and Tomasz, A.** (1998). Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microb. Drug Resist.* 4 (4): 325-337.
94. **Courvalin, P., and Carlier, C.** (1986). Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 205: 291-297.
95. **Cristiano, L., Bonzi, D., Noris, C., Valota, V., Quaini, M., and Marzulli, G.** (1996). *Streptococcus betaemolitici* di group A: Rapido incremento di ceppi resistenti all'eritromicina in un'area del nord Italia. *Microbiologia Medica.* 11: 30-33.
96. **Cuéllar, S.** (1999). Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Jornada organizada por el Instituto de salud Carlos III. Ministerio de Salud y consumo. "La amenaza de la resistencia microbiana: ¿Qué hacer en España?" Madrid, 18 de marzo de 1999.
97. **Cundliffe, E.** (1987). On the nature of antibiotic binding sites in ribosomes. *Biochimie.* 69: 863-869.
98. **Danish Veterinary Laboratory.** (1998). The effect of virginiamycin on bacterial antimicrobial resistance development. Technical Report 1. Association between the use of virginiamycin and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland and Norway.
99. **Davey, P., Bax, R.P., Newey, J., Reeves, D., Rutherford, D., Slack, R. et al.** (1996). Growth in the use of antibiotics in the community in England and Scotland in 1980-93. *British Med. J.* 312: 613.
100. **Davis, D.R., McAlpine, J.B., Pazoles, C.J., Talbot, M.K., Alder, E.A., White, C., Jonas, B.M., Murray, B.E., Weinstock, G.M., and Rogers, B.L.** (2001). *Enterococcus faecalis* multi-drug resistance transporters: application for antibiotic discovery. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 179-184.
101. **De Azavedo, J.C., McGavin, M., Duncan, C., Low, D.E., and McGeer, A.** (2001).

- Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B *Streptococcus* isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (12): 3504-3508.
102. **De Azavedo, J.C., Yeung, R.H., Bast, D.J., Duncan, C.L., Borgia, S.B., and Low, D.E.** (1999). Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of group A streptococci from Ontario, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2144-2147.
  103. **De Mouy, D., Cavallo, J-D., Leclercq, R., Fabre, R., and the AFORCOPI-BIO Network.** (2001). Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: French multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (8): 2400-2402.
  104. **Del Castillo, F., Baquero-Artigao, F., and García-Perea, A.** (1998). Influence of recent antibiotic therapy on antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in children with acute otitis media in Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17: 94-97.
  105. **Del Grosso, M., Iannelli, F., Messina, C., Santagati, M., Petrosillo, N., Stefani, S., Pozzi, G., and Pantosti, A.** (2002). Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 40 (3): 774-778.
  106. **Dennesen, P.J., Bonten, M.J., and Weinstein, R.A.** (1998). Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. *Ann. Med.* 30: 1896-1903.
  107. **Depardieu, F., and Courvalin, P.** (2001). Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (1): 319-323.
  108. **Descheemaeker, P., Chapelle, S., Lammens, C., Hauchecorne, M., Wijdooghe, M., Vandamme, P., Ieven, M., and Goossens, H.** (2000). Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 167-173.
  109. **Di Giambattista, M., Nyssen, E., Engelborghs, Y., et al.** (1987). Kinetics of binding of macrolides, lincosamides and synergimycins to ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262: 8591-8597.
  110. **Di Giambattista, M., Nyssen, E., Pecher, A., et al.** (1990). Affinity labeling of the virginiamycin S binding site on bacterial ribosome. *Biochemistry.* 29: 9203-9211.
  111. **Di Giambattista, M., Thielen, A., Maassen, J., et al.** (1986). Localisation of virginiamycin S binding site on bacterial ribosome by fluorescence energy transfer. *Biochemistry.* 25: 3540-3547.

112. **Díez, P., y Calderón, V.** (1997). Empleo de antibióticos en veterinaria. *Rev. Esp. Quimioterapia*. 10 (4): 45-46.
113. **Dixon, J.M.** (1967). *Pneumococcus* resistant to erythromycin and lincomycin. *Lancet*. 1:573.
114. **Dixon, J.M., and Lipinski, A.E.** (1974). Infections with beta-hemolytic *Streptococcus* resistant to lincomycin and erythromycin and observations on zonal-pattern resistance to lincomycin. *J. Infect. Dis.* 130: 351-356.
115. **Doern, G.J., Brueggemann, A., Holley, H.P., and Rauch, A.M.** (1996). Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* recovered from outpatients in the United States during the winter months of 1994 to 1995: results of a 30-center national surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1208-1213.
116. **Doern, G.V., Brueggemann, A.B., Huynh, H., Wingert, E., and Rhomberg, P.** (1999). Antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1997-98. *Emerg. Infect. Dis.* 5 (6): 757-765.
117. **Doern, G.V., Heilmann, K.P., Huynh, H.K., Rhomberg, P.R., Coffman, S.L., and Brueggemann, A.B.** (2001). Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (6): 1721-1729.
118. **Doern, G.V., Pfaller, M.A., Kugler, K., Freeman, J., and Jones, R.N.** (1998). Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin. Infect. Dis.* 27: 764-770.
119. **Douthwaite, S., Prince, J.B., and Noller, H.F.** (1985). Evidence for functional interaction between domains II y V of 23S ribosomal RNA from an erythromycin resistant mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8330-8334.
120. **Dubnau, D.** (1984). Translational attenuation: the regulation of bacterial resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Crit. Rev. Biochem.* 16: 103-132.
121. **Ducoffre, G.** (1998). Surveillance van Infectieuze Aandoeningen door een Netwerk van Laboratoria voor Microbiologie 1997 and Epidemiologische Trends 1983-1996. (Institute of Public Health - Louis Pasteur), Ministry of Social Services, Public Health and Environment, Brussels.
122. **Duma, R.J., Weinberg, A.N., Medrek, T.F., and Kunz, L.J.** (1969). Streptococcal infections. *Medicine (Balt).* 48: 87-127.
123. **Dutka-Malen, S., Evers, E., and Courvalin, P.** (1995). Detection of glycopeptide

- resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24-27. (*Erratum* published in *J. Clin. Microbiol.* 33: 1434).
124. **Echevarría, M.J., Ayarza, R., López de Goicochea, M.J., y Gómez, M.** (1994). Sensibilidad antibiótica de estreptococo betahemolítico grupo A. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 12: 415.
125. **Edmond, M.B., Ober, J.F., Dawson, J.D., Weinbaum, D.L., and Wenzel, R.P.** (1996). Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: Natural history and attributable mortality. *Clin. Infect. Dis.* 23: 1234-1239.
126. **Eickhoff, T.C., Klein, J.O., Daly, A.K., Ingall, D., and Finland, M.** (1964). Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. *N. Engl. J. Med.* 271: 1221-1228.
127. **Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Zigelboim-Daum, S., Reiszner, E., Goldmann, D., and Moellering R.C. Jr.** (1988). High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus (Enterococcus) faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 (10): 1528-1532.
128. **Elliott, J.A., Farmer, K.D., and Faclam, R.R.** (1998). Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field electrophoresis type. *J. Clin. Microbiol.* 36 (7): 2115-2116.
129. **Els, H., Celmer, W.D., and Muroi, K.** (1958). Oleandomycin (PA-105). II. Chemical characterization. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 3777-3782.
130. **Esposito, S., Noviello, S., Ianniello, F., and D'Errico, G.** (1998). Erythromycin resistance in group A beta hemolytic *Streptococcus*. *Chemotherapy.* 44: 385-390.
131. **Facklam, R.R., and Collins, M.D.** (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27: 731-734.
132. **Farley, M.M.** (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis.* 33 (4): 556-561.
133. **Farley, M.M., Harvey, C.R., Stull, T. et al.** (1993). A population-based assessment of invasive due to group B *Streptococcus* in non-pregnant adults. *N. Engl. J. Med.* 328: 1807-1811.
134. **Farrel, D.J., Morrissey, I., Bakker, S., and Felmingham, D.** (2001). Detection of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* using a multiplex rapid cycle PCR with microwell-format probe hybridization. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 541-544.

135. **Feldman, D., Bisno, A.L., Lott, L., Dodge, R., and Jackson, R.E.** (1987). Efficacy of benzathine penicillin G in group A streptococcal pharyngitis: reevaluation. *J. Pediatr.* 110: 783-787.
136. **Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D., Pérez, A., and Casal, J.** (1998). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J. Clin. Microbiol.* 36 (12): 3447-3454.
137. **Fenoll, A., Matín Bourgon, C., Muñoz, R., Vicioso, D., and Casal, J.** (1991). Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain 1979-1989. *Rev. Infect. Dis.* 13: 56-60.
138. **Fernández, M., Hickman, M.E., and Baker, C.J.** (1998). Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (6): 1517-1519.
139. **Fernández-Muñoz, R., Monro, R.E., Torres-Pinedo, R., and Vasquez, D.** (1971). Substrate- and antibiotic-binding sites at the peptidyl-transferase centre of *Escherichia coli* ribosomes. Studies on the chloramphenicol, lincomycin and erythromycin sites. *Eur. J Biochem* 23: 185-193.
140. **Ferretti, J.J., Gilmore, K.S., and Courvalin, P.** (1986). Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J. Bacteriol.* 167: 631-638.
141. **Fitoussi, F., Doit, C., Geslin, P., Brahimi, N., and Bingen, E.** (2001a). Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2): 636-638.
142. **Fitoussi, F., Lukil, C., Gros, I., Clermont, O., Mariani, P., Bonacorsi, S., Le Thomas, I., Deforche, D., and Bingen, E.** (2001b). Mechanisms of macrolide resistance in clinical group B streptococci isolated in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (6): 1889-1891.
143. **Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P., and Auffray, Y.** (1996a). Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2416-2420.
144. **Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J.C., Benachour, A., Boutibonnes, P., and Auffray, Y.** (1996b). Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 49-54.
145. **Florentino, T.R., Beall, B., Mshar, P., and Bessen, D.E.** (1997). A genetic-based evaluation of the principal tissue reservoir for group A streptococci isolated from

