

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS-LINCOSAMIDAS-ESTREPTOGRAMINAS Y MECANISMOS IMPLICADOS EN CEPAS CLÍNICAS DE *Streptococcus spp.* EN LA RIOJA.

PORCILLO, A.¹, LANTERO, M.², ZARAZAGA, M.¹
GASTAÑARES, M.J.², OLARTE, I.², UNDABEITIA, E.²
RUIZ-LARREA, F.¹, TORRES, C.¹

RESUMEN

En los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia a los antibióticos Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLS) en distintas especies de *Streptococcus*, tanto en España como en otros países. Existen dos fenotipos de resistencia a antibióticos MLS en *Streptococcus spp.*: fenotipo MLS_B (conlleva resistencia a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B) y fenotipo disociado M (implica resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos, pero no a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas o estreptograminas). En La Rioja se ha estudiado la resistencia a antibióticos MLS en 501 cepas clínicas de *Streptococcus* pertenecientes a distintas especies, así como los fenotipos de resistencia y los mecanismos de resistencia implicados. Los porcentajes de resistencia a eritromicina detectados fueron: *S. pneumoniae* (54%, del cual el 74% se encontró en aislamientos de niños menores de 10 años), *S. pyogenes* (29%), *S. agalactiae* (14,7%) y *Streptococcus* grupo C y G (12,5% y 10,7%, respectivamente). Entre las cepas de *Streptococcus* resistentes a eritromicina, los fenotipos más frecuentemente encontrados fueron: fenotipo M en *S. pyogenes* [mecanismo de resistencia: bomba de eflujo mediada por el gen *mef(A)*] y el fenotipo MLS_B en el resto de las especies de *Streptococcus* estudiadas [mecanismo de resistencia: síntesis de metilasa de rRNA 23S mediada por diferentes genes del grupo *erm*]. Los distintos fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos MLS encontrados en las cepas de *Streptococcus* tienen importancia clínica, y permiten orientar sobre las diferentes opciones terapéuticas.

Palabras clave: resistencia a macrólidos, *Streptococcus spp.*, genes de resistencia a macrólidos.

An increase in Macrolide-Lincosamide-Streptogramin (MLS) resistance among Streptococcus spp. has been reported in Spain and in many other countries in recent

1. Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja; Madre de Dios, 51, 26006 Logroño - España
2. Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario "San Millán-San Pedro", c/ Autonomía de La Rioja, 3, 26004 - Logroño.

years. Two types of MLS resistance phenotypes have been described in *Streptococcus* spp.: MLS_B phenotype, which confers resistance to 14, 15 and 16 atom macrolides, lincosamides and group B streptogramins, and dissociated M phenotype, which confers resistance to 14 and 15 atom macrolides, but not to 16 atom macrolides, lincosamides or streptogramins. MLS resistance among 501 *Streptococcus* isolates of a variety of species has been studied in La Rioja. Resistance phenotypes and the mechanisms involved were analysed. Erythromycin resistance percentages were as follows: *S. pneumoniae* (54%, of which 74% were found in isolates from children under 10), *S. pyogenes* (29%), *S. agalactiae* (14,7%) and group C and G *Streptococcus* (12,5 and 10,7%, respectively). The most frequent phenotypes among erythromycin resistant strains were: M phenotype (mediated by an efflux pump) for *S. pyogenes*, and MLS_B phenotype (mediated by 23S rRNA methylases encoded by group *erm* genes) for the other species studied. This variety of MLS phenotypes and resistance mechanisms have important clinical consequences for establishing correct therapeutic treatments.

Key words: macrolide resistance, *Streptococcus* spp., macrolide resistance genes.

0. INTRODUCCIÓN

Distintas especies del género *Streptococcus* tienen un especial interés en medicina, ya que pueden ser responsables de múltiples procesos infecciosos. Entre estas especies destacaremos *Streptococcus pneumoniae* (también denominado neumococo), *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* β-hemolítico del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* β-hemolítico del grupo B) y *Streptococcus* β-hemolíticos de los grupos C y G.

S. pneumoniae es con frecuencia el agente etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad o de meningitis en adultos, así como también de otitis aguda en niños. *S. pyogenes* es un patógeno que frecuentemente coloniza y causa infecciones del tracto respiratorio superior como faringitis, tonsilitis, o sinusitis y también puede ocasionar infecciones cutáneas y sistémicas (Bisno, 1995). *S. agalactiae* es una causa común de infecciones neonatales severas, aunque también puede causar infecciones en adultos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades de base (Harrison et al., 1995; Blumberg et al., 1996; Lin et al., 2000). Por último, los estreptococos de los grupos C y G forman parte de la flora normal de la faringe, piel, tracto intestinal y vagina; sin embargo, estos microorganismos pueden ser causa de faringitis y de diversas infecciones severas en humanos (Salata et al., 1989; Vartian et al., 1985).

El tratamiento de elección de las infecciones estreptocócicas es la penicilina. Sin embargo, en muchas ocasiones, bien por presentar las bacterias mecanismos de resistencia a antibióticos β-lactámicos (relativamente frecuente en *S. pneumoniae*, pero no en las otras especies de estreptococos) (Liñares et al., 2000) o bien por presentar los pacientes problemas de alergia a penicilina, es necesaria la búsqueda de otras alternativas terapéuticas, entre las cuales se encuentran los macrólidos.

