

AGRADECIMIENTO

Quiero primero agradecer a Dios, por haberme dado la dicha de un hogar, en el cual he formado mi carácter y donde me han enseñado los valores del amor, el respeto, el trabajo, el esfuerzo, la dedicación y a luchar por una meta hasta alcanzarla.

A mi mamá, Pilar, Fausto, Camila, Patricia, Damián y Fernando por haber confiado en mí y haberme apoyado en todos los años de esta difícil carrera.

A mi esposo, por darme el amor y la ayuda necesaria para culminar este trabajo. Y por estar siempre a mi lado.

A la Dra. Jeannete Zurita por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por brindarme su ayuda y amistad y por ser un ejemplo a seguir.

A todos los integrantes de Zurita&Zurita Laboratorios, Dr. Santiago, Dr. Camilo, Sra. Anita, Dr. Gonzalito, Sra. Elsita, Santiago, Yoli, Emilia, Ángeles, Verónica, Anita, Maria Elena, Diana, Patricia, Silvia, Carlos, Pedro, Mariana, Johanna y Danny, por haber compartido este tiempo conmigo y por hacerme parte de esta gran familia.

A Mónica, César, Karina, Hugo, Melany y JuanK, mi nueva familia, por llenarme de cariño y apoyo incondicional.

A mis amigos Gabi, Vinicio y Anita, por haber compartido conmigo este camino, con alegrías y tristezas, subidas y bajadas. Todos estos momentos nos han permitido formar una amistad fuerte y duradera.

Ivonne Andrea Herrera Prada

DEDICATORIA

Me gustaría dedicar este logro a las personas más importantes en mi vida, mi mamá, mis hermanas Pilar y Patricia y a mi esposo Edgar; usando estas sencillas palabras:

No te hablo muy a menudo del profundo valor que tiene tu apoyo para mí... es la serenidad que me calma en los momentos de confusión, es el consuelo que alivia mi más profunda tristeza, o el coraje que tanta veces me impide abandonar la lucha y me alienta a continuar.

Tampoco te digo muy a menudo qué importante es para mí que me ofrezcas siempre tus brazos abiertos cuando necesito que me contengan, tus oídos atentos cuando necesito que me escuchen, y a tí cuando necesito que me amen.

Entonces, qué mejor modo que éste para agradecerte por ser simplemente la persona más importante de mi vida: porque has hecho por mí más que nadie...

Y significas más para mí que cualquier otra persona en el mundo.

Paula Finn

Gracias amigos.

Ivonne Andrea Herrera Prada

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
LISTADO DE TABLAS	X
LISTADO DE FIGURAS.....	XI
NOMENCLATURA UTILIZADA.....	XIII
RESUMEN..... VI	X
ABSTRACT..... II	XV
CAPÍTULOS	
CAPÍTULO I:	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.1.1 Streptococcus agalactiae.....	1
1.1.2 Resistencia macrolidos.....	2
1.1.3 Factores de virulencia.....	4
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	5

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	7	
1.3.1 Objetivo		
General.....	7	
1.3.2 Objetivos		
específicos.....	7	
1.4 MARCO		
TEÓRICO.....	8	
1.4.1		
Identificación.....	9	
1.4.2 Importancia		
clínica.....	10	
1.4.3 Genes de virulencia en <i>Streptococcus</i>		
<i>agalactiae</i>	10	
1.4.3.1		Gen
<i>Bac</i>	10	
1.4.3.2		Gen
<i>Bca</i>	11	
1.4.3.3		Gen
<i>Lmb</i>	11	
1.4.3.4 Gen		
<i>ScpB</i>	12	
1.4.4 Mecanismos de		
resistencia.....	12	
1.4.4.1 Modificación del sitio blanco (fenotipo MLS _B		
constitutivo		o
inductivo).....	13	
1.4.4.2 Eflujo activo (fenotipo		
M).....	13	

