

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina
Preventiva, Salud Pública y
Microbiología Médica



Resistencia a Macrólidos en *estreptococos viridans*. Epidemiología y Estudio Molecular

Tesis Doctoral.

M^a Sagrario Hernández Iglesias

2008.

A Carlos y mis niñas

Quiero agradecer al Profesor Dr. D. José Ángel García Rodríguez, catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y Jefe de Departamento de Microbiología y Parasitología Médica del Hospital Universitario de Salamanca, la oportunidad de haberme dejado realizar este trabajo en su departamento, su apoyo y el poner a mi alcance los medios necesarios para llegar a su fin.

También quiero agradecer al Profesor Dr. D. Juan Luis Muñoz Bellido Director de esta tesis por su dirección, tiempo, dedicación, y paciencia a lo largo de su realización.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología Médica del Hospital Universitario de Salamanca, por haberme acogido a lo largo de este tiempo.

A mi familia por su apoyo y paciencia incondicional.

A la Junta de Castilla Y León por la beca concedida de Formación de Personal Investigador, disfrutada en el periodo julio de 2005 a noviembre de 2006.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SA003A06 de la Junta de Castilla y León.

ÍNDICE

	página
I. REVISIÓN.	1
1. Macrólidos.	3
1.1. Estructura y clasificación.	4
1.2. Farmacocinética.	9
1.3. Mecanismo de acción.	13
1.4. Actividad antimicrobiana.	16
1.5. Espectro antimicrobiano.	17
1.6. Otras actividades de macrólidos.	23
1.7. Mecanismos de resistencia.	27
1.7.1. Inactivación enzimática.	28
1.7.2. Alteración del lugar de unión del ribosoma.	29
1.7.3. Bombas de expulsión.	34
1.7.4. Otros.	35
2. <i>Streptococcus viridans</i> .	37
2.1. Habitat.	40
2.2. Patogenicidad.	41
2.3. Manifestaciones clínicas.	43
2.3.1. Endocarditis.	43
2.3.2. Bacteriemia.	47
2.3.3. Meningitis.	49
2.3.4. Neumonía.	51
2.3.5. Otras infecciones.	52
2.4. Grupo mitis.	52

2.5. Grupo mutans.	55
2.6. Grupo salivarius.	55
2.7. Grupo anginosus.	58
2.7.1. Habitat.	63
2.7.2. Patogenicidad.	63
2.7.3. Manifestaciones clínicas.	67
2.7.3.1. Infecciones de cabeza y cuello.	67
2.7.3.2. Bacteriemia y endocarditis.	68
2.7.3.3. Infecciones del SNC.	68
2.7.3.4. Infecciones abdominales.	70
2.7.3.5. Infecciones torácicas.	71
2.7.3.6. Otras Infecciones.	71
3. Resistencia de Streptococos <i>viridans</i> a macrólidos.	72
4. Elementos genéticos.	80
II. MATERIALY MÉTODOS.	89
1. Microorganismo.	91
2. Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos.	91
2. 1. Determinación de sensibilidad mediante Etest®.	92
2. 2. Dilución en agar.	92
2. 3. Disco-placa.	94
2. 3. 1. Estudio de sensibilidad a clindamicina.	94
2. 3. 2. Detección del fenotipo de resistencia.	95
3. Extracción del ADN.	97

3. 1. Cuantificación del ADN.	99
4. Detección de genes de resistencia por amplif. de ADN.	100
4. 1. Amplificación	100
4. 2. Detección del amplificado.	102
4. 3. Purificación del amplificado.	103
4. 4. Secuenciación de los productos de PCR.	104
4. 5. Análisis de las secuencias de ADN.	106
5. Búsqueda del entorno genético.	106
6. Transformación genética.	111
7. RAPD.	112
8. Crecimiento a concentraciones subinibitorias.	114
9. Anexo	117
III. RESULTADOS.	123
IV. DISCUSION.	143
V. CONCLUSIONES.	157
VI. BIBLIOGRAFÍA.	163

I. REVISIÓN

1. MACRÓLIDOS

Gardner y Chain describen el primer antibiótico de este grupo, la picromicina en 1942¹. Diez años después (1952), en Filipinas, McGuier y cols. obtienen la eritromicina a partir de un cultivo de *Streptomyces erythreus* procedente de una muestra de suelo². La eritromicina se convertirá en el antibiótico tipo del grupo. A partir de este año y a lo largo de dos décadas se aislaron antibióticos estructuralmente análogos: en 1952 la espiramicina, de *Streptomyces ambofaciens*, en 1953 la kitasamicina o leucomicina en Japón, en 1956 la oleandomicina de *Streptomyces antibioticus*, la carbomicina en 1960, la josamicina en 1967 de *Streptomyces narbonensis* variedad *josamycecus*, en 1971 la rosamicina y midekamicina (de *Streptomyces mycarofaciens*) y en 1974 la miokamicina derivado acetilado de la anterior³.

Con el fin de mejorar su farmacocinética y fundamentalmente su mala disponibilidad oral, a finales de los años 70 se intentó modificar la estructura natural de estos antibióticos, con lo que aparecen los primeros derivados semisintéticos: la rokitamicina en 1979, en 1981 la roxitromicina y claritromicina, en 1982 la azitromicina y en 1989 la diritromicina⁴. Actualmente este grupo sigue en continuo desarrollo. El último antimicrobiano de este grupo comercializado fue la telitromicina, que es el representante de un nuevo grupo los cetólidos, por la comunidad europea el 9 de julio del 2001⁵. Posteriormente se han visto problemas siendo la última

notificación de la agencia española de medicamentos y productos sanitarios del 30 de marzo del 2007 donde comunican efectos adversos alguno de ellos graves. Entre ellos están empeoramiento de la miastemia gravis (pudiendo amenazar la vida del paciente) quedando contraindicado en pacientes diagnosticados de esta, pérdida transitoria de la conciencia y alteraciones temporales de la visión, raramente se han notificado problemas hepáticos severos⁶. No obstante se siguen investigando otras molécula como los nuevos cetólidos S-013420 (EDP-420, EP-013420)⁷, con buena actividad *in vitro* y pendientes de efectos adversos.

1. 1. Estructura y clasificación

Presentan una estructura de éster cíclico (lactona) formando un anillo con un elevado número de eslabones, generalmente entre 14 y 16, aunque en algunos casos alcanza hasta 22, como en la virginiamicina, hoy en desuso. El termino macrólido proviene de la fusión de los términos **macroanillo** y **lactónido** (derivado de lactona), “macrolactónido”, que conduce a **macrólido**. En sentido estricto serian macrólidos algunos antiparasitarios como la ivermectina y antifúngicos como los polienos. No obstante el término se reserva habitualmente para nombrar a la familia de antibióticos formada por 14 - 16 átomos de carbono más azúcares.

Además del anillo, contienen al menos dos restos de azúcares unidos mediante enlaces glucosídicos. Uno de ellos es la desosamina (dimetilaminoazúcar) presente en todos los macrólidos, el otro es la cladinosa (azúcar neutro) que se encuentra parcialmente sustituida en las macrólidos de 16 eslabones. En los macrólidos de 14 y 15 átomos, estos azúcares se sitúan en posición 5 y 3 respectivamente, mientras en los de 16 se sitúan en posición 5. La evolución de los macrólidos y las diferencias entre los disponibles se basa más en la farmacocinética que en el espectro antibacteriano. A partir de la molécula de eritromicina se ha buscado aumentar la biodisponibilidad oral, aumentar la permanencia en el organismo y reducir la incidencia de efectos adversos, principalmente digestivos, que sin ser graves son suficientemente molestos para condicionar en ocasiones el abandono del tratamiento por los pacientes.

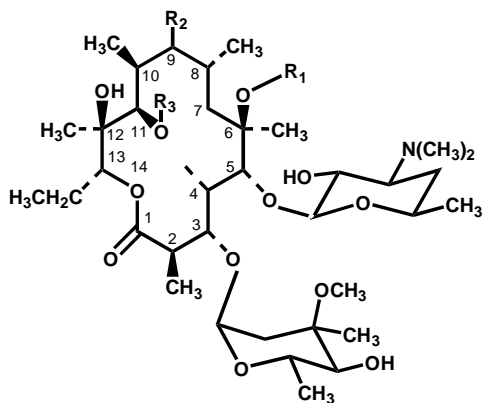
En la molécula de eritromicina hay dos grupos hidroxilo, en el C₆ y C₁₂, que en un medio ácido como es el estómago, sufren un proceso de acetalización al reaccionar con el átomo de C del grupo carbonílico en C₉. Estos determinan la degradación prematura de la eritromicina, que deriva en pérdida de actividad antimicrobiana, por la formación de derivados acetálicos sin actividad antimicrobiana y que ejercen además efecto agonista sobre los receptores de la motilina, originando parte de los efectos

adversos. Otros efectos adversos se deben a efectos locales inespecíficos sobre la flora intestinal.

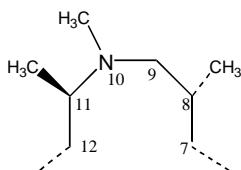
La síntesis de los derivados se ha dirigido sobre todo a modificar o sustituir estos radicales introduciendo diferentes alternativas:

En claritromicina se introduce un grupo metilo (CH₃) sobre el hidroxilo en C₆ y en roxitromicina el grupo carbonílico (CO) en C₉ de la eritromicina es sustituido por una oxima N-sustituída. En diritromicina se une el hidroxilo en C₁₂ con el grupo carbonílico en C₉ formando un sistema anular. Estas sustituciones les confieren resistencia en medio ácido y como consecuencia mejor biodisponibilidad oral.

Anillo de 14 eslabones



* La azitromicina presenta un anillo de 15 átomos

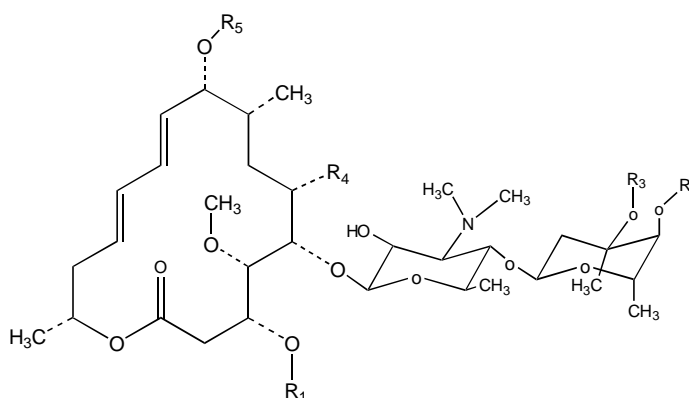


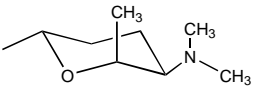
ANTIBIÓTICO	R1	R2	R3
Eritromicina	-H	=O	H-
Claritromicina	-CH ₃	=O	H-
Azitromicina	-H	*	H-
Diritromicina	-H		
Roxitromicina	-H		H-

En la azitromicina, se expande el anillo lactónido a 15 miembros, sustituyendo el grupo carbonílico en C₉ por un puente de metilnamina. Surge así una estructura nueva con un anillo de 15 átomos conocido como azólido, que además de mejorar las propiedades farmacocinéticas amplía el espectro antibacteriano⁸.

Dentro de los macrólidos con anillo de 16 átomos tenemos rosaramicina, que tiene sólo un aminoazúcar situado en posición 5, la josamicina, midekamicina y rokitamicina que tienen el azúcar neutro en posición 4' del aminoazúcar y espiramicina, que además de los 2 azúcares anteriores tienen otro aminoazúcar en posición 9³.

Anillo de 16 eslabones



ANTIBIÓTICO	R1	R2	R3	R4	R5
Josamicina	-COCH ₃	-COCH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	-CHO	-H
Midekamicina	-COCH ₂ CH ₃	-COCH ₂ CH ₃	-COCH ₃	-CH ₂ CHO	-COCH ₃
Espiramicina	-H	-H	-H	-CH ₂ CHO	

La sustitución del azúcar neutro (cladinosa) en posición 3 de los macrólidos con anillo de 14 átomos por un grupo cetónico, da lugar a una nueva familia de antimicrobianos denominados cetólidos. Telitromicina es el único actualmente comercializado aunque los problemas de toxicidad surgidos han hecho que su uso se reduzca muy significativamente. Posee un radical carbamato en posiciones C₁₁ y C₁₂, que explica en parte el aumento de actividad antimicrobiana respecto a macrólidos¹⁰.

Como se puede deducir de lo anterior los macrólidos se clasifican fundamentalmente por el tamaño de su anillo, pero además de esto se clasifican según su origen sea natural o semisintético:

- Anillo de 12 átomos:

- Origen natural: metimicina y neometimicina.

- Anillo de 14 átomos:

- Origen natural: eritromicina y oleandomicina.
- Semisintéticos: claritromicina, roxitromicina, diritromicina, fluritromicina.

-Anillo de 15 átomos o azalidos: azitromicina (semisintética).

-Anillo de 16 átomos:

- Origen natural: josamicina, midekamicina, espiramicina, kitasamicina.
- Semisintéticos: rokitamicina, miokamicina.

-Cetólidos: telitromicina.

1. 2. Farmacocinética

La eritromicina base es una base débil (pK 8.8) poco soluble en agua y de sabor amargo, en medios ácidos como el estómago es inestable, sufriendo un proceso de acetalización como se explicó anteriormente. Este determina la degradación prematura de la eritromicina, lo que deriva en pérdida de actividad antimicrobiana. Por ello la administración oral de este fármaco se hace, bien en formas farmacéuticas con envoltura resistente al medio ácido o bien administrarlo en forma de ésteres (etilsuccinato, estearato, estolato, propionato...). La eritromicina alcanza una biodisponibilidad oral de 35-75% dependiendo del derivado. Los alimentos van a interferir en su absorción retrasándola, salvo en la forma de sal de estolato. Además, en forma de estolato se absorbe mejor y la cantidad de eritromicina base liberada al hidrolizarse es superior al de otras formulaciones. Se puede administrar por vía intravenosa en forma de sal hidrosoluble de eritromicina lactobionato o gluceptato, teniendo la precaución de no mezclarla con otros fármacos en el mismo frasco de perfusión para que no se inactive por cambios de pH. La vía intramuscular no se utiliza por ser dolorosa.

Los derivados semisintéticos tienen mejores valores de absorción debido a su mejor resistencia al medio ácido¹¹. Claritromicina alcanza una biodisponibilidad del 55%, a pesar de que absorbe mejor que eritromicina, debido a efectos de primer paso. La administración con comidas puede llegar a aumentar la biodisponibilidad en un 25%¹². La biodisponibilidad oral de roxitromicina es del 80%, mientras que la de diritromicina es del 37%. La biodisponibilidad oral de la azitromicina es baja (40%), disminuyendo si se toma con comidas o con preparados que contengan magnesio, al retrasar significativamente la absorción. Los derivados acetilados de espiramicina (acetil-espiramicina) probablemente tengan mejor biodisponibilidad, al ser más estables en medio ácido.

Los alimentos interfieren como hemos visto en la absorción de eritromicina (salvo la sal de estolato), roxitromicina, josamicina y azitromicina, pero no interfieren con miokamicina o espiramicina. Con claritromicina y diritromicina aumentan su biodisponibilidad¹³. Todos los macrólidos excepto la azitromicina se metabolizan en el hígado y sufren efecto de primer paso que puede llegar a disminuir de manera significativa la biodisponibilidad. El pico sérico y la vida media se incrementan si se administran dosis altas o repetidas, parece ser que por la saturación del metabolismo hepático (excepto azitromicina).

Por su carácter lipofílico, se distribuyen bien en casi todos los tejidos, alcanzando concentraciones terapéuticas en casi todos. Pasan a saliva, a las secreciones bronquiales y a la leche materna, donde alcanza concentraciones mayores al 50% de la sérica. La concentración biliar es también superior a la sérica. Difunden mal al SNC, alcanzando concentraciones en el LCR inferiores al 10% de la sérica¹⁴. El porcentaje que atraviesa la placenta es muy pequeño, aunque sólo hay estudios con eritromicina y roxitromicina, y alcanza concentraciones séricas fetales bajas, y moderadas en el cordón umbilical y tejidos fetales^{15 16}.

Difunden al citoplasma celular, especialmente de las células del sistema fagocítico, alcanzando concentraciones superiores a las séricas. La acumulación en los fagolisosomas se debe al carácter ácido de estos, donde el macrólido se ioniza (protonización), quedando atrapado, ya que la forma ionizada no difunde a través de la membrana lipídica. La azitromicina presenta una concentración intracelular especialmente elevada y persistente, debido a que posee dos grupos ácidos en lugar de uno como otros macrólidos. Además mantiene concentraciones intracelulares elevadas durante más de una semana después de la última dosis, mientras la concentración sérica se hace indetectable. En cambio que con otros macrólidos estas concentraciones van relacionadas. Puede alcanzar en tejidos concentraciones de 10 a 100 veces más altas que en suero¹⁷.

La unión a proteínas plasmáticas es de un 65-90% para eritromicina, aproximadamente un 50% para miokamicina, troleandomicina, espiramicina y azitromicina, mientras que josamicina y diritromicina se unen 15% y un 19% respectivamente. Esta unión se realiza prioritariamente sobre la α -1-glicoproteína ácida¹⁸.

La semivida de eritromicina, josamicina, miocamicina y midekamicina es de dos horas. Espiramicina y troleandomicina presentan semividas de dos a cuatro horas, claritromicina de 5 horas y roxitromicina y azitromicina presentan semividas de aproximadamente 12 horas¹³.

TABLA I: Parámetros farmacocinéticos de los macrólidos^{19 20}

Macrólidos	Biodisponibilidad %	T1/2 (h)	Unión a proteínas % ³	Pico sérico (mg/L)
Eritromicina	35-75 ¹	2	65-90	1.5 con 500 mg oral ¹ 3-4 con 500 mg IV
Roxitromicina	80	12	95	7.8 con 150 mg VO
Claritromicina	55	5	65	3-4 con 500 mg VO 5.5 con 500 mg VO
Azitromicina	37	12 ²	50	0.4 con 500 mg VO
Josamicina	-	1-2	15	0.7 con 55 mg VO
Espiramicina	-	4	30	1.5 con 1g VO
Miocamicina	-	1-2	45	1.3-3 con 600 mg VO

¹ Depende del derivado

²La vida media en tejidos es superior a 2 días

³Unión a la α -1-glicoproteína

Excepto la azitromicina todos se metabolizan en el hígado (80% de espiramicina, 50% de eritromicina, etc.). Los macrólidos de 14 átomos y telitromicina emplean la vía metabólica del sistema

enzimático del citocromo P-450; sufren procesos de desmetilación dando metabolitos que forman complejos con el citocromo P-450 inhibiendo su actividad en mayor o menor grado. Los macrólidos de 16 átomos no se desmetilan, pero sufren procesos de biotransformación dando frecuentemente metabolitos activos. La azitromicina se excreta en bilis sin apenas metabolizarse y menos del 5% se excreta por orina. Se excretan mayoritariamente a través de la bilis y heces. La tasa de excreción por orina es baja siendo entre un 3 y 15 % para eritromicina y un 7% para roxitromicina. El 40% de claritromicina se excreta por orina, el 60% en forma de producto activo. El resto lo hace vía biliar.

No es necesario modificar la dosis de eritromicina en caso de insuficiencia renal o hepática pero se evitaran dosis elevadas. Con claritromicina, en caso de insuficiencia hepática, si la función renal en normal no hay que modificar las dosis, pero deben reducirse con valores de aclaramiento de creatinina inferiores a 30 mL/minuto. Con roxitromicina en caso de insuficiencia hepática o aclaramiento de creatinina inferior a 15mL/min debe reducirse la dosis. Con Azitromicina no sería necesario modificar la dosis en caso de insuficiencia hepática o renal. Se reducirán las dosis en caso de insuficiencia hepática con josamicina.

La hemodiálisis o la diálisis peritoneal los eliminan escasamente del organismo⁹.

1. 3. Mecanismo de acción

Aunque se conoce lo fundamental del mecanismo de acción de los macrólidos, sobre todo a partir de estudios sobre la actividad de eritromicina, los detalles de este mecanismo están todavía en buena parte por dilucidar.

Su acción se debe a la inhibición de la síntesis proteica. Esta inhibición se produce como consecuencia de la unión reversible entre el macrólido y el dominio V del ARN ribosómico 23S, un componente de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, y más en concreto a las proteínas L4 y L22²¹. La unión se realiza mediante puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido (especialmente entre el OH en posición 2' del azúcar desosamina) y bases del ARNr (A2058, A2059 y A2062 en algunos casos, referidas a *E. coli*). Además, es posible que se produzca también una interacción débil entre la cladinosa y el dominio II del ARNr 23S⁹.

Esta unión parece originar consecuencias complejas en el ribosoma: como consecuencia de la acción inhibitoria del macrólido sobre diferentes enzimas implicadas en el proceso de síntesis proteica (peptidil transferasas, peptidil-tRNA hidrolasas), se produce un acúmulo de complejos peptidil-tRNA, lo que origina a su vez una depleción de tRNA libre. Además, se produce una inhibición al menos transitoria de la transpeptidación²². Por otra parte, se produce un bloqueo de la reacción de translocación, por

la colisión del péptido nasiente con la pared del ribosoma, o quizá incluso con la propia molécula del macrólido, que dificulta su liberación.

En todo caso, lo que parece claro es que el macrólido modifica de forma trascendente la interacción entre el peptidil-tRNA y el punto de acción de la peptidil-transferasa encargada de incorporar el aminoácido a la cadena en formación, aunque probablemente la importancia de los diferentes mecanismos citados sea distinta según el tipo de macrólido²¹.

Una hipótesis que se considera probable es la que postula que el macrólido se uniría a las proteínas L4 y L22, en las proximidades del canal de salida del péptido nasiente, originando una desestabilización del complejo peptidil-tRNA durante la traslocación, e induciendo la disociación prematura del complejo peptidil-tRNA de los ribosomas durante la fase de elongación de la síntesis proteica. Ello da lugar a la formación de péptidos cortos, que oscilan entre 2-4 aminoácidos en el caso de macrólidos de 16 átomos, y 9-12 aminoácidos en el caso de los cetólidos. El tamaño del péptido parece estar en relación con el grado de obstrucción que unas y otras moléculas producen en el canal de salida del péptido nasiente.

Existe otro factor adicional, que la repercusión de los macrólidos sobre el propio proceso de síntesis de nuevos ribosomas. En presencia de eritromicina, la síntesis ribosómica se produce a través

de vías atípicas que generan precursores de las subunidades 50S con más de un punto de unión para macrólidos. La unión de los macrólidos también a esta segunda diana inhibe la finalización de la síntesis de la subunidad, y finalmente el precursor es hidrolizado por RNAasas, lo que implica una síntesis ineficaz y una depleción de ribosomas funcionalmente útiles. Se ha demostrado que, en presencia de macrólidos, la síntesis de ribosomas se reduce en un 40% en diversos Gram positivos. No obstante, como en casos anteriores, es un mecanismo con una importancia bastante variable de unos grupos de macrólidos a otros. Así, en macrólidos de 16 átomos, la reducción en la síntesis ribosómica es mucho menor que en el caso de macrólidos de 14 ó 15 átomos²¹.

En el caso de telitromicina, la unión con el dominio II del ARNr 23S es más fuerte, produciéndose a través del radical carbamato de C11-C12 y la adenina 752 (referido a *E. coli*). Además la telitromicina tiene una afinidad 10 veces mayor por el ribosoma que la eritromicina²³.

El lugar de unión en algunas bacterias es común con lincosamidas, cloranfenicol y estreptograminas, por lo que la asociación de estos antimicrobianos suele ser antagónica.

1. 4. Actividad Antimicrobiana

Son considerados principalmente bacteriostáticos frente a la mayoría de los microorganismos, pero pueden llegar a

comportarse como bactericidas dependiendo del tiempo de exposición, de la concentración del antibiótico y/o frente a determinados microorganismos como *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* en fase de crecimiento logarítmico²⁴, posiblemente por la activación de autolisinas o por la toxicidad producida por acumulación de moléculas de aminoacil-RNA. El pH alcalino favorece que la forma no ionizada difunda mejor a través de la membrana citoplasmática, dando como resultado concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) relativamente inferiores²⁵.

Tienen efecto postantibiótico (EPA), y son tiempo-dependiente excepto azitromicina, que se considera dosis-dependiente, siendo el área bajo la curva por encima de la CMI durante 24 horas el parámetro que mejor se correlaciona con su efecto.

La telitromicina es dosis-dependiente excepto frente a *S. pyogenes*, que se considera tiempo-dependiente, tiene un efecto posantibiótico mayor que los macrólidos y es bactericida frente a *S. pneumoniae*²⁶.

1. 5. Espectro antimicrobiano

Los macrólidos tienen un espectro de acción amplio, resultando más eficaces frente a bacterias grampositivas. Son activos de forma general frente a:

- 1- Microorganismos grampositivos, incluidos cocos (excepto estafilococos resistentes a meticilina y *Enterococcus sp.*) y bacilos (*Listeria*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Rodococcus equii*, *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Lactobacillus spp...*)
- 2- Microorganismos gramnegativos como *Neisseria sp*, *Moraxella sp.*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus ducreyi*, *Campylobacter jejuni*, *Gardnerella vaginalis*. Los bacilos gramnegativos, incluidos algunos anaerobios como *Bacteroides sp.* y *Fusobacterium sp.*, son resistentes, ya que la pared bacteriana impide la penetración del antibiótico. Otros como *Porphyromonas*, *Prevotella* y las formas L de *Proteus mirabilis* son sensibles.
- 3- Microorganismos de crecimiento intracelular: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia sp.*, *Legionella sp.*, *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*.
- 4- Moderadamente frente a algunos protozoos como *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* y *Plasmodium*.

Eritromicina es muy potente frente a estreptococos del grupo A y *Streptococcus pneumoniae*, aunque el porcentaje de cepas resistentes es alto. En España el 25% de streptococos del grupo A son resistentes a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, siendo la mayoría de estas sensibles a los de 16 átomos²⁷. La resistencia de

Streptococcus pneumoniae frente a macrólidos esta en torno al 30%²⁸. Tradicionalmente los streptococos del grupo *viridans* se consideran sensibles a eritromicina, pero la resistencia también ha ido aumentando, siendo en Canadá del 42% y en Taiwán del 53% de aislados de sangre²⁹. La eritromicina tiene actividad frente a estafilococos sensibles a meticilina, pero existe un alto riesgo de aparición de resistencia a lo largo del tratamiento.

La claritromicina tiene una actividad de 2 a 4 veces mayor que eritromicina frente a la mayoría de streptococos (incluyendo *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*) y estafilococos sensibles a meticilina, mientras que azitromicina es de 2 a 4 veces menos activo que eritromicina frente a estos microorganismos^{30,31}. Presentan resistencia cruzada y todos los estreptococos y estafilococos resistentes a eritromicina lo son también a claritromicina y azitromicina.

La mayoría de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Corynebacterium diphtheriae* se muestran sensibles a eritromicina³², mientras la mayoría de cepas de *Clostridium perfringens* solo muestran una sensibilidad moderada³³.

Eritromicina muestra una excelente actividad frente a *B. pertussis*, siendo de elección para su tratamiento. Aunque las resistencias son raras, la primera se describió en 1994 en Arizona³⁴. La actividad es moderada frente a *Neisseria meningitidis*³⁵ y *Neisseria gonorrhoeae*

y pobre frente a *Haemophilus influenzae*, siendo buena frente a *Haemophilus ducrey*. *Campylobacter jejuni* presenta buena sensibilidad con sólo un 1% de resistencias en el año 2000³⁶. La actividad de claritromicina frente a gram-negativos es similar a la de eritromicina. Existe un metabolito activo de ésta, la 14-hidroxi-claritromicina que es más activa que el producto original frente a *H. influenzae* y *M. catarrhalis*³⁷. Azitromicina es varias veces más activa que eritromicina y claritromicina frente a gram-negativos, especialmente frente a *H. influenzae* y *M. catarrhalis*³⁸ pero también frente a *Neisseria sp.*, *Brucella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Pasteurella sp.*, *Eikenella* y alguna enterobacterias, aunque esta mayor actividad frente a enterobacterias tiene escasa trascendencia clínica. Sí parece tener interés el hecho de que incubaciones prolongadas de *Pseudomonas aeruginosa* con macrólidos a concentraciones clínicas se asocia con un descenso de la viabilidad y una disminución de la síntesis de proteínas y de exopolisacáridos³⁹. Este efecto sobre la síntesis de exopolisacáridos se ha demostrado también en algunos Gram positivos, en los que la adición de eritromicina, incluso en el caso de cepas resistentes a macrólidos, mejora mucho el comportamiento de otros antimicrobianos (glicopéptidos, oxazolidinonas) frente a cepas productoras de *slime*.

Muestran poca actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*⁴⁰, aunque claritromicina y azitromicina presentan una actividad

apreciable frente a *Mycobacterium avium complex* siendo la actividad de claritromicina cuatro veces superior a la de la azitromicina *in vitro*⁴¹. Siendo claritromicina también la más activa frente a *Mycobacterium chelonae*, *M. kansasii* y *M. leprae*. Roxitromicina inhibe muchas cepas de *M. tuberculosis* a concentraciones de 4 mg/l⁹.

Claritromicina es la más activa frente a *Helicobacter pylori*.

Eritromicina es también activa y tiene gran utilidad clínica frente a organismos de crecimiento intracelulares o yuxtacelular como *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum* y algunas cepas de *Rickettsia*, *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydophila pneumoniae*. Claritromicina y azitromicina tienen actividad similar a eritromicina frente a *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* y *Chlamydophila pneumoniae*⁴², una actividad significativamente mayor que eritromicina frente a *C. trachomatis* y *U. urealyticum*^{43 44}, y relativamente mayor sobre *B. burgdorferi*^{45 31}, aunque clínicamente estas diferencias no tienen demasiada trascendencia.

Roxitromicina tiene una actividad similar o algo inferior a la de eritromicina, y es al menos tan activa como espiramicina frente a *Toxoplasma*.

Espiramicina tiene una actividad frente a protozoos como *Toxoplasma* y *Cryptosporidium*, y presenta una actividad antibacteriana inferior a la de la eritromicina.

Josamicina y miokamicina son algo más activas que eritromicina frente a *M. hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, y de 2 a 4 veces menos activas frente a cocos gram-positivos. A pesar de tener los macrólidos de 16 átomos de carbono una actividad inferior frente a cocos gram-positivos, hay que tener en cuenta que la resistencia a eritromicina en algunos cocos gram-positivos es debida en un porcentaje considerable, a una bomba de expulsión que no afecta a los macrólidos de 16 átomos.