Los macrólidos constituyen un grupo de antibióticos caracterizados desde el punto de vista estructural por poseer un anillo macrocíclico unido a dos azúcares. Los derivados dotados de mayor actividad tienen un anillo de 14 a 16 átomos. El mecanismo de acción de este grupo de antibióticos es la unión a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, inhibiendo la síntesis proteica. Existen otros dos gru-

TABLA 1
CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS

Grupo de antibióticos	Antibióticos	
MACRÓLIDOS Anillo de 14 átomos	Eritromicina	
	Roxitromicina	
	Claritromicina	
	Oleandomicina	
	Díritromicina	
	Fluritromicina	
	Anillo 15 átomos	Azitromicina
	Anillo de 16 átomos	Espiramicina
		Josamicina
		Midecamicina
Rokitamicina		
LINCOSAMIDAS	Lincomicina	
	Clindamicina	
ESTREPTOGRAMINAS	Pristinamicina	
	Virginiamicina	
	Quinupristín-dalfopristín	

pos de antibióticos: lincosamidas y estreptograminas, que, aunque poseen diferencias estructurales con los macrólidos, presentan un mecanismo de acción similar y también están muy relacionados en sus mecanismos de resistencia. En la tabla 1 se detallan los distintos antibióticos incluidos en el grupo Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLS).

En los últimos años se ha observado un incremento importante de la resistencia a antibióticos macrólidos en cepas de *Streptococcus* de las diferentes especies, tanto en Europa como en EE.UU. En España, la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* era escasa hasta 1985 (<3%). Sin embargo, en la última década se ha producido un incremento progresivo de la resistencia a macrólidos en todo el país. Esta evolución puede haber sido debida a la diseminación epidémica de ciertos serogrupos (6, 14, 15, 19 y 23) bajo la presión selectiva de un mayor uso de macrólidos (Liñares et al., 2000). Así, en un estudio realizado en Barcelona se pasó de 7,1% de resistencia en 1986 hasta un 29% en 1997 (Liñares et al., 1992; Liñares et al., 2000) y de la misma forma ocurrió en otras zonas de España (Soriano et al., 1993; Fenoll et al., 1998). En un estudio reciente realizado con aislamientos de *S. pneumoniae* procedentes de 14 hospitales españoles (1220 cepas recogidas desde mayo de 1996 hasta abril de 1997), el 35% de dichas cepas fueron resistentes a eritromicina. En este estudio se observó una gran diferencia entre las cepas no-inva-

sivas procedentes de niños (36-60% de resistencia a eritromicina) y cepas invasivas (13-16%) (García de Lomas et al., 1998). Las cepas de *S. pneumoniae* que presentan resistencia a eritromicina, con frecuencia son resistentes a otros antibióticos. De manera similar a *S. pneumoniae*, también se ha observado un incremento de la resistencia a macrólidos en las cepas de *S. pyogenes* (Hsueh et al., 1995; Cocuzza et al., 1997; Cornaglia et al., 1998; García-Bermejo et al., 1998; Muñoz-Bellido et al., 1998; Orden et al., 1998; Pérez-Trallero et al., 1998), *S. agalactiae* (Fernandez et al., 1998; Pearlman et al., 1998; Arpin et al., 1999), *Streptococcus* grupo C y *Streptococcus* grupo G (Kataja et al., 1998).

Se han descrito dos mecanismos de resistencia a macrólidos en el género *Streptococcus*: A) modificación de la diana de acción de los macrólidos y B) eflujo activo del antibiótico. Estos dos mecanismos de resistencia confieren diferentes fenotipos de resistencia a los antibióticos MLS de gran interés en la práctica clínica. El primero de los mecanismos de resistencia, "modificación de la diana de acción de los macrólidos", ocurre en los ribosomas, a través de una rRNA metilasa que modifica un residuo de adenina del rRNA 23S; esta metilación provoca un cambio conformacional en el ribosoma que da lugar a una menor afinidad de unión de macrólidos (de 14, 15 y 16 átomos) y también de lincosamidas y estreptograminas B (antibióticos MLS_B) por su diana en la subunidad ribosomal 50S (Leclercq et al., 1993). Por tanto, el fenotipo de resistencia en las cepas con este mecanismo de resistencia es el denominado MLS_B, siendo la bacteria resistente a todos los antibióticos MLS_B (Tabla 2). La resistencia MLS_B puede presentar una expresión constitutiva (se expresa tanto en presencia como en ausencia de macrólidos) o inducible (sólo se expresa previa inducción en presencia de eritromicina). Se han descrito diferentes metilasas que confieren resistencia a antibióticos MLS_B y que están codi-

TABLA 2
FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS (MLS) QUE SE PUEDEN DETECTAR EN CEPAS DE *Streptococcus* Y POSIBLES MECANISMOS ASOCIADOS.

Fenotipo de Resistencia	La bacteria es resistente a los antibióticos:	Mecanismo de Resistencia
Sensible	Sensible a todos los antibióticos MLS	Sin mecanismo
MLS _B *	Macrólidos de 14 átomos (ej. eritromicina) Macrólidos de 15 átomos (ej. azitromicina) Macrólidos de 16 átomos (ej. espiramicina, josamicina, midecamicina) Lincosamidas (ej. clindamicina) Estreptograminas del grupo B	rRNA metilasas
M	Macrólidos de 14 átomos (ej. eritromicina) Macrólidos de 15 átomos (ej. azitromicina)	Bomba de eflujo activo

*La expresión puede ser constitutiva (la resistencia se expresa siempre) o inducible (la resistencia se expresa sólo previa inducción con eritromicina).

ficadas por diferentes genes *erm* [*erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) y *erm*(TR) entre otros] (Roberts et al., 1999). El segundo de los mecanismos de resistencia a antibióticos macrólidos es por “eflujo activo del antibiótico”, es decir, por la existencia de bombas de achique o de eliminación del antibiótico al exterior de la célula. Este mecanismo de resistencia se caracteriza por conferir un fenotipo de resistencia disociado, también denominado fenotipo M (la bacteria con este mecanismo presenta resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, como eritromicina y azitromicina, y sensibilidad a macrólidos de 16 átomos, como josamicina o midecamicina, y también a lincosamidas y estreptograminas) (Tabla 2). Dicho mecanismo de resistencia está mediado en *Streptococcus* por los genes *mef* [*mef*(A) o *mef*(E)] (Clancy et al., 1996; Tait-Kamradt et al., 1997).