1.4.4.3 Inactivación de lincosamidas (fenotipo L).....	14
1.5	
HIPÓTESIS.....	15
1.5.1 Hipótesis general.....	15
1.5.2 Hipótesis específicas.....	15
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1	
COLABORADORES.....	16
2.2 ZONA DE ESTUDIO.....	16
2.3 PERÍODO DE INVESTIGACIÓN.....	17
2.4	
DISEÑO.....	17
2.5	
PROCEDIMIENTO.....	17
2.5.1 Material biológico.....	17
2.5.2 Conservación de las cepas.....	18

2.5.3 Extracción de ADN.....	18
2.5.4 Protocolo de PCR.....	18
2.5.5 Corridas de electroforesis.....	..20
2.6 ANÁLISIS DE DATOS.....	21

CAPÍTULO III:

RESULTADOS.....22

3.1 CONTROL DE IDENTIFICACIÓN DE <i>STREPTOCOCCUS</i> <i>AGALACTIAE</i>	22
3.2 FACTORES DE VIRULENCIA.....	22
3.2.1 Gen <i>bac</i>	22
3.2.2 Gen <i>bca</i>	23
3.2.3 Gen <i>lmb</i>	24
3.2.4 Gen <i>scpB</i>	24
3.2.5 Resultados combinados de los factores de virulencia.....	25
3.3 GENES DE RESISTENCIA.....	25

3.3.1 Fenotipos presentes en las cepas estudiadas.....	25
3.3.2. Genotipos presentes en las cepas estudiadas.....	26
3.3.2.1 Gen	
<i>ermA</i>	26
3.3.2.2 Gen	
<i>ermB</i>	27
3.3.2.3.Gen	
<i>mefA</i>	28
3.3.2.4.Gen	
<i>mreA</i>	28
3.3.2.5 Gen	
<i>linB</i>	29
3.3.3 Fenotipos y genotipos de cepas resistentes.....	30
3.3.4 Distribución de cepas con resistencia a eritromicina y clindamicina por año.....	30

CAPÍTULO IV:

DISCUSIÓN.....	32
4.1 CONTROL DE IDENTIFICACIÓN DE <i>STREPTOCOCCUS</i> <i>AGALACTIAE</i>	32
4.2 FACTORES DE VIRULENCIA.....	32
4.3 GENES DE RESISTENCIA.....	33

4.4 DISTRIBUCIÓN DE CEPAS RESISTENCIA A ERITROMICINA Y CLINDAMICINA	POR
AÑO.....	34
CAPITULO	V:
CONCLUSIONES.....	35
CAPITULO VI:	
RECOMENDACIONES.....	36
CAPITULO VII:	
BIBLIOGRAFÍA.....	37

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 <i>Streptococcus</i> Beta-hemolítico del grupo B, usando la coloración de Gram. 100X.....	8
Figura 1.2 <i>Streptococcus</i> Beta-hemolítico del grupo B, cultivado en agar sangre de cordero.....	.9
Figura 1.3 Prueba de Camp-test para identificar la producción de la proteína factor CAMP, propia de <i>Streptococcus</i> Beta-hemolítico del grupo B. En forma horizontal está sembrando <i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923, y verticalmente una cepa SGB.....	.9
Figura 1.4 SGB con fenotipo MLS _B constitutivo.....	13
Figura 1.5 SGB con fenotipo M.....	14
Figura 1.6 SGB con fenotipo L.....	14

Figura 3.1. Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *cfb*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....22

Figura 3.2. Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *bac*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....23

Figura 3.3. Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *bca*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....23

Figura 3.4 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *lmb*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....24

Figura 3.5 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *scpB*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....24

Figura 3.6 Distribución de los fenotipos de los SGBs.....26

Figura 3.7 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *ermA*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....27

Figura 3.8 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *ermB*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....27

Figura 3.9 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *mefA*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....28

Figura 3.10 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *mreA*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....29

Figura 3.11 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *linB*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV.....29

Figura 3.12 Distribución de los SGBs en los diferentes años de recolección.....31