- normally sterile sites. *J. Infect. Dis.* 176: 177-182.
146. **Fraimow, H., and Knob, C.** (1997). Amplification of macrolide efflux pumps *msr* and *mef* from *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction. 97<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology., abstr. A-125.
147. **Freiberg, L.A., Egan, R.S., and Washburn, W.H.** (1974). The synthesis of 9 epi leucomycin A<sub>3</sub>. The revised configurational assignment of C-9 in natural Leucomycin A<sub>3</sub>. *J. Org. Chem.* 30:2774-2775.
148. **French, J.C., Howells, J.D., and Andreson, L.E.** (1970). Antibiotic erythromycin by cultivating an erythromycin-producing microorganism of the genus *Arthrobacter* in an aqueous nutrient medium containing sources of assimilable carbon and nitrogen. US Patent 3, 551, 294 (16011968).
149. **Frimodt-Moller, N., Espersen, F., Jacobsen, B., Schlundt, J., Meyling, A., and Wegener, H.** (1997). Problems with antibiotic resistance in Spain and their relation to antibiotic use in humans elsewhere. *Clin. Infect. Dis.* 25: 939-941.
150. **Fujita, J., Murono, K., Yoshikawa, M., and Murai, T.** (1994). Decline of erythromycin resistance of group A streptococci in Japan. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13: 1075-1078.
151. **Fuller, R.E., Drew, R.H., and Perfect J.R.** (1996). Treatment of vancomycin-resistant enterococci, with a focus on quinupristin/dalfopristin. *Pharmacotherapy.* 16: 584-592.
152. **García de Lomas, J., Gimeno, C., Díez, J., Bermejo, M., Navarro, D., García-Ponte, L., y grupo español para el estudio de la sensibilidad a macrólidos en Atención Primaria.** (1999). Sensibilidad a eritromicina y claritromicina de aislados de *Streptococcus* betahemolítico del grupo A productores de faringoamigdalitis en la edad pediátrica: estudio multicéntrico en Atención Primaria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 17: 24-28.
153. **García de Lomas, J., Gimeno, C., Millas, E., et al.** (1997). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from pediatric carriers in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 11-13.
154. **García-Bermejo, I., Cacho, J., Orden, B., Alós, J.I., and Gómez-Garcés, J.L.** (1998). Emergence of erythromycin-resistant, clindamycin-susceptible *Streptococcus pyogenes* isolates in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 989-990.
155. **García-Rey, C., Aguilar, L., Baquero, F., Casal, J., and Dal-Ré, R.** (2002). Importance of local variations in antibiotic consumption and geographical differences of erythromycin and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 40 (1): 159-164.

156. **Gardner, A.D., and Cahin, E.** (1942). Proactinomycin: a "bacteriostatic" produced by a species of *Proactinomyces*. Br. J. Exp. Pathol. 23: 123-127.
157. **Gaunt, P.N., and Seal, D.V.** (1987). Group G streptococcal infections. J. Infect. 15: 5-20.
158. **Gay, K., and Stephens, D.S.** (2001). Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*. J. Infect. Dis. 184: 56-65.
159. **Gay, K., Baughman, W., Miller, Y., Jackson, D., Whitney, C.G., et al.** (2000). The emergence of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolide antimicrobial agents: a 6-year population based assessment. J. Infect. Dis. 182: 1417-1424.
160. **George, J., and Morrissey, I.** (1997). The bactericidal activity of levofloxacin compared with ofloxacin, D-ofloxacin, ciprofloxacin, sparfloxacin and cefotaxime against *Streptococcus pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 39: 719-723.
161. **Gerber, M.A.** (1995). Antibiotic resistance in group A streptococci. Pediatr. Clin. North. Am. 42: 539-551.
162. **Geslin, P.** (1998). Centre National de Référence des Pneumocoques: rapport d'activité année 1997. Centre National de Référence des Pneumocoques, Créteil, France.
163. **Geslin, P., Buu-Hoi, A., Fremaux, A., and Acar, J.F.** (1992). Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an epidemiology survey in France, 1970-1990. Clin. Infect. Dis. 15: 95-98.
164. **Gialdroni-Grassi, G.** (1993). Macrolides in dental infections. In Macrolides. Chemistry, Pharmacology and Clinical Uses (Bryskier, A.J., Butzler, J.P., Neu, H.C., and Tulkens, P.M., eds.), pp. 617-624. Arnette Blackwell, Paris.
165. **Gilmore, M.S., and Hoch, J.A.** (1999). A vancomycin surprise. Nature. 399: 524-527.
166. **Gilmore, M.S., Behnke, D., and Ferretti, J.J.** (1982). Evolutionary relatedness of MLS resistance and replication function sequences on streptococcal antibiotic resistance plasmids. In: Microbiology. (Schlessinger, D. ed.) ASM, Washington, D.C. pp. 174-176.
167. **Giovanetti, E., Montanari, M.P., Marchetti, F., and Varaldo, P.E.** (2000). *In vitro* activity of ketolides telithromycin and HMR 3004 against Italian isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* with different erythromycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. 46: 905-908.
168. **Giovanetti, E., Montanari, M.P., Mingoia, M., and Varaldo, P.E.** (1999). Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. Antimicrob. Agents Chemother. 43 (8): 1935-1940.

169. **Gobernado, M. y Grupo de Estudio de Actividad de Macrólidos.** (1997). Actividad comparada *in vitro* de la josamicina sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*: estudio multicéntrico. Rev. Esp. Quimioterapia. 10: 213-220.
170. **Goldaracena Tanco, M., Aza Pascual Salcedo, M., Bárcena Caamaio, M., y Fustero Fernández, M.V.** (1996). Consumo extrahospitalario de antiinfecciosos en dosis diaria definida por mil habitantes y día. Aten. Primaria. 18: 357-361.
171. **Gómez-Lus, R., Adrián, F., Gómez-Lus, S., y Rubio-Calvo, M.C.** (1998). Presión selectiva antibiótica y resistencia en infecciones por *Streptococcus pneumoniae*. Med. Clin. (Barc.). 110: 3-7.
172. **Gómez-Lus, R., Granizo, J.J., Aguilar, L., Bouza, E., Gutierrez, A., García de Lomas, J., and The Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens.** (1999). Is there an ecological relationship between rates of antibiotic resistance of species of the genus *Streptococcus*? J. Clin. Microbiol. 37 (10): 3384-3386.
173. **González-Lama, Z., González, J.J., Tejedor, M.T., y Lupiola, P.** (1999). Sensibilidad a antibióticos en estreptococos beta hemolíticos de los grupos A, B y C. Rev. Esp. Quimioterapia. 12 (3): 215-219.
174. **Goosens, H., Chapelle, S., Hauchecorne, M., Wijdooghe, M., and Descheemaeker, P.** (1998). Characterization of macrolide resistance among group A *Streptococcus* in Belgium, abstr. C-14, p. 72. In Abstracts of the 38<sup>th</sup> Intescience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
175. **Gordillo, M.E., Singh, K.V., Baker, C., and Murray, B.** (1993). Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 31 (6): 1430-1434.
176. **Gots, J.S.** (1945). The detection of penicillinase production properties of microorganisms. Science. 102: 309.
177. **Granizo, J.J., Aguilar, L., Casal, J., Dal-Ré, R., and Baquero, F.** (2000a). *Streptococcus pyogenes* resistance to erythromycin in relation to macrolide consumption in Spain (1986-1997). J. Antimicrob. Chemother. 46: 959-964.
178. **Granizo, J.J., Aguilar, L., Casal, J., García-Rey, C., Dal-Ré, R., and Baquero, F.** (2000b). *Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and  $\beta$ -lactam consumption in Spain (1979-1997). J. Antimicrob. Chemother. 46: 767-773.
179. **Green, K., McGeer, A., Zhanel, G., Hoban, D., Weiss, K. et al.** (2000). Decreasing

- penicillin and macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Canada: who's driving whom? In Program and Abstract of the fifth International Congress on Macrolides, Azalides, Streptogramins, Ketolides and Oxazolidinones, Seville, Spain. Abstract 7.21, p 68.
180. **Gregory, S.T., and Dahlberg, A.F.** (1999) Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 289: 827-834.
181. **Guillemot, D., Maison, P., Carbon, C., Balkau, B., Vauzelle-Kervroëdan, F., Sermet, C., Bouvenot, G., and Eschwège, E.** (1998). Trends in antimicrobial drug use in the community between 1981 and 1992, in France. *J. Infect. Dis.* 177: 492-497.
182. **Haas, M.J., and Dowdong J.E.** (1975). Aminoglycoside-modifying-enzymes. In: *Methods in Enzymology. XLIII. Antibiotics.* pp 611-640. Academic Press, Inc, New York.
183. **Hahn, S., Grandi, G., Gryezan, T., and Dubnau, D.** (1982). Translational attenuation of *ermC*. A deletion analysis. *Mol. Gen. Genet.* 186: 204-216.
184. **Hammerum, A.M., Flannagan, S.E., Clewell, D.B., and Jensen, L.B.** (2001) Indication of transposition of a mobile DNA element containing the *vat(D)* and *erm(B)* genes in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (11): 3223-3225.
185. **Hancock, L.E., and Gilmore, M.** (2001). Pathogenicity of enterococci. In: *Gram-positive pathogens.* (Fischetti, V., Novick, R., Ferretti, J., Portnoy, D., and Rood, J. eds.). ASM, Washington D.C. *In press.*
186. **Hata, T., Sano, Y., Ohki, N., Yokoyama, Y., Matsumae, A., and Ito, S.** (1953). Leucomycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* 6, serie A, 87-89.
187. **Hewitt, W.L., Seligman, S.J., and Deigh, R.A.** (1966). Kinetics of the synergism of penicillin-streptomycin and penicillin-kanamycin for enterococci and its relationship to L-phase variants. *J. Lab. Clin. Med.* 67: 792-807.
188. **Higgins, C.** (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res. Microbiol.* 152: 205-210.
189. **Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P.C., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., et al.** (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature.* 323: 448-450.
190. **Hinton, M., Kaukas, A., Lim, S.K., and Linton, A.H.** (1986). Preliminary observations on the influence of antibiotics on the ecology of *Escherichia coli* and the enterococci in the faecal flora of healthy young chickens. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 165-173.
191. **Hoban, D.J., Wierzbowski, A.K., Nichol, K., and Zhanel, G.G.** (2001). Macrolide-

- resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 1998-1999: prevalence of *mef(A)* and *erm(B)* and susceptibilities to ketolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (7): 2147-2150.
192. **Holmstrom, L., Nyman, B., Rosengren, M., Wallander, S., and Ripa, T.** (1990). Outbreaks of infections with erythromycin-resistant group A streptococci in child day care centres. *Scand. J. Infect. Dis.* 22: 179-185.
193. **Horaud, T., De Cespedes, G., Clermont, D., David, F., and Delbos, F.** (1991). Variability of chromosomal genetic elements in streptococci, p 16-20. In: G.M. Dunny, P.P. Cheary, and L.L. McKay (ed.). *Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci, and enterococci.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
194. **Horinouchi, S., and Weisblum, B.** (1980). Post-transcriptional modification of RNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 7: 7079-7983.
195. **Horn, D.L., Zabriskie, J.B., Austrian, R. et al.** (1998). Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1341-1345
196. **Horodniceanu, T., Bougueleret, L., El-Solh, N., Bieth, G., and Delbos, F.** (1979). High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 686-689.
197. **Hsueh, P.R., Chen, H.M., Huang, A.H., and Wu, J.J.** (1995). Decreased activity of erythromycin against *Streptococcus pyogenes* in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2239-2242.
198. **Hsueh, P.R., Liu, Y.C., Shyr, J.M., Wu, T.L., Yan, J.J., Wu, J.J. et al.** (2000). Multicenter surveillance of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during the 1998-1999 respiratory season. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1342-1345.
199. **Hsueh, P.R., Teng, L.J., Lee, L.N., Ho, S.W., Yang, P.C., and Luh, K.T.** (2001). High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (11): 3205-3208.
200. **Hsueh, P.R., Teng, L.J., Lee, L.N., Yang, P.C., Ho, S.W., and Luh, K.T.** (1999). Extremely high incidence of macrolide and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 37 (4): 897-901.
201. **Huebner, R.E., Wasas, A.D., and Klugman, K.P.** (2000). Trends in antimicrobial resistance and serotype distribution of blood and cerebrospinal fluid isolates of

- Streptococcus pneumoniae* in South Africa, 1991-1998. Int. J. Infect. Dis. 4 (4): 214-218.
202. **Hummel, R., and Witte, W.** (1981). Zum Problem der Resistenzentwicklung bei *Staphylococcus aureus* des Menschen infolge der Anwendung von Oxytetracyclin und Tylosin in den industriemäßigen Schweineproduktionsanlagen. Archiv. Für Experimentelle veterinärmedizin. 35: 419-432.
203. **Huycke, M.M., Sahm, D.F., and Gilmore, M.S.** (1998). Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg. Infect. Dis. 4: 239-249.
204. **Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., et al.** (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature. 346: 362-365.
205. **Hyde, T.B., Gay, K., Stephens, D.S., Vugia, D.J., Pass, M., Johnson, S. et al.** (2001). Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates. JAMA. 286 (15): 1857-1862.
206. **Ip, M., Lyon, D.J., Yung, R., Chan, C., and Cheng, A.** (2001). Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. Antimicrob. Agents Chemother. 45 (5): 1578-1580.
207. **Jackson, L.A., Hilsdon, R., Farley, M.M. et al.** (1995). Risk factors for group B streptococcal disease in adults. Ann. Intern. Med. 123: 415-420.
208. **Jacob, A.E., and Hobbs, S.J.** (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *Zymogenes*. J. Bacteriol. 117: 360-372.
209. **Jacobs, M.R., and Appelbaum, P.C.** (2000). Susceptibility of 1100 *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in 1997 from seven Latin American and Caribbean countries. Laser Study Group. Int. J. Antimicrob. Agents. 16 (1): 17-24.
210. **Jacobs, M.R., Bajaksouzian, S., Zilles, A., Lin, G., Pankuch, G.A., and Appelbaum, P.C.** (1999a). Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 US surveillance study. Antimicrobial. Agents Chemother. 43: 1901-1908.
211. **Jacobs, M.R., Felmingham, D., Appelbaum, P.C., and The Alexander Project Group.** (1999b). The Alexander Project 1998: Penicillin and macrolide resistance in 2675 isolates of *Streptococcus pneumoniae* from 15 countries on five continents. 39<sup>th</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1044.
212. **Järvinen, H., Nissinen, A., and Huovinen, P.** (1989). Erythromycin resistance in group A streptococci. Lancet. i: 1022-1023.

213. **Jasir, A., and Schalén, C.** (1998). Survey of macrolide resistance phenotypes in Swedish clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 135-137.
214. **Jasir, A., Tanna, A., Efstratiou, A., and Schalén, C.** (2001). Unusual occurrence of M type 77, antibiotic-resistant group A streptococci in Southern Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 39 (2): 586-590.
215. **Jasir, A., Tanna, A., Noorani, A., Mirsalehian, A., Efstratiou, A., and Schalén, C.** (2000). High rate of tetracycline resistance in *Streptococcus pyogenes* in Iran: an epidemiological study. *J. Clin. Microbiol.* 38 (6): 2103-2107.
216. **Jensen, L.B., Fridodt-Moller, N., and Aarestrup, F.M.** (1999). Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol. Lett.* 170 (1): 151-158.
217. **Jensen, L.B., Hammerum, A.M., and Aarestrup, F.M.** (2000). Linkage of *vatE* and *ermB* in streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2231-2232.
218. **Jenssen, W.D., Thakker-Varia, S., Dubin, D.T., and Weinstein, M.P.** (1987). Prevalence of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance and *erm* gene classes among clinical strains of staphylococci and streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1267-1272.
219. **Jett, B.D., Huycke, M.M., and Gilmore, M.S.** (1994). Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 462-478.
220. **Johnston, N.J., De Azavedo, J.C., Kellner, J.D., and Low, D.E.** (1998). Prevalence and characterization of the mechanisms of macrolide, lincosamide, and streptogramin resistance in isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2425-2426.
221. **Jonas, B.M., Murray, B., and Weinstock, G.M.** (2001). Characterization of *emeA*, a *norA* homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (12): 3574-3579.
222. **Jones, R.N., and Biedenbach, D.J.** (1997). Antimicrobial activity of RU-66647, a new ketolide. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 7-12.
223. **Jones, R.N., Cormican, M.G., and Wanger, A.** (1996). Clindamycin resistance among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 25 (4): 201-204.
224. **Kaplan, E.L.** (1997). Recent evaluation of antimicrobial resistance in  $\beta$ -haemolytic streptococci: *Clin. Infect. Dis.* 24 (Suppl.1): S89-S92.

225. **Kataja J, Huovinen P, Muotiala A et al.** (1998a). Clonal spread of group A *Streptococcus* with the new type of erythromycin resistance. *J. Infect. Dis.* 177: 786-789.
226. **Kataja, J., Huovinen, P., Skurnik, M., the Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, and Seppälä, H.** (1999). Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1): 48-52.
227. **Kataja, J., Huovinen, P., The Macrolide Resistance Study Group, and Seppälä, H.** (2000). Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 789-792.
228. **Kataja, J., Seppälä, H., Skurnik, M., Sarkkinen, H., and Huovinen, P.** (1998b). Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (6): 1493-1494.
229. **Kaukas, A., Hinton, M., and Linton, A.H.** (1987). The effect of ampicillin and tylosin on the faecal enterococci of healthy young chickens. *J. Appl. Bact.* 62: 441-447.
230. **Kaukas, A., Hinton, M., and Linton, A.H.** (1988). The effect of growth-promoting antibiotics on the faecal enterococci of healthy young chickens. *J. Appl. Bact.* 64: 57-64.
231. **Kiska, D.L., Thiehe, B., Caracciolo, J., Jordan, M., Johnson, D., Kaplan, F.L., Gruninger, R.P., Lohr, J.A., Gilligan, P.H., and Denny, F.W. Jr.** (1997). Invasive group A streptococcal infections in North Carolina: epidemiology, clinical features, and genetic and serotype analysis of causative organisms. *J. Infect. Dis.* 176: 992-1000.
232. **Kloos, W.E., Schleifer, K.H., and Smith, R.F.** (1976). Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 22-37.
233. **Klugman, K.P.** (1990). Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microbiol. Reviews.* 3: 171-196.
234. **Klugman, K.P., Capper, T., Widdowson, C.A., Koornhof, H.J., and Moser, W.** (1998). Increased activity of 16-membered lactone ring macrolides against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of South African isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 729-734.
235. **Klugman, K.P., Coffey, T.J., Smith, A., Wasas, A., Meyers, M., and Spratt, B.G.** (1994). Cluster of an erythromycin-resistant variant of the Spanish multiply resistant 23F clone of *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *European J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 171-174.
236. **Ko, W.C., Lee, H.C., Wang, L.R., Lee, C.T., Liu, A.J., and Wu, J.J.** (2001). Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B *Streptococcus* over an eight-year period in Southern Taiwan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (5): 334-339.
237. **Kuehne, M.E., and Benson, B.W.** (1965). The structures of spiramycins and

- magnamycins. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 4660-4662.
238. **Kwak, J.H., Choi, E.C., and Weisblum, B.** (1991) Transcriptional attenuation control of *ermK*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 173: 4725-4735.
239. **Lagrou, K., Peetermans, W.E., Verhaegen, J., Van Lierde, S., Verbist, L., and Van Eldere, J.** (2000). Macrolide resistance in Belgian *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 11-121.
240. **Lai, C.J., and Weisblum, B.** (1971). Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 856-860.
241. **Lancefield, R.C.** (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595.
242. **LeBlanc, D.J., Inamine, J.M., and Lee, L.N.** (1986). Broad geographical distribution of homologous erythromycin, kanamycin and streptomycin resistance determinants among group D streptococci of human and animal origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 549-555.
243. **LeClercq, R., and Courvalin, P.** (1993). Mechanisms of resistance to macrolides and functionally related antibiotics. In *Macrolides* (Bryskier, A.J., Butzler, J.P., Neu, H.N. & Tulkens, P.M., eds.), pp. 125-141. Arnette Blackwell, Paris.
244. **Lee, C.Y., Buranen, S.L., and Ye, Z-H.** (1991). Construction of single-copy integration vectors for *Staphylococcus aureus*. *Gene.* 103: 101-105.
245. **Li, J., Yuan, L., Yu, S., and Yang, Y.** (2001). Nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among children in Beijing. *Chin. Med. J.* 114 (11): 1196-1200.
246. **Limia, A., Jiménez, M.L., Delgado, T., Sánchez, I., López, S., y López-Brea, M.** (1998). Caracterización fenotípica de la resistencia a eritromicina en cepas del género *Streptococcus* aisladas de muestras clínicas. *Rev. Esp. Quimioterapia.* 11 (3): 216-220.
247. **Lin, F.Y., Azimi, P.H., Weisman, L.E., Philips, J.B. 3<sup>rd</sup>, Regan, J., et al.** (2000). Antibiotic susceptibility profiles for group B streptococci isolated from neonates, 1995-1998. *Clin. Infect. Dis.* 31 (1): 76-79.
248. **Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R., Vandenesch, F., and Etienne, J.** (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1062-1066.
249. **Linton, A.H., Hinton, M.H., and Al-Chalaby, Z.A.M.** (1985). Monitoring for antibiotic resistance in enterococci consequent upon feeding growth promoters active against Gram-positive bacteria. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.*