El grupo de trabajo formado por investigadores del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja y del Laboratorio de Microbiología del Hospital San Millán de Logroño, ha estudiado durante estos últimos años los fenotipos de resistencia a antibióticos MLS en cepas clínicas de las especies *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *Streptococcus* grupo C y G, así como también ha llevado a cabo la caracterización molecular de los mecanismos de resistencia implicados, determinando el carácter constitutivo o inducible de la resistencia (Portillo et al., 1999; Portillo et al., 2000; Portillo et al., 2001). Las diferencias encontradas en los mecanismos de resistencia en función de la especie de *Streptococcus* estudiada son de gran interés desde el punto de vista del tratamiento de los procesos infecciosos por dichos microorganismos. En la presente publicación se hace una revisión de los resultados obtenidos por el grupo en esta línea de investigación.

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizó un total de 501 cepas clínicas de *Streptococcus* de las especies: *S. pneumoniae* (n= 192), *S. pyogenes* (n= 137), *S. agalactiae* (n= 136), *Streptococcus* del grupo C (n= 8) y *Streptococcus* del grupo G (n= 28). La identificación de *S. pyogenes* y otros *Streptococcus* β-hemolíticos fue realizada mediante morfología macroscópica de las colonias, tinción de Gram, catalasa, hemólisis, sensibilidad a bacitracina y test de aglutinación con sueros específicos (BioMérieux). Los aislados de *S. pneumoniae* se identificaron según la morfología macroscópica de las colonias en agar Müeller Hinton sangre, tinción de Gram y sensibilidad a optoquina. Las cepas estudiadas correspondían a aislados consecutivos, obtenidos a partir de diferentes muestras clínicas en el laboratorio de Microbiología del Hospital San Millán de Logroño durante 1996-1997 (*S. pyogenes* y *S. pneumoniae*), 1999-2000 (*S. agalactiae*) y 1997-1999 (*Streptococcus* grupos C y G). El origen de las cepas incluidas en el estudio se detalla en la Tabla 3.

Se realizaron estudios de sensibilidad para eritromicina (ERI), clindamicina (CLI), espiramicina (SPI) y virginamicina (VGN) por el método de difusión con disco en agar Müeller Hinton (Difco) suplementado con 5% de sangre de carnero (BioMérieux) (NCCLS, 1999). Los puntos de corte utilizados para SPI y VGN fueron los recomendados por otros autores (Report of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 1996). Se realizó también un estudio de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) para ERI, penicilina y cefotaxima, utilizando el método del E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). Se define como CMI₅₀ y CMI₉₀ la concentración mínima de antibiótico que inhibe, respectivamente, el 50 y el 90% de los microorganismos analizados.

TABLA 3
ORIGEN DE LAS CEPAS DE *Streptococcus* INCLUIDAS EN ESTE ESTUDIO

Tipo de muestra	<i>S. pneumoniae</i> n=192	<i>S. pyogenes</i> n=137	<i>S. agalactiae</i> n=136	<i>Streptococcus</i> grupo C n=8	<i>Streptococcus</i> grupo G n=28
Tracto respiratorio superior	156 (95)*	84 (27)	7	3 (1)	10
Sangre	24 (5)	2	0	0	3 (1)
Piel/heridas	3 (1)	12 (5)	5 (1)	3	5 (2)
Orina	0	5 (2)	65 (9)	1	0
L. pleural/ LCR	3 (1)	0	0	0	0
Tracto vaginal	1	23 (4)	57 (10)	1	4
Otros	5 (2)	11 (2)	2	0	6

* Se señala entre paréntesis el número de cepas de cada especie resistentes a eritromicina según el origen de las muestras.
L. pleural: líquido pleural; LCR: líquido céfalo-raquídeo.

Para la determinación de los fenotipos de resistencia se utilizó el método del triple disco "ERI-SPI-CLI" previamente descrito (Seppälä et al., 1993). Se preparó una suspensión del microorganismo correspondiente con una turbidez del 0,5 McFarland (equivalente a aprox. 10^8 UFC/ml). Con este inóculo se sembró una placa de agar Müeller Hinton suplementada con sangre de carnero y se colocaron tres discos de antibiótico ERI-CLI-SPI a una distancia de 12 mm entre sí. Se consideró que la resistencia era MLS_B inducible cuando se observaba un achatamiento de los halos de inhibición de CLI y de SPI en las proximidades del disco de ERI, siendo la cepa resistente a ERI (fenotipo MLS_B inducible). La resistencia a ERI, CLI, y SPI sin achatamiento de los halos de inhibición indicaba un fenotipo MLS_B constitutivo. El fenotipo M se caracterizó por resistencia a ERI y sensibilidad absoluta a CLI y SPI, sin achatamiento de los halos de inhibición de CLI o de SPI en las proximidades del disco de ERI.