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Secuencias de los cebadores, tamaños de los fragmentos amplificados y las temperaturas de hibridación usados en el protocolo de PCR.....19

Tabla 3.1 combinaciones de factores de virulencia.....25

Tabla 3.2 Relación entre los fenotipos y los genotipo de los SGBs.....30

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1.1. *Streptococcus agalactiae*

El *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B (SGB) o *Streptococcus agalactiae*, fue reconocido como agente etiológico de procesos infecciosos hace

ya más de 60 años. Este coco Gram positivo, ha sido reconocido como la causa principal de enfermedades en los períodos neonatal y perinatal. Las mujeres se colonizan con el microorganismo en la vagina y el recto. La colonización vaginal asintomática se encuentra en el 5 al 35% de las mujeres embarazadas. Hasta el 60 % de las mujeres colonizadas pueden portar el microorganismo en forma intermitente. En realidad la colonización vaginal puede representar contaminación rectal, al ser el tracto gastrointestinal el principal reservorio de este microorganismo. El recién nacido se coloniza por transmisión vertical a partir de la madre colonizada, ya sea in útero o durante el parto. Además el recién nacido puede ser colonizado por exposición nosocomial después del nacimiento. Entre los lactantes colonizados la enfermedad puede aparecer en 1 a 4 por cada 1000 nacidos vivos (Koneman [et al. 1999](#)).

En mujeres embarazadas *Streptococcus agalactiae* puede dar origen a infección urinaria, corioamnionitis, endometritis, que puede producir abscesos pélvicos, infección de vías urinarias y shock séptico y endocarditis y es la causa más frecuente de sepsis bacteriana y meningitis neonatal. En la sepsis temprana los síntomas aparecen dentro de la primera semana de vida, sobre todo en las primeras 48 horas. En la sepsis tardía las manifestaciones clínicas tienen lugar en la tercera o cuarta semana, incluso hasta los tres meses de vida (Crespo [et al. 1996](#)).

En las décadas de los 70 y 80 aparecen en la literatura reportes sobre infecciones graves en adultos, para finalmente en los años 90 determinarlo como una importante causa de infección en población no embarazada. La presentación clínica más frecuente en este grupo de individuos incluye infecciones de la piel, hueso, bacteriemias, sin un foco identificado. Además puede causar cistitis, pielonefritis en hombres, mujeres no embarazadas y niños. En otros grupos los factores de riesgo de infección del tracto urinario producido por el SGB son enfermedades subyacentes (en especial, diabetes, cirrosis, hepatopatías) y anomalías estructurales del tracto urinario. La pielonefritis y el

absceso renal son complicaciones posibles de las infecciones ascendentes y de la diseminación por vía hemática de los SGB. Por último los SGB también pueden ser capaces de producir el síndrome similar a Shock Tóxico (SSST) asociado al *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A (Koneman [et al., 1999](#)).

1.1.2 Resistencia a macrólidos

Dada la importancia que ha cobrado el SGB como agente etiológico de varios procesos infecciosos, el interés se ha centrado naturalmente en las opciones de tratamiento antibiótico que se puede ofrecer a estos pacientes. Al momento la penicilina es el fármaco de elección. Debido a que no se ha encontrado resistencia a la penicilina entre estos microorganismos la realización de pruebas de sensibilidad de aislamientos clínicos por razones que no sean la vigilancia de la resistencia, no es necesaria. Sin embargo actualmente se da una circunstancia que ha hecho que algunos autores se planteen la pertinencia de mantener la penicilina como tratamiento de elección: el aumento de fracasos terapéuticos. Diversos estudios describen, con creciente frecuencia en algunas áreas, fracasos terapéuticos en faringoamigdalitis estreptocócicas tratadas con penicilina (Pichichero, 1995), que se atribuyen a disminución en la síntesis de PBP's (proteínas fijadoras penicilina por sus siglas en ingles), dando lugar a un cierto grado de tolerancia o a una hipotética protección por betalactamasa producida por otras bacterias integrantes de la microbiota faríngea (Portillo, 2003). Por lo tanto se ha considerado el uso de un macrólido como la eritromicina, o una lincosamida como la clindamicina, indispensables en los casos de pacientes alérgicos a la penicilina, por lo se requiere detectar la resistencia de estos microorganismos ([Soriano et al., 2000](#)).