Telitromicina (cetólido) presenta una actividad *in vitro* de 2 a 8 veces superior a eritromicina frente a microorganismos gram-positivos⁴⁶. Frente a cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina presenta actividad, pese a tener una CMI elevada comparadas con cepas sensibles a eritromicina y tiene buena actividad frente a *S. pyogenes* resistentes a eritromicina con fenotipo M ó MLS_B inducible, siendo reducida frente a fenotipos MLS_B constitutivos. Telitromicina tiene buena actividad frente a *S. aureus* sensibles a eritromicina o con resistencia inducible, incluidas la mayoría de cepas sensibles a meticilina, pero muestran escasa actividad con la cepas con resistencia constitutiva a eritromicina. Los cetolidos son más potentes que eritromicina frente a *Enterococcus faecalis* pero muy poco activos frente a *E. faecium*. Al igual que los macrólidos, no tiene actividad frente a enterobacterias, que son intrínsecamente resistentes, ni frente a *B. fragilis* y *Fusobacterium sp.* Presentan una actividad similar a la de

azitromicina frente a *H. influenzae*, y una buena actividad contra *M. catarrhalis* y *B. pertussis*. Son menos potentes que claritromicina frente a *M. avium*. Presentan actividad similar a los macrólidos frente a *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* y *M. pneumoniae*.

Los Macrólidos son el tratamiento de elección en distintas infecciones como:

- Neumonías de la comunidad.
- Neumonías u otras infecciones causadas por *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia sp.* y *Legionella pneumophila*. (en formas graves de legionelosis están considerados de 1ª elección junto con las fluoroquinolonas).
- Tos ferina.
- Difteria
- Enteritis causada por *Campylobacter sp.*
- En combinación con otros antiinfecciosos frente a:
 - *Mycobacterium avium complex* y otras micobacterias.
 - *Helicobacter pylori*.
- Como tratamiento alternativo a los β -lactámicos en casos de alergias.

1. 9. Otras actividades de macrólidos

- Efecto estimulante en la motilidad gastrointestinal.

Eritromicina actúa como agonista en los receptores de

motilidad en el intestino y la vesícula biliar. Estos efectos han sido estudiados en el tratamiento de la gastroparesia diabética, gastroparesia postvagotomía, en gastroparesia en pacientes que reciben ventilación mecánica y en dismotilidad infantil⁴⁷. Otros macrólidos como la claritromicina tienen efectos similares, pero se requiere más dosis para obtener los mismos resultados.

- Efecto antiinflamatorio: este efecto está aparentemente limitado a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono. Se han descrito varios mecanismos de acción como:
 - Inhibición de la liberación de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias. Entre las citoquinas que suprimen están⁴⁸:
 - IL-1b y TNF alfa en monocitos.
 - IL-1b, IL-6, TNF alfa y GM-CSF en células cebadas.
 - IL-8, ENA-78 (atractante de neutrófilos derivado de células epiteliales) y MIP-1 (proteína inhibitoria de macrófagos) en macrófagos y leucocitos.
 - IL-4 e IL-5 de forma dosis dependiente por roxitromicina.

Estos efectos se consiguen en tratamientos prolongados con dosis bajas de macrólidos.

- Reducción de la expresión de moléculas de adhesión. La activación de moléculas de adhesión en los

polimorfonucleares y células endoteliales vasculares favorece la entrada de neutrófilos u otras células inflamatorias del torrente sanguíneo a la vía aérea. La disminución de estas moléculas contribuye a atenuar las células inflamatorias en el órgano diana⁴⁸

- Inhiben la producción de elastasa y la producción de aniones superóxido en los neutrófilos que dañan el epitelio y reclutan más polimorfonucleares. Aceleran la apoptosis de los polimorfonucleares al incrementar el AMPc en ellos y promueve su fagocitosis por los macrófagos^{49 50}.
- Efectos en óxido nítrico: El óxido nítrico es generado por la sintetasa del óxido nítrico de la que existen dos isoformas: la constitutiva (c-NOS) y la inducible (i-NOS). La constitutiva se localiza en las células endoteliales vasculares, células nerviosas y en las células epiteliales de la vía aérea. El NO interviene en la regulación del tono muscular de la vía aérea y tono vascular, en la señalización-comunicación neural y en la defensa del huésped. Pero las células inflamatorias también pueden producir óxido nítrico que puede favorecer mayor inflamación y daño epitelial. La eritromicina incrementa la liberación de óxido nítrico mediada por c-NOS de las células endoteliales, y suprime *in vitro* la producción de NO mediada por i-NOS ⁴⁷.

- Los macrólidos reducen la producción de endotelina I, potente vasoconstrictor y broncoconstrictor⁵¹.
- Disminución de la hipersecreción de moco. Los macrólidos pueden disminuir tanto la secreción de moco causada por infección bacteriana como por inflamación alérgica. En pacientes con fibrosis quística disminuyen hasta un 80% la viscosidad del moco (parece estar relacionada con la disminución en la producción de alginato)⁵².
- Modulación de la virulencia bacteriana
 - Adherencia bacteriana. La adherencia de las bacterias a la mucosa es decisivo en el inicio de la mayoría de infecciones bacterianas. En presencia de eritromicina *Pseudomonas aeruginosa* con pili disminuye su adherencia al epitelio traqueal⁵³. En individuos con fibrosis quística donde la adherencia a células epiteliales bucales de *Pseudomonas aeruginosa* está aumentada, la administración de azitromicina llega a disminuirla esta adherencia hasta niveles normales⁴⁸.
 - Interfieren en la síntesis de alginato en cepas de *P. aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* mucoide produce alginato en forma de biopelícula, a través de deshidrogenada de guanosina-difosfo-d-manosa, que hace difícil su erradicación. Esta película protege relativamente a las bacterias del efecto antibiótico y se

comporta como un antígeno e induce una reacción antígeno anticuerpo en la superficie de la vía aérea, lo que desencadena una reacción inmune y daño tisular secundario. Los macrólidos disminuyen los complejos inmune séricos (claritromicina), y pueden reducir la formación de biopelículas inhibiendo el ciclo de producción de la deshidrogenada de guanosina-difosfo-d-manosa⁴⁸.

- Efecto en los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. La eritromicina a concentraciones subinhibitorias es capaz de suprimir las lectinas de *Pseudomonas aeruginosa*, la actividad hemaglutinante en la superficie celular, las proteasas extracelulares y la actividad hemolítica, así como la actividad de autoinducción. También suprimen la síntesis de una proteína mayor de estrés Gro-EL⁴⁸.
- Pueden potenciar la acción de antimicrobianos activos frente a G+ (glicopéptidos, linezolid) frente a estafilococos productores de *slime*, incluyendo cepas resistentes a macrólidos.

1. 7. Mecanismos de resistencia

Se han identificado tres grupos principales de mecanismos de resistencia adquirida a los macrólidos:

- Por inactivación enzimática.
- Por alteración del lugar de unión del ribosoma, que puede deberse a un cambio en la proteína diana o a la metilación de un residuo de adenina en el ARN ribosómico.
- Por bombas de expulsión.

1.7.1. Inactivación enzimática

Se ha descrito la inactivación enzimática de macrólidos mediada por fosfotransferasas y glicosiltransferasas que fosforilan o glicosilan respectivamente el grupo 2-OH de la D-desosamina, y por esterasas que hidrolizan el macrociclo lactona.

En cepas de *E. coli*, *Streptomyces coelicolor*, *S. aureus*, y *Nocardia spp* se ha descrito la inactivación enzimática de macrólidos de 14, 15 y 16 átomos por fosfotransferasas debido a la fosforilación del grupo 2'-OH de la D-desosamina. Se conocen 3 tipos, el primero MPH-2' fue descrito en Japón, mientras MPH-2'I y MPH-2'II han sido descritos en Europa. Son codificadas por los genes *mph(A)*, *mph(B)*, y *mph(C)* respectivamente²¹.

La 2'-OH glicosiltransferasa es codificada por el gen *mgt*. La inactivación por esta enzima es selectiva para macrólidos de 16 átomos de carbono con D-micaminosa como aminoazúcar. Esta enzima usa como cofactor UDP glucosa ó UDP galactosa. Ha sido descrita en *Streptomyces lividans* y *S. vendargensis*⁵⁴.

Actualmente hay descritas 3 esterasas. Las 2 primeras se denominan esterasas I y II ó enzimas ErcA y ErcB respectivamente,

por ser codificadas por los genes *ercA* y *ercB*, que se encuentran en plásmidos principalmente en *E. coli* y en algunas cepas de *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Enterobacter sp.*³⁷. Estas enzimas hidrolizan macrólidos de 14 átomos de carbono y la velocidad de hidrólisis varía dependiendo de los sustituyentes en C-9, C-6 y C-11. Así, claritromicina se hidroliza más rápidamente que roxitromicina pero menos que eritromicina A. Compuestos con C-9 oxima y C-11 carbamato se hidrolizan 30 veces más lentos que eritromicina A. La tercera esterasa ha sido descrita en *S. aureus* (cepa 01A1032) e hidroliza principalmente macrólidos de 16 y 14 átomos de carbono siendo incapaz de hidrolizar a azitromicina²¹.

1. 7. 2. Alteración del lugar de unión del ribosoma

Los cambios en la diana pueden ser por cambios en la secuencia de bases del ARNr 23S. Este tipo de mutaciones se vio hace varios años en *Helicobacter pylori* y *Mycobacterium avium* y recientemente en neumococo. Ya que la resistencia debida a este mecanismo depende del numero de copias del operón *rrn* que codifica el ARNr siendo en *M. avium* y *H. pylori* una o dos siendo frecuente en este tipo de resistencia mientras en otras especies como *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* existen numerosas copias siendo infrecuente este mecanismo de resistencia⁵⁵. El fenotipo en estos casos depende no solo del número de copias, sino también de la base sustituida⁵⁶.

También puede deberse a alteraciones de la proteína ribosómica L4 o L22⁵⁶. La mutación de la proteína L4 altera la estructura terciaria del ARNr 23S en el dominio V influyendo indirectamente en la afinidad por el macrólido⁵⁷.

Parece ser que son más frecuentes las mutaciones en los genes del 23S ARNr que las mutaciones en L4. En un estudio reciente en el que estudian 322 cepas de neumococo resistentes a eritromicina aisladas entre los años 1999 y 2000, se describen 21 cepas con mutaciones de este tipo:

- 19 presentan mutaciones en el dominio V del 23S RNAr en las posiciones 2058 ó 2059. De estas 19 dos presentan además *mefA* y una de estas presenta una sustitución de Glu77 por Gly en L22.
- 2 tienen una sustitución de 3 aminoácidos en la proteína L4.

Todos estos aislados son resistentes a eritromicina, claritromicina y azitromicina, presentando los aislados con mutaciones A2058G (3 de las 4 copias) alta resistencia, mayor incluso que aislados con 4 copias mutadas en posición 2059 (A por G ó C). 17 de los 21 eran resistentes a clindamicina, y 14 de estas presentaban baja CMI para telitromicina⁵⁸.

Otro mecanismo de resistencia por alteración del lugar de unión al ribosoma, y el primer mecanismo de resistencia descrito en 1956

para macrólidos, es la metilación de un residuo de adenina de ARN ribosómico, debido a la modificación postranscripcional del ARNr 23S por una adenina-N metiltransferasa. Esta enzima añade uno o dos grupos metilo en un residuo de adenina (A2058-A2059 en *E. coli*) en el ARNr 23S. Esto reduce la unión del antibiótico con el ribosoma. La monometilación genera resistencia cruzada a macrólidos, clindamicina, y estreptogramina B, resultando un fenotipo MLS_B. Este fenotipo confiere un nivel de resistencia a macrólidos alto (CMI > 16 µg/ mL). La dimetilación confiere además resistencia a telitromicina. La enzima metilasa está codificada por genes denominados *erm* (*erythromycin ribosome methylation*) que se localizan en plásmidos o en el cromosoma. Se han identificado 21 clases de genes *erm* (A-I, N, O, Q-Y, *chl*)⁵⁹ aunque su nomenclatura a veces es confusa.

La regulación de la metilasa más estudiada es la producida por el gen *ErmC* de estafilococo, presente en el plásmido pE194. Su expresión puede ser constitutiva o inducible, en función de la expresión de una región localizada en el extremo del gen estructural que codifica la metilasa, y que regula la síntesis de un pequeño péptido.

En el extremo 5'terminal de la región reguladora del ARNm hay 4 secuencias inversas complementarias que se pueden aparear unas

con otras y que circundan el sitio de unión al ribosoma y los codones iniciadores de la síntesis de la metiltransferasa.

El gen del péptido regulador y el de la metilasa son transcritos simultáneamente en la dirección 5'→3' del ARNm simple, de modo que este ARNm tiene 2 regiones codificadoras. Los ribosomas están ligados a otras secuencias de ARN conocidas como secuencias de Shine-Dalgarno (SD) ó sitio de unión al ribosoma localizado pocas bases antes del codon iniciador.

La traducción del ARNm ocurre en dirección 5'→3'. Esta empieza con un fragmento de lectura abierto del peptido regulador y suele continuar con la metilasa. Sin embargo en el caso del ARNm del *ermC*, el extremo 5' exhibe una serie de repeticiones inversas que forma una pareja de bucles (conformación I).

La secuencia SD-1 y el codon de iniciación de la síntesis del peptido regulador son accesibles al ribosoma y normalmente traducidos a través del bucle primero, lo cual no constituye un obstáculo. En ausencia de eritromicina A, estos bucles secuestran la secuencia SD-2 y el siguiente codon iniciador de la traducción, evitándose así la síntesis de la metilasa el ser inaccesible al ribosoma.

La eritromicina A al unirse al ribosoma puede producir un cambio conformacional del ARNm modificando estos bucles, dejando libre la secuencia SD-2 y permitiendo la síntesis de la metilasa (conformación II).

Cuando todos los ribosomas están metilados, la inhibición no continúa y el ARNm restablece su configuración. Esto es un sistema de autorregulación de la síntesis de metiltransferasa²¹.

Mecanismos parecidos aunque más complejos han sido demostrados en determinantes *ermA* de *S. aureus* y *ermG* de *Bacillus sphaericus*,

La regulación de resistencia es postranscripcional

La primera cepa de *Bacteroides fragilis* con resistencia MLS_B tipo constitutivo fue descrito en 1976.

La expresión de esta resistencia puede ser de forma constitutiva o inducible. La presencia de cladinosa en macrólidos de 14 y 15 átomos se ha relacionado con la inducción. Los macrólidos de 16 átomos, clindamicina y telitromicina no inducen la actividad de la metilasa porque no tienen este azúcar.

En aislados que presentan mutaciones, deleciones, o sustituciones en la región reguladora de la metilasa, el sitio de unión al ribosoma y el codón de iniciación de la metilasa están permanentemente accesibles.

Por tanto, la naturaleza constitutiva o inducible parece estar relacionada con la naturaleza relativa de la región reguladora del gen estructural, no de la clase de determinante *erm*.

1. 7. 3. Bombas de expulsión

En 1977 se produjo un brote epidémico en Hungría en el que se aislaron cepas de *S. aureus* que eran resistentes a eritromicina A, oleandomicina, y estreptogramina B, pero sensibles a macrólidos de 16 átomos de carbono y lincosamidas. Estas fueron las primeras cepas descritas con fenotipo MS. En 1993, Eady y col⁶⁰. describe cepas de *S. epidermidis* resistentes a eritromicina A y estreptogramina B pero sensibles a lincosamidas.

Posteriormente se demostró que el gen responsable de esta resistencia es el gen *mrsA*, que es el responsable de una bomba de expulsión activa dependiente de ATP, formada por una proteína de 488 aminoácidos.

Otra bombas de expulsión dependientes de energía ha sido descrita en *N. gonorrhoeae*, bajo el control del gen *mtr*. No es específica para macrólidos y es similar a otras descritas en *Pseudomonas aeruginosa* (*mexAB-oprKI*) y *E. coli* (*acrAB* y *acrEF*⁶¹).

Una bomba de expulsión diferente a la de estafilococos se encuentra en cepas de estreptococos. Se trata de una bomba que actúa por gradiente de protones, y es responsable del fenotipo M. Las cepas con este fenotipo son resistentes a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, pero sensibles los de 16, a lincosamidas y estreptograminas.

El gen responsable de esta bomba es el gen *mef* (macrolide efflux). Inicialmente se distinguían entre dos clases: gen *mefA* que se encontró originalmente en *S. pyogenes* y gen *mefE* en *S. pneumoniae* aunque posteriormente se ha postulado considerarlos como el mismo gen. El fenotipo M genera una resistencia moderada a macrólidos con unas CMI de 1- 64 µg/mL.

Un gen diferente al *mef*, llamado *mreA* (macrolide resistance efflux) ha sido descrito en cepas de *S. agalactiae*. Las cepas con este gen presentan resistencia a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos de carbono⁶².

1. 7. 4. Otros

En cepas de *S. epidermidis* que tienen el plásmido de 26.5-kb pNE24, se ha visto resistencia a eritromicina A, pero no a lincosamidas ni a streptogramina B. Esta resistencia esta bajo el control del gen *erpA*, que causa una modificación de la permeabilidad de la membrana que provoca una baja concentración intrabacteriana de eritromicina A, pero no afecta a macrólidos de 16 átomos⁶³.

La sobreexpresión de un segmento corto del RNAr 23S (posición *E. coli* 1235 a 1268), crea resistencia en *S. pneumoniae* a eritromicina A.

Se ha descrito que un pentapéptido (E-péptidos) puede interaccionar con eritromicina y desplazarla del ribosoma. Este E-pentapéptido es traducido por el ribosoma. EL RNAr que codifica el pentapéptido normalmente no se expresa, porque la región de lectura abierta del pentapéptido es secuestrada por la estructura secundaria del 23S ARNr. El péptido afecta al ribosoma en el que ha sido traducido. Hay una secuencia consenso MXLXV que puede ser reconocida en la mayoría de E-péptidos. Diferentes pentapéptidos confieren resistencia a diferentes macrólidos. EL pentapéptido para ketolidos es el K-péptido MRFFV. El tamaño del péptido (de 3 a 6 aminoácidos) y la secuencia de aminoácidos son esenciales⁶⁴

2. STREPTOCOCOS VIRIDANS

Los estreptococos *viridans* tienen las características generales de los streptococos descritas en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: cocos grampositivos, anaerobios facultativos que no producen catalasa ni coagulasa y si se cultivan en medio líquido se presentan en cadenas. Su denominación como *viridans* deriva de la palabra latina *viridis* que significa verde. Esto es debido a que la mayoría de especies de este grupo provocan una lisis parcial de los eritrocitos en agar sangre de carnero dando como resultado una coloración verdosa en el medio (α -hemólisis). También hay no obstante especies que no producen hemólisis (γ -hemólisis), incluso que produce hemólisis total o β -hemólisis (grupo *Streptococcus anginosus*). Son inmóviles, no esporulados y fermentan carbohidratos con producción de ácido pero no de gas. Son exigentes nutricionalmente, suelen requerir medios enriquecidos para conseguir un crecimiento primario óptimo. La mayoría crece bien en hemocultivos tradicionales. Aunque son anaerobios facultativos algunas cepas son capnófilas o microaerófilas.

Las especies no se pueden clasificar en serogrupos porque a pesar de que algunas cepas reaccionan con los antisueros de Lancefield, las especies no se amoldan a estos serogrupos.

La terminología aplicada a este grupo siempre ha sido confusa e inconsistente, refiriéndose a ellos generalmente como estreptococos α -hemolíticos. En la década de los 70 se propusieron

dos esquemas de clasificación: Colman y Williams los dividían en 5 especies: *S. mutans*, *S. milleri*, *S. sanguis*, *S. salivarius* y *S. mitior*, a los que llamaban “los estreptococos *viridans* orales humanos”⁶⁵. La otra propuesta era la de Facklam, que identificaba 10 especies fisiológicas: *S. sanguis I y II*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. uberis*, *S. acidominimus*, *S. morbillorum* y dos subdivisiones del grupo *S. milleri*, *S. anginosus-constellatus* y *S. MG-intermedius*⁶⁶. Recientemente, el uso de métodos moleculares basados en la relación genética para definir su taxonomía, ha demostrado la utilidad de la secuenciación genética del ARNr 16S para definir las relaciones filogenéticas entre especies. Actualmente los estreptococos *viridans* con importancia clínica se incluyen en uno de los siguientes grupos: el **grupo Anginosus** (*S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*), el **grupo Mitis** (*S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. gordonii*, *S. crista*, *S. infantis*, *S. mitis*, *S. oralis* y *S. peroris*), el **grupo Mutans** (*S. criceti*, *S. downei*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* y *S. sobrinus*), y el **grupo Salivarius** (*S. salivarius*, *S. thermophilus* y *S. vestibularis*)⁶⁷. Estas especies pueden diferenciarse fenotípicamente a través de características fisiológicas y bioquímicas como el tipo de hemólisis en agar sangre, reacción de

Voges-Proskauer, patrón de formación de ácido a partir de carbohidratos, capacidad de hidrolizar la esculina y la arginina y producción de dextrano, levano, fosfatasa alcalina, peróxido de hidrógeno y acetoína.

Las pruebas bioquímicas convencionales siguen representando el método más fiable para la identificación de estos organismos, porque aunque existen métodos comerciales automáticos y rápidos la eficacia es variable y a veces las bases de datos no están actualizadas.

Actualmente han quedado fuera de este grupo algunos microorganismos que en un principio se consideraron estreptococos viridans, como puede ser *Gemella morbillorum* antes denominado *S. morbillorum*. A pesar de ello, las enfermedades asociadas a este microorganismo y las bases del tratamiento son

TABLA II Características bioquímicas para la diferenciación de los estreptococos viridans⁶⁸

Microorgan.	Patrón lisis	Hidrólisis de				Producción de ácidos a partir de						Producción de		
		VP	Esculin.	Argin.	H ₂ O ₂	Manitol	Sorbitol	Lactosa	Trehalosa	Inulina	Rafinosa	Fosfat. alcalina	Dextrano	Levano
<i>S. mutans</i>	α,β,γ	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>S. mitis</i>	α	-	-	-	+	-	-	+	v	-	v	v	-	-
<i>S. oralis</i>	α	-	-	-	+	-	-	+	v	-	v	+	v	-
<i>S. sanguis</i>	α	-	v	+	+	-	v	+	+	+	v	-	+	-
<i>S. gordonii</i>	α	-	+	+	+	-	-	+	+	+	v	+	+	-
<i>S. crista</i>	α	-	-	v	+	-	-	v	+	-	-	-	v	ND
<i>S. salivarius</i>	α	+	+	-	-	-	-	v	v	v	+	v	-	+
<i>S. vestibularis</i>	α	v	v	-	+	-	-	v	v	-	-	v	-	-
<i>S. parasanguis</i>	α	-	v	+	+	-	-	+	v	-	+	+	-	-

+ ,85% o más de las cepas positivas; -, 85% o más de las cepas negativas; v, variable; ND, no disponible

similares a los de estreptococos *viridans*. *Streptococcus bovis* uno de los estreptococos del grupo D que fueron previamente incluido en el grupo *viridans*, pero posee un hábitat y una trascendencia clínica diferentes.

También han quedado fuera de este grupo, por no tener relación genética, los EVN (estreptococos variantes nutricionales), géneros *Abiotrophia* y *Granulicatella*⁶⁸.

2. 1. Hábitat

Los estreptococos *viridans* son parte de la flora microbiana normal del ser humano y otros animales. Nos los encontramos en las vías respiratorias altas, aparato genital y en el tubo digestivo, siendo en la cavidad oral donde más prevalecen. Dentro de la cavidad oral los streptococos no se distribuyen de manera uniforme, ni en cantidad ni por especie. Así encontramos que los estreptococos *viridans* representan un 46% de la flora total cultivable de la saliva, 45% de la lengua, 29% en las fisuras gingivales longitudinales y el 28% de la flora de la placa dental⁶⁹. Según la especie vemos que en la mucosa oral predominan *S. sanguis* y *S. mitis*, en el dorso de la lengua *S. mitis* y *S. salivarius* en la placa dental inicial *S. sanguis*, *S. mitis* y *S. oralis*, en la placa madura supragingival *S. gordonii* y en la placa subgingival *S. anginosus*⁷⁰. La fibronectina presente en la superficie de las células orales promueve el asentamiento de estas especies en la cavidad oral previniendo el asentamiento de otras

especies más patógenas (en ausencia o disminución de fibronectina aumenta la adherencia de otros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*).

2. 2. Patogenicidad

Los estreptococos *viridans* se consideran bacterias de baja virulencia, ya que no poseen los factores de virulencia clásicos que caracterizan a las bacterias más patógenas. No se sabe que posean endotoxina ni que secreten exotoxinas y son sensibles a la lisis por las enzimas séricas y lisosómicas⁶⁸.

No obstante la capacidad patógena de los estreptococos *viridans* queda demostrada por su capacidad de producir endocarditis. El dextrano extracelular tiene un importante papel en la propagación y adherencia de estos estreptococos a las válvulas cardiacas. Se ha visto que cuando hay una bacteriemia producida por una cepa productora de dextrano, la incidencia de endocarditis es superior a cuando la bacteriemia es causada por una cepa no productora. La producción de dextrano también modula la respuesta al tratamiento antimicrobiano viéndose que las cepas productoras de dextrano son más resistentes a la penicilina y producen vegetaciones mayores que las cepas no productoras⁷².

Otro factor que podría relacionarse con la patogenia de endocarditis es la proteína FimA. En algún estudio se ha relacionado esta proteína de superficie de *S. parasanguis* con la

colonización inicial del tejido dañado⁶⁸, y genéticamente tiene una alta homología con familias de bombas de expulsión de la familia ABC, y en especial con bombas relacionadas con la expulsión de metales.

Un posible factor que interviene en la adherencia de los estreptococos a las válvulas cardíacas es la fibronectina secretada por las células endoteliales, plaquetas y fibroblastos en respuesta a la lesión vascular, constituyendo un 4% de la masa del coágulo sanguíneo⁷². Los ácidos lipoteicoicos parecen ser la adhesina de la fibronectina en los estreptococos. *In Vitro* se ha visto que los streptococos causantes de endocarditis se unen a la fibronectina significativamente mejor que las cepas no productoras. Los estreptococos *viridans*, una vez adheridos a la superficie valvular, inducen la propagación de la vegetación infectada estimulando la producción de factor tisular por parte del tejido valvular subyacente al estimular directamente una mayor agregación plaquetaria⁷³.

Además de producir endocarditis infecciosa, algunas especies de Streptococos *viridans* en especial *S. mutans* poseen una fuerte asociación con la producción de caries dental. El microorganismo se adquiere en la primera etapa de la vida por una transmisión horizontal y vertical de la madre al lactante⁷⁴. La producción de caries se produce solo en presencia de sacarosa alimentaria, que es utilizada por el microorganismo para sintetizar diversos

polisacáridos extracelulares, incluyendo glucanos, que sirven para unirse al esmalte dental y a otras bacterias. Parece que el elevado potencial cariogénico de *S. mutans* está relacionado con su capacidad de adherirse en grandes cantidades a los dientes y de producir altas concentraciones de ácido a partir de la fermentación de azúcares.

En ocasiones los estreptococos *viridans* pueden provocar bacteriemia y shock séptico en pacientes neutropénicos. Se ha observado que los niveles séricos de factor de necrosis tumoral- α e interleucina-6 se encontraban elevados independientemente de si el shock estaba causado por estreptococo *viridans* o por bacilos gramnegativos⁷⁵, por tanto la etiopatogenia del shock causado por estreptococos *viridans* parece no ser diferente a la del shock séptico por gramnegativos.

2. 3. Manifestaciones clínicas

2. 3. 1. Endocarditis

Los estreptococos *viridans* eran responsables del 75% de todas las endocarditis infecciosas en la era preantibiótica. En la actualidad esta frecuencia ha declinado hasta un 20%⁷⁶, pero este cambio responde más que a la reducción anual global de endocarditis estreptocócica al incremento en el número de enfermos que adquieren endocarditis estafilocócica secundaria a inyección de drogas o por válvulas protésicas.

Los estreptococos *viridans* son la causa más frecuente de endocarditis en pacientes con cardiopatía conocida (55%) que en aquellos sin cardiopatía previa conocida (29%). Las características y el pronóstico de endocarditis causadas por diferentes especies de estreptococos *viridans* parecen ser semejantes. Se han descrito numerosas especies productoras de endocarditis como *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. vestibularis*, *S. oralis* y miembros del grupo *S. anginosus*, pero es posible que existan otras especies de streptococos *viridans* también productoras⁷⁷. La endocarditis infecciosa suele afectar a personas con una valvulopatía subyacente. Actualmente las principales lesiones predisponentes son el prolapso de la válvula mitral (29%) y las lesiones valvulares degenerativas (21%). Anteriormente ostentaban este papel las cardiopatías reumáticas y congénitas. En los usuarios de drogas por vía parenteral, los estreptococos representan solo el 6% como responsables de endocarditis infecciosa. En pacientes con prótesis valvular la incidencia de endocarditis estreptocócica va en relación con el tiempo transcurrido desde la cirugía, siendo la frecuencia en los dos primeros meses del 7% y aumentando hasta un 30% el cabo de un año o más⁷⁸.

El inicio de la endocarditis estreptocócica es insidioso, siguiendo de un curso clínico subagudo pero progresivo. Los síntomas aparecen a las 2 semanas del inicio pero el diagnóstico se suele retrasar hasta 5 semanas o más del inicio de los síntomas. La fiebre está presente

en casi todos los enfermos, menos en los que presentan insuficiencia renal preexistente, insuficiencia cardiaca congestiva o consumo concomitante de antibióticos, y suele ir acompañada de astenia, anorexia, pérdida de peso y malestar general. En el 90% de los casos se detectan soplos cardiacos, en la mitad de los casos esplenomegalia y en un 28% manifestaciones de complejos inmunes circulantes como nódulos de Osler, petequias y hemorragias⁷⁸.

El diagnóstico de la endocarditis infecciosa se basa en la identificación de una bacteriemia mantenida, siendo esta frecuentemente de baja intensidad (1-30 unidades formadoras de colonias por mililitro de sangre). El patógeno se identifica en el 96% de los casos con una serie de hemocultivos y en un 98% con 2 series. El ecocardiograma se emplea como prueba confirmatoria en pacientes con hemocultivos positivos.