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos MLS fueron estudiados mediante la amplificación por PCR de los genes *erm*, usando cebadores específicos para los genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* (Sutcliffe et al., 1996a) y *erm(TR)* (Kataja et al., 1998). Las condiciones utilizadas en cada caso fueron las recomendadas por los autores. El mecanismo de resistencia de bomba de flujo fue también analizado mediante PCR, utilizando los cebadores y las condiciones específicas para la amplificación de los genes *msr(A)* (Wondrack et al., 1996) y *mef(A)* (Sutcliffe et al., 1996a; Sutcliffe et al., 1996b). Se utilizaron controles positivos y negativos en todas las reacciones de PCR. El DNA genómico para las reacciones de PCR fue obtenido mediante el sistema Instagene matrix (BioRad), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En todos los aislamientos de *S. agalactiae* se determinó la presencia del gen *mre(A)* por PCR (Clancy et al., 1997). La caracterización de los productos de PCR obtenidos se realizó en algunos casos mediante secuenciación, utilizando para ello un secuenciador automático (Perkin-Elmer, ABI Prism).

Con el fin de determinar la diversidad clonal de los aislados de *Streptococcus* β -hemolíticos resistentes a ERI, éstos fueron sometidos a la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE), siguiendo el método descrito por Birren et al., 1993. Las muestras de *S. pyogenes* fueron digeridas con la enzima de restricción *Sfi*I

(BioLabs), mientras que en los aislados de *S. agalactiae* y *Streptococcus* del grupo C y grupo G, la digestión se realizó con la enzima *Sma*I (Pharmacia). La electroforesis se llevó a cabo empleando un sistema CHEF-DR II (Bio-Rad), con pulsos de 5 a 45 segundos a 5V/cm durante 22 horas.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Streptococcus pneumoniae. Se ha detectado resistencia a eritromicina en el 54% de las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas (Tabla 4). Dicha resistencia fue mayor en las cepas aisladas de muestras del tracto respiratorio superior (61%) que en aquellas obtenidas de fluidos estériles, como sangre o líquido cefaloraquídeo (22%) (Tabla 3). Otros autores refieren similares porcentajes de resistencia para aislados con significación clínica (Liñares et al., 2000). Por otra parte, se observó un mayor porcentaje de resistencia a eritromicina en los aislamientos de niños menores de 10 años (74%) que en aquellos obtenidos de otros pacientes de mayor edad (37%).

El rango de CMI y la CMI₅₀ para la eritromicina en las cepas de *S. pneumoniae* fue de ≤0,016->256 µg/ml y >256 µg/ml, respectivamente (Tabla 4). De las 104 cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina (ERI^R), 103 presentaron el fenotipo de resistencia MLS_B (resistencia a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos, lincosa-

TABLE 4
CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI* EN µg/ml) DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE *S. pneumoniae* A ERITROMICINA, PENICILINA Y CEFOTAXIMA.

Antibiótico	<i>S. pneumoniae</i> (n=192)	<i>S. pneumoniae</i> ERI ^R (n= 104)	<i>S. pneumoniae</i> ERI ^S (n= 88)
ERITROMICINA			
Rango	≤0,016->256	32->256	≤0,016- 0,5
CMI ₅₀	>256	>256	0,125
CMI ₉₀	>256	>256	0,25
% R	54,2	100	0
PENICILINA			
Rango	0,002-4	0,016-4	0,002-4
CMI ₅₀	0,25	0,5	0,016
CMI ₉₀	1	2	1
% I/R (CMI > 0,12)	61,4	88,5	29,5
CEFOTAXIMA			
Rango	0,002-2	0,012-2	0,002-1
CMI ₅₀	0,25	0,5	0,016
CMI ₉₀	1	1	0,5
% I/R (CMI > 1)	4,7	8,6	0

* La CMI se realizó mediante el sistema E-test.

S: cepas sensibles; R: cepas resistentes; I/R: cepas resistentes o con sensibilidad disminuida.

TABLA 5
FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS,
LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS (MLS) Y MECANISMOS IMPLICADOS
EN LA RESISTENCIA EN 192 CEPAS CLÍNICAS DE *S. pneumoniae*.

FENOTIPO RESISTENCIA (Nº CEPAS)	PATRÓN DE RESISTENCIA ^a	Nº DE CEPAS	DETECCIÓN DE GENES POR PCR ^b			
			<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>erm(C)</i>	<i>mef(A)</i>
MLS _B (103)	ERI ^R -SPI ^R -CLI ^R	47	-	+	-	-
		1	+	-	-	-
		55	ND	ND	ND	ND
Fenotipo M (1)	ERI ^R -SPI ^S -CLI ^S	1	-	-	-	+
Sensible (88)	ERI ^S -SPI ^S -CLI ^S	88	-	-	-	-

^a ERI, eritromicina; SPI, espiramicina; CLI, clindamicina.

^b *erm(A)*: se obtiene una amplificación positiva con los cebadores específicos de *erm(A)* o de *erm(TR)*.

mef(A): se obtiene una amplificación positiva con los cebadores específicos *mef(A/E)*.

ND: no determinado.

midas y estreptograminas tipo B) y sólo una cepa presentó el fenotipo disociado M (resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos, pero sensibilidad a macrólidos de 16 átomos y a lincosamidas y estreptograminas) (Tabla 5). El bajo porcentaje de fenotipo M entre nuestras cepas es similar a otros estudios españoles (Cercenado et al., 1997; Pérez-Trallero et al., 1998) y contrasta con el elevado porcentaje obtenido en EE.UU., donde el fenotipo M puede representar más del 40% de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina (Sutcliffe et al., 1996b). Los valores de CMI₅₀ a penicilina y a cefotaxima en las cepas de *S. pneumoniae* ERI^R (0,5 µg/ml para ambos antibióticos) fueron más elevados que en las cepas ERI^S (0,016 µg/ml) (Tabla 4). Esta correlación ha sido descrita anteriormente (Soriano et al., 1993).