- 8: 62-70.
250. **Liñares, J.** (1998). Community-acquired antimicrobial resistance: is it controllable? *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* 95: 23-26.
251. **Liñares, J., Pallarés, R., Alonso, T., Pérez, L., Ayats, J., Gudiol, F., Viladrich, P.F., and Martín, R.** (1992). Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). *Clin. Infect. Dis.* 15: 99-105.
252. **Llop, J.C.** (1997). Evolución en la utilización de antibacterianos en Cataluña. Impacto de los nuevos fármacos comercializados. *Aten. Primaria.* 19: 236-239.
253. **Lopardo, H.A., Venuta, M.E., Vidal, P., Rosaenz, I., Corthey, C., Farinati, A., et al.** (1997). Argentinian collaborative study on prevalence of erythromycin and penicillin susceptibility in *Streptococcus pyogenes*. The Argentinian *Streptococcus* Study Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 29: 29-32.
254. **Lowbury, E.J.L., and Hurst, L.** (1959). The sensitivity of staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleandomycin and spiramycin. *J. Clin. Pathol.* 12: 163-169.
255. **Lucas, G.M., Lechtzin, N., Puryear, W., Yau, L.L., Flexner, C.W., and Moore, R.D.** (1998). Vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1127-1133.
256. **Luna, V.A., Coates, P., Eady, E.A., Cove, J.H., Nguyen, T.H.T., and Roberts, M.C.** (1999). A variety of Gram-positive bacteria carry the mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 19-25.
257. **Luna, V.A., Cousin, S., Whittington, W.L.H., and Roberts, M.C.** (2000). Identification of the conjugative *mef* gene in clinical *Acinetobacter junii* and *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (9): 2503-2506.
258. **Lynch, C., Courvalin, P., and Nikaido, H.** (1997). Active efflux of antimicrobial agents in wild-type strains of enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 869-871.
259. **MacCallum, W.G., and Hastings, T.W.** (1899). A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. Spec.), with a description of the microorganism. *J. Exp. Med.* 4: 521-534.
260. **Mainous, M.R., Lipsett, P.A., and O'Brien, M.** (1997). Enterococcal bacteremia in the surgical intensive care unit. Does vancomycin resistance affect mortality? The John Hopkins SICU Study Group. *Arch. Surg.* 132: 76-81.
261. **Maniatis, A.N., Pournaras, S., Kanellopoulou, M., Kontos, F., et al.** (2001). Dissemination of clonally unrelated erythromycin- and glycopeptide-resistant

- Enterococcus faecium* isolates in a tertiary Greek hospital. J. Clin. Microbiol. 39 (12): 4571-4574.
262. **Manning, S.D., Pearlman, M.D., Tallman, P., Pierson, C.L., and Foxman, B.** (2001). Frequency of antibiotic resistance among group B *Streptococcus* isolated from healthy college students. Clin. Infect. Dis. 33 (12): E137-E139.
263. **Mao, J.C.-H., and Putterman, M.** (1968). Accumulation in Gram-positive and Gram-negative bacteria as a mechanism of resistance to erythromycin. J. Bacteriol. 96: 111-117.
264. **Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Jumas-Bilak, E., Isson, L., Drouillard, B., Darbas, H., and Carriere, C.** (2001). Distribution of macrolide resistance genes *erm(B)* and *mef(A)* among 160 penicillin-intermediate clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Southern France. Pathol. Biol. (Paris) 49 (7): 522-527.
265. **Marchese, A., Debbia, E.A., Arvigo, A., Pesce, A., and Schito, G.C.** (1995). Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Italy to penicillin and ten other antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 36: 833-837.
266. **Marchese, A., Mannelli, S., Tonoli, E., Gorlero, F., Toni, M., and Schito, G.C.** (2001). Prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy: results of the Italian Epidemiological Observatory survey (1997-1999). Microb. Drug Resist. 7 (3): 277-287.
267. **Marchese, A., Ramírez, M., Schito, G.C., and Tomasz, A.** (1998). Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered in Italy from 1993 to 1996. J. Clin. Microbiol. 36: 2944-2949.
268. **Marchese, A., Tonoli, E., Debbia, E.A., and Schito, G.C.** (1999). Macrolide resistance mechanisms and expression of phenotypes among *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy. J. Antimicrob. Chemother. 44: 461-464.
269. **Marco, F., Bouza, E., García de Lomas, J., Aguilar, L., and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens.** (2000). *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired respiratory tract infections in Spain: the impact of serotype and geographical, seasonal and clinical factors on its susceptibility to the most commonly prescribed antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 46: 557-564.
270. **Marrón, A., Carratalà, J., Pena, C., Rosón, B., Tubau, F., y Ruffí, G.** (1997). Endocarditis causada por estreptococos del grupo B en adultos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 15: 147-150.
271. **Martin, B., Alloing, G., Méjean, V., and Claverys, J.P.** (1987). Constitutive expression of erythromycin resistance mediated by *ermAM* determinant of plasmid

- pAM $\beta$ 1 results from deletion of 5' leader peptide sequences. *Plasmid*. 18: 250-253.
272. **Marton, A.** (1992). Pneumococcal antimicrobial resistance: the problem in Hungary. *Clin. Infect. Dis.* 15: 106-111.
273. **Maruyama, S., Yoshioka, H., Fojita, V., Takimoto, M., and Satake, Y.** (1979). Sensitivity of group A streptococci to antibiotics. *Am. J. Dis. Child.* 133: 1143-1145.
274. **Mason, D.J., Lummis, W.L., Dietz, A.** (1964). U-22956, a new antibiotic. I. Discovery and biological activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1703-1707.
275. **Matsubara, K., Nishiyama, Y., Katayama, K., Yamamoto, G., Sugiyama, M., Murai, T., and Baba, K.** (2001). Change of antimicrobial susceptibility of group B streptococci over 15 years in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (4): 579-582.
276. **Matsuoka, M., Endou, K., Kobayashi, H., Inoue, M., and Nakajima, Y.** (1998). A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 221-227.
277. **Matsuoka, M., Inoue, M., Nakajima, Y., and Endo, Y.** (2002). New *erm* gene in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (1): 211-215.
278. **Mayford, M., and Weisblum, B.** (1989). *ermC* leader peptide, amino acid sequence critical for induction by translational attenuation. *J. Mol. Biol.* 206: 69-79.
279. **Mayford, M., and Weisblum, B.** (1990). The *ermC* leader peptide: amino acid alterations leading to differential efficiency of induction by macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *J. Bacteriol.* 172: 3772-3779.
280. **McGee, L., Wang, H., Wasas, A., Huebner, R., Chen, M., and Klugman, K.P.** (2001). Prevalence of serotypes and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children in Beijing, China: identification of two novel multiply-resistant clones. *Microb. Drug Resist.* 7 (1): 55-63.
281. **McGuire, J.M., Boniece, W.S., Higgins, C.E., Hoehn, M.M., Stark, W.M., Westhead, J., and Wolfe, R.N.** (1961). Tylosin, a new antibiotic. I. Microbiological studies. *Antibiot. Chemother. (Basel)*. 11: 320-327.
282. **McGuire, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E.H., Powell, E.H., and Smith, J.W.** (1952). "Ilotycin", a new antibiotic. *Antibiot Chemother.* 2: 281-283.
283. **Megran, D.W.** (1992). Enterococcal endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 15: 63-71.
284. **Meier, F.A., Centor, R.M., Graham, L.Jr., and Dalton, H.P.** (1990). Clinical and microbiological evidence for endemic pharyngitis among adults due to group C streptococci. *Arch. Intern. Med.* 150: 825-829.
285. **Melander, E., Ekdahl, K., Jönsson, G., and Mölstad, S.** (2000). The frequency of

- penicillin-resistant pneumococci in children is correlated to the community-level utilisation of antibiotics. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19: 1172-1177.
286. **Melo-Cristino, J., Fernandes, M.L., and the Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens.** (1999). *Streptococcus pyogenes* isolated in Portugal: macrolide resistance phenotypes and correlation with T types. *Microb. Drug Resist.* 5 (3): 219-225.
287. **Midgley, M.** (1994). Characteristics of an ethidium efflux system in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 120 (1-2): 119-123.
288. **Miele, A., Bandera, M., and Goldstein, B.P.** (1995). Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine *van* genotype in enterococci and to study gene organization in *VanA* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1772-1778.
289. **Miller, Y.W., Eady, E.A., Lacey, R.W., Cove, J.H., Joanes, D.N., and Cunliffe, W.J.** (1996). Sequential antibiotic therapy for acne promotes the carriage of resistant staphylococci on the skin of contacts. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 829-837.
290. **Milton, I.D., Hewitt, C.L., and Harwood, C.R.** (1992). Cloning and sequencing of a plasmid-mediated erythromycin resistance determinant from *Staphylococcus xylosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 76: 141-147.
291. **Mitscher, L.A., and Showalter, H.D.H.** (1973). Chemical ionization mass spectrometry of some representative 16-membered ring macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* 26:55-59.
292. **Mitsuhashi, S., Imoue, M., Saito, K., and Nakae, M.** (1992). Drug resistance in *Streptococcus pyogenes* strains isolated in Japan. p. 151-154. *In: Schlessinger, D. (ed.). Microbiology.* ASM, Washington, D.C.
293. **Moellering, R.C., and Weinberg, A.N.** (1971). Studies on the antibiotic synergism against enterococci: II. Effects of various antibiotics on the uptake of <sup>14</sup>C-labeled streptomycin by enterococci. *J. Clin. Invest.* 50: 2580-2584.
294. **Moellering, R.C.J.** (1995). *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis*, and *Leuconostoc* species, p. 1826-1835. *In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., and Dolin, R. (ed.), Principles and Practices of Infectious Diseases, 4<sup>th</sup> de.* Churchill Livingstone, New York.
295. **Montanari, M.P., Mingoia, M., Giovanetti, E., and Varaldo, P.E.** (2001). Differentiation of resistance phenotypes among erythromycin-resistant pneumococci. *J. Clin. Microbiol.* 39 (4): 1311-1315.
296. **Morales, W.J., Dickey, S.S., Bornick, P., and Lim, D.V.** (1999). Change in antibiotic resistance of group B *Streptococcus*: impact on intrapartum management. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181 (2): 310-314.
297. **Morosini, M.I., Cantón, R., Loza, E., Negri, M.C., Galán, J.C., Almaraz, F., and**