La penicilina G sigue siendo el tratamiento de elección en el tratamiento de endocarditis por estreptococos *viridans*, administrándose en dosis altas, en general, durante 4 semanas. Si se administra junto con un aminoglucósido el tiempo de tratamiento puede acortarse, aunque hay que tener en cuenta la toxicidad por aminoglucósidos. Actualmente se elige la gentamicina para el régimen con dos fármacos, debido a la fácil determinación de niveles séricos y a la conveniencia de la administración i.v. aunque la experiencia clínica es con estreptomomicina.

Los regímenes antibióticos recomendados actualmente por la American Heart Association aparecen en la tabla III⁷⁹ :

<i>Microorganismo (CMI)</i>	<i>Antibiótico</i>	<i>Posología y vía de administración**</i>	<i>Duración (semanas)</i>
Estreptococos viridans sensibles a la penicilina ($\leq 0,1 \mu\text{g/ml}$)	Penicilina G acuosa	10-20 millon. de unid. i.v./ 24 h de forma contin. o divid. en 6 dosis	4
	Penicilina G acuosa con estreptomycin*	10-20 millon. de unid. i.v./ 24 h de forma contin. o divid. en 6 dosis	2
	o con gentamicina	7.5 mg/Kg i.m (sin superar los 500 mg) cada 12 horas	2
	Penicilina G acuosa con estreptomycin*	1 mg/Kg i.m. o i.v. (sin superar los 80 mg) cada 8 h	2
	o con gentamicina	10-20 millon. de unid. i.v./ 24 h de forma contin. o divid. en 6 dosis	4
	Ceftriaxona	7.5 mg/Kg i.m (sin superar los 500 mg) cada 12 horas 1 mg/Kg i.m. o i.v. (sin superar los 80 mg) cada 8 h 2 g i.m. o i.v. al día	2 2 4
Estreptococos viridans relativamente Resistentes ($>0,1 \mu\text{g/ml}$ y $<0,5 \mu\text{g/ml}$) y todos los streptococos variantes nutricionales	Penicilina G acuosa con estreptomycin* o con gentamicina	20 millon. de unid. i.v./ 24 h de forma contin. o divid. en 6 dosis	4
		7.5 mg/Kg i.m (sin superar los 500 mg) cada 12 horas	2
		1 mg/Kg i.m. o i.v. (sin superar los 80 mg) cada 8 h	2
Estreptococos viridans resistentes ($\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$)	Penicilina G acuosa con estreptomycin* o con gentamicina	20-30 millon. de unid. i.v./ 24 h de forma contin. o divid. en 6 dosis	4-6
		7.5 mg/Kg i.m (sin superar los 500 mg) cada 12 horas	4-6
		1 mg/Kg i.m. o i.v. (sin superar los 80 mg) cada 8 h	4-6

* Adaptado de Comité Recommendations of the American Heart Association's Council on Cardiovascular Disease in the Young

**Las dosis deben ajustarse de acuerdo con la función renal

¥Son deseables niveles máximos de estreptomycin y gentamicina de 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

La elección de un aminoglucósido concreto puede depender de la sensibilidad de la cepa a altas concentraciones.

Las recidivas son infrecuentes. Se debe personalizar la elección del régimen de tratamiento. El régimen de 2 semanas está indicado en casos no complicados de endocarditis y pacientes con bajo riesgo de toxicidad por aminoglucósidos. No está indicado en enfermos con focos extracardiacos o abscesos intracardiacos. En pacientes cuya infección afecta a material protésico se recomienda un régimen de 6 semanas con penicilina, más gentamicina durante al menos las 2 primeras semanas.

Aunque es infrecuente encontrar estreptococos *viridans* resistentes a penicilina, los pacientes infectados con estas cepas tienen mayor riesgo de recidivas. Se recomienda para las cepas relativamente resistentes (CMI de penicilina $>0,1\mu\text{g/ml}$ pero $< 0,5\mu\text{g/ml}$) administrar gentamicina en las 2 primeras semanas de tratamiento de un total de 4 semanas con penicilina. Con cepas resistentes (CMI $\geq 0,5$) el tratamiento consiste en penicilina más gentamicina durante 4 ó 6 semanas.

En pacientes alérgicos a la penicilina de tipo inmediato, la alternativa al tratamiento es un régimen de 4 semanas con vancomicina. En pacientes con otro tipo de alergia a penicilina puede administrarse cefazolina u otra cefalosporina de primera generación. Estas pueden administrarse en solitario durante 4 semanas o en ciclos cortos junto con un aminoglucósido. Las cefalosporinas no están indicadas cuando el microorganismo presenta alta resistencia a la penicilina (CMI $\geq 0,5$).

2. 3. 2. Bacteriemia

Los estreptococos *viridans* representan el 2,6% de los hemocultivos positivos de laboratorios clínicos y de estos se cree que solo el 21% tienen importancia clínica, el resto se atribuyen a contaminaciones⁶⁸. En contraste, la bacteriemia prolongada se ha convertido en un problema en pacientes que reciben quimioterapia oncológica. En algunos centros, los estreptococos se han convertido en una de las primeras causas de bacteriemia en

pacientes neutropénicos febriles. *S. mitis* y *S. oralis* son las especies que se identifican con mayor frecuencia en pacientes neutropénicos con bacteriemia estreptocócica⁸⁰. La bacteriemia por estreptococos *viridans* es más frecuente en niños que en adultos, y se desarrolla en los primeros 15 días tras la quimioterapia o el trasplante de médula ósea, en el contexto de una neutropenia intensa.

Se ha descrito un síndrome de shock fulminante caracterizado por hipotensión, exantema, descamación palmar y síndrome de dificultad respiratoria del adulto en más o menos la cuarta parte de los enfermos. *S. mitis* fue la causa de la mayoría de los casos. Pocos casos de bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos evolucionan a endocarditis clínicamente aparente.

La tasa de mortalidad de mortalidad por bacteriemia por estreptococos *viridans* en pacientes inmunodeprimidos es de aproximadamente el 6-12%, a pesar de la administración precoz de antibióticos de amplio espectro⁸¹. Esta falta de eficacia terapéutica se asocia con el mal estado clínico del paciente al inicio del tratamiento antibiótico.

El uso de profilaxis antibiótica para prevenir la bacteriemia es controvertido y no está clara su eficacia. Independientemente de su eficacia, una consecuencia del uso de antibióticos como profilaxis es la aparición de resistencias. Hay un estudio en el que se demuestra cómo aumenta la proporción de bacteriemias

causadas por estreptococos resistentes a penicilina desde un 0% en 1989, antes de que se usara profilaxis en los receptores de médula ósea, hasta un 16% en 1991, cuando se usaban quinolonas como profilaxis y hasta un 44% cuando se añadió penicilina a las quinolonas⁸².

2. 3. 3. Meningitis

Los estreptococos *viridans* representan solo el 0,3-5% de casos de meningitis verificados en cultivo⁸³. Parece que *S. salivarius* es el que se aísla con mayor frecuencia en las meningitis, pero es difícil saberlo ya que en los primeros estudios no se daba información acerca de la especie. También se han descrito infecciones por *S. mitis* y *S. sanguis*. Las características clínicas son las típicas de una meningitis aguda piógena, con signos de irritación meníngea, déficit neurológico, convulsiones y alteración de conciencia. La infección se produce en pacientes de todas las edades, incluyendo neonatos. La mayoría de los casos de meningitis por estreptococos *viridans* tienen como fuente de infección la flora endógena, siendo las puertas de entrada varias y no siempre identificables. En neonatos se da por hecho que la infección se adquiere de la madre en el período perinatal. En un estudio sobre 55 pacientes se observó alguna patología de oído, nariz o garganta en el 31% de los mismos, endocarditis en el 13%, infección extracraneal primaria en el 13%, traumatismo craneoencefálico o neurocirugía en el 8% y en el 35% no se identificó ninguna posible

puerta de entrada⁶⁸. Otros factores predisponentes son trastornos gastrointestinales, manipulación o instrumentación gastrointestinal, traumatismo, termocoagulación ganglionar e inmunodeficiencia intensa tras quimioterapia. En una revisión de 60 casos de meningitis iatrogénicas se ha visto que en el 63% fueron responsables las especies estreptocócicas⁸⁴, siendo los factores predisponentes más frecuentes la anestesia epidural, mielografía y punción lumbar respectivamente. Se ha visto que este tipo de meningitis están relacionadas con el incumplimiento de las medidas de control de la infección en especial con el uso de mascarillas.

La importancia del aislamiento de un estreptococo α -hemolítico distinto de neumococo en un líquido cefalorraquídeo radica en el contexto clínico y en los parámetros de laboratorio del LCR. La concentración de proteínas y el recuento leucocitario diferencial en el LCR son claramente anormales en pacientes con una meningitis por estreptococos *viridans* pero los niveles de glucosa en el LCR pueden ser normales. Una tinción de Gram positiva es altamente significativa, pero se observa en menos del 50% de los pacientes con meningitis por estreptococos *viridans*. La presencia de hemocultivos positivos en el contexto de meningitis por estreptococos *viridans* sugiere una endocarditis subyacente.

En la era preantibiótica, la meningitis por estreptococos *viridans* era casi siempre fatal. Con los tratamientos antibióticos la mortalidad descendió significativamente, siendo la mayoría de los

fallecidos enfermos inmunodeprimidos. La penicilina G en dosis de 24 millones de unidades al día constituye el antibiótico de elección para el tratamiento de estas meningitis. La mayoría de los aislados en la clínica son extremadamente sensibles, aunque también se han descrito meningitis causadas por cepas resistentes.

2. 3. 4. Neumonía

La aparición de estreptococos *viridans* en muestras de las vías respiratorias altas no suele tener trascendencia clínica, ya que se consideran que forman parte de la flora oral normal. Sin embargo cuando se aíslan de muestras de las vías respiratorias bajas obtenidas por aspiración transtraqueal o por cepillado bronquial protegido, suelen aparecer asociados a otros microorganismos orales (Ej: anaerobios) como parte del síndrome de neumonía por aspiración. Se desconoce la importancia relativa de los estreptococos *viridans* en la etiopatogenia de estas infecciones polimicrobianas. Varios informes describen el aislamiento de estreptococos *viridans* como patógenos únicos en infecciones de las vías bajas. Hay varios factores predisponentes del huésped, como son la edad (49-80 años), múltiples enfermedades subyacentes, como alcoholismo, carcinoma pulmonar y diabetes mellitus⁸⁵. También se han descrito neumonías en niños por estreptococos *viridans*.

El pronóstico es en general bueno en pacientes con neumonía primaria por estreptococos *viridans*, y es raro el fallecimiento en

ausencia de inmunodepresión. Se ha empleado la penicilina G como tratamiento en la mayoría de los casos publicados.

2. 3. 5. Otras infecciones

Se han identificado cepas de estreptococos viridans en pacientes con pericarditis, peritonitis, sialoadenitis bacteriana aguda, infecciones orofaciales odontogénicas, endoftalmitis, espondilodiscitis e infecciones de las vías respiratorias altas (otitis media, sinusitis).

2. 4. GRUPO MITIS

S. sanguis, *S. parasanguis*, *S. gordonii*, *S. crista*, *S. infantis*, *S. mitis*, *S. oralis* y *S. peroris*^{68,86}.

Todos sus componentes son α-hemolíticos, e incluye varias especies con una importancia clínica conocida como pueden ser *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis* y *S. gordonii*, que se encuentran en la placa dental junto a otras con pocos o ningún dato clínico conocido como pueden ser *S. parasanguis* y *S. crista*, que son los más recientemente descritos.

La mayoría de las cepas de este grupo producen un polisacárido extracelular (dextrano) a partir de la sacarosa, dando como resultado colonias duras, mucosas y adherentes. La mayoría de cepas reaccionan con el antisuero del grupo H de Lancefield frente a la cepa Blanckburn (British group H).

La mayoría de cepas de *S. gordonii* producen colonias como las de *S. sanguis* en agar sacarosa. Las cepas de estas especies frecuentemente reaccionan con el antisuero del grupo H de Lancefield frente a la cepa F90A (ATCC12396) o frente a la cepa Blanckburn.

Hay que tener en cuenta en este grupo que la cepa tipo actual de *S. mitis* es NCTC 12261, que reemplaza a la cepa tipo anterior a los cambios en la taxonomía, que era la NCTC 3165 y que se ha incluido posteriormente como *S. gordonii*⁸⁷.

S. oralis y *S. mitis* se caracterizan por la pared celular que presentan, que contiene ácido ribitol teicoico y carecen de cantidades significativas de ramnosa. La producción extracelular de polisacárido es variable en *S. oralis* y negativa en *S. mitis*.

De *S. parasanguis* y *S. crista* se tienen pocos datos clínicos, pero se sabe que *S. parasanguis* ha sido aislado de muestras clínicas (orina, sangre), mientras *S. crista* se aísla de la boca y tracto respiratorio superior (lengua, placa dental, abscesos periodontales. Las dos son α-hemolíticas e hidrolizan arginina pero no esculina. La producción de polisacárido extracelular es una característica variable de *S. crista* y negativa para *S. parasanguis*. *S. crista* presenta en la superficie lateral penachos de fibrillas

S. peroris and *S. infantis* son α-hemolíticas y se aíslan de la faringe y dientes humanos⁸⁸.

TABLA IV: Diferenciación de especies en el grupo mitis⁸⁶

Test	S. sanguis			S. parasanguis	S. gordonii	S. crista	S. oralis	S. mitis	S. peroris	S. infantis
	Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 3							
Actividad enzimático										
β-D-Fucosidasa	-	+	+	v	-	-	-	-	-	v
β-D-Acetilgalactosaminidasa	-	-	-	+	v	+	+	-	NT	NT
Neuraminidasa	-	-	-	-	-	-	+	v	NT	NT
α-L-Fucosidasa	-	-	-	v	+	+	-	-	NT	NT
β-D-acetilglucosaminidasa	-	v	+	+	+	+	+	-	-	v
α-D-Glucosaminidasa ^α	-	-	-	+	v	-	+	+	NT	NT
β-D-Glucosaminidasa ^α	v	+	v	v	+	-	-	-	-	-
α-Arabinosidasa	-	-	-	v	-	-	-	-	NT	NT
α-D-Galactosidasa ^α	v	+	-	+	-	-	v	v	-	-
β-D-Galactosidasa ^α	-	v	+	+	v	v	v	v	-	+
Producción de ácido a partir de:										
Amigdalina	-	+	-	v	+	-	-	-	-	-
Inulina	v	v	v	-	+	-	-	-	-	v
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
N-Acetilglucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	-
Rafinosa	+	+	-	v	-	-	v	+	-	-
Sorbitol	v	v	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina	+	+	v	v	+	+	-	-	-	+
Lactosa	+	+	+	+	+	v	+	v	+	-
Melibiosa	+	v	-	v	-	-	v	+	-	+
Tagatosa	NT	NT	NT	v	v	v	v	-	-	+
Hidrólisis de:										
Arginina	+	+	+	+	+	v	-	-	-	-
Esculina	+	+	-	+	+	-	v	-	-	-
Producción de:										
Acetoina (VP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hialuronidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
Fosfatasa alcalina	NT	NT	NT	v	+	-	v	v	v	-

+, positivo; -, negativo; v, variable; NT, no disponible

α, EL porcentaje de cepas positivas puede variar dependiendo del método usado.

2. 5. GRUPO MUTANS

Este grupo incluye *S. criceti*, *S. downei*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* y *S. sobrinus*. Estas especies se caracterizan por la producción de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles a partir de sacarosa y por la producción de ácido a partir de carbohidratos.

S. mutans puede dar formas cocobacilares en medios sólidos o en medio líquido en condiciones de acidez. En agar sangre las colonias suelen ser α -hemolíticas, duras y adherentes, aunque ocasionalmente pueden ser β -hemolíticas. Las cepas de *S. sobrinus* son mayoritariamente no hemolíticas aunque pueden ser α -hemolíticas y en agar sacarosa como en el caso de *S. criceti* las colonias tienen un aspecto áspero y pueden aparecer agrupadas y rodeadas por líquido rico en glucano. Las colonias de *S. rattus* son elásticas en agar sacarosa⁸⁶.

Ver tabla V.

2. 6. GRUPO SALIVARIUS

Incluye a *S. salivarius*, *S. thermophilus* y *S. vestibularis*^{68,86}.

S. thermophilus es aislado de productos lácteos, en contraste con los otros miembros del grupo. *S. salivarius* se aísla de la mayoría de zonas de la boca como la lengua, saliva y la mucosa. *S. vestibularis* se aísla del vestíbulo oral pero su extensión en las superficies orales no ha sido determinada. Ninguna de estas especies se consideran patógenos importantes, a pesar de que *S. salivarius* puede

ocasionar septicemias en pacientes neutropénicos. *S. salivarius* suele ser a o no hemolítico en agar sangre, y forma colonias distintivas en agar sacarosa por la producción de polisacárido extracelular resultando colonias mucoides (fructano o levano soluble), o colonias duras que pueden picar el agar (glucano o dextrano insoluble). Un alto porcentaje aglutinan con el antisuero K del grupo de Lancefield, y la mitad de los aislados producen ureasa.

S. vestibularis es a-hemolítico, ureasa positivo y no produce polisacárido extracelular a partir de sacarosa⁸⁶.

Ver tabla V.

TABLA V: Características bioquímicas de <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. salivarius</i> y <i>S. vestibularis</i> ⁸⁶				
Test	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. vestibularis</i>
Actividad enzimática				
β-D-Fucosidasa	-	-	V	-
β-D-Acetilgalactosaminidasa	-	-	-	-
Neuraminidasa	-	-	-	-
α-L-Fucosidasa	-	-	-	-
β-D-acetilglucosaminidasa	-	-	-	-
α-D-Glucosaminidasa ^a	+	+	V	V
β-D-Glucosaminidasa ^a	+	-	V	-
α-Arabinosidasa	-	-	+	+
α-D-Galactosidasa ^a	V	-	-	-
β-D-Galactosidasa ^a	+	+	+	+
Producción de ácido a partir de:				
Amigdalina	+	-	V	V
Inulina	+	-	V	-
Manitol	+	+	-	-
N-Acetilglucosamina	+	-	V	V
Rafinosa	+	-	V	-
Sorbitol	+	V	-	-
Arbutina	V	-	+	V
Lactosa	+	+	+	V
Melibiosa	+	-	-	-
Hidrólisis de:				
Arginina		+	-	-
Esculina		+	+	V
Producción de:				
Acetoina (VP)		+	+	-
Ureasa		-	V	+
Hialuronidasa		-	-	-

+ ,positivo; - , negativo; v, variable; NT, no disponible

2. 7. GRUPO ANGINOSUS

Este grupo incluye actualmente tres especies: *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*. A este grupo también se le denomina "grupo *Streptococcus milleri*".

En el pasado se hacía referencia a él como "grupo *Streptococcus intermedius*" o solamente "*Streptococcus anginosus*". Dentro de este grupo se incluyen estreptococos anteriormente conocidos como grupo *Streptococcus-MG*, como estreptococos tanto hemolíticos como no hemolíticos portadores del antígeno F de Lancefield, estreptococos formadores de colonias pequeñas de los grupos F y G de Lancefield, los antiguos *S. milleri* y "grupo *S. milleri*", *S. anginosus-constellatus* y *S. MG-intermedius*, *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*⁸⁶.

S. constellatus se divide en dos subespecies: *S. constellatus* subespecie *constellatus* que se suele aislar de muestras clínicas y *S. constellatus* subespecie *pharyngis* que se relaciona con la faringe humana.

Desde un punto de vista clínico, se caracterizan desde hace mucho tiempo por poder causar infecciones piógenas invasivas, lo que los diferencia de otros estreptococos *viridans*⁸⁹.

Desde el punto de vista bacteriológico, las cepas de este grupo pueden ser β , α o no hemolíticas en agar sangre, aunque una gran proporción de cepas de *S. intermedius* son no hemolíticas (93%)⁹⁰. El crecimiento se realiza normalmente en condiciones microaerófilas,

aunque con algunas cepas se requieren condiciones anaerobias. Forman colonias diminutas (0.5 mm de diámetro) y frecuentemente presentan olor a caramelo al cultivarlas en placas de agar. Este olor característico es debido a la formación del metabolito diacetilo, cuya presencia tiene valor diagnóstico. Este grupo en general no produce polisacárido extracelular⁸⁶, pero algunas cepas de *S. anginosus* aisladas de muestras genitourinarias muestran un crecimiento diseminado en ciertos tipos de agar debido a la producción de glucocálix extracelular (cápsula) ⁶⁸.

Las cepas de *S. anginosus* pueden poseer antígenos A, C, F ó G del grupo de Lancefield o ser no agrupables y aproximadamente el 18% son β -hemolíticas. *S. constellatus* son frecuentemente β -hemolíticas (38%)⁹⁰, y poseen mayormente el antígeno F del grupo de Lancefield, o son no agrupables aunque alguna cepa puede ser del grupo A,C o G,S. *S. intermedius* son no agrupables o poseen el antígeno F, siendo la especie de este grupo menos diversa serológicamente respecto al grupo de Lancefield.

Por tanto, la clasificación por grupos de Lancefield es de poca utilidad en la identificación de estos microorganismos, puesto que pueden presentar cualquier antígeno.

Este grupo puede distinguirse de otros streptococos mediante 3 pruebas rápidas: prueba de Voges- Proskauer (producción de acetoína), hidrólisis de arginina e imposibilidad de fermentar el sorbitol. La presencia de olor a caramelo puede servir de ayuda.

Tabla VI: Identificación presuntiva de los miembros del grupo *Streptococcus anginosus*. Adaptada del esquema de identificación de Whiley y cols⁹⁰

Crecimiento de colonias estreptocócicas diminutas bajo condiciones microaerófilas/anaeróbicas.

Formación de ácido a partir de

Insulina –

Sorbitol –

Salicina +

Hidrólisis de

Hipurato –

Esculina +

Desoxirribonucleasa –

Dihidrólisis de arginina +

Prueba de Voges-Proskauer +*

Olor a caramelo V

+, ≥ 90% de las cepas tienen reacción positiva; -, ≤ 90% de las cepas tienen reacción negativa; v, variable; * raras excepciones.

TABLA VII: Diferenciación de especies del grupo <i>Streptococcus anginosus</i> ⁸⁶ .			
Test	<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i> <i>Subps.constellatus</i>	<i>S. constellatus</i> <i>Subps.pharyngis</i>
Actividad enzimática			
β-D-Fucosidasa	-	-	+
β-D-Acetilgalactosaminidasa	-	-	+
Neuraminidasa	-	-	-
α-L-Fucosidasa	-	-	-
β-D-acetilglucosaminidasa	-	-	+
α-D-Glucosaminidasa ^a	v	+	+
β-D-Glucosaminidasa ^a	+	-	+
α-Arabinosidasa	v	-	-
α-D-Galactosidasa ^a	v	-	-
β-D-Galactosidasa ^a	v	v	+
Producción de ácido a partir de:			
Amigdalina	+	v	+
Inulina	-	-	-
Manitol	-	-	-
N-Acetilglucosamina	v	v	+
Rafinosa	v	-	-
Sorbitol	-	-	-
Arbutina	+	+	+
Lactosa	+	v	+
Melibiosa	v	v	-
Hidrólisis de:			
Arginina	+	+	+
Esculina	+	v	+
Producción de:			
Acetoina (VP)	+	+	+
Ureasa	-	-	-
Hialuronidasa	-	+	v

+ ,positivo; - , negativo; v, variable; NT, no disponible

Existen bastantes sistemas comerciales para la identificación de *Streptococcus viridans*. No obstante comparando estos sistemas con métodos convencionales, no presentaban una concordancia superior al 74%, *S. constellatus* y *S. intermedius* eran de los microorganismos identificados erróneamente con mayor frecuencia. Otra comparación posterior del método comercial Fluo-Card Milleri con los métodos convencionales mostró coincidencias entre el 88% y el 98% con las especies de este grupo⁹¹.

Los métodos genéticos-moleculares están siendo muy útiles para ubicar taxonómicamente a los estreptococos *viridans*. Uno de ellos emplea secuencias génicas de ARN ribosómico (ARNr) 23S amplificadas por PCR, seguidas de sondas de hibridación específicas de especie. Este método ha podido identificar cepas que bioquímicamente se pensaba que eran miembros del grupo de *S. anginosus*, y realmente se relacionan más con *S. parasanguis*. También se han empleado secuencias génicas parciales de ARNr 16S amplificadas por PCR, seguidas de sondas de hibridación específicas de especie, para identificar a una población ARN definida que comparte el 98% de homología entre secuencias con *S. constellatus*⁹². Otro de ellos se basa en la amplificación de fragmentos génicos internos específicos que codifican la D-alanina⁹³.

2. 7. 1. Hábitat

Principalmente los encontramos en la cavidad oral humana, donde se consideran flora normal. Se pueden aislar de los surcos gingivales longitudinales, la placa dental y los canales radiculares de los dientes. Los podemos encontrar también en la garganta y la rinofaringe, quizá por diseminación desde la cavidad oral y también por ello en el tubo digestivo. *S. intermedius* es el más detectado en la placa dental, y *S. anginosus* en el tracto gastrointestinal. Podemos observar una diseminación desde el tubo digestivo hacia la vagina con su consecuente colonización. *S. anginosus* es el más frecuente en vagina, estando frecuentemente encapsulados⁹⁴. Su presencia en el canal del parto puede originar infección neonatal.

2. 7. 2. Patogenicidad

Las características de crecimiento de este grupo parecen tener importancia en su patogenicidad, ya que crecen bien en entornos ácidos como el de los abscesos. Además parece que en infecciones mixtas, donde estén implicados miembros de este grupo y otros microorganismos (ej: *Eikenella corrodens*, anaerobios...), se ve la replicación de los estreptococos favorecida. Hay estudios que confirman que los anaerobios potencian el crecimiento de los microorganismos de este grupo⁹⁵.

Este grupo además posee factores intrínsecos que probablemente estén implicados en su patogenia. Los estreptococos expresan distintas adhesinas en su superficie celular que facilita su adherencia a sustratos presentes en su entorno. Todos los miembros del grupo *S. anginosus*, a través de una proteína de superficie, son capaces de unirse a la fibronectina, y algunas cepas pueden unirse a la fibrina plaquetaria, coágulos de fibrina y al fibrinógeno⁹⁶, siendo esto probablemente un factor importante en la capacidad de estos patógenos en producir endocarditis. La unión al fibrinógeno a su vez puede favorecer la agregación plaquetaria lo que también puede ayudar al desarrollo de endocarditis. En un estudio sobre endocarditis experimental con ratas, las cepas de *S. anginosus* produjeron vegetaciones infecciosas y bacteriemia en casi todas las ratas, las cepas de *S. constellatus* lo hicieron con menor frecuencia y las cepas de *S. intermedius* sólo en ocasiones. Además, las vegetaciones infectadas por *S. anginosus* albergaban un número significativamente mayor de microorganismos que las infectadas con otras cepas⁹⁷.

Otro factor de virulencia es la frecuente presencia de capsula polisacárida en los miembros de este grupo, que dificulta la fagocitosis.

La producción de exotoxinas piógenas por parte de las especies de estreptococos es conocida, pero son pocas las publicadas en relación con el grupo *S. anginosus*. Se ha descrito en una cepa de

S. intermedius aislada de un absceso hepático la única toxina citolítica específica para las células humanas, la intermedilisina⁹⁸. Posee un potente efecto hemolítico sobre los eritrocitos humanos. Su gen solo está presente en *S. intermedius*. Parece que es un factor de virulencia, ya que su producción es mayor en cepas aisladas en infecciones profundas que en cepas aisladas de hábitats normales.

Además los miembros del grupo *S. anginosus* producen una gran variedad de enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa, desoxirribonucleasa y condroitinsulfatasa. Estas enzimas favorecen la diseminación de los patógenos a través de los tejidos, favorecen la licuefacción del pus y desempeñan un papel de nutrición microbiana. Una de las más prevalentes es la hialuronidasa, demostrando ser un factor de crecimiento. La actividad ribonucleasa se distribuye por igual en todas las cepas, y la actividad hialuronidasa se relaciona con *S. intermedius* y *S. constellatus*, pero ninguna se asocia de forma significativa con cepas aisladas de infección. Sin embargo la actividad desoxirribonucleasa y la condroitinsulfatasa relacionadas también con *S. intermedius* y *S. constellatus*, sí se asociaron a cepas aisladas de infección. Además, se ha aislado una glucoaminodespolimerasa en *S. intermedius* que actúa tanto sobre el condroitinsulfato como sobre el ácido hialurónico. Otra enzima con posible papel en la etiopatogenia es la sialidasa

(neuraminidasa), producida por *S. intermedius*. Los miembros de este grupo son capaces de usar el ácido siálico como única fuente de carbono. Por tanto, la sialidasa puede ser un factor de crecimiento y tener un importante papel en la capacidad proliferativa de estos microorganismos.

También hay posibles factores de virulencia relacionados con la respuesta inmunológica del huésped, como puede ser una proteína de 90 kDa que inhibe la proliferación de los linfocitos y fibroblastos, que ha sido descrita en *S. intermedius*⁹⁹. Esta proteína podría tener un efecto de virulencia mediado por la estimulación de linfocitos supresores. También se ha visto la ausencia de receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G humana, que puede tener que ver con la virulencia. No obstante el factor de virulencia más importante relacionado con la respuesta inmunológica posiblemente sean los superantígenos. Al ser potentes inductores de la síntesis de citocinas inflamatorias (Th1), tienen gran importancia en la gravedad de las infecciones estreptocócicas invasivas. Se cree que estos son los responsables de síndromes de shock tóxico agudos, fascitis necrosante y enfermedades multisistémicas, a través de la liberación de estas citocinas¹⁰⁰. Sabemos que las exotoxinas eritrogénicas estreptocócicas tienen propiedades de superantígenos y posiblemente la intermedilina, la hemolisina reconocida de *S. intermedius*, pueda actuar como tal¹⁰¹.

Debido a su propensión a causar abscesos se ha estudiado la interacción del grupo *S. anginosus* con las células polimorfonucleares humanas¹⁰². Un estudio mostró que la probabilidad de que los leucocitos polimorfo-nucleares humanos destruyeran a una cepa virulenta de *S. constellatus* era menor que en el caso de que las cepas fueran avirulentas. Otro estudio observó que los miembros del grupo *S. anginosus* estimulan menos quimiotaxis que *Staphylococcus aureus*, lo que es una ventaja para la proliferación de bacterias. Además, los miembros de este grupo sobreviven a la ingesta de los polimorfonucleares mejor que *S. aureus*. Esto puede explicar la capacidad de los miembros de grupo *S. anginosus* para causar abscesos¹⁰³.

La existencia de factores de virulencia en este grupo (aunque aún no bien definidos) viene avalada por el hecho de que, en numerosas ocasiones, son los únicos patógenos aislados en infecciones graves, como la formación de abscesos.