En 48 de las cepas de *S. pneumoniae* ERI^R con fenotipo de resistencia MLS_B se determinó el mecanismo de resistencia implicado por PCR (Tabla 5). En 47 de estas cepas se obtuvo un resultado de PCR positivo con los cebadores específicos para el gen *erm(B)*, siendo los resultados negativos para *erm(A)*, *erm(C)* y *mef(A)*; en la cepa restante con fenotipo MLS_B se detectó el gen *erm(TR)*. Por otro lado, se estudió la cepa con el fenotipo de resistencia disociado M, detectándose el gen *mef(A)* por PCR (Tabla 5). En todas las cepas estudiadas sensibles a eritromicina, las reacciones de PCR fueron negativas.

Los resultados anteriormente señalados indican que la resistencia a eritromicina está en aumento en *S. pneumoniae*, particularmente en aquellas cepas aisladas de niños y del tracto respiratorio superior, probablemente debido al elevado uso de macrólidos en este grupo de población (Granizo et al., 2000). El fenotipo de resistencia más frecuente en nuestro medio es el MLS_B, mediado por el gen *erm(B)*, y con poca frecuencia se detecta el fenotipo disociado M. Esto indica que entre los aislamientos de La Rioja, las cepas de *S. pneumoniae* con resistencia a eritromicina frecuentemente son resistentes a otros macrólidos de 15 y 16 átomos, así como a lincosamidas y estreptograminas. Sería muy importante realizar un seguimiento de

los fenotipos de resistencia y de los mecanismos de resistencia, con objeto de poder determinar si la frecuencia de los distintos fenotipos de resistencia varía a lo largo del tiempo, ya que esto tiene importancia a la hora de establecer recomendaciones terapéuticas apropiadas.

S. pyogenes. Se ha detectado un elevado porcentaje de resistencia a eritromicina (29%) entre las cepas de *S. pyogenes* estudiadas. El rango de CMI y la CMI₅₀ para eritromicina fue $\leq 0,03$ ->256 $\mu\text{g/ml}$ y 0,125 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Tabla 6). Teniendo en cuenta el origen de las muestras, se detectó un 40% de resistencia a este macrólido en cepas aisladas de heridas y úlceras, un 32% en cepas procedentes del tracto respiratorio superior y un 17% en cepas de origen vaginal (Tabla 3). En los últimos años se ha detectado un incremento general de la resistencia a eritromicina en esta especie microbiana en diferentes países de Europa y en Taiwan (Cornaglia et al., 1998; García-Bermejo et al., 1998; Pérez-Trallero et al., 1998; Hsueh et al., 1995), probablemente debido a un incremento en el consumo de macrólidos (Pérez-Trallero et al., 1998). Sin embargo, en EE.UU. la prevalencia de resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* es relativamente baja (Coonan et al., 1994; Barry et al., 1997), lo que podría estar relacionado con un menor consumo de macrólidos.

De las 40 cepas de *S. pyogenes* con resistencia a eritromicina estudiadas, en 36 se detectó el fenotipo disociado M (90%) y en las 4 cepas restantes, el fenotipo

TABLE 6
CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI* EN $\mu\text{g/ml}$) DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE *Streptococcus* DE DIFERENTES ESPECIES A ERITROMICINA, PENICILINA Y CEFOTAXIMA.

Antibiótico	<i>S. pyogenes</i> (n=137)	<i>S. agalactiae</i> (n=136)	<i>Streptococcus</i> grupo C (n=8)	<i>Streptococcus</i> grupo G (n=28)
ERITROMICINA				
Rango	$\leq 0,03$ ->256	0,032->256	0,125->256	0,064->256
CMI ₅₀	0,125	0,094	0,19	0,125
CMI ₉₀	16	>256	>256	>256
% R (CMI ≥ 1)	29,2	14,7	12,5	10,7
PENICILINA				
Rango	$\leq 0,0035$ -0,03	0,023-0,190	0,008-0,032	0,008-0,032
CMI ₅₀	0,015	0,047	0,012	0,016
CMI ₉₀	0,015	0,064	0,032	0,023
% I/R (CMI ≥ 1)	0	0	0	0
CEFOTAXIMA				
Rango	$\leq 0,0035$ -0,125	0,023-0,125	0,012-0,064	0,016-0,64
CMI ₅₀	0,015	0,032	0,023	0,023
CMI ₉₀	0,03	0,064	0,064	0,094
% I/R (CMI ≥ 1)	0	0	0	0

* La CMI se realizó mediante el sistema E-test.

S: cepas sensibles; R: cepas resistentes; I/R: cepas resistentes o con sensibilidad disminuida.

TABLA 7
FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS,
LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS (MLS) Y MECANISMOS IMPLICADOS
EN LA RESISTENCIA EN 137 CEPAS CLÍNICAS DE *S. pyogenes*

Fenotipo resistencia	Patrón de resistencia ^a	CMI a eritromicina (µ/ml)	nº de cepas	Detección de genes por PCR ^b			
				<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>erm(C)</i>	<i>mef(A)</i>
MLS _B inducible	ERI ^R -SPI ^R -CLI ^R	>256	2	+	+	-	-
MLS _B constitutivo	ERI ^R -SPI ^R -CLI ^R	>256	2	-	-	-	-
M	ERI ^R -SPI ^S -CLI ^S	8-64	36	-	-	-	+
Sensible	ERI ^S -SPI ^S -CLI ^S	≤0,03-0,5	97	-	-	-	-

^a ERI, eritromicina; SPI, espiramicina; CLI, clindamicina.
^b *erm(A)*: se obtiene una amplificación por PCR positiva con los cebadores específicos *erm(A)* y/o *erm(TR)*.
mef(A): se obtiene una amplificación por PCR positiva con los cebadores específicos *mef(A/E)*.