- Baquero, F.** (2001). *In vitro* activity of telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (9): 2427-2431.
298. **Muñoz Bellido, J.L., García-Sáenz, J.A., Alonso Manzanares, M.A., Gutiérrez Zufiaurre, M.N., y García-Rodríguez, J.A.** (1998). Resistencia a los macrólidos en *Streptococcus pyogenes*. *Rev. Esp. Quimioterapia.* 11(3): 196-204.
299. **Muñoz, R., Coffey, T.J., and Daniels, M.** (1991). Intercontinental spread of multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 164: 302-306.
300. **Muñoz, R., Dowson, C.G., Daniels, M., Coffey, T.J., Martin, C., Hakenbeck, R., and Spratt, B.G.** (1992). Genetics of resistant to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 6: 2461-2465.
301. **Murase, T., Suzuki, R., Watanabe, Y., and Yamai, S.** (2000). Erythromycin resistance genes in *Streptococcus pyogenes* isolates in Kanagawa, Japan. *Microbiol. Immunol.* 44 (10): 863-865.
302. **Murdoch, D.R., and Reller, I.B.** (2001). Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated from patients with invasive disease: 10-year perspective. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (12): 3623-3624.
303. **Murray, B.E.** (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46-65.
304. **Murray, B.E.** (2000). Problems and perils of vancomycin resistant enterococci. *Braz. J. Infect. Dis.* 4 (1): 9-14.
305. **Musher, D.M.** (2000). *Streptococcus pneumoniae*. In: Principles and practice of infectious diseases (Mandell, G.L., Bennett, J.E., and Dolin, R. eds.). 5<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone. 2128-2147.
306. **Nagai, K., Appelbaum, P.C., Davies, T.A., Kelly, L.M., Hoellman, D.B., et al.** (2002a). Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 pneumococci from 10 Central and Eastern European countries. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2): 371-377.
307. **Nagai, K., Appelbaum, P.C., Davies, T.A., Kelly, L.M., Hoellman, D.B., et al.** (2002b). Susceptibility to telithromycin in 1011 *Streptococcus pyogenes* isolates from 10 Central and Eastern European countries. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2): 546-549.
308. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** (2000a). Performance

- standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard M2-A7, 7<sup>th</sup> ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
309. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** (2000b). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A5, 5<sup>th</sup> ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
310. **Neu, H.C.** (1993). Activity of macrolides against common pathogens *in vitro*, p. 167-182. In: A.J. Bryskier, J.P. Butzler, H.C. Neu, and P.M. Tulkens (ed.), Macrolides-chemistry, pharmacology and clinical uses. Arnette, Blackwell, Paris, France.
311. **Nguyen, L., Levy, D., Ferroni, A., Gehanno, P., and Berche, P.** (1997). Molecular epidemiology of *Streptococcus pyogenes* in an area where acute pharyngotonsillitis is endemic. J. Clin. Microbiol. 35 (8): 2111-2114.
312. **Niida, T., Tsuruoka, T., Ezaki, N., Shomura, T., Akita, E., and Inouye, S.** (1971). A new antibiotic, SF-837. J. Antibiot., serie A. 24: 319-320.
313. **Nishijima, T., Saito, Y., Aoki, A., Toriya, M., Toyonaga, Y., and Fujii, R.** (1999). Distribution of *mefE* and *ermB* genes in macrolide-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* and their variable susceptibility to various antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 43: 637-643.
314. **NNIS Report** (1997). National nosocomial infections surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1997, issued May 1997. Am. J. Infect. Control. 25: 477-487.
315. **Noble, C.J.** (1978). Carriage of group D streptococci in the human bowel. J. Clin. Pathol. 31:1182-1186.
316. **Noble, J.T., Tyburski, M.B., Berman, M., Greenspan, J., and Tennebaum, M.J.** (1980). Antimicrobial tolerance in group G *Streptococcus*. Lancet ii: 982.
317. **Noguchi, N., Emura, A., Matsuyama, H., O'Hara, K., Sasatsu, M., and Kono, M.** (1995). Nucleotide sequence and characterization of erythromycin resistance determinant that encodes macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 39 (10): 2359-2363.
318. **Noller, H.F.** (1991). Ribosomal RNA and translation. Ann. Rev. Biochem. 60: 191-227.
319. **Nuorti, J.P., Butler, J.C., Gelling, L., Kool, J.L., Reingold, A.L., and Vugia, D.J.** (2000). Epidemiologic relation between HIV and invasive pneumococcal disease in San Francisco County, California. Ann. Intern. Med. 132: 182-190.
320. **Oh, T.G., Kwon, A.R., and Choi, E.C.** (1998). Induction of *ermAMR* from a clinical strain of *Enterococcus faecalis* by 16-membered-ring macrolide antibiotics. J. Bacteriol.

- 180: 5788-5791.
321. **Omoto, S., Iwamatsu, K., Inouye, S., and Niida, T.** (1976). Modifications of a macrolide antibiotic midecamycin (SF 837). I. Synthesis and structure of 9,3'-diacetylmidecamycin. *J. Antibiot.* 39: 536-548.
322. **Omura, S., Nakagawa, A., Otani, M., Hata, T., Ogura, H., and Furuhata K.** (1969). Structures of the spiramycin (foramicidines) and their relationship with the leucomycins and carbomycins (magnamycins). *J. Am. Chem. Soc.* 91: 3401-3404.
323. **Opal, S.M., Cross, A., Palmer, M., and Almazan, R.** (1998). Group B streptococcal sepsis in adults and infants: contrast and comparisons. *Arch. Intern. Med.* 148: 641-645.
324. **Orden, B., Pérez-Trallero, E., Montes, M., and Martínez, R.** (1998). Erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes* in Madrid. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17 (6): 470-473.
325. **Orrling, A., Stjernquist-Desatnik, A., Schalén, C., and Kamme, C.** (1996). Treatment failure in streptococcal tonsillitis. An attempt to identify penicillin tolerant *Streptococcus pyogenes*. *Scand. J. Infect. Dis.* 28: 143-147.
326. **Osono, T., Oka, Y., Watanabe, S., Numazaki, Y., Moriyama, K., Ishida, H., Suzuki, K., Oyami, Y., and Umezawa, H.** (1967). A new antibiotic josamycin – I - Isolation and physico-chemical characteristics. *J. Antibiot.* 20, serie A, 174-180.
327. **Oster, P., Zanchi, A., Cresti, S., Lattanzi, M., Montagnani, F., Cellesi, C., and Rossolini, G.M.** (1999). Patterns of macrolide resistance determinants among community-acquired *Streptococcus pneumoniae* isolates over a 5-year period of decreased macrolide susceptibility rates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2510-2512.
328. **Oteo, J., Alós, J.I., and Gómez-Garcés, J.L.** (2001). Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates in 1999 and 2000 in Madrid, Spain: a multicentre surveillance study. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 215-218.
329. **Otto Cars, Sigvard Mølsted, and Arne Melander.** (2001). Variation in antibiotic use in the European Union. *The Lancet.* 357: 1851-1853.
330. **Ounissi, H., and Courvalin, P.** (1981). Classification of macrolide-lincosamide-streptogramin B type antibiotic resistance determinants. *Ann. Inst. Pasteur.* 132: 441-454.
331. **Ounissi, H., Derlot, E., Carlier, C., and Courvalin, P.** (1990). Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in Gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34 (11): 2164-2168.
332. **Palavecino, E.L., Riedel, I., Berrios, X., Bajaksouzian, S., Johnson, D., Kaplan, E., and Jacobs, M.R.** (2001). Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* in Santiago, Chile. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (1): 339-

- 341.
333. **Pallarés, R., Gudiol, F., Liñares, J., Ariza, J., Rufi, G., Murgui, L., et al.** (1987). Risk factors and response to antibiotic therapy in adults with bacteremic pneumonia caused by penicillin-resistant pneumococci. 317: 18-22.
334. **Pao, S.S., et al.** (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.
335. **Pardo, D., and Rosset, R.** (1977). Properties of ribosomes from erythromycin resistant mutants from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 156: 267-271.
336. **Paul, R., and Tchelitcheff, S.** (1959). Structure de la spiramycine. I. Etude des produits de dégradation: caractérisation du mycarose. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 443-447.
337. **Pearlman, M.D., Pierson, C.L., and Faix, R.G.** (1998). Frequent resistance of clinical group B streptococci isolates to clindamycin and erythromycin. *Obstet. Gynecol.* 92 (2): 258-261.
338. **Pérez-Trallero, E.** (2000). Pneumococcal macrolide resistance - not a myth. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 401-402.
339. **Pérez-Trallero, E., Fernández-Mazarrasa, C., García-Rey, C., Bouza, E., Aguilar, L., García de Lomas, J., Baquero, F., and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens.** (2001a). Antimicrobial susceptibilities of 1684 *Streptococcus pneumoniae* and 2039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3334-3340.
340. **Pérez-Trallero, E., García Arenzana, J.M., and Urbietta Engaña, M.** (1989). Erythromycin resistance in streptococci. *Lancet.* 2: 444-445.
341. **Pérez-Trallero, E., Urbietta, M., Montes, M., Ayestaran, I., and Marimon, J.M.** (1998). Emergence of *Streptococcus pyogenes* strains resistant to erythromycin in Gipuzkoa, Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 25-31.
342. **Pérez-Trallero, E., Urbietta, M., Montes, M., Ayestaran, I., and Marimon, J.M.** (1999). Clonal differences among erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 235-240.
343. **Pérez-Trallero, E., Vicente, D., Montes, M., Marimon, J.M., and Piñeiro, L.** (2001b). High proportion of pharyngeal carriers of commensal streptococci resistant to erythromycin in Spanish adults. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 225-229.
344. **Phillips, G., Parrat, D., Orange, G.V., Harper, I., McEwan, H., and Young, N.** (1990). Erythromycin resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 723-724. (Letter).