2. 7. 3. Manifestaciones clínicas

2. 7. 3. 1. Infecciones de cabeza y cuello

Los miembros de este grupo se aíslan en abscesos endodontales y periapicales, normalmente tras un procedimiento dental como cirugía, extracción o tras traumatismos. Aunque lo habitual es aislar a los miembros de este grupo en cultivo puro, pueden ir acompañados de otros microorganismos como *Bacteroides fragilis*.

Estos abscesos dentales pueden originar bacteriemias e incluso abscesos metastáticos. Aunque su papel no está claro, también se han aislado en caries dentales y enfermedad periodontal. Su ubicación aquí predispone a bacteriemias transitorias y a infecciones metastáticas.

Su ubicación oral predispone a infecciones orales, maxilofaciales, y de cabeza y cuello¹⁰⁴. Se han descrito como causa de pansinusitis aguda con bacteriemia. Son habituales en las sepsis intracraneales de origen sinusal, siendo identificados en empiemas intracraneales y orbitarios hasta en el 50% de los casos¹⁰⁵. El tratamiento de la sinusitis causada por un miembro del grupo *S. anginosus* requiere un tratamiento agresivo debido a la potencial diseminación metastática. También se han descrito en infecciones de cuello, así como en fascitis fulminante de cabeza y cuello que pueden resultar letales.

2. 7. 3. 2. Bacteriemia y endocarditis

La mayoría de las bacteriemias están relacionadas con un foco de infección identificable, en general un absceso profundo en una víscera, y cuyo origen suele ser el tubo digestivo. Se ha apreciado un aumento en la tasa de bacteriemia por estreptococos *viridans* incluyendo los del grupo *S. anginosus* en pacientes con cáncer¹⁰⁶. Las bacteriemias nosocomiales causadas por estreptococos son un problema en aumento en pacientes oncológicos neutropénicos.

Los estreptococos *viridans*, incluyendo los miembros del grupo *S. anginosus*, son responsables de hasta el 50% de los aislamientos hematológicos nosocomiales¹⁰⁷. Se han descrito bacteriemias causadas por microorganismos del grupo *S. anginosus* en neonatos y en el resto de población pediátrica, incluyendo niños con enfermedades oncológicas.

Los estreptococos *viridans* se han relacionado con el síndrome de distress respiratorio del adulto (SDRA), y con un síndrome similar al síndrome del shock tóxico en pacientes neutropénicos producido por *Staphylococcus aureus*, e incluye exantema con posterior descamación palmar, shock, SDRA y una alta tasa de mortalidad. *S. intermedius* y *S. constellatus* se han asociado a este síndrome.

La bacteriemia por microorganismos del grupo *S. anginosus* puede tener su origen en una endocarditis bacteriana o ser consecuencia de ella. Los miembros de este grupo representan entre un 5 y el 15 % de todos los estreptococos aislados en pacientes con endocarditis^{108,109}. Aunque no se producen en todos los casos, la tendencia supurativa de estos microorganismos puede dar lugar a abscesos miocárdicos o metastáticos. La endocarditis suele aparecer en una válvula cardíaca anormal.

2. 7. 3. 3. Infecciones del sistema nervioso central

Los miembros de este grupo se aíslan en el 50 -80% de los abscesos cerebrales, bien en cultivo puro o en combinación con

anaerobios¹¹⁰. Estas infecciones están relacionadas con cardiopatías congénitas, sinusitis, otitis media, hepatopatía y traumatismos directos. *S. intermedius* es el microorganismo que se aísla con mayor frecuencia en estos abscesos, y parece que su origen está en el intestino. En raras ocasiones, miembros del grupo *S. anginosus* producen meningitis. Se han aislado estas bacterias en espondilodiscitis agudas, abscesos epidurales espinales y en empiemas subdurales.

2. 7. 3. 4. Infecciones abdominales

Como comensales del tubo digestivo, no es raro encontrarlos causando infecciones en el interior de la cavidad abdominal tales como abscesos hepáticos, peritonitis, abscesos pélvicos, abscesos subfrénicos, apendicitis, infecciones de heridas abdominales y colangitis. También se han descrito casos de mediastinitis. El uso de antibióticos con poca o nula actividad frente al grupo *S. anginosus* en profilaxis o tratamiento en la cavidad abdominal, se relaciona con estas infecciones. También se ven infecciones en cirugías abdominales cuando la profilaxis no cubre estos microorganismos. No se debe olvidar su posible implicación en abscesos hepáticos, bacteriemias y cáncer silente de colon. En este tipo de infecciones, las especies del grupo *S. anginosus* identificadas más frecuentemente son *S. anginosus* y *S. constellatus*¹¹¹.

2. 7. 3. 5. Infecciones torácicas

Pueden causar neumonías por aspiración debido a su presencia en la orofaringe, seguidas de complicaciones pulmonares como abscesos pulmonares y/o empiema pleural. Estas complicaciones son más frecuentes en infecciones mixtas¹¹². Un 68% de los abscesos pulmonares y empiemas pleurales causados por estreptococos *viridans* están producidos por miembros del grupo *S. anginosus*. Hay factores predisponentes para infecciones pulmonares por miembros del grupo *S. anginosus* como son el sexo masculino, neumonía previa, alcoholismo y cáncer. Las tasas de morbilidad y mortalidad (15-30%) son altas. Al igual que en las infecciones abdominales las especies del grupo *S. anginosus* más frecuentes en infecciones de las vías respiratorias son *S. constellatus* y *S. anginosus*¹¹¹.

2. 7. 3. 6. Otras infecciones

Otras infecciones producidas por este grupo que han sido descritas son osteomielitis, artritis séptica, infecciones de la vaina de los flexores, celulitis (básicamente en usuarios de drogas por vía parenteral) y hidradenitis supurativa crónica de la región anogenital. También se han descrito abscesos periamigdalinos en infecciones mixtas que implican anaerobios junto con los miembros del grupo *S. anginosus*.

3. RESISTENCIA DE *STREPTOCOCOS VIRIDANS* A MACRÓLIDOS

La resistencia de estreptococos *viridans* a macrólidos esta mediada fundamentalmente por dos mecanismos de resistencia que confieren distintos fenotipos. Uno de ellos deriva de la alteración del lugar de unión del ribosoma, debido a la metilación de un residuo de adenina del ARN ribosómico llevado a cabo por una metilasa (adenina-N metiltransferasa), que es codificada por un grupo de genes denominados *erm* (erythromycin ribosome methylase), en estreptococos *viridans* predomina el *erm B*. Este mecanismo genera resistencia cruzada a macrólidos, clindamicina, y estreptogramina B, resultando un fenotipo MLS_B. Este fenotipo confiere un nivel alto de resistencia a macrólidos. Esta resistencia puede ser constitutiva (cMLS_B) o inducible (iMLS_B). El segundo mecanismo es una bomba de expulsión que actúa por gradiente de protones. El gen responsable de esta bomba es el gen *mef* (macrolide efflux). Habitualmente se distinguen entre dos clases: gen *mefA*, que se encontró originalmente en *S. pyogenes* y gen *mefE* en *S. pneumoniae*. Las cepas con este mecanismo de resistencia son resistentes a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, pero sensibles a los de 16, a lincosamidas y streptograminas. EL fenotipo de resistencia se denomina fenotipo

M, e implica resistencia moderada a macrólidos con unas CMI_s entre 1- 32µg/mL.

La presencia de estas bombas de expulsión en estreptococos fue establecida en 1996 por Sutcliffe y col.¹¹³. Ese mismo año, Clancy y col.¹¹⁴ identificaron el gen responsable de este sistema de bombas en *Streptococcus pyogenes* y lo designaron *mef A* (número de acceso del Gen-Bank U70055). Poco mas tarde, Tait-Kamradt y col.¹¹⁵ identifican un gen similar en *Streptococcus pneumoniae* que fue denominado *mef E* (número de acceso del Gen-Bank U83667). Estos muestran una similitud a nivel de nucleótidos del 90% (88% nivel de proteínas). EL gen *mef* codifica una proteína altamente hidrofóbica, con 12 segmentos transmembrana.

Hay autores que propusieron referirse a los dos genes como una sola clase debido a su similitud¹¹⁶. Se ha visto sin embargo que hay diferencias entre ellos, como son por ejemplo los elementos genéticos que los transportan. La diseminación de los mismos también ha sido diferente, y han sido descritos en un número distinto y creciente de microorganismos. *mef A* se ha descrito en estreptococos, mientras *mef E* se ha descrito en estreptococos y en otras 9 especies no estreptocócicas. Todos los genes detectados han sido en Gram positivos, menos 2 excepciones en *Neisseria gonorrhoeae* y *Bacteroides ovatus*.

TABLA VIII: Diseminación del gen *mef* en especies microbianas¹¹⁷

Organismo	<i>mef A</i>	<i>mef E</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+
<i>Streptococcus mitis</i>	+	+
<i>Streptococcus oralis</i>	+	+
<i>Streptococcus salivarius</i>		+
<i>Streptococcus anginosus</i>		+
<i>Streptococcus intermedius</i>		+
Grupo C <i>Streptococcus</i>		+
<i>Streptococcus sp.</i>		+
<i>Enterococcus faecalis</i>		+
<i>Enterococcus sp.</i>		+
<i>Staphylococcus aureus</i>		+
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		+
<i>Staphylococcus intermedius</i>		+
<i>Staphylococcus sp.</i>		+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		+
<i>Bacteroides ovatus</i>	±	±
<i>Granilucateella adiacens</i>		+
<i>Gemella haemolysans</i>		+

Dadas las diferencias, Corné¹¹⁷ propone diferenciarlos, hablando de estos genes como *mef* en un contexto general y especificando *mef A* o *mef E* cuando se haya discriminado entre ellos a través de métodos específicos, como pueden ser la secuenciación, hibridación con sondas, o enzimas de restricción. Después de haber realizado este trabajo y haber revisado artículos sobre el tema también es la nomenclatura que nos parece más correcta para no crear confusión y para dar información sobre el posible origen de

los genes y los elementos transferibles a los que están habitualmente vinculados.

Los estudios de resistencia y caracterización genética en estreptococos *viridans* son difíciles de comparar por el origen diverso de las muestras analizadas, y la obtención de estas unas veces de sujetos sanos y otras en sujetos con síntomas de faringitis... niños, adultos, etc.

Los estudios de resistencia en streptococos *viridans*, muestran altas tasas de resistencia a macrólidos. Los primeros estudios españoles (2001) muestran un **49%** (31 de 63 cepas) **de resistencia**¹¹⁸ en cepas obtenidas de **hemocultivos**. De estos aislados 52% (16 cepas) muestran fenotipo MLS_B constitutivo y un 48% (15 cepas) fenotipo M. Los estudios genéticos muestran que el fenotipo MLS_B coincide con el gen *erm B* en 12 cepas, y este en combinación con *mef* en 4 cepas. El gen *mef* fue también encontrado en las 15 cepas con fenotipo M. Otro estudio español del mismo año¹¹⁹ estudia personas (adultos y niños) sanas y personas con síntomas de faringoamigdalitis o controles de esta. De las cepas aisladas de sujetos **con sintomatología un 76.35 %** (226 aislados de 296) fueron no susceptibles a eritromicina. De ellas un 79,65 % (180 de 226) presentaban fenotipo M y un 20,35 % (46 de 226) fenotipo MLS_B (44 constitutivo y 2 inducible). De los aislados de **sujetos sanos un 63.4%** (45 de 71 aislados) fueron no susceptibles a eritromicina y de estos

un 86,67 % (39 de 45) presentaban fenotipo M y un 13,33 % (6 de 45) fenotipo MLS_B constitutivo. Este mismo año, 2001, hay otro estudio realizado en Grecia en **niños sanos**¹²⁰. En este caso de 200 aislados, **38,5%** (77 aislados) fueron resistentes a eritromicina (33,5% a claritromicina), y de estos 74,03% (57 de 77 aislados) presentaban fenotipo M, y 25,97% (20 de 77 aislados) presentaban fenotipo MLS_B (15 constitutivo y 5 inducible). En 2003 se publican los datos genéticos¹²¹ de 70 de las 77 cepas resistentes, coincidiendo el fenotipo M con el gen *mef* y el cMLS_B con el *ermB*. El gen *mef* predominó en todas la especies de *streptococos viridans* menos en *S. salivarius*, donde se vio una frecuencia similar de ambos genes. No se encontró ningún *erm A*, ni la coexistencia de dos genes de resistencia en ninguna de las cepas estudiadas. En Finlandia, en 2003, hay otro estudio¹²² en el que encuentran un **22,4%** (36 de 161 aislados) **de resistencia** a macrólidos en aislados procedentes de **personas adultas sanas**. La proporción de aislados resistentes fue mayor en *S. parasanguis*, *S. mitis* y *S. oralis* con un 30,4%, 30,3% y 28,0% respectivamente. Siete de los 36 aislados resistentes, es decir un 19,4%, presentaban fenotipo MLS_B (6 constitutivo y 1 inducible) y tenían el gen *ermB*. Un 80,6% (29 de los 36) expresaban el fenotipo M y confirmaron el gen *mef* en 28.

Otro estudio español del año 2004, en el que estudian 160 *S. viridans* resistentes, encuentra una proporción de 60% que presentan fenotipo M, siendo este el único fenotipo encontrado en

S. sanguis. Un 30.6 % presentan fenotipo cMLS_B y un 9.4 % iMLS_B. cMLS_B fue el fenotipo más común sólo en *S. oralis* (48.2%). Genéticamente, el gen *mef* se encontró en todas las cepas con fenotipo M y el gen *erm B* se encontró en todas los aislados con fenotipo MLS_B, bien sólo o en combinación con el gen *mef* (~45,75% de los cMLS_B y ~ 52,63% de los iMLS_B). Ningún otro tipo de *erm* fue encontrado. EL *mef E* fue predominante, encontrándose en el 95% de los estreptococos *viridans*. Solo 6 aislados presentaron el gen *mef A* (3 *S. mitis*, 2 *S. oralis* y 1 *S. sanguis*)^{123,124}. En otro estudio español del año 2005 se encuentra un **39.7%** de aislados **resistentes a eritromicina** (209 de 527 aislados de distintos tipos de muestras). De estos, un 59.3 % (124) presentan fenotipo M. Estudiaron genéticamente 50 de estos aislados y encontraron el gen *mef E* en 49 de ellos y solo 1 gen *mef A* en *S. salivarius*¹²⁵.

Como estamos viendo el fenotipo M, mediado por gen *mef*, parece mucho más frecuente que el *erm*, en estreptococo *viridans*. Hay no obstante algún estudio donde los resultados son los contrarios. Es el caso de un estudio francés de 1999, donde predomina el gen *erm*. De 35 cepas estudiadas, el 77% presentan el fenotipo cMLS_B, frente el 23% que presentan el M¹²⁶. El estudio español de Rodríguez-Avial del 2001 en aislados de hemocultivos, encuentra el fenotipo M y el cMLS_B casi al 50%, predominando este último¹¹⁸. Cerdá en 2004 también encuentra que el fenotipo cMLS_B

es el predominante en aislados de hemocultivos, no siendo así en aislados de orofaringe, y siendo *S. oralis* la especie que presenta fenotipo cMLS_B en mayor porcentaje¹²⁴. Hay algún otro estudio que describe una alta proporción del fenotipo cMLS_B, con un 50 %, en España¹²⁷ y con un 38% en Inglaterra¹²⁸. El fenotipo cMLS_B es predominante en nuestro entorno en *S. pneumoniae*. Hay estudios que describen un porcentaje del 77.3%, siendo en otros países europeos como Francia de un 87.5%, Suiza 80% o Polonia con un 100%, en contrapartida esta Grecia que describen un 100% de resistencias en *S. pneumoniae* mediadas por gen *mef*¹²⁹. En Barcelona en el año 2005 se describe una resistencia a eritromicina del 24,2%, 32,9% y 39,7% en *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y estreptococos *viridans* respectivamente. De estos presentaban fenotipo M el 47,1% de *S. pyogenes*, 59,3% de *S. viridans* y solo el 5,6% (42 aislados) de *S. pneumoniae*. Todos los *S. pyogenes* presentaron el gen *mef A* mientras en los *S. pneumoniae* 38 presentaron el gen *mef E* y 4 el *mef A*¹²⁵.

Es llamativa la ausencia de *erm A* en estreptococos *viridans*¹²¹. Solo se ha descrito en estreptococos *viridans* el gen *ermA* (subclase TR) en 2 aislados de *S. anginosus* con fenotipo MLS_B en Holanda¹³⁰. Además de en *S. pyogenes* este gen se ha encontrado en *Peptostreptococcus spp.*, en algunos aislados de estreptococos del grupo B, C Y G β-hemolíticos y en un aislado de *S. pneumoniae*¹²².

Tampoco se han encontrado los genes *erm(A)* y *erm(C)* en estreptococos *viridans*¹²⁴.

La resistencia a macrólidos se encuentra en aislados de flora normal tanto de personas sanas como enferma.

Amezaga en 2002 hace referencia a la presencia del gen *mef (A)* en una cepa sensible simplemente nombrandolo¹³¹.

4. ELEMENTOS GENÉTICOS

Los elementos genéticos en los que está integrado el gen *mef* están descritos en *S. pneumoniae*, pero estos mismos elementos se han encontrado en los *estreptococos viridans*.

El primer elemento genético que se describió fue el Tn 1207.1, por M. Santagati en el año 2000¹³² que es el elemento que integra habitualmente el *mef A*. Tiene un tamaño de 7,244 bp y presenta 8 marcos de lectura abierta (ORFs) de los cuales los 5 primeros tienen la misma dirección de transcripción mientras *orf6*, *orf7* y *orf 8* transcriben en sentido reverso. Entre *orf3* y *mef A* hay una región de integración con un alto potencial para la formación de bucles, y se pueden detectar secuencias palindrómicas indicativas de terminación por detrás de *orf1* y *orf2*. No se encontraron repeticiones terminales.

Se encontró integrado en un sitio específico del cromosoma de *S. pneumoniae*, por detrás del nucleótido adenina en posición 1676 del gen *celB*, causando una delección de 1,947 bp en el genoma de neumococo (nucleótidos 1393 a 3339 de 4139) afectando al extremo 3' de *celB* (nucleótidos 2775 to 3339 de 4139) y al extremo 5' de *orf436* (nucleótidos 1393 to 1784 de 4139).

No se encontraron homologías para los *orf1* y *orf3*, mientras que *orf2* resultó ser homólogo de una recombinasa (tabla VIII). *orf5* se inicia 119 bp por detrás del stop codon de *mef A*, y muestra homología con *msr* (SA) y *vga* (A). *msr* (SA) confiere resistencia a

macrólidos y estreptogramina B y *vga* (A) codifica resistencia a estreptogramina A. Ambos genes forman parte de la superfamilia de transportadores ABC y median la resistencia codificando bombas de expulsión. *orf6*, *orf7* y *orf8* son homólogos de 3 ORFs del Tn5252 conjugativo de pneumococo. El extremo 5' de *orf8* parece truncado, ya que su producto es homólogo al fragmento C-terminal de UmuC, una proteína relacionada con resistencia a la luz UV, codificada por Tn5252. No se conoce la función de los productos del *orf6*, *orf7* ni de los homólogos de Tn5252. Aunque no se detectó homología a nivel de nucleótidos, el fragmento *orf6*, *orf7* y *orf8* y sus homólogos en Tn5252 muestran una organización similar caracterizada por ORFs solapados. *Orf6* y *orf7* se solapan en 14 bp, y *orf7* y *orf8* en 4 bp.

Tn1207.1 debe ser considerado un transposón defectivo, ya que termina con un ORF truncado en el lado derecho. En este trabajo consiguen transferir el gen por transformación, pero no por conjugación.

La secuencia completa de nucleótidos está depositada en GenBank con el número de acceso AF227520.

TABLA IX¹³²: Homología de los ORFs de Tn 1207.1

ORF ^a	Genes homólogos ^b	Origen	Función propuesta del producto del gen	Identidad amino ácidos	Similitud de amino ácidos
orf1 (218)	Ninguno				
orf2 (370)	<i>ccrB</i> (AB014438)	mec DNA (<i>S. aureus</i>)	Recombinasa	93/294 (31%)	144/294 (48%)
	<i>cisA</i> (M29040)	elemento skin (<i>B. subtilis</i>)	Recombinasa	79/304 (25%)	139/304 (44%)
	<i>int</i> (AJ24593)	Bacteriophage A118 (<i>L. monocytogenes</i>)	Integrasa	59/196 (30%)	104/196 (52%)
	<i>tnp X</i> (U15027)	Transposon Tn 4451 (<i>C. perfringens</i>)	Recombinasa	78/312 (25%)	132/312 (42%)
orf3 (138)	Ninguno				
mefA (405)	<i>mef(A)</i> (U70055)	(<i>S. pyogenes</i>)	Macrolide-efflux protein	405/405(100%)	
orf5(487)	<i>mrs</i> (SA) (AB016613) <i>vga(a)</i> (M90056)	Plásmido pEP (<i>S. aureus</i>) Plásmido pIP (<i>S. aureus</i>)	Macrolide-resistance protein	180/471 (38%)	285/471 (60%)
			Streptogramin A-resistance protein	183/485 (37%)	283/485 (57%)
orf6 (99)	orf11 (L29324)	Tn conjugativo Tn5252(<i>S. pneumoniae</i>)	Desconocido	45/76 (59%)	61/76 (80%)
orf7 (122)	orf12(L29324)	Tn conjugativo Tn5252(<i>S. pneumoniae</i>)	Desconocido	30/96 (31%)	46796 (47%)
orf8 (117)	umuC (L29324)	Tn conjugativo Tn5252(<i>S. pneumoniae</i>)	Resistencia luz UV	70/116 (60%)	89/116(76%)

a número de aminoácidos, entre paréntesis

b Número de acceso al GenBank

En 2001 Gay y Stephens¹³³ describen el elemento genético que contiene al *mef E* en pneumococo. Tiene un tamaño de 5532-bp o 5433-bp, lo denominaron MEGA (macrolide efflux genetic assembly) y su número de acceso en GenBank es AF274302.

La secuencia de nucleótidos 5' de MEGA contiene 944-bp (33,8% guanina/citosina) que no predicen ningún ORFs ni muestra homología significativa a nivel de nucleótidos o amino ácidos en GenBank. La región final 5' de 180 bp que precede a *mef E* en MEGA es igual a las secuencia que precede a *mef A* en Tn1207.1 e incluye una región promotora. El ORF con la secuencia homologa en >99% al *mefE* empieza en la posición 1125 de MEGA.

La secuencia inmediata de 3' del *mef E* contiene un ORF de 1464-bp con la misma orientación, a la que se denominó *mel*. La proteína de este ORF muestra una similitud en el 36.2% de los aminoácidos con la *MsrA* descrita en *Staphylococcus epidermidis* (SWISS-PROT n° acceso P23212) y relacionada también con resistencia a macrólidos. En una de las cepas encuentran una región intergenética entre *mefE* y *mel* de 119-bp. Esta región contiene una secuencia de consenso Shine-Dalgarno por encima del codon de iniciación del *mel*. *mefE* y *mel* tienen un promotor común por lo que siempre se cotrascriben.

En las posiciones 4044-4342 y 4329-4641, en el extremo 3' de *mel*, hay 2 ORFs (3 y 4) con orientación opuesta a *mef E* y *mel*. Las proteínas que predicen estos ORFs son en un 52% y 38% iguales respectivamente a las predichas por los ORFs 11 y 12 del Tn5252 de *S. pneumoniae* (N° acceso del GenBank L29324). Los 4 primeros ORFs del MEGA y los ORFs 4-7 del Tn1207.1 son similares a nivel de nucleótidos en más del 94%. EL 5° ORFs del MEGA tiene orientación opuesta al *mefE*, se sitúa entre las posiciones 4711 y 5046 del MEGA, y presenta una similitud a nivel de nucleótidos del 92% con el ORF8 del Tn1207.1, del 59% con el ORF 13 del Tn5252 y un 45% con ORF U de un plasmado descrito en *Lactococcus* (N° acceso del GenBank U36837). Estos son también homólogos del *umuC* de *E. coli*. La región intergenética entre el ORF5 y ORF 4 del MEGA es diferente de las del Tn5252 y Tn1207.1. Asociado a ORF5, con inicio en la base

5449, aparece un segmento de 20 pb homólogo al punto de unión de *lexA* en *E. coli*. Las 150 pb finales de ORF5, incluyendo la secuencia de unión a LexA, son exclusivas de MEGA. Los extremos 5' y 3' de MEGA tienen repeticiones terminales invertidas imperfectas que son asimismo únicas

Estos autores describen 4 sitios de inserción del elemento MEGA en el genoma de *S. pneumoniae*. EL punto de inserción I sitúa al elemento MEGA de 5,5-kb en un ORF que codifica un homólogo de la fosfometil pirimidina kinasa de *Bacillus subtilis* en orientación opuesta del ORF cromosómico. La inserción clase II está localizada en el segmento SP-101 del genoma completo de *S. pneumoniae* a partir de la base 1003. En esta localización se encontró la inserción del 5433-bp de MEGA interrumpiendo un ORF que codifica un homólogo del ADN-3-metiladenina glicosidasa de *Haemophilus influenzae*. Este sitio de inserción también se encuentra orientado en dirección opuesta del ORF cromosómico. La secuencia de nucleótidos de 5,4-kb del elemento MEGA Clase II es idéntica, excepto por la delección de 99-bp en la región entre el *mefE* y *mel* que elimina la secuencia consenso Shine-Dalgarno por encima del codón de inicio de *mel*. EL punto de inserción III muestra un fragmento de 260-bp en el extremo 5' del MEGA que muestra una similitud del 93% con la secuencia de nucleótidos que se encuentra en el fragmento SP-15 del genoma de neumococo. Aquí, el MEGA se encuentra en la misma orientación que el ORF que codifica una

proteína homologa a la proteína Cap5D de *Staphylococcus aureus*. En el punto de inserción IV, el MEGA se inserta en el fragmento SP-28 del genoma de pneumococo, en la posición 1329, y tiene la misma orientación que el ORF que predice la codificación de una proteína homologa a la ARN-metiltransferasa de *B. subtilis*. La región intergenética entre los ORFs 1 y 2 en el elemento mega de clase I y III es de 119-bp. En los alelos MEGA de clase II y IV la región está truncada por 99 bp.

Mega tiene repeticiones invertidas imperfectas de 7-bp al final de cada inserción.

La transformación de MEGA en *S. pneumoniae* R6 da lugar a la obtención de transformantes resistentes a eritromicina con una frecuencia de $\sim 2 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\text{ADN}$.

No obstante, algunos autores¹³³ han publicado el hallazgo de genes *mef* en cepas de estreptococos *viridans* con fenotipo M de resistencia a macrólidos, en ausencia del resto de secuencias halladas tanto en MEGA como en Tn 1207. Algunos artículos refieren la presencia de *mef* en ausencia del resto de elementos con alta frecuencia, pero se ignora si se encuentra el gen aislado o asociado a algún elemento genético similar a los anteriores y si se encuentra o no asociado también a *mel*. Estas cepas eran resistentes.

La bomba de expulsión que origina el fenotipo M parece tratarse de un mecanismo de expulsión formado por dos componentes,

una bomba por gradiente de protones, que estaría codificada por el gen *mef*, y una bomba de tipo ABC, codificada por el gen *mel*. *mef* y *mel* serían cotranscritos como un solo operón, de modo que sería necesaria la presencia de ambas proteínas para que el sistema de expulsión fuera eficaz. Mel presenta además dominios similares a la de una bomba ABC ya descrita *msrA*, codificada por el gen *msrA* en *S. aureus*. No obstante, esta bomba parece capaz de originar expulsión de macrólidos de forma autónoma, lo que no sería posible en el caso de *mel*, que necesitaría la acción conjunta de *mef*.

Para ver la importancia de estos genes, los autores¹³⁴ provocan una delección en los genes *mef* y *mel* independientemente, y en los dos genes a la vez. Para ello utilizan una cepa con mega tipo II, obteniendo una reducción de las CMI para eritromicina en los mutantes con delección tanto en *mefE* (13 veces más baja) como en *mel* (22 veces más baja) comparadas con la cepa inicial. En otra cepa con inserción del mega tipo I obtienen reducciones de 2 veces la CMI con defección en *mefE* y de 9 veces con la delección en *mel*. Con la doble mutación en ambas cepas se reduce fuertemente la CMI a eritromicina con CMI < 0,15µg/ml (tabla). Con estas mutaciones tanto independientemente como juntas también se observa una reducción de la CMI para telitromicina.

TABLA X¹³⁴: CMI's de eritromicina en mutantes de mega

Cepa	CMI's µg/ml (etest)	Cepa	CMI's µg/ml (etest)
con mega tipo II	15	con mega tipo I	4,13
<i>ΔmefE</i>	1,13	<i>ΔmefE</i>	2,13
<i>Δmel</i>	0,68	<i>Δmel</i>	0,46
<i>ΔmefE Δmel</i>	0,15	<i>ΔmefE Δmel</i>	0,13
ATCC 49619	0,19		

En cuanto a la expresión de los genes en las cepas mutantes observaron, que la expresión del gen *mefE* en los mutantes de *mel* aumenta por encima de 10 veces, mientras la expresión de *mel* en mutantes de *mefE* no experimenta cambios significativos,. Esto se cumple en cepas con las dos formas de mega. Este aumento de expresión del gen *mefE* no restaura los niveles de resistencia a eritromicina

También observaron que la expresión de estos genes es inducible por eritromicina, y que la incubación de las cepas con concentraciones subinhibitorias, incrementa la expresión de los mismos.

Los mutantes de *mefE*, *mel* y dobles mutantes acumulan más eritromicina que la cepa de origen, esto indica un descenso en la expulsión de eritromicina.

La mayoría de los estudios sobre estos mecanismos de resistencia han sido realizados en *S. pneumoniae*, y son escasos los estudios disponibles sobre estreptococos *viridans*. En 2004, un estudio español sobre mecanismos de resistencia a macrólidos en

estreptococos *viridans* encuentra los genes *mefA* o *mefE* en todos los estreptococos *viridans* con fenotipo M (sobre todo *mefE*, que aparece en más del 95% de los aislamientos). En cuatro de estos aislamientos (1 *S. mitis*, y 3 *S. oralis*), los autores no encuentran gen *mel*, si bien no aportan información relativa al nivel de resistencia de estos aislamientos¹²⁴.