El conocimiento del porcentaje de resistencia de los SGB que circulan en el país es importante para el manejo de este tipo de infecciones, pues la resistencia a eritromicina suele variar dependiendo de la zona geográfica. Así por ejemplo en países de América Latina como Venezuela se han reportado

porcentajes que superan el 33%, (Riera [et al.](#), 1993), mientras que en Argentina es del 6% (Pérez [et al.](#), 2004). Otros países arrojan cifras similares, tal es el caso de Chile en donde las cepas de SGB presentan una tasa de resistencia del 17% (Betriu [et al.](#), 2004), en México del 16% (Romeo [et al.](#), 2000) y en Brasil del 18% (Bencherit [et al.](#), 1982). La resistencia en los países europeos, también es variable. Así lo demuestran los porcentajes del 17% en España (Weisner [et al.](#), 2004) o tan baja como el 4% en Inglaterra (Betriu [et al.](#), 2003). El mismo comportamiento de variabilidad lo podemos observar en países asiáticos como Arabia Saudita donde la resistencia alcanza el 14% (Hsueh [et al.](#), 2001), en Japón es del 47% (Hsueh [et al.](#), 2001), en Taiwán alcanza el 30% (Ko [et al.](#), 2004) mientras que en países africanos como Nigeria es del 20% (Suara [et al.](#), 1994), en Costa de Marfil es de 19% (Suara [et al.](#), 1994). Es importante por lo tanto conocer los porcentajes de resistencia a macrólidos, y su comportamiento genético.

Una de las razones para la variabilidad en las tasas de resistencia entre las diferentes zonas geográficas, es la diversidad de serotipos de *S. agalactiae*. Existen 8 serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII), de acuerdo a la estructura del polisacárido capsular, que condiciona la resistencia a los antimicrobianos. De esta forma, se han descrito diferencias geográficas y temporales en la distribución de los serotipos de este microorganismo (Martínez [et al.](#), 2004).

Por todo lo expuesto, podemos afirmar que es importante tener datos sobre la resistencia a eritromicina en el país. No se han planteado estudios para analizar los niveles de resistencia a antimicrobianos. Además es necesario plantear nuevos métodos de vigilancia de resistencia, que pueden trabajar de la mano con los métodos convencionales.

1.1. 3 Factores de virulencia

El grado de patogenicidad o capacidad para producir enfermedad de un microorganismo está dado por los factores de virulencia. En el SGB algunos de estos son: *bac*, *bca*, *lmb*, *scpB*. Varios estudios aseguran que los genes de virulencia *scpB* y *lmb* están siempre presentes en cepas de *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B que infectan a los humanos. Dmitriev [et al.](#) (2004) estudiaron los fragmentos que se encontraban entre estos dos genes y se encontró tres tipos de regiones intergénicas. Por ejemplo, uno de los fragmentos intergénicos fue encontrado solo en cepas del serotipo III. A partir de esto, actualmente se propone, como un criterio adicional de clasificación de *Streptococcus agalactiae*, el estudio de las regiones o fragmentos intergénicos.

Otro factor de patogenicidad primario es el polisacárido capsular que establece los diferentes serotipos de *Streptococcus agalactiae*. Los serotipos contribuyen a causar las diversas enfermedades en diferentes poblaciones, así por ejemplo el 30% de las infecciones en mujeres no embarazadas son causadas por el serotipo II, mientras que el serotipo III causa más del 70% de meningitis neonatal. En este sentido actualmente se desarrollan vacunas enfocadas a los serotipos de mayor prevalencia. Uno de los componentes de estos polisacáridos capsulares son las proteínas C alfa y beta codificadas por los genes *bca* y *bac* respectivamente, candidatas potenciales para la elaboración de vacunas (Manning [et al.](#), 2006). Estas proteínas C alfa y beta fueron objeto de este estudio para sentar las bases de una posible elaboración de vacunas