MLS_B (10%) (Tabla 7). El nivel de resistencia de las cepas con fenotipo M fue bajo (CMI: 8-64 µg/ml), mientras que en las cepas con fenotipo MLS_B fue elevado (CMI > 256 µg/ml). En dos de las 4 cepas con el fenotipo MLS_B, la expresión fue constitutiva y en las otras dos, fue inducible. El gen *mef(A)* se detectó por PCR en todas las cepas con el fenotipo M y los genes *erm(B)* y *erm(A)* en las dos cepas con fenotipo MLS_B inducible. Sin embargo, no se pudo determinar ningún mecanismo de resistencia en las cepas con fenotipo MLS_B con expresión constitutiva. Recientemente se han descrito nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos MLS en cepas de *S. pneumoniae* que conllevan modificaciones de la estructura del rRNA y en un futuro próximo se analizará si nuestras cepas poseen éstos u otros nuevos mecanismos no referidos en la literatura (Tait-Kamradt et al., 2000a; Tait-Kamradt et al., 2000b). Otros autores han detectado el gen *mef(A)* en las cepas de *S. pyogenes* con fenotipo M (Sutcliffe et al., 1996b; Orden et al., 1998; Pérez-Trallero et al., 1998; Kataja et al., 1999; Pérez-Trallero et al., 1999).

La sensibilidad a penicilina y a cefotaxima fue muy elevada en todas las cepas, con valores de CMI₅₀ de 0,015 y 0,03 µg/ml, respectivamente (Tabla 6).

En conclusión, podemos decir que la resistencia a eritromicina es elevada en los aislados de *S. pyogenes* de nuestra región y que el mecanismo más frecuentemente detectado es una bomba de eflujo activo mediada por el gen *mef(A)*, que confiere resistencia a eritromicina pero sensibilidad a macrólidos de 16 átomos, como la josamicina, espiramicina y midecamicina, lincosamidas y estreptograminas. Estos resultados tienen implicaciones clínicas en relación con la elección de opciones terapéuticas en infecciones por *S. pyogenes*.

***S. agalactiae*.** Se ha detectado resistencia a eritromicina en el 14,7% de los 136 aislados de *S. agalactiae* estudiados (n=20) y la CMI₅₀ y CMI₉₀ para estos aislados fue 0,094 y >256 µg/ml, respectivamente (Tabla 6). Analizando la resistencia en fun-

ción del origen de las muestras, se detectó un 17,5% de resistencia a eritromicina en cepas procedentes de exudados vaginales y un 14% en cepas aisladas de orina (Tabla 3). La CMI₅₀ para la penicilina y cefotaxima fue de 0,064 µg/ml y todos los aislamientos fueron sensibles a ambos antibióticos. Porcentajes de resistencia a eritromicina similares al nuestro han sido referidos por otros grupos (Lin et al., 2000). El 95% (19 de 20) de nuestras cepas de *S. agalactiae* con resistencia a eritromicina (CMI a eritromicina en el rango 4->256 µg/ml) presentaron el fenotipo de resistencia MLS_B y el 5% (1 de 20) de las cepas (CMI de 2 µg/ml) presentó el fenotipo disociado M (Tabla 8).

En todas las cepas de *S. agalactiae*, tanto en las sensibles como en las resistentes a eritromicina, se detectó por PCR la existencia del gen *mre(A)*. (Clancy et al., 1997), indicando que, probablemente, este gen sea intrínseco de esta especie bacteriana y que quizás no tenga una acción clara en la resistencia a antibióticos MLS. Por otro lado, se ha detectado el gen *mef(A)* en la cepa con el fenotipo M y distintas asociaciones de los genes *erm* en las cepas con el fenotipo MLS_B, tanto con expresión constitutiva como con expresión inducible, como puede observarse en la Tabla 8. Por tanto, en los aislados de *S. agalactiae* en nuestro medio, el fenotipo de resistencia más frecuente es el MLS_B, que conlleva resistencia a todos los antibióticos del grupo MLS.

Streptococcus grupo C y G. Se ha observado resistencia a eritromicina en una de 8 cepas de *Streptococcus* grupo C (12,5%), procedente del tracto respiratorio superior, y en tres de 28 *Streptococcus* grupo G (10,7%), de muestras aisladas de heridas y úlceras (n=2) y de origen sanguíneo (n=1) (Tablas 3 y 6). En la Tabla 6 también se detallan los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para eritromicina, penicilina y cefotaxima en estos dos grupos de microorganismos. Todas estas cepas presentaron una elevada sensibilidad a la penicilina y a la cefotaxima. Todas las cepas de *Streptococcus* grupos C y G con resistencia a la eritromicina presentaron el fenoti-

TABLA 8
FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS,
LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS (MLS) Y MECANISMOS IMPLICADOS
EN LA RESISTENCIA EN 136 CEPAS CLÍNICAS DE *S. agalactiae*