En 2003, Santagati¹³⁵ describe un nuevo elemento genético, esta vez en *Streptococcus pyogenes*, que transporta el gen *mefA* y confiere fenotipo M. Este nuevo elemento fue llamado Tn1207.3 y tiene un tamaño de 52 kb. En este nuevo transposón descrito se encuentra integro el Tn1207.1 con sus 7.244-bp en el final izquierdo, mientras nuevas secuencias se presentan hacia el final derecho. Este elemento se encontró insertado en un solo sitio específico del cromosoma, y es transferible por conjugación, con una frecuencia de 7×10^{-6} . La inserción de este transposón en el cromosoma *de S. pneumoniae* no causa ninguna delección, mientras el Tn1207.1 producía una delección de 1,947-bp.

EL descubrimiento de este transposón sugiere que el Tn1207.1 es un elemento defectivo, parte de un transposón conjugativo mayor.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS

Se estudiaron cepas de *Streptococcus viridans*, aislados de tomas faringoamigdalares de personas sanas.

Las muestras faringoamigdalares se sembraron en agar Mueller-Hinton con un 5% de sangre de carnero, aislándose las colonias α -hemolíticas. A éstas se les realizó una tinción de Gram y la prueba de la catalasa, de las mismas se seleccionaron los cocos Gram +, catalasa -. A continuación se les realizó la prueba de la optoquina y de la bilis, descartando las optoquina y/o bilis positivas. Se procedió a su identificación bioquímica utilizando el sistema comercial API® 20 Strep (Bio-Mérieux).

Los aislamientos se conservaron en leche (20%) a -70°C.

2. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos utilizados fueron:

- Eritromicina Etest® (Ab Biodisk)
- Eritromicina discos de 15 μ g (Oxoid)
- Clindamicina discos de 2 μ g (Oxoid)
- Eritromicina polvo valorado estándar (Sanofi-aventis)
- Claritromicina polvo valorado estándar (Sanofi-aventis)
- Josamicina polvo valorado estándar

2. 1. Determinación de sensibilidad mediante Etest®

Se estudio la sensibilidad a eritromicina de todas las cepas, mediante Etest®: se preparó un inóculo de 0.5 McFarland en caldo Todd Hewitt, y se sembraron con un hisopo estéril placas de agar Mueller-Hinton con un 5% de sangre de carnero, realizando una siembra completa y uniforme de la superficie del agar en 3 direcciones y se deja secar. A continuación se aplicaron tiras de Etest sobre el agar con la escala de CMI hacia arriba. Las placas se incubaron durante 20-24 horas a 37°C y 5% CO₂. La lectura se realizó observando el punto de intersección de la elipse de inhibición (sin tener en cuenta la hemólisis) con la tira, que será el valor de la CMI.

Interpretación de la CMI (µg/ml): R ≥ 1, I = 0.5, S ≤ 0.25 (NCCLS M100-S15).

2. 2. Dilución en agar

Se utilizó este método para ver la sensibilidad de las cepas a eritromicina, claritromicina y josamicina, así como para ver la CMI a eritromicina en presencia de reserpina (inhibidor de las bombas de expulsión).

Se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que está diluido en el medio de cultivo. Con esta técnica se

pueden determinar de manera simultánea la CMI de un gran número de cepas a un antimicrobiano (en nuestro caso 32).

Para ello se prepararon una serie de tubos (una serie por antibiótico a utilizar) con cantidades decrecientes de antibiótico, que se preparan haciendo diluciones seriadas a $\frac{1}{2}$ utilizando los disolventes y diluyentes adecuados según NCCLS (solvente: ácido acético glacial y diluyente: agua) De cada tubo añadimos un mililitro de dilución de antibiótico a placas Petri bien rotuladas a las que se añadirá agar fundido al que le acabamos de añadir sangre de carnero 5% (esto se hace a una temperatura aproximada de 50°C) y se deja solidificar. Al calcular las concentraciones de antibiótico hay que tener en cuenta la potencia del mismo. Nuestras concentraciones finales en placa van desde 128 a 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Los medios que contienen reserpina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se prepararon añadiendo al matraz de medio de cultivo la cantidad necesaria de una disolución madre de reserpina disuelta en DMSO justo en el momento de dispensar el medio de cultivo. Las placas que contienen reserpina fueron preparadas y utilizadas inmediatamente.

El inóculo se preparó haciendo una suspensión de 0.5 McFarland que posteriormente diluimos 1:10 por microorganismo a

estudiar, obteniendo una cantidad de microorganismo en cada gota depositada en el agar igual a 10⁴ UFC. Las placas se inocularon utilizando un replicador de Steer, comenzando por la placa de menor concentración de antibiótico para evitar un efecto de arrastre y con la precaución de poner al principio y final de cada serie una placa sin antibiótico como control de crecimiento. Se incubaron a 35-37 °C con 5% CO₂ durante 20 horas.

El valor de CMI para cada microorganismo y antibiótico se considera el de la placa con la menor concentración de antibiótico en la que el crecimiento bacteriano está inhibido.

Como cepa control se utilizó *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.

2. 3. Disco-placa

Se utilizó este método para ver la sensibilidad a clindamicina, y comprobar el fenotipo de las cepas.

Este método se basa en la colocación de un disco de filtro impregnado de antibiótico en la superficie de agar, el disco se humedece permitiendo la difusión del antibiótico de forma radial creando un gradiente de concentración.

2. 3. 1. Estudio de sensibilidad a clindamicina

Se utilizó como medio agar Mueller-Hinton con un 5% de sangre de carnero, que se siembra con el inóculo de forma completa y

uniforme en 3 direcciones y se deja secar, como inóculo se utilizó una suspensión con una turbidez de 5 McFarland de la cepa a estudiar. A continuación se coloca el disco de antibiótico con ayuda de unas pinzas o un dispensador y se incuban las placas durante 20-24 horas a 37°C con un 5% CO₂. Se crea un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco, se mide el diámetro de este halo y se interpreta según criterios del NCCLS M100-S15.

Interpretación: Clindamicina: R ≤ 15 mm, I: 16-18 mm, S ≥ 19 mm.

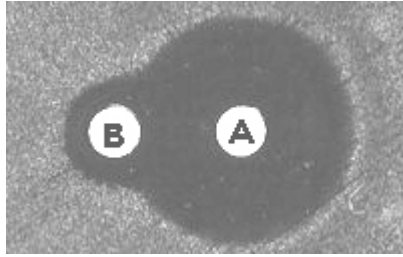
2. 3. 2. Detección del fenotipo de resistencia.

A todas las cepas resistentes a eritromicina, se las caracterizó fenotípicamente según la resistencia a los distintos macrólidos y a la clindamicina.

Para buscar fenotipos de resistencia, paralelamente a los estudios de resistencia a clindamicina, y en las mismas condiciones se colocaban un disco eritromicina (15µg) y otro de clindamicina (2 µg) separados aproximadamente unos 12mm (método descrito por Seppälä et al¹³⁶).

Interpretación:

-Si la cepa era sensible a clindamicina y resistente a eritromicina → fenotipo M



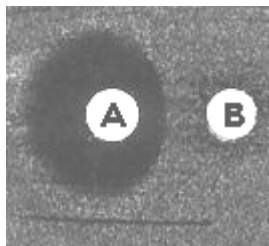
B:eritromicina, A:clindamicina.

-Si la cepa se mostraba resistente a ambos antibióticos→ fenotipo MLSB constitutivo



B:eritromicina, A:clindamicina.

-Si el halo de inhibición de clindamicina se distorsiona en las proximidades del de eritromicina → fenotipo de resistencia MLSB inducible.



B:eritromicina, A:clindamicina.

Después de esto a aquellas cepas que presentaba resistencia a eritromicina y claritromicina, pero se mantenían sensibles tanto a josamicina como a clindamicina se las catalogó como resistentes a macrólidos con fenotipo M. Las que presentaban resistencia tanto a los 3 macrólidos como a clindamicina se las catalogó como resistentes a macrólidos con fenotipo MLSB constitutivo (cMLSB) y las que se mostraron resistentes a los 3 macrólidos y el alo de inhibición de clindamicina se distorsionaba en las proximidades de

eritromicina se las catalogó como resistentes a macrólidos con fenotipo MLSB inducible (iMLSB)

3. EXTRACCIÓN DEL ADN

A todas las cepas se les extrajo el ADN para posteriormente realizar otras técnicas como amplificar distintos segmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y realizar transformaciones genéticas.

Para la extracción del ADN se sigue el protocolo de Sambrook modificado. Se siembra en 2 placas de agar sangre una colonia y se incuba durante 18h a 37°C. El contenido de estas placas de emulsiona en 5 ml de TE y se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm, se tira el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 500 µl de TE. Se toman 400 µl del inóculo en un eppendorf y se le añade 150 µl de lisozima, se incuba 1 hora en un baño a 37°C. En este paso de pre-lisis, se pretende eliminar la pared bacteriana, que en bacterias Gram positivas es muy densa.

A lo anterior le añadimos 30 µl de SDS, 10 µl de proteinasa K y se pone en baño de agua a 50°C durante 3 horas. El SDS es un detergente con el que rompemos la membrana bacteriana y desnaturalizamos las proteínas asociadas a la bicapa lipídica y con la proteasa K digerimos las enzimas asociadas al DNA, con lo que se consigue liberar el DNA.

Después de las 3 horas se añaden 500 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agita vigorosamente durante 1 minuto, se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm. Se obtienen dos fases una superior acuosa que se recoge y una inferior orgánica que se desprecia. Con la fase acuosa repetimos este procedimiento añadiendo un volumen semejante a esta de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico hasta que no se observe fase orgánica. En este paso lo que hacemos es separar los distintos componentes celulares según su solubilidad en disolventes orgánicos, así el DNA se queda en la fase acuosa mientras los restos celulares se quedan en la fase orgánica. El cloroformo desnaturaliza las proteínas y facilita la separación en fases a la vez que el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la extracción.

Al sobrenadante final se le añaden 2 volúmenes de etanol al 100% y una décima parte del volumen de acetato sódico, esto se deja 30 minutos a -70°C ó toda la noche a -20 . Así conseguimos que el DNA se deshidrate, desestabilice y precipite.

Centrifugamos durante 30 minutos a 14000 rpm, recuperando el DNA como un precipitado y rechazando el sobrenadante. El precipitado se lava con 500 μ l de etanol frío al 70% y se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm, se decanta el sobrenadante y se deja secar bien el precipitado evitando que queden restos de etanol. Por último se resuspende el DNA en agua libre de nucleasa, se cuantifica una muestra y se almacena a -20°C .

3. 1. Cuantificación del DNA.

La cuantificación se hace por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260nm y 280 nm.

Gracias a la capacidad de absorber luz ultravioleta en las proteínas como en el DNA que permite determinar la presencia de ambos compuestos en una preparación. La absorbancia a estas longitudes de onda del DNA se debe a la presencia en los nucleótidos de bases nitrogenadas que absorben a longitudes de onda de 260nm, mientras que en el caso de las proteínas aminoácidos como el Trp absorben a 280nm. De este modo ambos compuestos presentan una curva de absorbancia diferente, con picos a 260nm en el caso del DNA y 280nm en el de las proteínas.

Esta característica física permite cuantificar la presencia de ambos compuestos y, la razón de la absorbancia a estas dos longitudes de onda, valorar su pureza. En el DNA puro la razón A_{260}/A_{280} es de 1.8, por lo que una disminución de esta razón indicaría contaminación debido a la presencia de proteínas.

La cantidad de DNA obtenido se calcula teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA de doble cadena.

Para la medición utilizamos el espectrómetro BiomateTM3 (Termo Spectronic)

4. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA POR AMPLIFICACIÓN DEL ADN

A todas las cepas se les buscó el gen *mef* que codifica una bomba de expulsión de macrólidos y a toda las cepas resistentes o con sensibilidad intermedia se les buscaron los genes *ermB*, *ermTR* y *ermA* que codifican enzimas responsables de la metilación del ARN ribosómico 23S.

A varias de las muestras que amplificaron el gen *mef*, se les extrajo de nuevo el ADN y se amplificaron con una pareja distinta de iniciadores para el gen *mef* (lo llamaremos *mef'*)

4.1. Amplificación

La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se utilizó el reactivo comercial PCR Master Mix 2X (Promega, Madison, WI, USA) llevándose a cabo la reacción en un termociclador Eppendorf (Mastercycler®Personal).

La reacción se llevó a cavo en un volumen final de 50µl compuesto de:

TABLA XI

REACTIVO	VOLUMEN DE REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
PCR Master Mix,2x a	25 µl	1x
Primer directo (6.25µM)	2 µl	0.25 µM
primer inverso (6.25µM)	2µl	0.25 µM
DNA	5 µl-2 µl	<250 ng
H2O libre de nucleasas	16 µl-19 µl	

a:La PCR Mster Mix 2x comercial este compuesta de : 50 unid/ml de Taq polimerasa, 400 μ M de cada dNTP, 3mM de MgCl₂

Los iniciadores y las condiciones fueron específicos en cada caso.

Iniciadores:

TABLA XII:

mef-d	AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC
mef-r	TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG
ermB-d	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA
ermB-r	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TA
ermTR-d	AGA AGG TTA TAA TGA AAC AGA A
ermTR-r	GGC ATG ACA TAA ACC TTC AT
ermA-d	CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AG
ermA-r	TCT AAA AAG CAT GAT AAA GAA
mef'-d	GCT GGG TAA TCA AGT GCA
mef'-r	ACC CAA TTG GCA TAG CA

Condiciones:

- *Mef*: Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 94°C, hibridación 1 minuto a 50°C, extensión 1 minuto a 72°C), extensión final 10 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.
- *ermB*: Desnaturalización inicial a 93°C durante 3 minutos, 35 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 93°C, hibridación 1 minuto a 53°C, extensión 1 minuto a 72°C), extensión final 5 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.
- *ermTR* y *ermA*: Desnaturalización inicial a 93°C durante 5 minutos, 35 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 93°C, hibridación 30 segundos a 52 °C, extensión 30 segundos a

72°C), extensión final 5 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.

- *Mef*: Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 94°C, hibridación 1 minuto a 53°C, extensión 1 minuto a 72°C), extensión final 5 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.

4. 2. Detección del amplificado

Para confirmar la amplificación de las secuencias del gen se somete a los productos obtenidos de la PCR a una electroforesis en gel de agarosa al 2% (1g agarosa (Promega. USA) + 50ml TBE 5x), aplicando un voltaje constante de 75V, y visualizándose posteriormente mediante luz UV previo revelado con bromuro de etidio (10mg/ml), ya que este compuesto es un agente intercalante en el DNA visible con luz UV .

Los geles se cargaron en cada carril con una mezcla de 5 µl de agua libre de nucleasa, 5 µl de ADN amplificado y 2 µl de tampón de carga Blue/Orange Loading Dye 6x (Promega, Madison, WI, USA). Como marcador de peso molecular se utiliza el 100 bp Marker (Promega, Madison, WI, USA). La electroforesis se realiza en una cubeta horizontal Minicell®Primo (Bio Rad).

El gel se analiza en un transiluminador para comprobar la amplificación y los datos son procesados con el analizador de imágenes Scion Image (TDI, Madrid).

4. 3. Purificación del amplificado

Previo a la secuenciación se realiza la purificación del amplificado para eliminar restos de dNTPs e iniciadores que puedan interferir posteriormente.

Esta purificación se realizó por el método de columnas cromatográficas usando MicroSpin S-300 HR Columnas (Amersham Biosciences) siguiendo el protocolo general del comerciante, para ello primero se resuspende la resina de la columna, se desenrosca el tapón un poco y se rompe la parte de debajo de la columna, se coloca en un tubo colector y se centrifuga 1 minuto a 735 g, se pone la columna en un tubo nuevo, se le quita el tapón y se dispensa la muestra (25-50 μ l) en el centro de la resina, se centrifuga 2 minutos a 735 g. La muestra purificada se recoge en el tubo.

O bien con Exo SAP-IT® (usb) según indicaciones del fabricante. Para la limpieza se cogíamos 5 μ l de DNA (amplificado) y 2 μ l del producto de limpieza, conservándolo durante su uso siempre en hielo. La muestra la llevamos al termociclador : 15' a 37°C, 15' a 80°C y mantenimiento a 4°C. La muestra tratada la guardamos a -20°C.

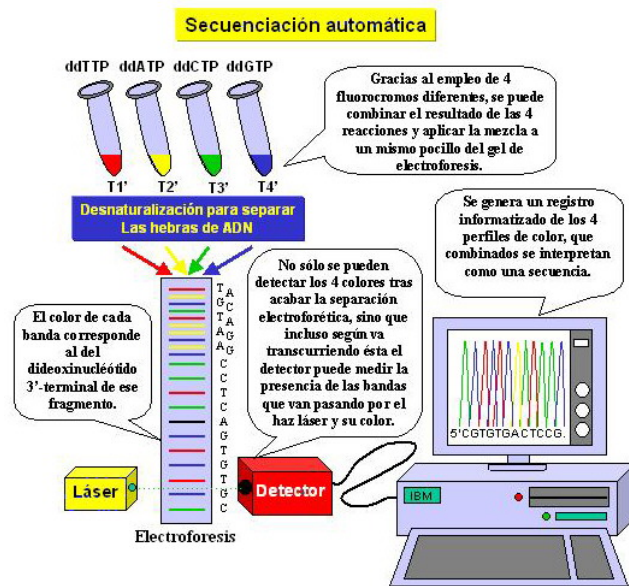
4. 4. Secuenciación de los productos de PCR

En este paso obtenemos la secuencia de nucleótidos que tiene el fragmento amplificado por PCR. Se basa es el método descrito por Sanger y cols. en 1977, utiliza una mezcla de desoxinucleótidos y dideoxinucleótidos. Así se van incorporando desoxinucleótidos a la copia de ADN molde, pero cuando se incorpora un dideoxinucleótido, el fragmento de ADN que se estaba fabricando queda interrumpido.

Una vez que tenemos la muestra purificada se llevó a secuenciar por un método automático, secuenciador automático 377 DNA Sequencer ABI PRISM (Pekin Elmer) basado en el marcaje fluorocrómico diferencial de los primers y posterior separación electroforética de los amplificados.

El resultado de la secuenciación automática es un cromatograma que con los programas informáticos adecuados (Chromas, Chromas Pro...) es procesado y convertido en la secuencia de nucleótidos del ADN estudiado, nosotros utilizamos el Chromas (versión 1.45).

La cantidad de muestra que llevamos a secuenciar son 5 μ l que contenga 100-150 ng de ADN a la que añadimos 3 μ l de iniciador a una concentración 10 μ M.



Para la secuenciación automática se separan cuatro alícuotas del primer directo, y cada alícuota se marca con fluorocromo: fluoresceína, NBD, rojo de Tejas o tetrametilrodamina. En cada alícuota se realiza una PCR a la que se añade un único dideoxinucleótido trifosfato (ddNTP) en una proporción tal que se detiene la polimerización en las distintas posiciones en las que se haya incorporado el ddNTP. Las cuatro reacciones de PCR se mezclan y se realiza una electroforesis en una sola calle. El resultado es que en esta calle del gel de poliacrilamida se obtiene un continuo de bandas de distintos colores según el ddNTP en el que se ha detenido la reacción, y cada una de ellas corresponde a un conjunto de amplificadas del mismo tamaño. Por último, una célula fotométrica analiza las señales de color y transmite los datos a un ordenador.

4. 5. Análisis de las secuencias de ADN

Existen varios programas informáticos (BLAST, Clustal W...) que nos permiten caracterizar, identificar y comparar nuestras secuencias mediante el alineamiento múltiple de nuestra secuencia con las existentes en la base de datos del programa o bien convertirla en secuencia aminoacídica. Nosotros empleamos el programa BLAST 2.2.13 disponible vía Internet en la red del "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

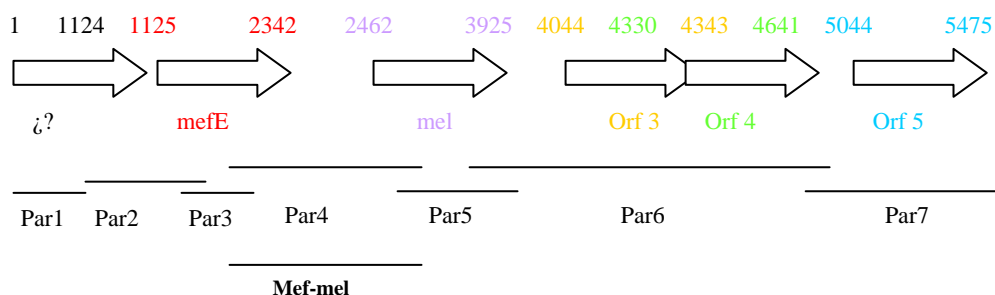
Las referencias del genBak más usadas han sido:

- genBank U70055: *mef*(A).
- genBank U83667: *mef* (E).
- GenBank AF 2743020: MEGA.
- GenBank AF227520: Tn 12.07.1

5. BUSQUEDA DEL ENTORNO GENÉTICO

En todos los aislados que se detecto el gen *mef*, buscamos los elementos MEGA y Tn 1207.1 para ello utilizamos la amplificación por PCR.

Primero buscamos el elemento MEGA, para ello dividimos el elemento en 7 partes y diseñamos una pareja de iniciadores para cada parte, llamando a cada parte par1 (22-816), par2 (690-1484), par3 (1405-2148), par4 (2032-3038), par5 (2980-3960), par6 (3840-4941) y par7 (4881-5508) (el par3 queda dentro del gen *mef*).



La amplificación se llevo a cabo como se ha explicado anteriormente con los iniciadores y condiciones siguientes:

Iniciadores:

TABLA XIII:

par1-d	GTA GTC AAG GAG TAA AAC GC
par1-r	CAT AGT TTC GGT TCC TCC TA
par2-d	TCC TTT AAA TCT GGC ATC GA
par2-r	GGT ATG AAA AGC TGT TCC AA
par3-d	TTG CAT TCT GTA TGG AGC TA
par3-r	CAG GCT TAA TTT TCT CCT GA
par4-d	GAA TAC TTC CTC CAA ATG GA
par4-r	TAC GTT CTT CCT CTT TCT GA
par5-d	AAT CAC TGA GTA TTG GGG AA
par5-r	GAA CAG ACT ATT ACT GAC CA
par6-d	TTA TCA CCC CAG ATA AAC GA
par6-r	CTT CAA AAC TTC GTC AGA GA
par7-d	GCA TGT ACT AGT CGT ATC GA
par7-r	TAA TAG ACG AAA GGG TGT GA

Condiciones:

- Par1, par3, par4 y par5, : Desnaturalización inicial a 92°C durante 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 92°C, hibridación 30 segundos a 53°C, extensión 1 minuto a 72°C), extensión final 5 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.

- Par2 y par6: Desnaturalización inicial a 92°C durante 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 92°C, hibridación 30 segundos a 54°C, extensión 1 minuto a 72°C), extensión final 5 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.
- Par7: Desnaturalización inicial a 92°C durante 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 92°C, hibridación 30 segundos a 54°C, extensión 30 segundos a 72°C), extensión final 5 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.

Se utilizaron otros primers para amplificar y secuenciar la zona queda entre el gen *mef* y el gen *mel* ya que con los primers anteriores había zonas que nos interesaban y no se cogían o daban problemas. A estos primers los llamamos mef-mel d y mef-mel r cogiendo la zona que comprende entre la base 2017 y 3101.

Para ello se utilizó el reactivo comercial Fidelitaq™ PCR Master Mix 2X (USB Corporation, Ohio, USA) llevándose a cabo la reacción en un termociclador Eppensorf.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50µl compuesto de:

TABLA XIV:

REACTIVO	VOLUMEN DE REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
FideliTaq™ Master Mix	25 µl	1x
Primer directo (6.25µM)	2 µl	0.25 µM
primer inverso (6.25µM)	2µl	0.25 µM
DNA	5 µl-2 µl	<500 ng
H2O libre de nucleasas	16 µl-19 µl	

a:La FideliTaq PCR Mster Mix 2x comercial este compuesta de : USB RecombinantTaq DNA Polimerasa, 0.4 mM de cada dNTP, 3mM de MgCl2

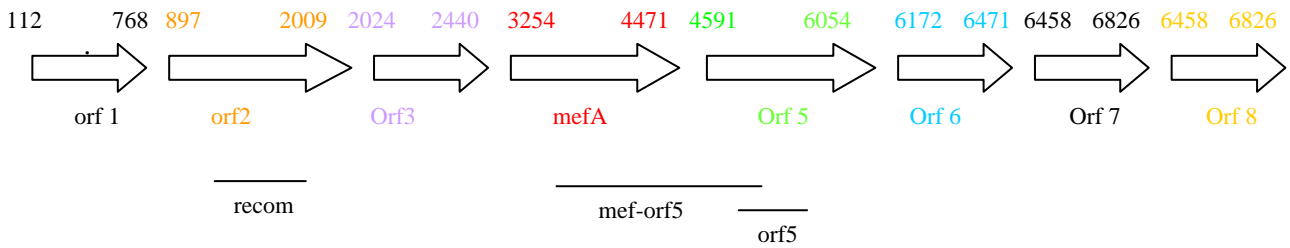
Los Primers y condiciones fueron:

TABLA XV:

mef-mel d	GTT TAG CCG TTT CGG GAA
mef-mel r	CCG CAG CCC TTT CCA A

Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 38 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 94°C, hibridación 1 minuto a 52°C, extensión 3 minutos a 72°C), extensión final 10 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.

En las cepas donde no se detecto el elemento MEGA se buscó el transposón 1207.1, se diseñaron 3 parejas de iniciadores así amplificamos 3 partes distintas, llamándolas: recom (1153-1668) mef-orf5 (4229-4723), orf5 (4699-5213)



Iniciadores:

TABLA XVI:

recom-d	ACC AAG GTG CAT CAG GAA
recom-r	TCC AAC GCT CCA AAC CA
mef-orf5-d	TTT TAC AGC GGT GTG CA
mef-orf5-r	TGC TTT TTC CTG CAC CA
orf5-d	GAG CAA ATG GTG CAG GA
orf5-r	GAG CAC GTT CCG CAA

Condiciones:

- Recom, orf5 y mef-orf5: Desnaturalización inicial a 92°C durante 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 92°C, hibridación 30 segundos a 56°C, extensión 30 segundos a 72°C), extensión final 5 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.

6. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Consiste en la incorporación de ADN liberado en el medio circundante por células receptoras que lo incorporan en su genoma. Nosotros queremos ver si el gen *mef* es capaz de transformar y en que circunstancias.

Realizamos la transformación basándonos en el método descrito por Lacks. La realizamos en *S. pneumoniae* R6, con ADN genómico de *Streptococcus viridans* y utilizando el medio AGCH (descrito en anexo).

Primero obtuvimos células competentes, tras varios pasos de dilución (crecimiento hasta una DO₆₂₀ ~ 0.25) en medio AGCH, con sacarosa al 0.2% y cloruro cálcico 100µM, en agitación. Estas células se diluyeron 1:20 en el mismo medio con sacarosa y CaCl₂ y se mantuvieron 20 min a 30°C. A 1 ml de células competentes se añadió en un volumen máximo de 50 µl 1 µg de ADN genómico. Las células se mantuvieron 40 minutos a 30°C para que tuviera lugar la captación de ADN y 90 minutos a 37°C para la expresión de los genes o nuevos alelos adquiridos. A continuación sembramos las células en agar sangre y en agar sangre con 1µg/ml de eritromicina, y las guardamos a -80°C con un 20% de glicerol.

Una vez que crece el *S. pneumoniae* en los medios sólidos, extraemos el ADN y buscamos el gen *mef* como se describió anteriormente.

7. RAPD

La técnica de RAPD (random amplified polymorphic DNA) o DNA polimórfico amplificado al azar consiste en una amplificación de áreas específicas distribuidas al azar del ADN cromosómico a estudiar, con la que podemos detectar rápidamente polimorfismos genómicos, empleando una secuencia de iniciador arbitraria en una reacción en cadena de la polimerasa convencional. La PCR se realiza en condiciones de baja astringencia que aseguran una generación de productos reproducibles y específicos de la cepa en cuestión, que serán posteriormente analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa.

La técnica de RAPD ha sido empleada en numerosas aplicaciones: detección de la diversidad entre cepas, mapeado genético, análisis de poblaciones, epidemiología, demostración de relaciones taxonómicas y filogenéticas...Esta técnica se usa ampliamente debido a su capacidad para detectar rápidamente polimorfismos en un variado número de diferentes loci empleando tan sólo cantidades muy pequeñas de ADN cromosómico, del orden de nanogramos. Además, el RAPD puede llevarse a cabo en organismos en los que no exista o sea muy escasa la información concerniente a su secuencia u organización genómica, siendo de este modo posible analizar polimorfismos en prácticamente

cualquier organismo en el que sea posible aislar su ADN cromosómico de manera relativamente pura.

Para la realización de esta técnica se emplea el kit comercial Ready-To-Go RAPD Análisis Beads (Amersham Biosciences). Una vez extraído el ADN cromosómico molde de cada cepa a estudiar se hace una mezcla de :

- 5-50 ng de ADN disuelto en 5µl de agua destilada libre de nucleasas.
- 25 pmoles (5µl una vez reconstituido) del oligonucleotido iniciador número 1 del kit (previa selección haciendo un RAPD con 2 cepas y todos los iniciadores).
- 15µl de agua destilada libre de nucleasas

Todo esto mezclado en los tubos (Análisis Beads) proporcionados por el kit. En estos tubos se encuentran liofilizados una mezcla de Taq polimerasa y fragmento Stoffel, dNTPs (0.4 mM como concentración final en los 25 µl de volumen final de reacción), BSA (2,5 µg), y tampón (MgCl₂ 3 mM, KCl 30 mM y Tris 10 mM, pH 8.3). Se mezcla bien y se llevan los tubos al termociclador. Las condiciones de amplificación son: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 45 ciclos (desnaturalización 1 minuto a 95°C, hibridación 1 minuto a 36°C, extensión 2 minutos a 72°C), extensión final 10 minutos a 72°C y parada de reacción a 4°C.

Una vez terminada la amplificación, el análisis de los fragmentos obtenidos se realizó sometiendo a una electroforesis convencional en gel de agarosa de 20 cm al 2%, dejando correr el gel durante dos horas a 150V. Se tiñe el gel con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se visualiza y fotografía mediante un transiluminador de luz ultravioleta mediante cámara conectada a ordenador y software.

Las imágenes de los geles se obtuvieron mediante el programa de tratamiento de imagen 1-D Manager (TDI. S.A., Madrid, España).

La representación gráfica de la distancia/similitud entre los aislados se calculó mediante dendograma. Para ello se utilizó el programa TDI Lane Manager 2.0 (TDI S.A., Madrid, España).