345. Pichichero, M.E., MacLinn, S.E., Gooch, W.M., Rodríguez, W., Goldfarb, J., Reidenberg, B.E., and Members of the Cefitibuten Pharyngitis International Study Group. (1995). Cefitibuten vs. penicillin V in group A  $\beta$ -hemolytic streptococcal pharyngitis. *Pediatr. J. Infect. Dis.* 14 (suppl. 7): S102-S107.
346. Piddock, L.J., Johnson, M., Ricci, V., and Hill, S.L. (1998). Activities of new fluoroquinolones against fluoroquinolone-resistant pathogens of the lower respiratory tract. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2956-2960.
347. Pinnert-Sindico, S., Ninet, L., Preud'Homme, J., and Cosar, C. (1955). A new antibiotic – spiramycin. *Antibiot. Ann.*, 1954-1955, 724-727.
348. Portillo, A., Lantero, M., Gastañares, M. J., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Olarte, I., and Torres, C. (1999a). MLS phenotypes and mechanisms of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. In: S.H. Zinner, L.S. Young, J.F. Acar, and H.C. Neu (ed.), *New considerations for macrolides, azalides, streptogramins, and ketolides*. Marcel Dekker Inc., pp. 237-242. New York, N.Y.
349. Portillo, A., Lantero, M., Gastañares, M.J., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. (1999b). Macrolide resistance phenotypes and mechanisms of resistance in *Streptococcus pyogenes* in La Rioja, Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 13: 137-140.
350. Portillo, A., Lantero, M., Olarte, I., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. (2001). MLS resistance phenotypes and mechanisms in  $\beta$ -haemolytic group B, C and G *Streptococcus* isolates in La Rioja, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 113-114.
351. Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martínez, J.L., and Torres, C. (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 967-971.
352. Portnoy, D., Prentis, J., and Richards, G.K. (1981). Penicillin tolerance of human isolates of group C streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 235-238.
353. Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Carlier, C., and Courvalin, P. (1991). Nucleotide sequence specific for TN1545-like conjugative transposons in pneumococci and staphylococci resistant to tetracycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1657-1660.
354. Reichler, M.R., Allphin, A.A., Breiman, R.F., Schreiber, J.R., Arnold, J.E., McDougal, L.K., *et al.* (1992). The spread of multiply resistant *Streptococcus pneumoniae* at a day care center in Ohio. *J. Infect. Dis.* 166: 1346-1353.
355. Reig, M., Galán, J.C., Baquero, F., and Pérez-Díaz, J.C. (2001). Macrolide resistance in *Peptostreptococcus* spp. mediated by *ermTR*: possible source of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents*

- Chemother. 45 (2): 630-632.
356. **Rende-Fournier, R., Leclercq, R., Galimand, M., Duval, J., and Courvalin, P.** (1993). Identification of the *sata* gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in *Enterococcus faecium* BM4145. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 2119-2125.
357. **Ripa, S., Zampaloni, C., Vitali, L.A., Giovanetti, E., Montanari, M.P., Prenna, M., and Varaldo, P.E.** (2001). *Sma*I macrorestriction analysis of Italian isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and correlations with macrolide-resistance phenotypes. Microb. Drug Resist. 7 (1): 65-71.
358. **Roberts, M.C.** (1994). Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. Trends Microbiol. 2: 353-357.
359. **Roberts, M.C., Sufcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., and Seppälä, H.** (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother. 43 (12): 2823-2830.
360. **Robredo, B., Singh, K.V., Torres, C., and Murray, B.** (1999). Identification to the species level by PCR of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans*. 39<sup>th</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., p. 228.
361. **Rolland, K., Marois, C., Siquier, V., Cattier, B., and Quentin, R.** (1999). Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and *hylB* gene analysis. J. Clin. Microbiol. 37 (6): 1892-1898.
362. **Rolston, K.V., Chandrasekar, P.H., and LeFrock, J.L.** (1984). Antimicrobial tolerance in group C and G streptococci. J. Antimicrob. Chemother. 13: 389-392.
363. **Rolston, K.V., LeFrock, J.L., and Schell, R.F.** (1982). Activity of nine antimicrobial agents against Lancefield group C and G streptococci. Antimicrob. Agents Chemother. 22: 930-932.
364. **Romero Vivas, J., Rubio Alonso, M., Corral, O., Pacheco, S., Agudo, E., y Picazo, J.J.** (1997). Estudio de las infecciones respiratorias extrahospitalarias. Enferm. Inf. Microb. Clin. 15: 289-298.
365. **Rondini, G., Cocuzza, C.E., Cianflone, M., Lanzafame, A., Santini, L., and Mattina, R.** (2001). Bacteriological and clinical efficacy of various antibiotics used in the treatment of streptococcal pharyngitis in Italy. An epidemiological study. Int. J. Antimicrob. Agents. 18: 9-17.
366. **Rosato, A., Vicarini, H., and Leclercq, R.** (1999). Inducible or constitutive expression of resistance in clinical isolates of streptococci and enterococci cross-resistant to erythromycin and lincomycin. J. Antimicrob. Chemother. 43: 559-562.

367. **Rosato, A., Vicarini, H., Bonnefoy, A., Chantot, J.F., and Leclercq, R.** (1998). A new ketolide, HMR 3004, active against streptococci inducibly resistant to erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1392-1396.
368. **Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., and Baumberg, S.** (1995). Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene.* 153: 93-98.
369. **Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S., and Wootton, J.C.** (1990). Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport supergene family. *Mol. Microbiol.* 4: 1207-1214.
370. **Ross, J.I., Farrell, M.A., Eady, E.A., Cove, J.H., and Cunliffe, W.J.** (1989). Characterisation and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 851-862.
371. **Rouse, D.J., Andrews, W.W., Liu, F.Y., Mott, C.W., Ware, J.C., and Philips, J.B.** 3<sup>rd</sup>. (1998). Antibiotic susceptibility profile of group B *Streptococcus* acquired vertically. *Obstet. Gynecol.* 92 (6): 931-934
372. **Ruess, M., Muller, U., Sander, A., and Berner, R.** (2000). Antimicrobial susceptibility patterns of *Streptococcus agalactiae* in a German university hospital. *Scand. J. Infect. Dis.* 32 (6): 623-626.
373. **Ruiz Bremón, A., Ruiz-Tovar, M., Pérez Gorricho, B., Díaz de Torres, P., and López Rodríguez, R.** (2000). Non-hospital consumption of antibiotics in Spain: 1987-1997. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 395-400.
374. **Sahm, D.F., Jones, M.E., Hickey, M.L., Diakun, D.R., Mani, S.V., and Thornsberry, C.** (2000). Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 457-466.
375. **Sakakibara, H., Fujiwara, T., Aizawa, M., and Omura, S.** (1981b) 9-epi-leucomycin A<sub>5</sub> - Synthesis and antimicrobial activity. *J. Antibiot.* 34: 1577-1580.
376. **Sakakibara, H., Okakawa, O., Fujiwara, T., Otani, M., and Omura, S.** (1981a). Acyl derivatives of 16-membered macrolides. 1. Synthesis and biological properties of 3''-O-propionyl leucomycin A<sub>5</sub>. (TMS-19-Q). *J. Antibiot.* 34:1001-1010.
377. **Salata, R.A., Lerner, P.I., Shlaes, D.M., Gopalakrishna, K.V., and Wolinsky, I.** (1989). Infections due to Lancefield group C streptococci. *Medicine (Baltimore).* 68: 225-239.
378. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory

- manual 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
379. **Santagati, M., Iannelli, F., Oggioni, M.R., Stefani, S., and Pozzi, G.** (2000). Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (9): 2585-2587.
380. **Savoia, D., Avanzini, C., Bosio, K., Volpe, G., Carpi, D., Dotti, G., and Zucca, M.** (2000). Macrolide resistance in group A streptococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 41-47.
381. **Sawicka-Grzelak, A., Rokosz, A., and Luczak, M.** (1999). Drug resistance of 100 clinical strains of *Enterococcus* spp. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 51 (3-4): 239-247.
382. **Schattner, A., and Vosti, K.L.** (1998). Bacterial arthritis due to beta-hemolytic streptococci of serogroups A, B, C, F and G. Analysis of 23 cases and a review of the literature. *Medicine (Balt).* 77: 122-139.
383. **Schito, G.C., Debbia, E.A., and Marchese, A.** (2000). The evolving threat of antibiotic resistance in Europe: new data from the Alexander project. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, Topic T1, 3-9.
384. **Schito, G.C., Mannelli, S., Cibrari-Sent, M., Pesece, A., and Marchese, A.** (1999). Evoluzione delle resistenze ai farmaci antimicrobici in *Streptococcus pneumoniae* circolante in Italia. Analysis dei dati dell'Osservatorio Epidemiologico Italiano. *Giornale Italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica.* 3: 43-57.
385. **Schleifer, K.H., and Kilpper-Balz, R.** (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 34:31-34.
386. **Schmitz, F.J., Perdikouli, M., Beeck, A., Verhoef, J., and Fluit, A.C.** (2001). Molecular surveillance of macrolide, tetracycline and quinolone resistance mechanisms in 1191 clinical European *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 18 (5): 433-436.
387. **Schmitz, F.J., Sadurski, R., Kray, A., Boos, M., Geisel, R., Kohrer, K., Verhoef, J., and Fluit, A.C.** (2000). Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 891-984.
388. **Scott, R.J.D., Naidoo, J., Lightfoot, N.F., and George, R.C.** (1989). A community outbreak of group A beta haemolytic streptococci with transferable resistance to erythromycin. *Epidemiol. Infect.* 102:85-91.
389. **Seppälä, H., Klaukka, T., Lehtonen, P., Nenonen, E. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, and Huovinen, P.** (1995). Outpatients use of erythromycin:

- link to increased erythromycin resistance in group A streptococci. Clin. Infect. Dis. 21: 1378-1385.
390. **Seppälä, H., Klaukka, T., Lehtonen, R., Nenonen, E., and Huovinen, P.** (1997a). Erythromycin resistance of group A streptococci from throat samples is related to age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16: 651-656.
391. **Seppälä, H., Klaukka, T., Vupio-Varkila, J., et al.** (1997b). The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. *N. Engl. J. Med.* 337: 441-446.
392. **Seppälä, H., Nissinen, A., Jirvinen, H., Houvinen, S., Henriksson, T., and Herva, E.** (1992). Resistance to erythromycin in group A streptococci. *N. Engl. J. Med.* 326: 292-297.
393. **Seppälä, H., Nissinen, A., Yu, Q., and Huovinen, P.** (1993). Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 885-891.
394. **Seppälä, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M.C., and Huovinen, P.** (1998). A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (2): 257-262.
395. **Seppälä, H., Vuopio-Varkila, J., Österblad, M., Jahkola, M. et al.** (1994). Evaluation of methods for epidemiologic typing of group A streptococci. *J. Infect. Dis.* 169: 519-525.
396. **Seral, C.** (2000a). Distribución de los genes de resistencia *erm(A)*, *erm(B)* y *mef(A)* en cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes* y su relación con los transposones conjugativos. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza.
397. **Seral, C., Castillo, F.J., Rubio-Calvo, M.C., Fenoll, A., García, C., and Gómez-Lus, R.** (2001b). Distribution of resistance genes *tet(M)*, *aph3'-III*, *cat<sub>pC194</sub>* and the integrase gene of *Tn1545* in clinical *Streptococcus pneumoniae* harbouring *erm(B)* and *mef(A)* genes in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 863-866.
398. **Seral, C., Castillo, F.J., Rubio-Calvo, M.C., García, C., y Gómez-Lus, R.** (2001a). Asociación de los genes de resistencia a antibióticos MLS y a tetraciclina en *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Esp. Quimioterapia.* 14 (Nº 1): 55-62.
399. **Seral, C., Castillo, J., García, C., Rubio-Calvo, M.C., y Gómez-Lus, R.** (2000b). Presencia del transposón conjugativo *Tn1545* en cepas de *Streptococcus pneumoniae* con los genes *mef(A)*, *erm(B)*, *tet(M)*, *cat<sub>pC194</sub>* y *aph3'-III*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 18: 506-511.
400. **Seral, C., González, V., Castillo, J., García, C., Rubio, M.C., y Gómez-Lus, R.**

- (2000c). Estudio de los genes de resistencia a macrólidos en estreptococos de los grupos C y G. *Rev. Esp. Quimioterapia*. 13 (2): 171-175.
401. **Serra, A., Ramírez, A., and Arteaga, E.** (1993). Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to common use antimicrobial. 6<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sevilla. Abstract nº 10.3.
402. **Shaw, J.H., and Clewell, D.B.** (1985). Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon *Tn917* in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 164: 782-796.
403. **Shortridge, V.D., Doern, G.V., Brueggemann, A.B., Beyer, J.M., and Flamm, R.K.** (1999). Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. *Clin. Infect. Dis.* 29: 1186-1188.
404. **Shortridge, V.D., Flamm, R.K., Ramer, N., Beyer, J., and Tanaka, S.K.** (1996). Novel mechanism of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 73-78.
405. **Shortridge, V.D., Zhong, P., Cao, Z., Beycr, J.M., Almer, L.S., Ramer, N.C., Doktor, S.Z., and Flamm, R.K.** (2002). Comparison of *in vitro* activities of ABT-773 and telithromycin against macrolide-susceptible and -resistant streptococci and staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (3): 783-786.
406. **Siles Gutierrez, M., Ortega Martínez, J., Goldaracena Tanco, M., Hernández Dettoma, J.L., y Obaldia, A.** (1998). Utilización de antiinfecciosos en Atención Primaria en La Rioja. *Aten. Primaria.* 22 (9): 574-579.
407. **Silverman, N.S., Morgan, M., and Nichols, W.S.** (2000). Antibiotic resistance patterns of group B *Streptococcus* in antenatal genital cultures. *J. Reprod. Med.* 45 (12): 979-982.
408. **Singh, K.V., Jonas, B.M., Weinstock, G.M., and Murray, B.E.** (2001a). Characterization of an ABC homolog encoded by a species specific gene from *E. faecalis* associated with clindamycin (CLI) and quinupristin dalfopristin (Q D) resistance. 41<sup>st</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. C1-2016.
409. **Singh, K.V., Malathum, K., and Murray, B.E.** (2001b). Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 263-266.
410. **Skogberg, K., Simonen, H., Renkonen, O.V., and Valtonen, V.Y.** (1988). Beta-haemolytic group A, B, C and G streptococcal septicaemia: a clinical study. *Scand. J. Infect. Dis.* 20: 119-125.

411. **Sobin, B.A., English, A.R., and Celmer, W.D.** (1954). PA 105, a new antibiotic. *Antibiot. Ann.* 1954-1955, 827-829.
412. **Sociedad Española de Quimioterapia.** (2001). Evaluación del consumo de antibióticos en la Atención Primaria de Salud (1999). *Rev. Esp. Quimioterapia.* 14 (1): 69-72.
413. **Song, J.H., Lee, N.Y., Ichiyama, S., et al.** (1999). Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP) Study. *Clin. Infect. Dis.* 28: 1206-1211.
414. **Sood, R.K., Poth, M., Shepherd, S., Patel, A., Naso, R., and Fattom, A.** (1998). Capsular serotyping of *Enterococcus faecalis*: isolation, characterization, and immunogenicity of capsular polysaccharide isolated from *E. faecalis* type 1, abstr. E-19, p. 238. *In* Abstracts of the 98<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology, ASM, Washington, D.C.
415. **Soriano, S., Brasili, S., Saiz, M., Carranza, C., Vidal, P., Calderón, J., and Lopardo, H.A.** (2000). *Streptococcus pyogenes*: sensibilidad a penicilina y eritromicina en las ciudades de Neuquen y Cipolletti. *Medicina (Buenos Aires).* 60: 487-490.
416. **Spencer, R.C., Wheat, P.F., Magee, J.T., and Brown, E.H.** (1989). Erythromycin resistance in streptococci. *Lancet.* i: 168.
417. **Stingemore, H., Francis, G.R.J., Toohey, M., and McGeachie, D.B.** (1989). The emergence of erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Fremantle, Western Australia. *Med. J. Austr.* 150: 626-631.
418. **Stokstad, E.L.R., and Jukes, T.H.** (1950). Further observations on the animal protein factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73: 523-528.
419. **Suara, R.O., Adegbola, R.A., Baker, C.J., Secka, O., Mulholland, E.K., and Greenwood, B.** (1994). Carriage of group B streptococci in pregnant Gambian mothers and their infants. *J. Infect. Dis.* 170:1316-1319.
420. **Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., and Wondrack, L.** (1996a). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (11): 2562-2566.
421. **Sutcliffe, J., Tait-kamradt, A., and Wondrack, L.** (1996b). *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (8): 1817-1824.
422. **Swann, M.M.** (1969). Joint Committee on the use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. Her Majesty's Stationery Office, London, United Kingdom.
423. **Syrogiannopoulos, G.A., Grivea, I.N., Davies, T.A., Katopodis, G.D., Appelbaum,**

- P.C., and Beratis, N.G.** (2000). Antimicrobial use and colonization with erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greece during the first 2 years of life. *Clin. Infect. Dis.* 31 (4): 887-893.
424. **Syrogianopoulos, G.A., Grivea, I.O., Tait-Kamradt, A., et al.** (2001). Identification of an *erm(A)* erythromycin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (1): 342-344.
425. **Tait-Kamradt, A., Clancy, J., Cronan, M., Dib-Hajj, F., Wondrack, L., Yuan, W., and Sutcliffe, J.** (1997). *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (10): 2251-2255.
426. **Tait-Kamradt, A., Davies, T., Appelbaum, P.C., Depardieu, F., Courvalin, P., Petipas, J. et al.** (2000a). Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3395-3401.
427. **Tait-Kamradt, A., Davies, T., Cronan, M., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C., and Sutcliffe, J.** (2000b). Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected *in vitro* by macrolide passage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (8): 2118-2125.
428. **Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B.** (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
429. **Thal, L.A., Welton, L.A., Perri, M.B., Donabedian, S., McMahon, J., Chow, J.W., and Zervos, M.J.** (1996). Antimicrobial resistance in enterococci isolated from turkeys fed virginiamycin. *In: Proceedings of 36<sup>th</sup> ICAAC.* New Orleans.
430. **Thornsberry, C., Jones, M.E., Hickey, M.L. Mauriz, Y., Kahn, J., and Sahn, D.F.** (1999a). Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in the United States, 1997-1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 749-759.
431. **Thornsberry, C., Ogilvie, P.T., Holley, H.P., and Sahn, D.F.** (1999b). Survey of susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective US study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2612-2623.
432. **Tomasz, A., and Muñoz, R.** (1995).  $\beta$ -lactam antibiotic resistance in Gram-positive bacterial pathogens of the upper respiratory tract. *Microb. Drug Resist.* 1: 103-109.
433. **Tomasz, A., Corso, A., and members of the PAHO/Rockefeller University**