Fenotipo de resistencia	Patrón de resistencia	CMI a Eritromicina (µg/ml)	nº de cepas	Genes detectados por PCR
Sensible	ERI ^S -SPI ^S -CLI ^S	0,032-0,38	11	<i>mre(A)</i>
Fenotipo M	ERI ^R -SPI ^S -CLI ^S	2	1	<i>mef(A)</i> + <i>mre(A)</i>
MLS _B constitutivo	ERI ^R -SPI ^R -CLI ^R	>256	10	<i>erm(B)</i> + <i>mre(A)</i>
		>256	1	<i>erm(A)</i> + <i>erm(B)</i> + <i>mre(A)</i>
		>256	1	<i>erm(A)</i> + <i>mre(A)</i>
		8	1	<i>erm(B)</i> + <i>mre(A)</i>
MLS _B inducible ^a	ERI ^R -SPI ^R -CLI ^R	>256	2	<i>erm(A)</i> + <i>mre(A)</i>
		>256	1	<i>erm(A)</i> + <i>erm(B)</i> + <i>mre(A)</i>
		4-16	3	<i>erm(A)</i> + <i>mre(A)</i>

^a La resistencia a espiramicina y clindamicina sólo se expresa previa inducción con eritromicina.

po de resistencia MLS_B (tanto de carácter inducible como constitutivo), y en ningún aislamiento se observó el fenotipo M (Tabla 9). En las 4 cepas resistentes a eritromicina se detectó el gen *erm*(TR) mediante PCR y posterior secuenciación del fragmento amplificado; según la nueva nomenclatura recientemente publicada (Roberts et al., 1999), el gen *erm*(TR) se engloba dentro del grupo *erm*(A). Las reacciones de PCR realizadas con los cebadores de PCR específicos de los genes *erm*(B), *erm*(C) y *mef*(A) fueron negativas (Tabla 9). Datos similares han sido obtenidos en otros grupos (Seral et al., 2000).

El estudio del origen clonal de las cepas con resistencia a eritromicina de *Streptococcus* β-hemolíticos de las diferentes especies mediante PFGE puso de manifiesto que existe una gran diversidad clonal entre las cepas resistentes y que, por tanto, éstas no proceden de la diseminación de un único clon.

TABLA 9
FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS,
LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS (MLS) Y MECANISMOS IMPLICADOS EN
LA RESISTENCIA EN 8 CEPAS CLÍNICAS DE *Streptococcus* β-HEMOLÍTICOS DEL
GRUPO C Y EN 28 CEPAS CLÍNICAS DE *Streptococcus* β-HEMOLÍTICOS GRUPO G

	Fenotipo de resistencia	Patrón de resistencia	CMI a eritromicina (µg/ml)	nº de cepas	Genes detectados por PCR
<i>Streptococcus</i> β-hemolíticos del grupo C	Sensible	ERI ^S -SPI ^S -CLI ^S	≤0,5	7	Sin genes de resistencia
	MLS _B inducible ^a	ERI ^R -SPI ^R -CLI ^R	>256	1	<i>erm</i> (A) ^b
<i>Streptococcus</i> β-hemolíticos del grupo G	Sensible	ERI ^S -SPI ^S -CLI ^S	≤0,38	25	Sin genes de resistencia
	MLS _B constitutivo	ERI ^R -SPI ^R -CLI ^R	>256	2	<i>erm</i> (A) ^b
	MLS _B inducible ^a	ERI ^R -SPI ^R -CLI ^R	>256	1	<i>erm</i> (A)

^a La resistencia a espiramicina y clindamicina sólo se expresa previa inducción con eritromicina.

^b *erm*(A): se obtiene una amplificación por PCR positiva con los cebadores específicos *erm*(A) y/o *erm*(TR).

3. CONCLUSIONES

1.- En nuestro medio se observa un elevado porcentaje de cepas clínicas de *Streptococcus* con resistencia a eritromicina (*S. pneumoniae*, 54%; *S. pyogenes*, 29%; *S. agalactiae*, 15%; *Streptococcus* grupo C y G: 10-12%).

2.- En las cepas de *Streptococcus* con resistencia a eritromicina, se observan diferencias importantes en los fenotipos de resistencia (fenotipo MLS_B o fenotipo M) y en los mecanismos de resistencia, en función de la especie de estreptococo de que se trate. En este sentido, el fenotipo M es muy frecuente en las cepas ERI^R de *S. pyogenes* y el fenotipo MLS_B en el resto de las especies de estreptococo estudiadas (*S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *Streptococcus* grupo C y G). El fenotipo y el

mecanismo de resistencia son muy importantes para establecer una pauta terapéutica, ya que el fenotipo MLS_B (genes *erm*) indica resistencia a todos los antibióticos MLS, mientras que el fenotipo M y el mecanismo de bomba de eflujo mediada por *mef(A)* indica sólo resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos, pero no al resto de los antibióticos MLS, como por ejemplo los macrólidos de 16 átomos. Esto tiene un gran interés en terapias empíricas.

3.- Es de interés estudiar la evolución de los mecanismos de resistencia en las diferentes especies en el tiempo, con objeto de poder determinar cambios en dichos mecanismos que pudiesen ser importantes en el establecimiento de terapias empíricas.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Arpin, C., Daube, H., Tessier, F., and Quentin, C., 1999. Presence of *mefA* and *mefE* genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (43), 944-946.
- Barry, A.L., Fuchs, P.C., and Brown, S.D., 1997. Macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolates from outpatients in the USA. *J. Antimicrob. Chemother.* (40), 139-140.
- Birren, B. and Lai, E., 1993. Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Bisno, A., 1995. *Streptococcus pyogenes*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone. 1786-1799.
- Blumberg, H.M., Stephens, D.S., Modansky, M., Erwin, M., Elliot, J., Facklam, R.R. et al., 1996. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J. Infect. Dis.* (173), 365-373.
- Cercenado, E., Sánchez Carrillo, C., García Rey, C., and Bouza, E., 1997. Erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*: high incidence of M phenotype among clinical isolates (abstract E-110). Presentado en 37th Annual Meeting of the ICAAC, American Society for Microbiology, Toronto, Canada.
- 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), 867-879.
- Clancy, J., Dib-Hajj, F., Petitpas, J.W., and Yuan, W., 1997. Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, *mreA*, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (41), 2719-2723.
- 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.* (13), 630-635.
- Cocuzza, C.E., Mattina, R., Mazariol, A. et al., 1997. 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. Res.* (3), 371-378.