8. CRECIMIENTO A CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS

Sometimos a alguna cepa a un crecimiento continuo en presencia de eritromicina a unas concentraciones que no afectaran a su crecimiento, para ver si después de varios días llegaban a expresar resistencia al antibiótico.

Para hacer esto lo primero que se realiza es un crecimiento en microplaca con caldo Todd Hewitt y eritromicina a concentraciones decrecientes, haciendo los cálculos oportunos para que las concentraciones finales de antibiótico una vez inoculada la placa vayan desde la CMI decreciendo, dejando siempre un pocillo control sin antibiótico. Se inocula la placa con el

microorganismo para tener una concentración final de 10⁴ UFC. Y una vez inoculada se incuba a 35-37 °C con 5% CO₂ durante 20 horas. Una vez incubada la placa se realiza un recuento de los pocillos que presenta una turbidez parecida a la del control incluido este, para ello se hacen diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 y se siembran 10 µL de cada dilución en placas de agar sangre, se hace la media del crecimiento y se elige la concentración donde el crecimiento es similar al del control. Esta es la concentración de antibiótico que se pondrá en el crecimiento continuo.

Antes de empezar con el crecimiento continuo se preparan placas de agar sangre con concentraciones de antibiótico a 4X CMI, 8 X CMI, 16X CMI y 32 X CMI de la cepa a estudiar, de la forma comentada en el apartado de sensibilidad, dilución en agar.

Se preparan 2 series de tubos de caldo de Todd Hewitt una sin antibiótico para los pases control y otra con eritromicina a la concentración calculada anteriormente.

EL primer día de la serie preparo una dilución del microorganismo a estudiar a una concentración de 0.5 McFarland, y de aquí inoculo 100µl en un tubo control y en otro con antibiótico rotulándolos bien como 1º día, se incuban se incuba a 35-37 °C con 5% CO₂ durante 20 horas y se toma una alícuota de 100 µl de estos tubos y se pasa a otros rotulando como 2º día y volviendo a incubar, esto se realiza durante 15 días seguidos. Cada día del cultivo en caldo que

obtenemos vamos a guardar una alícuota bien rotulada a -70°C . Y se van a sembrar diariamente para recuento, tanto la serie control como la serie con antibiótico en las placas preparadas anteriormente con concentraciones de antibiótico a 4X CMI, 8 X CMI, 16X CMI y 32 X CMI y placas sin antibiótico. En las placas con antibiótico sembramos alícuotas de 100 μl y en las sin antibiótico hacemos diluciones de 100 μl en 1000, 10^5 y 10^6 sembrando posteriormente 10 μl (esto habrá que tenerlo en cuenta posteriormente para los recuentos).

9. ANEXO

Composición de los reactivos utilizados

Soluciones

EDTA 0.5M pH 8

- 186 g de Na₂EDTA-H₂O (Sigma, USA).
- Añadir 800 ml de agua destilada
- Disolver agitando por calor y ajustar pH con NaOH (Panreac, España).
- Enrasar a 1l con agua y esterilizar (121°C 15')

Tris HCl 1M pH8

- 121.1 g Tris base (Sigma, USA).
- Añadir 800 ml agua y ajustar pH con HCl (Merk, Alemania).
- Enrasar a 1l con agua y esterilizar.

SDS 10% pH 7.2

- 10 g SDS (Biorad, USA).
- Añadir 90 ml agua destilada y disolver calentando 68 °C.
- Ajustar pH con HCl y enrasar a 100 ml.

Acetato sódico 3M pH 5.2

- 20.4 g AcONa 3H₂O (Sigma, UK)
- Añadir 40 ml agua destila y ajustar pH con acético glacial (Panreac, España)
- Enrasar a 50 ml y esterilizar.

Lisozima

Disolver 1g de lisozima (Sigma. USA) en 10 ml de agua estéril y conservar a -20°C.

Proteinasa K

Disolver 10mg de proteinasa K (Sigma. USA) en 1 ml de agua estéril y conservar a -20°C.

Bromuro de etidio

Disolver 20 mg de Bromuro de etidio (Sigma, USA) en 1 ml de agua y conservar protegido de la luz a 4°C.

Tampones**TE**

- 10 mM Tris ClH
- 1mM EDTA

TBE (Tris borato) 5X

- 54 g Tris base
- 27.5 ácido bórico
- 20 ml EDTA 0.5M
- Enrasar a 1 L y almacenar a T^a ambiente

Medio de transformación AGCH**AGCH**

- | | | |
|-------------------------------|--------|--------------------|
| ▪ Pre-CH | 400 ml | |
| ▪ Addition Mixture | 10 ml | |
| ▪ Albúmina (4%) | 5 ml | |
| ▪ Enzcas (5%) | 8 ml | |
| ▪ Bicarbonato Sódico (8%) | 2 ml | (Panreac. España)) |
| ▪ MgCl ₂ (0.5g/ml) | 0.4 ml | (Merck. USA.) |
| ▪ Catalasa (3000u/ml) | 0.4 ml | |

- Triptófano (5mg/ml) 1.8 ml (Merck. USA.)

Conservar a 4°C

PRE-CH

Para 4 litros de agua destilada

- K₂HPO₄ 34 g (Merck. USA)
- Bacto-Casamonoácidos 20 g (Disco. USA)
- Na-Acetato 5 g (Merck. USA)
- L-Triptófano 26 mg
- L-Cisteina HCl 126 mg (Eastman)

Llevar a pH 7.5-7.8, distribuir en botellas de 400ml y esterilizar en autoclave

ADITION MIXTURE

- Asparagina 2 g (Merck. USA)
- Adenina 200 mg (Sigma. Alemania)
- Agua destilada 900 ml

Calentar para disolver, enfriar y añadir:

- Glutamina 400 mg (Sigma. Alemania)
- Colina 200 mg (Sigma-Aldrick. USA.)
- Cloruro cálcico 10% 2.5 ml (Sigma. Alemania)
- Adams I 40 ml
- Adams II 40 ml

Ajustar a pH 7 con 1.5 ml de NaOH 4N y llevar a 1 litro.

Esterilizar por filtración. Conservar en nevera cubierto con papel aluminio.

MEDIO ADAMS I

Para 400 ml:

- Biotina 0.25 mg (Sigma-Aldrich. USA)
- Ácido Nicotínico 120 mg (Merck. USA)
- Piridoxina 120 mg (Sigma. USA)
- Pantotenato-Ca 480 mg (Sigma. USA)
- Tiamina 120 mg (Sigma. USA)
- Riboflavina 60 mg (Sigma. USA)

Disolver en 400 ml de agua destilada y llevar a pH 7 (0.5-1 ml de 4N NaOH). Esterilizar en agua hirviendo durante 15 minutos y filtrar con millipore. Conservar a 4°C cubierto con papel aluminio.

MEDIO ADAMS II

- FeSO₄ + 7 H₂O 50 mg (Merck. USA)
- CuSO₄ + 5 H₂O 50 mg (Merck. USA)
- ZnSO₄ + 7 H₂O 50 mg (Merck. USA)
- MnCl₂+ 4 H₂O 2 mg (Merck. USA)

Disolver en 100 ml de agua esteril. Esterilizar en agua hirviendo durante 20 minutos, enfriar y filtrar . Conservar a 4°C.

ALBÚMINA 4%

Disolver en agua el producto (Merck. USA) y ajustar a pH 7.5. Filtrar (filtros de 0.45).

Guardar a 4°C.

ENZCAS 5%

Disolver 10g de hidrolizado enzimático de caseína (Pronadisa.

España) en 200 ml de agua.

Calentar para disolver. Esterilizar por filtración.

CATALASA

Disolver la catalasa (Calbiochem. Alemania) en 19.9 ml de solución salina (0.85%) y 0.1 ml de K₂HPO₄ 1M.

Una vez disuelta filtrar con filtros millipore y guardar en nevera.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

La identificación de las 90 cepas de estreptococos *viridans* estudiadas mostró que la especie más frecuente fue *Streptococcus mitis* (53 aislamientos, 58.9%), seguido de *Streptococcus oralis* (18 aislamientos, 20%), *Streptococcus sanguis* (11 aislamientos, 12.2%), *Streptococcus salivarius* (5 aislamientos, 5.5%), *Streptococcus constellatus* (2 aislamientos, 2.2%) y *Streptococcus mutans* (1 aislamiento, 1.1%).

En conjunto, el 68.9% de los aislamientos estudiados (62 aislamientos) fueron resistentes a eritromicina, y un 1.1% (1 aislamiento) presentaron sensibilidad intermedia. Los resultados de sensibilidad a macrólidos de estos aislamientos, distribuidos por especies, aparecen reflejados en la Tabla XVII.

Tabla XVII. Sensibilidad a macrólidos de las cepas estudiadas.

ANTIMICROBIANO	Especie (n° cepas)	CIM50	CIM90	Intervalo	% resistencia
Eritromicina	<i>S. mitis</i> (53)	2	128	128-0.02	73.6
	<i>S. oralis</i> (18)	2	128	128-0.05	66.7
	<i>S. sanguis</i> (11)	4	64	128-0.05	90.9
	<i>S. salivarius</i> (5)	0.1	2	2-0.05	20.0
	<i>S. constellatus</i> (2)	0.05	0.1	0.1-0.05	0
	<i>S. mutans</i> (1)	0.05	0.05	0.05	0
Claritromicina	<i>S. mitis</i> (53)	2	128	128-0.005	73.6
	<i>S. oralis</i> (18)	1	128	128-0.02	66.7
	<i>S. sanguis</i> (11)	4	64	128-0.1	90.9
	<i>S. salivarius</i> (5)	0.05	1	1-0.005	20.2
	<i>S. constellatus</i> (2)	0.1	0.1	0.1	0

	<i>S. mutans</i> (1)	0.01	0.01	0.01	0
Josamicina	<i>S. mitis</i> (53)	0.2	16	128-0.01	
	<i>S. oralis</i> (18)	0.1	128	128-0.05	
	<i>S. sanguis</i> (11)	0.2	4	128-0.05	
	<i>S. salivarius</i> (5)	0.05	0.1	0.1-0.02	
	<i>S. constellatus</i> (2)	0.1	0.5	0.5-0.1	
	<i>S. mutans</i> (1)	0.1	0.1	0.1	

Los fenotipos de resistencia por especies, y el global, aparecen reflejados en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII:

Especie (n° aisl.)	Fenotipo	N° aislamientos (%)
<i>S. mitis</i>	cMLSB	7 (17.9)
	M	32 (82.1)
<i>S. oralis</i>	cMLSB	4 (33.3)
	M	8 (66.7)
<i>S. sanguis</i>	cMLSB	1 (10.0)
	M	9 (90.0)
<i>S. salivarius</i>	cMLSB	0 (0.0)
	M	1 (100.0)
<i>S. constellatus</i>	cMLSB	0 (0.0)
	M	0 (0.0)
<i>S. mutans</i>	cMLSB	0 (0.0)
	M	0 (0.0)
TOTAL	cMLSB	12 (19.35)
	M	50 (80.65)

Los resultados fenotípicos muestran que el fenotipo más frecuente es el fenotipo M (50 aislamientos, 80.65%), mientras un 19.35% (12 aislamientos) mostraban fenotipo MLS_B. EL fenotipo MLS_B fue en todas ellas constitutivo, y no se detectó ningún fenotipo MLS_B inducible.

El estudio genómico de los mecanismos de resistencia mostró que todas las cepas con fenotipo M eran portadoras del gen *mef*. En 25 de ellas el estudio de la CIM de eritromicina en presencia y ausencia de reserpina mostró que dicha resistencia estaba efectivamente vinculada a la actividad expulsiva de la bomba, ya que la CIM, en presencia de reserpina, se redujo al menos 1 dilución (intervalo de reducción [1-7] concentraciones, moda 2 diluciones).

Tabla XIX: Reducción de las CIMs de eritromicina en cepas con fenotipo M en presencia de reserpina (20 mg/l).			
	MIC50	MIC90	Intervalo
Eritromicina	8	16	64-2
Eritromicina+Reserpina	2	4	8-0.02

En las cepas con fenotipo MLSB, se determinó la presencia de genes *ermA*, *ermB* y *ermTR*. Todas las cepas que mostraban este fenotipo eran portadoras del gen *ermB*. Once de estos 12 aislamientos eran portadores, además, del gen *mefE*. Únicamente se encontró el gen *ermB* aislado en un aislamiento de *S. oralis*. No se observó diferencia en la sensibilidad a macrólidos entre las cepas portadoras de *ermB* y las portadoras de *ermB* y *mefE*.

Entre las cepas resistentes a macrólidos con fenotipo M y portadoras del gen *mef*, la secuenciación de dicho gen mostró que tres aislamientos (1 *S. sanguis* y 2 *S. mitis*) eran portadores del gen *mefA*, y las 47 restantes del gen *mefE*. En todas ellas se determinó el elemento genético en que se hallaba incluido el gen *mef*, observándose que, en los tres aislamientos portadores de *mefA*, este gen estaba incluido en un trasposón Tn1207.1, descrito inicialmente en *Streptococcus pyogenes*, mientras que todos los *mefE* aparecían incluidos en un Macrolide Efflux Genetic Assemble (MEGA), más frecuente de manera habitual en *Streptococcus pneumoniae*.

Es bien conocido que el nivel de expresión de los mecanismos de resistencia vinculados a bombas de expulsión es muy variable. Como consecuencia de ello, en otros microorganismos grampositivos se ha descrito la presencia de genes codificadores de bombas de expulsión tanto en aislamientos resistentes como en microorganismos con CIMs en torno al punto de corte, o incluso claramente por debajo. De hecho, en algunos casos, como es el de la presencia de bombas *norA* en *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolonas, lo habitual es que la actividad expulsiva que genera en condiciones basales no de lugar a CIMs por encima del punto de corte, y sólo en circunstancias que modifican este nivel de expresión, como puede ser la presencia de

mutaciones en el promotor, estas CIMs se pueden incrementar hasta niveles que entren claramente en el intervalo de resistencia. Por ello, se planteó realizar una búsqueda de genes *mef* en cepas de estreptococos *viridans* sensibles a macrólidos. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente 23 aislamientos sensibles (9 *S. mitis*, 1 *S. sanguis*, 6 *S. oralis*, 4 *S. salivarius*, 1 *S. mutans*, 2 *S. constellatus*), con CIMs de eritromicina que oscilaban entre 0.01 y 0.2 mg/l. Se detectó mediante PCR la presencia del gen *mefE* en 15 de los 23 aislamientos estudiados (65.2%). No se detectó en caso alguno la presencia de *mefA*. La distribución de especies y la presencia de *mefE* aparecen reflejadas en la Tabla XX.

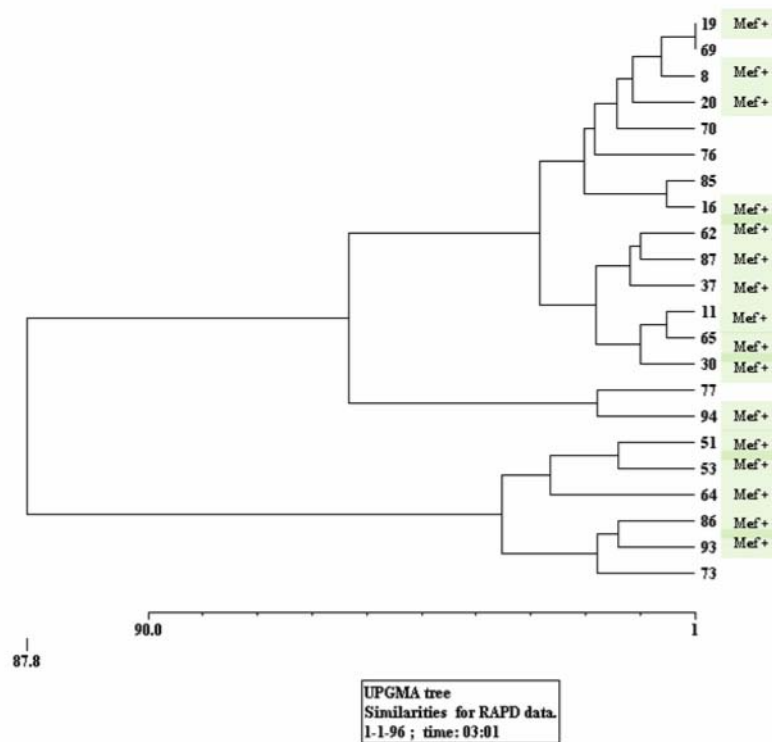
Tabla XX. Presencia de genes *mef* en aislamientos de estreptococos *viridans* sensibles a macrólidos

Especies	Nº cepas	Presencia de <i>mefE</i> Nº cepas (%)	Presencia de <i>MEGA</i> Nº cepas (%)
<i>S. mitis</i>	9	4 (44.4%)	1 (25%)
<i>S. sanguis</i>	1	1 (100%)	1 (100%)
<i>S. oralis</i>	6	4 (66.7%)	-
<i>S. salivarius</i>	4	3 (75%)	-
<i>S. mutans</i>	1	1 (100%)	-
<i>S. constellatus</i>	2	2 (100%)	2 (100%)

Aunque las cepas procedían de pacientes distintos de origen ambulatorio, lo que hacía poco probable la relación clonal entre cepas obtenidas de distintos pacientes, esta ausencia de

clonalidad se corroboró mediante RAPD. Para ello, se estudiaron mediante esta técnica las 23 cepas sensibles que mostraban presencia de *mef*, junto con una serie de cepas sensibles, *mef*(-), y una serie de cepas resistentes portadoras de gen *mef*, pertenecientes a diferentes especies. Los resultados del RAPD mostraron que existe una proximidad genética considerable entre las cepas de estreptococos *viridans*, pero que esta similitud no es mayor entre las cepas de la misma especie, sensibles a macrólidos y portadoras de *mef*, que entre cepas de la misma especie no portadoras de los mismos elementos genéticos, o incluso entre cepas de distintas especies. Por tanto, no estábamos ante la difusión de una cepa portadora de una característica genética poco habitual, sino más bien ante una situación, la presencia del gen *mef* en ausencia de resistencia a macrólidos, relativamente frecuente en estreptococos *viridans*. Aunque el bajo número de cepas de cada especie limita la fiabilidad de los datos, lo que sí se puede afirmar es que, en todas las especies en que se encontraron cepas sensibles, se encontró que alguna de ellas era portadora de *mef*, y que en todas ellas la proporción de cepas *mef* (+) era superior al 50%. (Figura I).

Figura 1. Dendrograma del estudio de RAPD de cepas de estreptococo *viridans* sensible a macrólidos, portadoras y no portadoras del gen *mef*.



Una vez comprobada la presencia del gen *mefE*, se determinó su sensibilidad a eritromicina en presencia y ausencia de reserpina, comprobándose que no había reducciones significativas de CIM en presencia de la misma, lo que indicaba que la actividad expulsiva era mínima o nula.

Tabla XXI: Reducción de las CIMs de eritromicina en cepas sensibles a macrólidos, *mef* (+), en presencia de reserpina (20 mg/l).

	MIC50	MIC90	Intervalo
Eritromicina	0.05	0.2	0.5-0.05
Eritromicina+Reserpina	0.02	0.05	0.1-0.01

A continuación se procedió a la secuenciación del gen *mefE* completo, comprobándose que no existían mutaciones internas de dicho gen que justificaran alteraciones en su actividad expulsiva.

Finalmente, se determinó el elemento genético portador de estos genes *mefE*. En cuatro de los 15 aislamientos (26.7%) se detectaron mediante PCR fragmentos de ADN que correspondían a un elemento MEGA. En los 11 aislamientos restantes no se identificaron fragmentos pertenecientes a ninguno de los elementos genéticos descritos como portadores de genes *mef* (MEGA, Tn1207.1 y Tn1207.3).

A partir de este punto, se centró el estudio en el elemento MEGA portador de genes *mefE* en 4 de las cepas sensibles. Para ello, se diseñaron parejas de *primers* que amplificaban fragmentos solapados del elemento MEGA descrito y depositado en GenBank (AF274302), con el fin de amplificar y secuenciar estos elementos de manera completa. MEGA es un elemento genético con un tamaño de entre 5433 y 5532 pares de bases, susceptible de

transmisión horizontal mediante transformación, y que incluye, junto con el gen *mefE*, un gen *mel*, que codifica una proteína de unión a ATP similar a algunas otras descritas relacionadas con bombas de expulsión como *MsrA*, y una serie de ORFs de función desconocida. La descripción inicial de este elemento¹³³, ya incluye la existencia de dos variedades, una de ellas el elemento completo de 5532 pares de bases, y la otra un elemento idéntico, pero con una deleción de 99 pares de bases en la región situada entre los genes *mel* y *mefE*, que elimina una secuencia de consenso Shine-Dalgarno situada por encima del codón de inicio de *mel*. La secuenciación de este elemento mostró que dos de estas cepas correspondían a un elemento MEGA de 5532 pares de bases, y dos cepas a elementos MEGA de 5433 pares de bases, según aparece en la figura II.

Figura II. Secuencia comparada de los elementos MEGA portadores de *mefE* encontrados en cepas sensibles a macrólidos:

MEGA 5.5	1	catgttgagg	cggtaagttt	gctagtcaag	gagtaaaacg	acgaagatta	gcatttactt
MEGA-like	1	catgttgagg	cggtaagttt	gctagtcaag	gagtaaaacg	acgaagatta	gcatttactt
MEGA 5.5	61	ccgccccatgc	gatagctgtc	cgtgattgac	aagtgctagc	acgcagacag	aacggagata
MEGA-like	61	ccgccccatgc	gatagctgtc	cgtgattgac	aagtgctagc	acgcagacag	aacggagata
MEGA 5.5	121	gcgaaccgct	gagtgtgtcg	ctctgctcgt	aaaagcttag	aaacctttga	acgaaagggg
MEGA-like	121	gcgaaccgct	gagtgtgtcg	ctctgctcgt	aaaagcttag	aaacctttga	acgaaagggg
MEGA 5.5	181	taatgaaagc	cttgattgca	aggctttttg	ctttatgggtg	ggtaagtatc	agagtgagaa
MEGA-like	181	taatgaaagc	cttgattgca	aggctttttg	ctttatgggtg	ggtaagtatc	agagtgagaa
MEGA 5.5	241	aatttttggg	atgagtagaa	gtgatagcta	gaaattatca	gtttctatct	ccatttacc
MEGA-like	241	aatttttggg	atgagtagaa	gtgatagcta	gaaattatca	gtttctatct	ccatttacc
MEGA 5.5	301	tgtgggtacg	tgtttgtttc	cattgacaag	gagtttgtgg	gaatagaaat	gtaccacct
MEGA-like	301	tgtgggtacg	tgtttgtttc	cattgacaag	gagtttgtgg	gaatagaaat	gtaccacct
MEGA 5.5	361	tgtttgaatc	aagtgaagtg	tagttgaagg	aaatctggtg	aaagcaatac	ttcattttac
MEGA-like	361	tgtttgaatc	aagtgaagtg	tagttgaagg	aaatctggtg	aaagcaatac	ttcattttac
MEGA 5.5	421	cgaataagta	ataatttagg	caacttcaaa	tcgattaata	aaaactatct	taaagggtta
MEGA-like	421	cgaataagta	ataatttagg	caacttcaaa	tcgattaata	aaaactatct	taaagggtta
MEGA 5.5	481	gagtagacaa	aaattgtcca	ctcttttttg	caaactcaat	ttatcaataa	atgaaatgag
MEGA-like	481	gagtagacaa	aaattgtcca	ctcttttttg	caaactcaat	ttatcaataa	atgaaatgag
MEGA 5.5	541	ggaatgtaaa	atgaaatatt	ttgagggttg	gtagaaaaat	cctgatgaat	ttttaaact
MEGA-like	541	ggaatgtaaa	atgaaatatt	ttgagggttg	gtagaaaaat	cctgatgaat	ttttaaact
MEGA 5.5	601	acaacacagaa	gattttgtga	aaagctaata	gcttgctact	aaggaaaata	atccagagcg
MEGA-like	601	acaacacagaa	gattttgtga	aaagctaata	gcttgctact	aaggaaaata	atccagagcg
MEGA 5.5	661	ttacagtcta	tgaagaaaac	ttcgtcatat	cctttaaatc	tggcatcgaa	ttggaagtat
MEGA-like	661	ttacagtcta	tgaagaaaac	ttcgtcatat	cctttaaatc	tggcatcgaa	ttggaagtat
MEGA 5.5	721	gagtctcatt	ccataacttt	tatattgaac	atatcatctt	gttggtttat	actataaatt
MEGA-like	721	gagtctcatt	ccataacttt	tatattgaac	atatcatctt	gttggtttat	actataaatt
MEGA 5.5	781	gatataaaca	aagatgtagg	aggaaccgaa	actatgacag	cctcaatgcg	tttaagataa
MEGA-like	781	gatataaaca	aagatgtagg	aggaaccgaa	actatgacag	cctcaatgcg	tttaagataa
MEGA 5.5	841	gctggcaata	aaaaaagcag	aatctatacc	cgatgatagg	cttttttggt	gtgcttattt
MEGA-like	841	gctggcaata	aaaaaagcag	aatctatacc	cgatgatagg	cttttttggt	gtgcttattt
MEGA 5.5	901	atacgatatt	gagcattcat	tagttacggt	gaggatattg	gttatttaac	tataccttta
MEGA-like	901	atacgatatt	gagcattcat	tagttacggt	gaggatattg	gttatttaac	tataccttta
MEGA 5.5	961	tttaactata	cctttattta	actatgtctt	taatatgaat	gtttccaaat	tgtatgtatg
MEGA-like	961	tttaactat	-----	-----gtctt	taatatgaat	gtttccaaat	tgtatgtatg
MEGA 5.5	1021	cagaccaaaa	gccacattgt	ggatttaggc	ctgcattttt	ttattgocct	taatgctatt
MEGA-like	1021	cagaccaaaa	gccacattgt	ggggttggc	ctgcattttt	t_attgocct	gaatgctatt
MEGA 5.5	1081	caaaatagaa	atttaagcaa	aataatatgc	aggagataat	ataaatggaa	aaatacaaca
MEGA-like	1081	caaaatagaa	attcaagcaa	aataatatgc	aggagataat	ataaatggaa	aaatacaaca
					<i>mef</i>	
MEGA 5.5	1141	attggaaacg	aaaattttat	gcaatatggg	cagggcaagc	agtatcatta	atcactagtg
MEGA-like	1141	attggaaacg	aaaattttat	gcaatatggg	cagggcaagc	agtatcatta	atcactagtg
MEGA 5.5	1201	ccatcctgca	aatggcgatt	attttttacc	ttacagaaaa	aacaggatct	gcgatggctt
MEGA-like	1201	ccatcctgca	aatggcgatt	attttttacc	ttacagaaaa	aacaggatct	gcgatggctt

MEGA 5.5	1261	tgtctatggc	ttcattagta	ggttttttac	cctatgcat	tttgggacct	gccattgggt
MEGA-like	1261	tgtctatggc	ttcattagta	ggttttttac	cctatgcat	tttgggacct	gccattgggt
.....							
MEGA 5.5	1321	tgctagtggg	tcgtcatgat	aggaagaaga	taatgattgg	tgccgattta	attatcgag
MEGA-like	1321	tgctagtggg	tcgtcatgat	aggaagaaga	taatgattgg	tgccgattta	attatcgag
.....							
MEGA 5.5	1381	cagctgggtgc	agtgcttgc	attggttgc	tctgtatgga	gctacctg	tgcatgatta
MEGA-like	1381	cagctgggtgc	agtgcttgc	attggttgc	tctgtatgga	gctacctg	tgcatgatta
.....							
MEGA 5.5	1441	tgatagtatt	gtttatccgt	agcattggaa	cagcttttca	tacccagca	ctcaatgcgg
MEGA-like	1441	tgatagtatt	gtttatccgt	agcattggaa	cagcttttca	tacccagca	ctcaatgcgg
.....							
MEGA 5.5	1501	ttacaccact	tttagtacca	gaagaacagc	taacgaaatg	cgcaggctat	agtcagtctt
MEGA-like	1501	ttacaccact	tttagtacca	gaagaacagc	taacgaaatg	cgcaggctat	agtcagtctt
.....							
MEGA 5.5	1561	tgcatgctat	aagctatatt	gttagtccgg	cagttgcagc	actcttatac	tcggttggg
MEGA-like	1561	tgcatgctat	aagctatatt	gttagtccgg	cagttgcagc	actcttatac	tcggttggg
.....							
MEGA 5.5	1621	attdaaatgc	tattattgcc	atcgacgtat	tggtgctgt	gattgcatct	attacgtag
MEGA-like	1621	attdaaatgc	tattattgcc	atcgacgtat	tggtgctgt	gattgcatct	attacgtag
.....							
MEGA 5.5	1681	caattgtacg	tatacctaag	ctgggtaatc	aagtgcaaag	tttagaacca	aatttcataa
MEGA-like	1681	caattgtacg	tatacctaag	ctgggtaatc	aagtgcaaag	tttagaacca	aatttcataa
.....							
MEGA 5.5	1741	gggagatgaa	agaaggagtt	gtggttctga	gacaaaacaa	aggattgttt	gccttattac
MEGA-like	1741	gggagatgaa	agaaggagtt	gtggttctga	gacaaaacaa	aggattgttt	gccttattac
.....							
MEGA 5.5	1801	tcttaggaac	actatatact	tttgtttata	tgccaatcaa	tgcaactatt	cctttaataa
MEGA-like	1801	tcttaggaac	actatatact	tttgtttata	tgccaatcaa	tgcaactatt	cctttaataa
.....							
MEGA 5.5	1861	gcatggaaca	ctttaatgga	acgcctgtgc	atatttctat	tacggaaatt	tcctttgcat
MEGA-like	1861	gcatggaaca	ctttaatgga	acgcctgtgc	atatttctat	tacggaaatt	tcctttgcat
.....							
MEGA 5.5	1921	ttgggatgct	agcaggaggc	ttattattag	gaagattagg	gggcttcgaa	aagcatgtat
MEGA-like	1921	ttgggatgct	agcaggaggc	ttattattag	gaagattagg	gggcttcgaa	aagcatgtat
.....							
MEGA 5.5	1981	tactaataac	aagttcattt	tttataatgg	ggaccagttt	agccgtttcg	ggaatacttc
MEGA-like	1981	tactaataac	aagttcattt	tttataatgg	ggaccagttt	agccgtttcg	ggaatacttc
.....							
MEGA 5.5	2041	ctccaaatgg	attdgtaata	ttcgtagttt	gctgtgcaat	aatggggcct	tcgggtgcat
MEGA-like	2041	ctccaaatgg	attdgtaata	ttcgtagttt	gctgtgcaat	aatggggcct	tcgggtgcat
.....							
MEGA 5.5	2101	tttatagcgg	tggtgcaaca	gctctttttc	aggagaaaat	taagcctgaa	tatttaggac
MEGA-like	2101	tttatagcgg	tggtgcaaca	gctctttttc	aggagaaaat	taagcctgaa	tatttaggac
.....							
MEGA 5.5	2161	gtgtattttc	tttgatcgga	agtatcatgt	cacttgctat	gccaatggg	tttaattctt
MEGA-like	e2161	gtgtattttc	tttgatcgga	agtatcatgt	cacttgctat	gccaatggg	tttaattctt
.....							
MEGA 5.5	2221	ctggattcct	tgctgataaa	atcggtgtaa	atcattgggt	ttactatca	ggatatttaa
MEGA-like	2221	ctggattcct	tgctgataaa	atcggtgtaa	atcattgggt	ttactatca	ggatatttaa
.....							
MEGA 5.5	2281	ttattggcat	tgctatagtt	tgccaaatga	taactgaggt	tagaaaatta	gatttaaaat
MEGA-like	2281	ttattggcat	tgctatagtt	tgccaaatga	taactgaggt	tagaaaatta	gatttaaaat
.....							
MEGA 5.5	2341	aaacaatatt	ggaggaatat	ttatgtatct	tattttcatg	taactcttcc	tgctaaaatc
MEGA-like	2341	aaacaatatt	ggaggaatat	ttatgtatct	tattttcatg	taactcttcc	tgctaaaatc
MEGA-like	2341	aaacaatatt	ggaggaa	-----	-----	-----	-----
Corto		...					
MEGA 5.5	2401	gcagggtttt	cctgcatac	aagcaaatga	aagcatgcga	ttatagacag	gaggaaatgt
MEGA-like	2401	gcagggtttt	cctgcatac	aagcaaatga	aagcatgcga	ttatagacag	gaggaaatgt
MEGA-like	2401	-----	-----	-----	-----	-----g	gaggaaatgt
corto							