- Workshop: Severina, E.P., Echaniz-Avilés, G., et al.** (1998). Molecular epidemiological characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive pediatric isolates recovered in six South American countries. *Microb. Drug Resist.* 4: 195-207.
434. **Tomich, P.K., An, F., and Clewell, D.B.** (1980). Properties of erythromycin inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 141 (3): 1366-1374.
435. **Torres, C., y Zarazaga, M.** (1998). Repercusiones en el hombre del consumo de antibióticos por animales. *Rev. Esp. Quimioterapia.* 11 (1): 5-13.
436. **Travis, J.** (1994). Reviving the antibiotic miracle. *Science.* 264: 360-362.
437. **Trieu-Cuot, P., Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., and Courvalin, P.** (1990). Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn1545. *Nucleic Acids Res.* 18: 3660.
438. **Tsakris, A., and Maniatis, A.N.** (1993). Inducible type of erythromycin resistance among group B streptococci isolated in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 177-178.
439. **Turner, J.C., Hayden, F.G., Lobo, M.C., Ramírez, C.E., and Murren, D.** (1997). Epidemiologic evidence for Lancefield group C beta-hemolytic streptococci as a cause of exudative pharyngitis in college students. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1-4.
440. **Tyrrell, G.J., Senzilet, L.D., Spika, J.S., Kertesz, D.A., Alagaratnam, M., Lovgren, M., and Talbot, J.A.** (2000). Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study--1996. Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators. *J. Infect. Dis.* 182 (1): 168-173.
441. **Tzelepi, E., Kouppari, A., Mavroidi, A., Zaphiropoulou, A., and Tzouveleakis, L.S.** (1999). Erythromycin resistance amongst group A  $\beta$ -haemolytic streptococci isolated in a paediatric hospital in Athens, Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 43: 745-746.
442. **Uh, Y., Jang, I.H., Hwang, G.Y., Yoon, K.J., and Song, W.** (2001). Emerging erythromycin resistance among group B streptococci in Korea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (1): 52-54.
443. **Valisena, S., Falci, C., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Cocuzza, C.E., Nicoletti, P., Rescalidani, R., and Fontana, R.** (1999). Molecular typing of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains with the M phenotype isolated in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 260-264.
444. **Van Asselt, G.J., Sloos, J.H., Mouton, R.P., Van Boven, C.P.A., and Van de Klundert, J.A.M.** (1995). Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to azithromycin, clarithromycin, erythromycin and roxithromycin *in vitro*. *J. Med. Microbiol.* 43: 386-

- 391.
445. **Van de Klundert, J.A.M., and Vliegthart, J.S.** (1993). PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. *In: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications.* (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., and White, T.J., eds.) ASM. Washington, D.C.
446. **VanDamme, P., Pot, B., Falsen, E., Kersters, K., and Devriese, L.A.** (1996). Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 774-781.
447. **Vannuffel, P., Di Giabattista, M., and Cocito, C.** (1992b). The role of rRNA bases in the interaction of peptidyltransferase inhibitors with bacterial ribosomes. *J. Biol. Chem.* 267: 16114-16120.
448. **Vannuffel, P., Di Giabattista, M., Morgan, E.A., et al.** (1992a). Identification of a single base change in ribosomal RNA leading to erythromycin resistance. *J. Biol. Chem.* 267: 8377-8382.
449. **Vannuffel, P., Di Giambattista, M., and Cocito, C.** (1994). Chemical probing of a virginiamycin M-promoted conformational change of the peptidyltransferase domain. *Nucl. Acids. Res.* 22: 4449-4453.
450. **Varaldo, P.E., Debbia, E., Nicoletti, G., Pavesio, D., Ripa, S., Schito, G.C., et al.** (1999). Nationwide survey in Italy of treatment of *Streptococcus pyogenes* pharyngitis in children: influence of macrolide resistance on clinical and microbiological outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 29: 869-873.
451. **Varon, E., Havlickova, H., Pitman, C., et al.** (1997). Comparison of invasive (septicemic) and non-invasive strains of group A streptococci isolated during one year national survey in France. *Adv. Exp. Med. Biol.* 418: 83-85.
452. **Vartian, C., Lerner, P.I., Shlaes, D.M., and Gopalakrishna, K.V.** (1985). Infections due to Lancefield group G streptococci. *Medicine.* 64: 75-88.
453. **Vergheze, A., Mireault, K., and Arbeit, R.D.** (1986). Group B streptococcal bacteremia in men. *Rev. Infec. Dis.* 8: 912-917.
454. **Von Recklinghausen, G., Fischer, W., Schmidt, K., and Ansorg, R.** (1989). Resistance of *Streptococcus agalactiae* to erythromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (1): 93.
455. **Wagman, G.H., Waitz, J.A., Marques, J., Murawski, A., Orden, E.M., Testa, R.T., and Weinstein, M.J.** (1972). New *Micromonospora* – produced macrolide antibiotic, rosamicin. *J. Antibiot.* 25: 641-646.

456. **Waites, K., Johnson, C., Gray, B., Edwards, K., Crain, M., and Benjamin, W.** (2000). Use of clindamycin disks to detect macrolide resistance mediated by *ermB* and *mefE* in *Streptococcus pneumoniae* isolates from adults and children. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1731-1734.
457. **Weber, J.M., Leung, J.O., Swanson, S.J., Idler, K.B., and McAlpine, J.B.** (1991). An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. *Science.* 252: 114-117.
458. **Weisblum, B.** (1985). Inductible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity, and structural element that regulate expression – a review. *J. Antimicrob. Chemother.* 16 (suppl. A): 63-90.
459. **Weisblum, B.** (1995). Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 797-805.
460. **Weisblum, B.** (1998). Macrolide resistance. *Drug Resist. Update.* 1: 29-41.
461. **Weisblum, B.** (2000). Resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics. *In: Gram positive pathogens* (Fischetti *et al.*, ed.). ASM, Washington, DC.
462. **Weisblum, B., Holder, S.B., and Halling, S.M.** (1979). Deoxyribonucleic acid sequence common to staphylococcal and streptococcal plasmids which specify erythromycin resistance. *J. Bacteriol.* 138: 990-998.
463. **Weiss, I., Gorodnitzky, Z., Korenman, Z., and Yagupsky, P.** (1997). Serotyping and susceptibility to macrolides and other antimicrobial drugs of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with invasive disease in Southern Israel. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 20-23.
464. **Weiss, K., De Azavedo, J., Restieri, C., Galarneau, L.A., Gourdeau, M., Harvey, P., Paradis, J.F., Salm, K., and Low, D.E.** (2001a). Phenotypic and genotypic characterization of macrolide-resistant group A *Streptococcus* strains in the province of Quebec, Canada. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 345-348.
465. **Weiss, K., De Azavedo, J., Restieri, C., Quach, C., Laverdiere, M., Rubin, E., Gourdeau, M., and Low, D.E.** (2001b). *In vitro* activity of a novel ketolide ABT-773 against invasive strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 407-409.
466. **Wells, C.L., Jechoreck, R.P., and Erlandsen, S.L.** (1990). Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J. Infect. Dis.* 162: 82-90.
467. **Werckenthin, C., and Schwarz, S.** (2000). Molecular analysis of the translational

- attenuator of a constitutively expressed *erm(A)* from *Staphylococcus intermedius*. J. Antimicrob. Chemother. 46: 785-788.
468. **Werner, G., and Witte, W.** (1999). Characterization of a new enterococcal gene, *saiG*, encoding a putative acetyltransferase conferring resistance to streptogramin A compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1813-1814.
469. **Werner, G., Hildebrandt, B., and Witte, W.** (2001). The newly described *msrC* gene is not equally distributed among all isolates of *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 45 (12): 3672-3673.
470. **Werner, G., Hildebrandt, B., Klare, I., and Witte, W.** (2000). Linkage of determinants for streptogramin A, macrolide-lincosamide-streptogramin B, and chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium* and dissemination of this cluster among streptogramin-resistant enterococci. Int. J. Med. Microbiol. 290: 543-548.
471. **Wessels, M.R., and Kasper, D.L.** (1993). The changing spectrum of group streptococcal disease. N. Engl. J. Med. 328: 1843-1844.
472. **Widdowson, C.A., and Klugman, K.P.** (1998). Emergence of the M phenotype of erythromycin-resistant pneumococci in South Africa. Emerg. Infect. Dis. 4: 277-281.
473. **Wiley, P.F., Gerzon, K., Flynn, E.H., Sigal, M.V. Jr., Weaver, O., Quarck, U.C., Charrette, R.R., and Monahan, R.** (1957). Erythromycin. X. Structure of erythromycin. J. Am. Chem. Soc. 79: 6062-6070.
474. **Wirth, R., An, F.Y., and Clewell, D.B.** (1986). Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. J. Bacteriol. 165 (3): 831-836.
475. **Witte, W.** (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. Science. 279: 996-997.
476. **Wittler, R.F., Yamada, S.M., Bass, J.W., Hamill, R., Wiebe, R.A., and Ascher, D.P.** (1990). Penicillin tolerance and erythromycin resistance of group A beta haemolytic streptococci in Hawaii and the Philippines. Am. J. Dis. Child. 144: 587-589.
477. **Wondrack, L., Massa, M., Yang, B.V., and Sutcliffe, J.** (1996). Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. Antimicrob. Agents Chemother. 40 (4): 992-998.
478. **Wu, J.J., Lin, K.Y., Hsueh, P.R., Liu, J.W., Pan, H.I., and Sheu, S.M.** (1997). High incidence of erythromycin-resistant streptococci in Taiwan. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 844-846.
479. **Yagupsky, P., Porat, N., Fraser, D., Prajrod, F., Merires, M., McGee, L., et al.**

- (1998). Acquisition, carriage, and transmission of pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in Southern Israel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 177: 1003-1012.
480. **Yan, J.J., Wu, H.M., Huang, A.H., Fu, H.M., Lee, C.T., and Wu, J.J.** (2000). Prevalence of polyclonal *mefA*-containing isolates among erythromycin-resistant group A streptococci in Southern Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 38 (7): 2475-2479.
481. **York, M.K., Gibbs, L., Perdreau-Remington, F., and Brooks, G.F.** (1999). Characterization of antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates from the San Francisco bay area of Northern California. *J. Clin. Microbiol.* 37 (6): 1727-1731.
482. **Zaoutis, T., Schneider, B., Moore, L.S., and Klein, J.D.** (1999). Antibiotic susceptibilities of group C and group G streptococci isolated from patients with invasive infections: evidence of vancomycin tolerance among group G serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 37 (10): 3380-3383.
483. **Zhanel, G.G., Carrie, A., Hoban, L., Weiss, K., Low, D.E., and Gin, A.S.** (2000). 40<sup>th</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., p. 508.
484. **Zhanel, G.G., Karlowsky, J.A., Palatnick, L., Vercaigne, L., Low, D.E., the Canadian Respiratory Infection Study Group, and Hoban, D.** (1999). Prevalence of antimicrobial resistance in respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae*: results of a Canadian national surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2504-2509.
485. **Zhong, P., and Shortridge, V. D.** (2000). The role of efflux in macrolide resistance. *Drug Resist. Updates.* 3: 325-329.
486. **Zhong, P., Cao, Z., Hammond, R., Chen, Y., Beyer, J., Shortridge, V., et al.** (1999). Induction of ribosome methylation in MLS-resistant *Streptococcus pneumoniae* by macrolides and ketolides. *Microb. Drug Resist.* 5 (3): 183-188.