- 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), S87-92.
- Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D. et al., 1998. Evolution of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antibiotic resistance in Spain. Update 1990-1996. *J. Clin. Microbiol.* (36), 3447-3458.
- Fernandez, 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), 1517-1519.
- 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.
- García de Lomas, J., y Grupo español para la vigilancia de patógenos respiratorios en España, 1998. Situación epidemiológica actual y resistencia de los patógenos respiratorios en España. *Med. Clin.* (110), 44-52.
- Granizo, J.J., Aguilar, L., Casal, J., García-Rey, C., del-Ré, R., and Baquero, F., 2000. *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.
- Harrison, L.H., Ali, A., Dwyer, D.M., Libonati, J.P., Reeves, M.W., Elliot, J.A. et al., 1995. Relapsing invasive group B streptococcal infection in adults. *Ann. Intern. Med.* (123), 421-427.
- 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.
- Kataja, J., Seppälä, H., Skurnik, M., Sarkkinen, H., and Huovinen, P., 1998. Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* (42), 1493-1494.
- 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), 48-52.
- 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). Arnette Blackwell, Paris. 125-141.
- Liñares, J., Pallarés, R., Alonso, T. et al., 1992. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain 1979-1990. *Clin. Infect. Dis.* (15), 99-105.
- Liñares, J., Tubau, F., and Dominguez, M.A., 2000. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Spain: an overview of the 1990s. *Streptococcus pneumoniae*. Ed. A. Tomasz. Mary Ann Liebert, New York, 399-407.
- Lin F. Y., Azimi, P. H., Weiswman, L. E. et al., 2000. Antibiotic susceptibility profiles for group B streptococci isolated from neonates. 1995-1998. *Clin. Infect. Dis.* (31), 76-79.
- 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. Quimioter.* (11-3), 196-204.

- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 9th informational supplement. M100-S9*. NCCLS, Wayne, PA.
- 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.
- Pearlman, M.D., Pierson, C.L., and Faix, R.G., 1998. Frequent resistance of clinical group B streptococci isolates to clindamycin and erythromycin. *Obstetrics and Gynecology*. (92), 258-261.
- Pérez-Trallero, E., Urbietta, M., Montes, M., Ayestaran, I., and Marimón, J.M., 1998. Emergence of *Streptococcus pyogenes* strains resistant to erythromycin in Gipuzkoa, Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (16), 25-31.
- Pérez-Trallero, E., Marimón, J.M., Montes, M., Orden, B., and de Pablos, M. 1999. Clonal differences among erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Emerg. Infect. Dis.* (5), 235-240.
- Portillo, A., Lantero, M., Gastañares, M.J., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C., 1999. Macrolide resistance phenotypes and mechanisms of resistance in *Streptococcus pyogenes* in La Rioja, Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents.* (13), 137-140.
- Portillo, A., Lantero, M., Olarte, I., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C., 2001. MLS phenotypes and mechanisms of resistance in beta-haemolytic group B, C and G *Streptococcus* isoaltes in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* (47), 113-114.
- Portillo, A., Lantero, M., Gastañares, M.J., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Olarte, I., and Torres, C., 2000. MLS phenotypes and mechanisms of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. In: "New considerations for macrolides, azalides, streptogramins, and ketolides"; ed. S.H. Zinner, L.S. Young, J.F. Acar, C. Ortiz-Neu. Marcel Dekker, New York.
- Report of de Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 1996. *Clinical Microbiology Infections* (2 Suppl. 1), S47-S48.
- 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), 2823-2830.
- Salata, R.A., Lerner, P.I., Shlaes, D.M., Gopalakrishna, K.V., and Wolinsky, L., 1989. Infections due to Lancefield group C streptococci. *Medicine*. (68), 225-239.
- 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.
- 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.
- Seral, C., González, V., Castillo, J., García, C., Rubio, M.C., Gómez-Lus, R., 2000. Study of macrolide-resistant genes in group C and G streptococci. *Rev Esp Quimioter.* (13-2), 171-5.
- Soriano, F., and Fernandez-Roblas, R., 1993. High rates of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among penicillin-resistant strains. *J. Antimicrob. Chemother.* (31), 440.

- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., and Wondrack, L., 1996a. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* (40), 2562-2566.
- 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), 1817-1824.
- 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):2251-5.
- Tait-Kamradt, A., Davies, T., Appelbaum, P.C., Depardieu, F., Courvalin, P., Petitpas, J., Wondrack, L., Walker, A., Jacobs, M.R., and Sutcliffe, J., 2000a. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* (44-12), 3395-3401.
- 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), 2118-2125.
- Vartian, C., Lerner, P.I., Shlaes, D.M., and Gopalakrishna, K.V., 1985. Infections due to Lancefield group G streptococci. *Medicine.* (64), 75-88.
- Wondrack, L., Masa, M., Yang, B. V., and Sutcliffe, J., 1996. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* (40), 992-998.