MEGA 5.5	2461	tatggaatta	atattaaaag	caaaagacat	tcgtgtggaa	ttcaaaggac	gcgatgtttt
MEGA-like	2461	tatggaatta	atattaaaag	caaaagacat	tcgtgtggaa	ttcaaaggac	gcgatgtttt
		<i>me l</i>					
MEGA 5.5	2521	agatataaat	gaattagaag	tatatgatta	tgaccgtatt	ggtttagtag	gagcaaatgg
MEGA-like	2521	agatataaat	gaattagaag	tatatgatta	tgaccgtatt	ggtttagtag	gagcaaatgg
						
MEGA 5.5	2581	tgctggaaaa	agcactttac	tcagggctact	tttaggagaa	ttaactcccc	caggatgtaa
MEGA-like	2581	tgctggaaaa	agcactttac	tcagggctact	tttaggagaa	ttaactcccc	caggatgtaa
						
MEGA 5.5	2641	aatgaatcgt	ctgggtgaac	ttgcctatat	tccccagttg	gacgaagtaa	ctctgcagga
MEGA-like	2641	aatgaatcgt	ctgggtgaac	ttgcctatat	tccccagttg	gacgaagtaa	ctctgcagga
						
MEGA 5.5	2701	ggaaaaagat	tttgcaactt	taggcaagct	aggtgttgag	caattaaata	tacagactat
MEGA-like	2701	ggaaaaagat	tttgcaactt	taggcaagct	aggtgttgag	caattaaata	tacagactat
						
MEGA 5.5	2761	gagcgggtgg	gaagaaacaa	ggcttaaaat	agcacaggcc	ttatcggcac	aggttcatgg
MEGA-like	2761	gagcgggtgg	gaagaaacaa	ggcttaaaat	agcacaggcc	ttatcggcac	aggttcatgg
						
MEGA 5.5	2821	tatttttagcg	gatgaacct	cgagccattt	agaccgtgaa	ggaattgatt	ttctaatagg
MEGA-like	2821	tatttttagcg	gatgaacct	cgagccattt	agaccgtgaa	ggaattgatt	ttctaatagg
						
MEGA 5.5	2881	acagctaaaa	tattttacag	gtgcactggt	agttattagc	catgaccgct	attttcttga
MEGA-like	2881	acagctaaaa	tattttacag	gtgcactggt	agttattagc	catgaccgct	attttcttga
						
MEGA 5.5	2941	tgaaatagta	gataaaatat	gggaactgaa	agatggcaaa	atcactgagt	attggggaaa
MEGA-like	2941	tgaaatagta	gataaaatat	gggaactgaa	agatggcaaa	atcactgagt	attggggaaa
						
MEGA 5.5	3001	ctattctgat	tatcttcgtc	agaaagagga	agaacgtaag	agccaagctg	cagaatacga
MEGA-like	3001	ctattctgat	tatcttcgtc	agaaagagga	agaacgtaag	agccaagctg	cagaatacga
						
MEGA 5.5	3061	acaatattatt	gcggaacgtg	cccgattgga	aagggtctgc	gaggaaaagc	gaaaacaggc
MEGA-like	3061	acaatattatt	gcggaacgtg	cccgattgga	aagggtctgc	gaggaaaagc	gaaaacaggc
						
MEGA 5.5	3121	tcgtaaaata	gaacagaagg	caaaagggtc	ttcaaagaaa	aaaagtactg	aagacggagg
MEGA-like	3121	tcgtaaaata	gaacagaagg	caaaagggtc	ttcaaagaaa	aaaagtactg	aagacggagg
						
MEGA 5.5	3181	gcgttttagct	catcaaaaat	caataggaag	taaggaaaaa	aagatgtata	atgctgctaa
MEGA-like	3181	gcgttttagct	catcaaaaat	caataggaag	taaggaaaaa	aagatgtata	atgctgctaa
						
MEGA 5.5	3241	aaccctagag	cacaggattg	cggccttagg	aaaagtagaa	gctccggaag	gcattcgcag
MEGA-like	3241	aaccctagag	cacaggattg	cggccttagg	aaaagtagaa	gctccggaag	gcattcgcag
						
MEGA 5.5	3301	aattcgtttc	aggcaaagta	aagcattgga	gctccataat	ccatacccta	tagtcgggtg
MEGA-like	3301	aattcgtttc	aggcaaagta	aagcattgga	gctccataat	ccatacccta	tagtcgggtg
						
MEGA 5.5	3361	agaaattaat	aaagtatttg	gggataaggc	tctgtttgaa	aatgcatctt	ttcaaattcc
MEGA-like	3361	agaaattaat	aaagtatttg	gggataaggc	tctgtttgaa	aatgcatctt	ttcaaattcc
						
MEGA 5.5	3421	gttaggagca	aaagtggcgt	taactggtgg	taatggaatc	ggaaaaacaa	ctttaatcca
MEGA-like	3421	gttaggagca	aaagtggcgt	taactggtgg	taatggaatc	ggaaaaacaa	ctttaatcca
						
MEGA 5.5	3481	aatgatctta	aaccatgaag	aaggaatttc	tatttcgcct	aaggcaaaaa	taggttactt
MEGA-like	3481	aatgatctta	aaccatgaag	aaggaatttc	tatttcgcct	aaggcaaaaa	taggttactt
						
MEGA 5.5	3541	tgcacagaat	ggttacaagt	acaacagtaa	tcagaatggt	atggagttaa	tcagaagga
MEGA-like	3541	tgcacagaat	ggttacaagt	acaacagtaa	tcagaatggt	atggagttaa	tcagaagga
						
MEGA 5.5	3601	ttgtgactac	aatatatcag	aaattcggtc	agtgctagca	tctatggggg	tcaaacagaa
MEGA-like	3601	ttgtgactac	aatatatcag	aaattcggtc	agtgctagca	tctatggggg	tcaaacagaa
						
MEGA 5.5	3661	cgatattgga	aaaagtttat	ctgttttaag	cggtggagaa	attataaaat	tgttgcttgc
MEGA-like	3661	cgatattgga	aaaagtttat	ctgttttaag	cggtggagaa	attataaaat	tgttgcttgc
						

MEGA 5.5 3721	taaaatgctc	atgggtagat	ataacatcct	aataatggat	gaacccagta	acttccttga
MEGA-like 3721	taaaatgctc	atgggtagat	ataacatcct	aataatggat	gaacccagta	acttccttga
MEGA 5.5 3781	cataccaagt	ttagaggctt	tggaaatact	aatgaaggag	tacaccggaa	ctatcgtggt
MEGA-like 3781	cataccaagt	ttagaggctt	tggaaatact	aatgaaggag	tacaccggaa	ctatcgtggt
MEGA 5.5 3841	tatcaccac	gataaacgat	tactcgaaaa	tgtagcagat	gtagtttatg	aaattagaga
MEGA-like 3841	tatcaccac	gataaacgat	tactcgaaaa	tgtagcagat	gtagtttatg	aaattagaga
MEGA 5.5 3901	taagaaaata	aatctgaaac	attaaattta	aggtagtcgc	tggtcagtaa	tagtctgttc
MEGA-like 3901	taagaaaata	aatctgaaac	attaaattta	aggtagtcgc	tggtcagtaa	tagtctgttc
MEGA 5.5 3961	tggttggcga	ctccattggt	aaagagtata	aagactttag	atTTTTatgaa	tattaaaaat
MEGA-like 3961	tggttggcga	ctccattggt	aaagagtata	aagactttag	atTTTTatgaa	tattaaaaat
MEGA 5.5 4021	aggaacagtc	aattgaactg	ctcctatTTT	tctgctaaat	atattgtagt	tttcttatat
MEGA-like 4021	aggaacagtc	aattgaactg	ctcctatTTT	tctgctaaat	atattgtagt	tttcttatat
MEGA 5.5 4081	gtataatgat	agattagcgg	attctcatct	acggtagctta	cttcaaata	gaagaagtga
MEGA-like 4081	gtataatgat	agattagcgg	attctcatct	acggtagctta	cttcaaata	gaagaagtga
MEGA 5.5 4141	tgcggttat	ctctggactt	ttccttattg	aggacaaagt	aattcttacg	tgaagtcgcc
MEGA-like 4141	tgcggttat	ctctggactt	ttccttattg	aggacaaagt	aattcttacg	tgaagtcgcc
MEGA 5.5 4201	attgttttta	ggatatcatc	agttaggaag	gtcaatggaa	tattcatggt	agagtagcgg
MEGA-like 4201	attgttttta	ggatatcatc	agttaggaag	gtcaatggaa	tattcatggt	agagtagcgg
MEGA 5.5 4261	tagaagtcac	gttcaaaatc	ttggtagctc	tgcctataat	agtccatttg	taggtgatta
MEGA-like 4261	tagaagtcac	gttcaaaatc	ttggtagctc	tgcctataat	agtccatttg	taggtgatta
MEGA 5.5 4321	cgctgaaact	caagctgatt	catagagcac	ctcctcgaca	agttcaatac	taataatgtc
MEGA-like 4321	cgctgaaact	caagctgatt	catagagcac	ctcctcgaca	agttcaatac	taataatgtc
MEGA 5.5 4381	ttttaatttc	aaattgatgt	gacctgttgt	agtttttatc	aaaatgaaat	ctttggtcag
MEGA-like 4381	ttttaatttc	aaattgatgt	gacctgttgt	agtttttatc	aaaatgaaat	ctttggtcag
MEGA 5.5 4441	acttggatt	gttccagtgt	aggaaacacg	cttgtttttt	tcaatcactt	gaatgcgtgt
MEGA-like 4441	acttggatt	gttccagtgt	aggaaacacg	cttgtttttt	tcaatcactt	gaatgcgtgt
MEGA 5.5 4501	gcgtagctgc	ccggcgtata	cttgactgag	gagtaataat	ttcttctcta	gtgataagtc
MEGA-like 4501	gcgtagctgc	ccggcgtata	cttgactgag	gagtaataat	ttcttctcta	gtgataagtc
MEGA 5.5 4561	agacatgtac	gttactttgt	ttgtatcatc	agagagtgct	gatgcatggt	cagataggaa
MEGA-like 4561	agacatgtac	gttactttgt	ttgtatcatc	agagagtgct	gatgcatggt	cagataggaa
MEGA 5.5 4621	aaagcccatc	catttttgca	tctttgtatc	ctggtagctc	cttgctgatt	gaaatggtaa
MEGA-like 4621	aaagcccatc	catttttgca	tctttgtatc	ctggtagctc	cttgctgatt	gaaatggtaa
MEGA 5.5 4681	aattggaacg	gtcaatcata	tcaaactcct	tctatgcaga	ggcaagggta	tttttatcaa
MEGA-like 4681	aattggaacg	gtcaatcata	tcaaactcct	tctatgcaga	ggcaagggta	tttttatcaa
MEGA 5.5 4741	attgaaatcgt	aaaaccttga	attccccac	ctgtgtaaca	ttcttttaaag	cgattgatta
MEGA-like 4741	attgaaatcgt	aaaaccttga	attccccac	ctgtgtaaca	ttcttttaaag	cgattgatta
MEGA 5.5 4801	cctcagtata	gattatcaca	gatgagcttg	ttggcttaat	gctaaatgta	aattccaatg
MEGA-like 4801	cctcagtata	gattatcaca	gatgagcttg	ttggcttaat	gctaaatgta	aattccaatg
MEGA 5.5 4861	gtaatcgggt	ttcagattta	gcatgtacta	gtcgtatcga	tatttcagtt	gttttgagtt
MEGA-like 4861	gtaatcgggt	ttcagattta	gcatgtacta	gtcgtatcga	tatttcagtt	gttttgagtt
MEGA 5.5 4921	ttctctgacg	aagttttgaa	gttgctgttt	caacgattcc	atgtaaaaaat	ctttcaagca
MEGA-like 4921	ttctctgacg	aagttttgaa	gttgctgttt	caacgattcc	atgtaaaaaat	ctttcaagca

MEGA 5.5 4981	tttcaatatac	attacatcct	ttgctacgga	tttctgaaaa	ttgtactgta	tttttttctt
MEGA-like 4981	tttcaatatac	attacatcct	ttgctacgga	tttctgaaaa	ttgtactgta	tttttttctt
MEGA 5.5 5041	gtttcattttt	aatccctcca	atccaccgcg	ggaatgacca	ccgataagtt	tactgcgttc
MEGA-like 5041	gtttcattttt	aatccctcca	atccaccgcg	ggaatgacca	ccgataagtt	tactgcgttc
MEGA 5.5 5101	aatatctctg	gaaccttcag	ttaggacggt	tcctttttgt	atggctaaaa	aaccaaactg
MEGA-like 5101	aatatctctg	gaaccttcag	ttaggacggt	tcctttttgt	atggctaaaa	aaccaaactg
MEGA 5.5 5161	ttctctgaca	acatcaatag	ctgtctgaag	tctattatct	ttttcaattt	gttctacatc
MEGA-like 5161	ttctctgaca	acatcaatag	ctgtctgaag	tctattatct	ttttcaattt	gttctacatc
MEGA 5.5 5221	atcaaagagt	gatagtagag	tatagctttc	atctacgaag	ccactataag	atacaccaat
MEGA-like 5221	atcaaagagt	gatagtagag	tatagctttc	atctacgaag	ccactataag	atacaccaat
MEGA 5.5 5281	ttgtctcact	gcaccagagg	tgtatTTTTT	cggataaata	caagtacatg	actcaccat
MEGA-like 5281	ttgtctcact	gcaccagagg	tgtatTTTTT	cggataaata	caagtacatg	actca_ccat
MEGA 5.5 5341	tgTTTTGGGG	agatttgcgg	gttcaatttt	attctgagca	tttatagatt	ttttcatctc
MEGA-like 5341	tgTTTTGGGG	agatttgcgg	gttcaatttt	attctgagca	tttatagatt	ttttcatctc
MEGA 5.5 5401	agtcctagaa	tagccaatat	gaatagaaac	gacagtagtc	aatactaggg	ctactgttcc
MEGA-like 5401	agtcctagaa	tagccaatat	gaatagaaac	gacagtagtc	aatactaggg	ctactgttcc
MEGA 5.5 5461	gttccacagt	atcatttaaa	aatcattttc	acaccctttc	gtctattagt	atagaagaaa
MEGA-like 5461	gttccacagt	atcatttaaa	aatcattttc	acaccctttc	gtctattagt	atagaagaaa
MEGA 5.5 5521	gctctcagca	ca				
MEGA-like 5521	gctctcagca	ca				

La delección en 969 no existe en MEGA, pero sí en el transposón Tn 1207.1.

Estudios previos han demostrado que los genes *mel* y *mef* aumentan de forma muy significativa su expresión en presencia de cantidades subinhibitorias de macrólidos. Para comprobar si esta inducibilidad se mantiene en las cepas objeto de estudio, se sometió a inducción en concentraciones subinhibitorias de eritromicina a una cepa portadora de los genes *mel* y *mef* en un elemento MEGA de tipo II, con una CIM de eritromicina de 0.1 mg/l. Esta cepa se incubó en una concentración de eritromicina 4 veces inferior a la CIM (0.025 mg/l), y se mantuvo en pases

continuos a esta misma concentración durante 12 días, realizándose controles diarios en placas de 0.5 mg/l de eritromicina. Sin embargo, en ningún caso se observó un incremento de las CIMs que permitiera su crecimiento en placas de 0.5 mg/l, por lo que hay que deducir que, o bien no se incrementa la expresión de estos genes en concentraciones subinhibitorias en estas cepas, o si se incrementa no tiene una repercusión significativa en su nivel de sensibilidad.

Los estudios llevados a cabo previamente por otros autores han demostrado que el elemento MEGA es transferible por transformación desde las cepas resistentes con fenotipo M a cepas receptoras, adquiriendo éstas el mismo fenotipo que la cepa donadora. Este estudio se había llevado previamente a cabo usando como cepas donadoras tanto cepas resistentes de *S. pneumoniae* como de estreptococos *viridans*.

En el presente trabajo se realizó el estudio de transformación utilizando como donantes una cepa de estreptococo *viridans* portadora de un elemento MEGA tipo I, con una CIM de eritromicina de 4 mg/l, una cepa de estreptococo *viridans* portadora de un elemento MEGA tipo I y un gen *ermB*, con una CIM de eritromicina de >128 mg/l, dos cepas de estreptococo *viridans* portadoras de un trasposón *Tn1207.1*, con CIMs de eritromicina de 4 y 6 mg/l, y finalmente dos cepas de estreptococo

viridans portadoras de un elemento MEGA tipo II, con CIMs de eritromicina de 0.03 y 0.06 mg/l. Como receptor se utilizó en todos los casos *S. pneumoniae* R6. Tal como se ha descrito previamente, las cepas resistentes portadoras tanto de elementos MEGA como de transposones *Tn1207.1* transformaron correctamente en *S. pneumoniae* R6. No transformó en cambio el gen *ermB*, de modo que el transformante obtenido con el ADN de la cepa portadora del elemento MEGA I y de *ermB* mostró una CIM característica de fenotipo M. Las transformaciones realizadas y las CIMs obtenidas aparecen reflejadas en la tabla XXII.

Tabla XXII. CIMs de las cepas originales y de los transformantes obtenidos.

	CIM Er cepa original	Elementos transformados	CIM Er transformante
Cepa 1 (EV*, MEGA I)	4 mg/l	MEGA I	2 mg/l
Cepa 2 (EV*, MEGA I, <i>ermB</i>)	>128 mg/l	MEGA I	2 mg/l
Cepa 3 (EV*, <i>Tn1207.1</i>)	4 mg/l	<i>Tn1207.1</i>	2 mg/l
Cepa 4 (EV*, <i>Tn1207.1</i>)	8 mg/l	<i>Tn1207.1</i>	2 mg/l
Cepa 5 (EV*, MEGA II)	0.03 mg/l	MEGA II	2 mg/l

Cepa 6 (EV*, MEGA II)	0.06 mg/l	MEGA II	2 mg/l
--------------------------	-----------	---------	--------

Como se observa en esta Tabla, las dos cepas portadoras del elemento MEGA II y sensibles a eritromicina transformaron correctamente a *S. pneumoniae* R6. Sorprendentemente, la transformación dio lugar en *S. pneumoniae* R6 a una CIM característica de un fenotipo M, semejante a la obtenida en la transformación a partir de elementos MEGA o de transposones procedentes de cepas resistentes.

IV. DISCUSIÓN

III. DISCUSIÓN.

Los resultados del estudio de sensibilidad de las 90 cepas de estreptococos *viridans* aisladas muestran unos porcentajes de resistencia altos, teniendo en cuenta que se trata de cepas aisladas de individuos sanos que no habían sido sometidos a tratamiento antimicrobiano alguno, al menos en los tres últimos meses. Los resultados por especie resultan difíciles de valorar, dado el bajo número de aislamientos de algunas especies, pero en conjunto cerca del 70% de los aislamientos fueron resistentes a macrólidos. Otros estudios realizados en España muestran porcentajes de resistencia que van desde un 37.7% a un 76.35% en cepas clínicas y de un 63.4% en cepas colonizadoras¹¹⁹, cifra esta similar por tanto a la obtenida en el presente estudio en aislamientos de características similares. Estudios realizados en otros países muestran cifras de resistencia inferiores, de entre un 22.4% y un 38.5%^{122,120}.

En lo que respecta a los mecanismos de resistencia, se observa un predominio del fenotipo M respecto al fenotipo MLS_B, ya que supone el 80.6% de las resistencias. Este predominio se observó además en todas las especies incluidas en el estudio. Dentro de fenotipo MLS_B, todos los aislamientos mostraron fenotipo constitutivo. Se trata de un comportamiento similar al observado en

otros estudios sobre estreptococos *viridans*, en los que el fenotipo de resistencia que predomina es el M¹²⁵.

Es un comportamiento además claramente distinto al observado en *Streptococcus pneumoniae*, especie en la que el fenotipo de resistencia que predomina sigue siendo el MLS_B, tanto en estudios realizados en España como en otros países europeos. Así en Francia, Suiza y Polonia predomina de manera clara el fenotipo MLS_B con un 87,5%, 80% y 100% respectivamente. En España, los estudios existentes dan cifras de un 77,3% de MLS_B. Estudios recientes realizados en Estados Unidos muestran sin embargo un claro predominio de la resistencia de fenotipo M, oscilando su frecuencia entre el 62,3% y el 68,8% en los últimos años¹³⁷. Dentro de Europa, un estudio realizado en Grecia refiere también un predominio del gen *mef*, con un 100%¹²⁹.

Desde el punto de vista de las bases genéticas de esta resistencia se observó, como era previsible, que todas las cepas con fenotipo M eran portadoras de genes del grupo *mef*. Dentro de las mismas, se observó una clara prevalencia del gen *mefE* (94%), como ha sido observado ya por otros autores. Así Cerdá, en 2004, publica un estudio¹²⁴ según el cual el 95.36% de las cepas de estreptococos *viridans* con fenotipo M eran portadoras del gen *mefE*. Otros estudios como el de Ardanuy en 2005 publican porcentajes del 98%¹²⁵.

Entre las cepas con fenotipo MLS_B, todas las cepas eran portadoras del gen *ermB*. Este dato coincide también con lo encontrado por Cerda et al.¹²³, que hallan el gen *ermB* en el 100% de las cepas de estreptococos *viridans* con fenotipo MLSB constitutivo o inducible.

Solamente una cepa era portadora de este gen de resistencia de manera aislada, mientras el resto de las cepas portadoras de *ermB* (91.7%) eran portadoras, además, de *mefE*, aunque ello no se traducía fenotípicamente al verse enmascarado el fenotipo M por el MLSB constitutivo. El estudio de Cerdá muestra también una alta frecuencia de coexistencia de ambos mecanismos de resistencia, aunque no llega a cifras tan altas como en este caso, sino que se queda en cifras del 47.44 %. En otros estudios españoles como el de Rodríguez-Avial¹¹⁸, este porcentaje es del 25%. En general, los pocos estudios disponibles sobre estreptococos *viridans*, muestran una alta frecuencia de presencia de genes *mefE* en cepas portadoras de *ermB*, mayor de la que se observa en otros estreptococos como *S. pneumoniae*¹³⁶. Solamente un estudio publicado por Ioannidou¹²¹ en Grecia refiere no encontrar coexistencia de ambos genes.

Como cabía esperar, el estudio de sensibilidad en presencia de un inhibidor de bombas de expulsión como reserpina redujo sensiblemente las CIMs de eritromicina en todas las cepas portadoras de genes *mef* de manera aislada, pero no así en las cepas portadoras de genes *mef* y *ermB*. Ello demuestra que, en

efecto, la resistencia en el primer caso está directamente vinculada a la actividad expulsiva del mecanismo de flujo, mientras que en las cepas portadoras de *ermB*, aunque pueda existir un mecanismo expulsivo si son portadoras también de *mefA* o *mefE*, éste es accesorio desde el punto de vista funcional, y la resistencia deriva esencialmente de la metilación del ARN ribosómico.

La determinación del elemento genético portador de estos genes de resistencia mostró que, en todos los casos, el gen *mefA* se encontraba incluido en un transposón Tn1207.1, tal como se describió inicialmente, mientras el gen *mefE* se encontraba incluido en un elemento MEGA. No existen estudios previos relativos a los elementos portadores de estos genes en estreptococos *viridans*. No obstante, los estudios realizados en otros estreptococos muestran también una clara distribución de estos genes en relación con el elemento genético portador^{133,135}. Ello apoya el mantenimiento de la diferenciación entre ambos genes, ya que aunque mantengan una similitud de secuencias considerable, parecen ligados de forma casi exclusiva a elementos de transmisión característicos y diferenciados.

No obstante, como se refiere en los resultados, el elemento MEGA hallado en estos estreptococos *viridans* difiere en algunos aspectos de los descritos en neumococo. Al igual que estos, presenta una alta similitud con la secuencia correspondiente de los transposones Tn 1207.1 a partir de la base 797. Las primeras 796 bases no

muestran homología alguna con secuencias conocidas. Sin embargo, el fragmento situado entre la base 797 y el inicio del gen *mef*, en la base 1124, muestra un nivel de homología más alto con el fragmento correspondientes del transposón Tn 1207.1 que con el del elemento MEGA descrito en neumococo, ya que, al igual que Tn 1207.1, carece de una secuencia repetida que aparece entre las bases 970 y 985, y que en cambio sí aparece en el MEGA descrito en neumococo. Por el contrario, a partir del gen *mef*, presenta una homología prácticamente completa con el elemento MEGA neumocócica.

Dentro de estas cepas parece predominar de forma clara el elemento MEGA de 5.5 pb, que se encuentra en el 85,7% de las cepas resistentes por *mefE*, mientras apenas un 15% presentan el elemento de 5.4 pb, que como ya se ha explicado, carece de un fragmento de 99 pb intermedio entre el gen *mel* y el gen *mef*, y que correspondería a las bases 2358 a 2449 del elemento MEGA de 5.5 bp, dentro del área no codificante situada entre ambos genes, que abarca entre las bases 2343 y 2460 (117 pb). Apenas existen estudios que determinen la frecuencia de elementos MEGA de clase I y de clase II en cepas con fenotipo M no sólo en estreptococos *viridans*, sino tampoco en neumococo. El estudio en que se describe inicialmente el elemento MEGA¹³³ muestra que, en cepas invasivas de neumococo, resistentes a macrólidos y

portadoras de *mefE*, el elemento MEGA de clase II sería mayoritaria, encontrándose en un 62% de los aislamientos, frente al 15.7% en que se encontraría el elemento MEGA de clase I. Por el contrario, los datos obtenidos en este estudio sugieren que la difusión del elemento MEGA de clase I sería muy superior en estreptococos *viridans*, mientras MEGA de clase II constituiría un elemento claramente minoritario, al menos entre las cepas resistentes a macrólidos de estreptococos *viridans*.

El dato probablemente más sorprendente hallado aparece al determinar la presencia de genes *mef* en cepas de estreptococo *viridans* sensibles a macrólidos. La determinación de la presencia de genes *mef* en 23 aislamientos pertenecientes a todas las especies aisladas como colonizadoras faríngeas (9 *S. mitis*, 1 *S. sanguis*, 6 *S. oralis*, 4 *S. salivarius*, 1 *S. mutans*, 2 *S. constellatus*), y con CIMs de eritromicina ubicadas claramente dentro del intervalo de sensibilidad (0.01-0.2 mg/l), permitió observar que 15 de estos aislamientos (65.2%) eran portadores de un gen *mef* (*mefE* en todos los casos).

Se trata de un hallazgo no descrito previamente. Amezaga¹³¹ en 2002 hace referencia a la posible presencia del gen *mefA* en una cepa sensible, pero no de mayores datos al respecto, y no se han vuelto a producir publicaciones sobre este extremo. Gay, en cepas de neumococo resistentes a macrólidos y portadoras del gen *mef*, sí refiere encontrar en un porcentaje alto solamente este gen, pero

no el resto de las ORFs integrantes de MEGA ni de ninguno de los transposones implicados en la transferencia de *mefA*.

Ambrose et al. demostraron en 2005 que el tándem *mel/mef* era necesario para la expresión del fenotipo M, de modo que, desde el punto de vista teórico, sería posible que un microorganismo fuera portador de *mef* pero sensible, siempre que careciera del segundo elemento. Ello requeriría no obstante que *mef* no estuviera incluido en ninguno de los elementos genéticos en que se ha descrito hasta el momento (Tn 1207.1, Tn 1207.3 y MEGA), en los que va siempre acompañado de *mel*, formando parte además, aparentemente, de un único operón. Las cepas en las que Ambrose et al describen este comportamiento son cepas en las que se introducen deleciones en *mef* y en *mel* mediante manipulación genética, pero no se trata de microorganismos que carezcan de estos genes de forma natural.

Una posibilidad alternativa era, como es lógico, que se tratase de un gen *mef* portador de mutaciones que originaran una proteína funcionalmente anómala. Sin embargo, la secuenciación del gen *mefE* dio en todos los casos una secuencia idéntica a la silvestre, lo que permitía descartar esa posibilidad. Sin embargo, la determinación de la CIM de eritromicina en presencia y ausencia de reserpina mostraba CIMs prácticamente idénticas en ambos

casos, lo que sugería que no existía una actividad expulsiva significativa en estas cepas.

Por tanto, era obligado determinar la inclusión o no del gen *mefE* en algunos de los elementos genéticos habituales, fundamentalmente en un elemento MEGA, que es su elemento portador habitual, y si este elemento presentaba, en su caso, alguna modificación que justificara este comportamiento.

En 11 de los 15 aislamientos no se pudo amplificar mediante PCR ninguno de los fragmentos característicos de Tn 1207.1, Tn 1207.3 ni MEGA, incluidos los fragmentos portadores del gen *mel*, lo que sugiere la existencia de genes *mef* de manera aislada, que por tanto no resultarían funcionales desde el punto de vista de la expulsión efectiva de macrólidos. Se trata de una circunstancia descrita desde el punto de vista teórica, pero cuya existencia no se había demostrado previamente en la naturaleza. Este hallazgo abre toda una serie de perspectivas que serán objeto de futuros estudios, como el de determinar si el gen *mefE* está incluido en otro elemento genético transferible distinto de MEGA, derivado de él, o insertado en el cromosoma de estos estreptococos de manera directa, su funcionalidad en caso de que la cepa adquiriese un gen *mel* externo, presumiblemente mediante transformación, y su posibilidad de transferencia a otros microorganismos.

Puesto que hasta el momento la presencia del gen *mef* se había vinculado directamente a resistencia a macrólidos de fenotipo M, y

no se había investigado en cepas sensibles, el hallazgo aquí presentado sugiere que pueda tratarse de un gen mucho más difundido en la naturaleza de lo que se ha venido pensando. De hecho, en el caso que nos ocupa, aunque la prevalencia de genes *mef* vinculados a fenotipo M en la población estudiada es del 69%, la prevalencia global, teniendo en cuenta su presencia en cepas sensibles, se aproximaría al 80%.

Por otra parte, cuatro de los 15 aislamientos sí mostraban un elemento MEGA. Pese a que se observan cambios sugerentes en la región del promotor del operón *mef/mel*, ya que los cambios respecto al MEGA silvestre afectan sobre todo a zonas inmediatas a la región -35, y afectan directamente a la región -10 del promotor, estos cambios no parecen estar relacionados con este comportamiento, puesto que aparecen también en cepas resistentes.

Sí llama la atención el hecho de que los cuatro elementos MEGA hallados vinculados a este comportamiento pertenecen a la clase II. Como se explica en la revisión, el fragmento de 99pb del que carece el MEGA de clase II respecto al de clase I, contiene un región consenso Shine-Dalgarno (AGGAGG), cuya función es, como es bien conocido, constituir un punto de unión al ribosoma que ayuda al alineamiento del codón de inicio con el ribosoma y por tanto al inicio de la síntesis proteica. Mutaciones en esta región

pueden causar una reducción en la traslación, debido a una menor eficiencia en el alineamiento entre el ARNm y el ribosoma.

Sin embargo, la delección se produce de tal manera que no altera la situación de esta región, por lo que no parece que ese sea el motivo del comportamiento anómalo. Por otra parte, aunque este comportamiento sea más frecuente en cepas portadoras de un MEGA tipo II, también se ha observado ocasionalmente en cepas portadoras de MEGA tipo I. Por lo tanto, desde el punto de vista genético no existe ninguna modificación que determine claramente la expresión o no de la resistencia, por lo que se deberá realizar un estudio proteómico para aclarar este extremo.

Finalmente, una circunstancia a tener en cuenta es el comportamiento de los transformantes obtenidos a partir de estas cepas. La transformación de ADN de cepas procedentes de cepas de estreptococo *viridans* portadoras de MEGA y resistentes a macrólidos, se ha demostrado ya previamente que podía dar lugar a resistencia a en neumococo R6. Sin embargo, en este estudio se ha demostrado que también cepas portadoras de MEGA pero incapaces de expresar resistencia, sí que son en cambio capaces de expresarla en neumococo R6 cuando son transformadas. Por tanto, deben existir en neumococo factores capaces de promover o complementar esta expresión, y que no existan en estreptococos *viridans*.

Si se asume que se trata de de una bomba de expulsión con dos componentes, es posible que estos estreptococos *viridans* no sean capaces de expresar alguno de ellos, que pueda ser en cambio sustituido por otros en neumococo. Ha de tenerse en cuenta que la familia *mef* tiene pocas similitudes con otros genes, pero *mel* pertenece en realidad a una familia de genes (*mrs*) de la que existen varios miembros con un alto grado de homología. La presencia de otros componentes de esta familia en el genoma de neumococo podría complementar una hipotética falta de expresión del mismo, permitiendo la acción del mecanismo de expulsión.

En todo caso, como en la situación anterior, el estudio proteómico será el que de probablemente la clave de la diferencia de comportamiento en ambas circunstancias.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. Las cepas de estreptococos *viridans* colonizadoras faríngeas incluidas en este estudio muestran altos niveles de resistencia a macrólidos.
2. Estas cepas resistentes a macrólidos muestran de forma muy mayoritaria fenotipo M. Además, la gran mayoría de las cepas con fenotipo MLSB son portadoras también de genes *mef*, asociados al fenotipo M, lo que demuestra que estos genes están muy ampliamente difundidos entre las especies integrantes del grupo *viridans* de estreptococos.
3. Las cepas con fenotipo MLSB son todas portadoras de genes *ermB*.
4. Dentro de las cepas resistentes a macrólidos que mostraban fenotipo M, se identificó de manera muy mayoritaria el gen *mefE*, aunque un pequeño grupo era portador de *mefA*.
5. Todas las cepas portadoras de *mefA*, incluían este gen dentro de un trasposón *Tn1207.1*.
6. Las cepas portadoras de *mefE*, incluían este gen siempre dentro de un Macrolide Efflux Genetic Assembly (MEGA) semejante al descrito en *Streptococcus pneumoniae*, aunque con algunas diferencias en su fragmento inicial, que muestra mayores similitudes con el fragmento correspondiente del trasposón *Tn1207.1*.

7. La gran mayoría de las cepas resistentes a macrólidos portadoras de MEGA, lo eran de un MEGA de tipo I.
8. Sorprendentemente, un 30% de las cepas sensibles a macrólidos, eran también portadoras de genes *mef*, circunstancia no descrita previamente en cepas clínicas.
9. Dentro de estas cepas se encontraban algunas cepas portadoras de MEGA de tipo I, pero la gran mayoría portaban MEGA de tipo II, que muestra una delección de 99 pb en un fragmento intergénico situado entre los genes *mef* y *mel*, o bien no se detectaba en ellos ninguna de las ORFs adicionales a *mef* que se encuentran en MEGA o en *Tn1207.1*.
10. En todas estas cepas, las CIMs de macrólidos eran similares a las de cepas no portadoras de *mef*, y no se modificaban por la adición de inhibidores de bombas de flujo, al contrario de lo que ocurre en cepas portadoras de *mef* y resistentes a macrólidos. Estudios proteómicos posteriores deberán determinar qué proteínas no se expresan adecuadamente en estas cepas, para dar lugar a este comportamiento.
11. La transformación no sólo de elementos MEGA causantes de resistencia a macrólidos en estreptococos *viridans*, sino también de elementos MEGA presentes en estreptococos *viridans* que no son capaces de expresar fenotipo M, origina un fenotipo M en *Streptococcus pneumoniae* R6. Es probable

que ello derive de la existencia en *Streptococcus pneumoniae*, de manera basal, de la capacidad para expresar otros genes necesarios para este fenotipo de resistencia, algunos de los cuales probablemente no existirían o no se expresarían en estreptococos *viridans*. Ello implica además un importante papel potencial de estreptococos *viridans* como reservorio de resistencia, ya que los genes *mef* se encuentran muy difundidos en este grupo (se encuentran en el 80% de los aislamientos), e incluso cepas incapaces de expresar resistencia a macrólidos serían en cambio capaces de transferir esta resistencia a *Streptococcus pneumoniae*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Garder AD, Chain E. Proactinomycin: a "bacteriostatic" produced by a species of *Proactinomyces*. B J Exp Pathol 1942; 23:123-127.
2. McGuire J M, Bunch R L, Anderson R C et al. Anti biot Chemother 1952; 2: 281.
3. Prieto Prieto J, Anta Carabias L, Alou Cervera y García del Potro M. Macrólidos en Antimicrobianos en Medicina (García Sánchez JE, López R, Prieto J.) Sociedad Española de Quimioterapia. SmithKline Beecham 1999:349-356.
4. García Rodríguez JA, Gomis M, Ginzaléz J, Prieto J. El control de las enfermedades infecciosas. 60 años de terapéutica antimicrobiana. Historia de la antibioterapia. Pfizer. 2003:75-76
5. European Medicines Agency. EMEA/H/C/354.
6. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios: comunicación sobre riesgos de medicamentos para profesionales sanitarios. Ref:2007/4, del 30 de marzo de 2007. Restricciones de uso y advertencias sobre telitromicina (Ketek®)
7. 45th ICAAC.
8. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Introducción a la química de los medicamentos (I).
9. Mensa J, García-Vázquez E, Vila J. Macrólidos, cetólidos y estreptograminas. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 2003; 21:200-208.
10. Balfour JA, Figgitt DP. Telithromycin. Drugs 2001;61:815-819.
11. Willians JD, Sefton AM. Comparison of macrolide antibiotics. J antimicrob Chemother 1993; 31: 11-26

12. Guay DR, Gustavson LE, Devcich KJ, Zhang J, Cao G, Olson CA. Pharmacokinetics and tolerability of extended-release clarithromycin. *Clin Ther* 2001; 23: 566-577.
13. Nilsen OG. Comparative pharmacokinetics of macrolides. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 81-88.
14. Jain R, Danziger LH. The macrolide antibiotics: a pharmacokinetic and pharmacodynamic overview. *Curr Pharm Des.* 2004; 10:3045-3053.
15. Zhanel GG, Walters M, Noreddin A y cols. The Ketolides: A critical review. *Drugs* 2002;62:1771-1804.
16. Bergogne-Bérezin. Tissue distribution of roxithromycin. *J Antimicrob Chemother* 1987;20: 113-120.
17. Foulds G, Shepard RM, Jonson RB. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25: 73-82.
18. Bergogne-Bérezin E, Tissue distribution of dirithromycin: comparison with erythromycin. *J antimicrob Chemother* 1993; 31: 77-87.
19. Drobnic L. Tratamiento antimicrobiano. Esgon.
20. Gildert D, Moellering R, Eliopoulos G, Sande M. Guía de terapéutica antimicrobiana SANFORD. 2005.
21. Bryskier A, Bergogne-Berezin E. Macrolides. En: *Antimicrobial Agents. Antibacterials and antifungals.* (Bryskier A, ed.) ASM, Washinton, 2005, pp.475-526.
22. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2727-2734.
23. Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol Microbiol* 1999;31:623-631
24. Haight T, Finland M. Observations on mode of action of erythromycin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952;81:188-193.

25. Golman R, Fesik S, Doran C. Role of protonated and neutral forms of macrolides in binding to ribosomes from gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:426-431.
26. Odenholt I, Löfdin E, Cars O. Pharmacodynamics of telithromycin in vitro against respiratory tract pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:23-29.
27. Baquero F, García JA, García de Lomas. Antimicrobial resistance of 914 beta-hemolytic streptococci isolated from pharyngeal swabs in Spain: Results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:178-180.
28. Mensa J. Guía de terapéutica antimicrobiana. MASSON 16ª edición.
29. Wu JJ, Lin KY, Hsueh PR, et al. High incidence of erythromycin-resistant streptococci in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:844-846
30. Bahal N, Nahata MC. The new macrolide antibiotics: Azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, and roxithromycin. *Ann Pharmacother* 1992;26:46-55
31. Piscitelli S, Danziger LH, Rodvold KA. Clarithromycin[®] and azithromycin: New macrolide antibiotics. *Clin Pharm.* 1992;11:137-152.
32. Engler KH, Warner M, George RC. In vitro activity of ketolides HMR 3004 and HMR 3647 and seven other antimicrobial agents against *Corynebacterium diphtheriae*. *J Antimicrob Chemother.* 2001.
33. Citron DM, Appleman MD. Comparative in vitro activities of ABT-773 against 362 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:345-348

34. Lewis K, Saubolle MA, Tenover FC, et al. Pertussis caused by an erythromycin-resistant strain of *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:388-391
35. Angyo IA, Okpeh ES. Changing patterns of antibiotic sensitivity and resistance during an outbreak of meningococcal infection in Jos, Nigeria. *J Trop Pediatr* 1998;44:263-265
36. Centers for Disease Control and Prevention. National antimicrobial resistance monitoring system: Enteric bacteria 2000 annual report. NARMS. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2000.
37. Sutcliffe J, Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides, lincosamides, and ketolides. In: Schonfeld W, Kirst HA, eds. *Macrolide Antibiotics*. Boston: Birkhauser Verlag 2002:281-317.
38. Credito KL, Lin G, Pankuch GA, et al. Susceptibilities of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* to ABT-773 compared to their susceptibilities to 11 other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:67-72.
39. Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, et al. Potential of macrolide antibiotics to inhibit protein synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*: Suppression of virulence factors and stress response. *J Infect Chemother* 2000;6:1-7
40. Yew WW, Piddock LJ, Li MS, et al. In-vitro activity of quinolones and macrolides against mycobacteria. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:343-351
41. Steele-Moore L, Stark K, Holloway WJ. In vitro activities of clarithromycin and azithromycin against clinical isolates of *Mycobacterium avium-M. intracellulare*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1530
42. Critchley IA, Jones ME, Heinze PD, et al. In vitro activity of levofloxacin against contemporary clinical isolates of

- Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* from North America and Europe. Clin Microbiol Infect 2002;8:214-221
43. Samra Z, Rosenberg S, Soffer Y, Dan M. In vitro susceptibility of recent clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* to macrolides and tetracyclines. Diagn Microbiol Infect Dis 2001;39:177-179
44. Kenny GE, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalbapristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalbapristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2604-2608
45. Neu HC. Clinical microbiology of azithromycin. Am J Med 1991;91:12S-18S
46. Felmingham D, Zhanel G, Hoban D. Activity of the ketolide antibacterial telithromycin against typical community-acquired respiratory pathogens. J Antimicrob Chemother 2001;48:33-42
47. Hawkyard C.V. and Koerner R. J. The use of erythromycin as a gastrointestinal prokinetic agent in adult critical care: benefits versus risks authors' response. J. Antimicrob. Chemother 2008; 61: 227 - 228.
48. Sacre Hazouri JA. Macrólidos. Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. Indicaciones en enfermedades respiratorias. Revista Alergia México 2006;53:108-122.
49. MeursH, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hypersensitivity. Trends Pharmacol Sci 2003;24:48-53

50. Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, et al. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:538-551
51. Feldman C, Anderson R, Theron A et al. The effects of ketolides on bioactive phospholipid-induced injury to human respiratory epithelium *in vitro*. *EUR Respir J* 1999;13:1022-1028
52. Baumann U, Fischer JJ, Gudowius P, et al. Buccal adherence of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis under long-term therapy with azithromycin. *Infection* 2001;29:1-11
53. Tang KW, Ng P, Ho PL, et al. Effects of erythromycin on *Pseudomonas aeruginosa* adherence to collagen and morphology *in vitro*. *Eur Respir J* 2003;21:401-406
54. Sasaki J, Mikoue K, Morimoto S and Omura S. Microbial Glycosylation of Macrolide Antibiotics by *Streptomyces hygroscopicus* (ATCC 31080) and Distribution of a Macrolide Glycosyl transferasa in Several Streptomyces Strains.
55. Birte vester, stephen douthwaite. Macrolide Resistance Conferred by Base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1-12
56. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2727-2734.
57. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1267-72
58. Todd A. Davies, Karen Bush, Daniel Sahm, And Alan Evangelista. Predominance of 23S rRNA Mutants among Non-Erm, No-Mef Macrolide-Resistant Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* Collected in the United States in 1999-2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:3031-3033.

59. Marilync.Roberts, Joyce Sutcliffe, Patrice Courvalin, Lars Bogo Jensen, Julian Rood, Helena Seppala. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999;42:2823-2830.
60. Eady EA, Ross JI, Tipper JL, Walters CE, Cove JH, Noble WC. Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1993;31:211-7
61. Zhang L, Lin N, Huang C, Chen H, Lin Y, Tu y. Relationship between mutation of IR in the mtr system of *Neisseria gonorrhoeae* and multiple antibiotic resistance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006;26:248-50.
62. Clancy J, Dib-Hajj F, Petitpas JW, Yuan W. Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, mreA, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2719-23.
63. Lampson BC, von David W, Parisi JT. Novel mechanism for plasmid-mediated erythromycin resistance by pNE24 from *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:653-658.
64. Verdier L, Gharbi-Benarous J, Bertho G, Mauvais P, Girault JP. Antibiotic resistance peptides: interaction of peptides conferring macrolide and ketolide resistance with *Staphylococcus aureus* ribosomes: conformation of bound peptides as determined by transferred NOE experiments. *Biochemistry* 2002;41:4218-29.
65. Colman G, Williams REO. Taxonomy of some human *viridans* streptococci. In: Wannamaker LW, Matsen JM, eds.

- Streptococci and Streptococcal Diseases: Recognition, Understanding, and Management. New York: Academic Press 2001;82:281-299
66. Facklam RR. Physiological differentiation of *viridans* streptococci. J Clin Microbiol 1977;5:184-201
 67. Facklam R. What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev 2002;15:613-630.
 68. Jonson CC, Tunkel RA. *Streptococcus viridans*, *Streptococcus* de los grupos C y G, y *Gemella morbillorum*. En: Enfermedades infecciosas Principios y práctica. (Mandell, Douglas y Bennett). Ediciones ELSEVIER, Madrid, 2006:2434-2451.
 69. Marsh P, Martín M. Oral Microbiology. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology;1984.
 70. Frandsen EVG, Pedrazzoli V, Kilian M. Ecology of *viridans* streptococci in the oral cavity and pharynx. Oral Microbiol Immunol 1991;6:129-133
 71. Pulliam L, Dall L, Inokuchi S, et al. Effects of exopolysaccharide production by *viridans* streptococci on penicillin therapy of experimental endocarditis. J Infect Dis 1985;151:153-156
 72. Scheld WM, Keeley JM, Balian G, et al. Microbial adhesion to fibronectin in the pathogenesis of infective endocarditis (Abstract). Clin Res 1983;31:542A
 73. Sullam PM, Valone FH, Mills J. Mechanisms of platelet aggregation by *viridans* group streptococci. Infect Immun 1987;55:1743-1750.
 74. Berkowitz RJ. Acquisition and transmission of *mutans* streptococci. J Calif Dent Assoc 2003;31:135-138

75. Engel A, Kern P, Kern WV. Levels of cytokines and cytokine inhibitors in the neutropenic patients with α -hemolytic streptococcus shock syndrome. *J Infect Dis* 1996;23:785-789
76. Hoen B, Alla F, Seïtpn-Suty C, et al. Changing profile of infective endocarditis: Results of a 1-year survey in France. *JAMA* 2002;288:75-81.
77. Verhagen DWM, Vedder AC, Speelman P, Van der Meer JTM. Antimicrobial treatment of infective endocarditis caused by *viridans* streptococci highly susceptible to penicillin: historic overview and future considerations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006;57:819-824.
78. Eleftherios Mylonakis and Stephen B. Calderwood. Infective Endocarditis in adults. *N Engl J Med* 2001;18 (345):1318-1330.
79. Wilson WR, Karchmer AW, Dajani AS, et al. Antimicrobial treatment of adults with infective andocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci, and HACEK microorganisms. *JAMA* 1995;274:1706-1713.
80. Alcalde F, Benítez MA, Carratalá J, et al. In Vitro activities of the new ketolide HMR 3647 (telithromycin) in comparison with those of eight other antibiotics against *viridans* group streptococci isolated from blood of neutropenic patients with cancer. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:624-626.
81. Elting LS, Bodey GP, Keefe BH. Septicemia and shock syndrome due to *viridans* streptococci: case-control study of predisposing factors. *Clin Infect Dis* 1992;14:1201-1207
82. Koren P, Kremery V Jr. *Viridans* streptococcal bacteriemia due to penicillin-resistant and penicillin-sensitive streptococci: Analisis of risk factors and outcome in 60 patients from a single cancer centre before and after

- penicillin is used for prophylaxis. *Scan J Infect Dis* 1997;29:245-249.
83. Enting RH, deGans J, Blankevoort JP, Spanjaard L. Meningitis due to *viridans* streptococci in adults. *J Neurol* 1997;244:435-438.
 84. Yaniv LG, Potasmam I. Iatrogenic meningitis: an increasing role for resistant *viridans* streptococci? Case report and review of the last 20 years. *Scan J Infect Dis* 2000;32:693-696
 85. Marrie TJ. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *viridans* group streptococci. *Clin Invest Med* 1993;16:38-44.
 86. Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. Streptococcus. En: *Manual of Clinical Microbiology*. (Murray PR). ASM, Washington, 2003, pp. 405-420.
 87. Kilian M, Mikkelsen L, and Henrichsen. Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended description of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int. J. Syst. Bacteriol* 1989;39:471-484
 88. Kawamura Y, Hou XG, Todome Y, Sultana F, Hirose K, et al. *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1998;48:921-927
 89. Jacobs JA, Tjhie JH, Smeets MG, et al. Genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis reveals persistence and recurrence of infection with *Streptococcus anginosus* group organisms. *J Clin Microbio* 2003;41:2862-2866
 90. Whiley RA, Fraser HY, Hardie JM, et al. Phenotypic differentiation of *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus*

- intermedius*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): Association with different body sites and clinical infections. J Clin Microbiol 1990;28:1497-1501
91. Flynn CE, Ruoff KL. Identification of "*Streptococcus milleri*" group isolates to the species level with a commercially available rapid test system. J Clin Microbiol 1995;33:2704-2706
92. Jacobs JA, Schot CS, Bunschoten Ae, et al. Rapid species identification of "*Streptococcus milleri*" strains by line blot hybridization: Identification of a distinct 16S rRNA population closely related to *Streptococcus constellatus*. J Clin Microbiol 1996;34:1717-1721
93. Garnier F, Gerbaud G, Courvalin P, et al. Identification of clinically relevant *viridans* group streptococci to the species level by PCR. J Clin Microbiol 1997;35:2337-2341
94. Bergman S, Selig M, Collins MD, et al. "*Streptococcus milleri*" strains displaying a gliding type of motility. Int J Syst Bacteriol 1995;45:235-239
95. Shinzato T, Saito A. The *Streptococcus milleri* group as a cause of pulmonary infections. Clin Infect Dis 1995; 21: S238-S243.
96. Wilcox MD, Knox KW. Surface-associated properties of *Streptococcus milleri* group strains and their potential relation to pathogenesis, J Med Microbiol 1990;31:259-270.
97. Kitada K, Inoue M, Experimental endocarditis induction and platelet aggregation by *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius*. FEMS Immunol Med Microbiol 1997;19:25-32.

98. Nagamune H, Ohnishi C, Katsuura A, et al. Intermedilysin: A cytolytic toxin specific for human cells of a *Streptococcus intermedius* isolated from human liver abscess. *Adv Exp Med Biol* 1997;418:773-775.
99. Arala-Chaves MP, Ribeiro AS, Santarem MMG, et al. Strong mitogenic effect for murine B lymphocytes of an immunosuppressor substance released by *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun* 1986;54:543-548.
100. Norrby-Teglund A, Thulin P, Gan BS, et al. Evidence for superantigen involvement in severe group A streptococcal tissue infections. *J Infect Dis* 2001;184:853-860.
101. Magamune H, Whiley RA, Goto T, et al. Distribution of intermedilysin gene among the anginosus group streptococci and correlation between intermedilysin production and deep-seated infection with *Streptococcus intermedius*. *J Clin Microbiol* 200;38:220-226.
102. Toyoda K, Kusano N, Saito A. Pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group in pulmonary infections-effect on phagocytic killing by human polymorphonuclear neutrophils. *Kansenshogaku Zasshi* 1995;69:308-315
103. Wanahita A, Goldsmith EA, Musher DM, et al. Interaction between human polymorphonuclear leukocytes and *Streptococcus milleri* group bacteria. *J. Infect Dis* 2002;185:85-90.
104. Bancescu G, Lofthus B, Hofstad T, et al. Isolation and characterization of "*Streptococcus milleri*" group strains from oral and maxillofacial infections. *Adv Exp Med Biol* 1997;418:165-167.
105. Watkins LM, Pasternack MS, Banks M, et al. Bilateral cavernous sinus thromboses and intraorbital abscesses secondary to *Streptococcus milleri*. *Ophthalmology* 2003;110:569-574.

106. Awada A, Van der Auwera P, Meunier F, et al. Streptococcal and enterococcal bacteremia in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 1992;15:33-48.
107. Pfaller MA, Jones RN, Marshall SA, et al. Nosocomial streptococcal blood stream infection in the SCOPE Program: Species occurrence and antimicrobial resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29:259-263.
108. Gossling J. Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. *Rev Infect Dis* 1988;1:102-108.
109. Woo PC, Tse H, Chan KM, Lau SK et al. *Streptococcus milleri* "endocarditis caused by *Streptococcus anginosus*". *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:81-88.
110. Mathisen GE, Johnson JP. Brain abscess. *Clin Infect Dis* 1997;25:763-781.
111. Clarridge JE III, Attori S, Musher DM, et al. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus anginosus* ("*Streptococcus milleri* group") are of different clinical importance and are not equally associated with abscess. *Clin Infect Dis* 2001;32:1511-1515.
112. Porta G, Rodríguez-Carballeira M, Gomez L, et al. Thoracic infection caused by *Streptococcus milleri*. *Eur respir J* 1998;12:357-362
113. Sutcliffe J, Tait-kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother* 1996;40:1817-1824.

114. Clancy J, Petitpas J, Did-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath A.V, Bergeron J, and Retsema J A. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mef (A)*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol* 1996;22:867-879.
115. Tait-kamradt A, Clancy J, Cronan M, Did-Hajj F, Wondrack L, Yuan W and Sutcliffe J. *mef (E)* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997;41:2251-225
116. Roberts M C, Sutcliffe J., Courvalin L, Jensen B, Rood J and Seppala. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin b resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999;43:2823-2830
117. Corné H, Klaassen W, Mouton J W. Minireview : Molecular Detection of the Macrolide Efflux Gene :To Discriminate or Not To Discriminate between *mef(A)* and *mef(E)*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 2005;49:1271-1278
118. Rodríguez- Avial J, Rodríguez- Avial C, Culebras E, Bénitez A, Picazo J. Distribution of *mef(A)* and *erm(B)* genes in macrolide-resistant blood isolates of ciridans group streptococci. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy* 2001;47:719-730.

119. Aracil B, Miñambres M, Oteo J, Torres C, Gómez-Garcés J L, Alós JI. High prevalence of erythromycin-resistant and clindamycin-susceptible (M phenotype) *viridans* group streptococci from pharyngeal samples: a reservoir of *mef* genes in commensal bacteria 2001; 48:592-594
120. Ioannidou S, Tassios P T, Kotsoyilli-Tseleni, Foustoukou M, Legakis N J, Vatopoulos A. Antibiotic resistance rates and macrolide resistance phenotypes of *viridans* group streptococci from the oropharynx of healthy Greek children. International Journal of Antimicrobial Agents 2001;17:195-201
121. Ioannidou S, Papaparaskevas J, Panayotis T, Tassios M F, Legakis N J, Vatopoulos A. Prevalence and characterization of the mechanisms of macrolide, lincosamide and streptogramin resistance in *viridans* group streptococci. International Journal of Antimicrobial Agents 2003;22:626-629.
122. Seppälä H, Haanperä M, Al-Juhaish M, Järvinen H, Jalava J, and Huovinen P. Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of *viridans* group streptococci from normal flora. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003;52:636-644.
123. Cerdá Zolezzi P, Rubio Clavo MC, Millán L, Goñi P, Canales M, Capilla S, Durán R, Gómez-Izquierdo R. Macrolide resistance phenotypes of commensal *viridans* group streptococci and

- Gemella* spp. And PCR detection of resistance genes. International Journal of Antimicrobial Agent 2004;23:582-589.
124. Cerdá Zolezzi p, Millán L, Rubio Clavo MC, Goñi P, Caudes M, Gómez-lus R. Molecular Basis of Resistance to Macrolides and Other Antibiotics in Comensal *Viridans* Group Streptococci and *Gemella* spp. And Transfer of Resistance Genes to *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004;48:3462-3467.
125. Ardanuy C, Tabau F, Liñares J, Domínguez MA, Pallares R, Martín R. and The Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Distribution of Subclasses *mefA* and *mefE* of the *mefA* Gene among Clinical Isolates of Macrolide-Resistant (M-Phenotype) *Streptococcus pneumoniae*, *Viridans* Group Streptococci, and *Streptococcus pyogenes*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005;49:827-829.
126. Arpin C, Carron MH, Maugein J, Quentin C, Incidence of *mefA* and *mefE* genes in *viridans* group streptococci. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2335-2336.
127. Trallero E, Vicente D, Montes M et al. High proportion of pharyngeal carriers of commensal streptococci resistant to erythromycin in Spanish adults. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001;48:225-229.
128. King A, Bathgate T and Philips I. Erythromycin susceptibility of viridans streptococci from the normal throat flora of patients

- treated with azitromycin or clarithromycin. *Clinical Microbiology and Infection* 2002;8:85-92
129. Reinert RR, Ringelstein A, Linden M, et al. Molecular Epidemiology of Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;3:1294-1300.
130. Jacobs J A, van Baar G J, London N H, et al. Prevalence of macrolide resistance genes in clinical isolates of the *Streptococcus anginosus* ("S.milleri") group. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 2001;45:2375-2377
131. Amezaga MR, Carter PE, Cash P, McKenzie Maíz. Molecular Epidemiology of Erythromycin Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Blood and Noninvasive Sites. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40:3313-3318
132. Santagati M, Iannelli F, Oggioni MR, Stefani S, Pozzi G. Characterization of a Genetic Element Carrying the Macrolide Efflux Gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 2000;44:2585-2587.
133. Gay K, Stephens D S. Structure and Dissemination of a Chromosomal Insertion Element Encoding Macrolide Efflux in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infection* 2001;184:56-65
134. Ambrose KD, Nisbet R, Stephens DS. Macrolide Efflux in *Streptococcus pneumoniae* Is Mediated by a Dual Efflux

- Pump (*mel* and *mef*) and Is Erythromycin Inducible. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 2005;49:4203-4209.
135. Santagati M, Iannelli F, Cascote C, Campanile F, Oggioni M, Stefani S, Pozzi G. The Novel Conjugative Transposon Tn1207.3 Carries the Macrolide Efflux Gene *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Drug Resistance* 2003;3:243-247.
136. Seppälä H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen, P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1993;32:885-891
137. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;11:7-1.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina
Preventiva, Salud Pública y
Microbiología Médica



Resistencia a Macrólidos en *estreptococos viridans*. Epidemiología y Estudio Molecular

Tesis Doctoral.

M^a Sagrario Hernández Iglesias

2008.