De acuerdo a lo descrito, es útil determinar los factores de patogenicidad, de las poblaciones bacterianas de SGB que circulan en población enferma, no solo de embarazadas sino también en adultos y niños para que una vez confirmada la especie de SGB, a través de estos factores que pueden generar nuevos criterios moleculares de selección y se pueda conocer las proteínas capsulares que podrían ser candidatas para la elaboración de vacunas.

1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En el tratamiento para *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B, el antibiótico de primera elección es la penicilina. El tratamiento alternativo, en pacientes con hipersensibilidad es un macrólido de primera generación, la eritromicina, o una lincosamida como la clindamicina que son altamente activas contra *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A y además la mayoría de cepas de *Streptococcus* β -hemolítico incluyendo grupos B, C, F, y G (Crespo [et al, 1996](#)).

En cuanto a los mecanismos de resistencia a eritromicina, existen dos tipos: la modificación del sitio blanco y el eflujo activo, además recientemente se ha descrito un mecanismo de resistencia a clindamicina y sensibilidad a eritromicina dado por la Inactivación enzimática mediada por la presencia del gen *linB*. La modificación del sitio blanco se debe a la acción de metilasas (A2058 en *Escherichia coli*) que mono o dimetilan un residuo de adenina del dominio V del ARNr 23S en la posición N⁶, mecanismo que se produce por la adquisición del gen *erm*. El eflujo activo se produce por la presencia del gen *mefA* (*macrolide efflux*) que codifica la síntesis de una bomba que media el eflujo en forma activa (Tait-Kamradt [et al, 1997](#)).

Considerando la importancia clínica que representa el pronto y preciso análisis de resistencia a antibióticos y los varios tipos de mecanismos genéticos que median este comportamiento, específicamente en este caso a macrólidos y lincosamidas en *S. agalactiae*, el método PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) resulta ventajoso ante el procedimiento tradicional de pruebas de susceptibilidad y de análisis fenotípico de resistencia por difusión por disco. Además se presenta como una alternativa importante en el desarrollo de estudios epidemiológicos que arrojen datos confiables y completos sobre los niveles de resistencia y factores de virulencia predominantes en una determinada zona geográfica (De Mouy [et al, 2001](#)).

Mediante la PCR es posible investigar a profundidad los mecanismos que involucran la resistencia a eritromicina (modificaciones del sitio blanco y eflujo activo), ya que el desarrollo de primers enfocados a diferentes genes nos brinda versatilidad (Faile [et al, 2005](#)).

Además de la velocidad de análisis que se obtiene con la PCR, lo cual es un factor de gran importancia en pacientes con hipersensibilidad a la penicilina que requieren ser tratados de urgencia con otros antibióticos del grupo de los macrólidos, el uso de primers o iniciadores específicos permite mayor especificidad. Asimismo, la PCR al ser un método altamente sensible, permite detectar y brindar un diagnóstico a partir de bajas copias de material genético en una muestra (De Mouy [et al, 2001](#)).

Considerando todos los puntos planteados, el objetivo de este proyecto es identificar los genes de resistencia y virulencia utilizando la técnica de PCR a partir de cepas recolectadas de varios hospitales de la ciudad de Quito (Hospital Voz Andes, Hospital Militar, Maternidad Isidro Ayora y Hospital Carlos Andrade Marín). Se utilizará esta técnica debido a la facilidad de su desarrollo en comparación con otras técnicas moleculares.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia de genes de resistencia a eritromicina (*ermA*, *ermB*, *mefA*, *mreA*, *linB*) y genes de virulencia (*bac*, *bca*, *lmb*, *scpB*) en *Streptococcus*

agalactiae aislado de muestras de pacientes que acudieron a diversos hospitales de Quito.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar los tipos de genes más comunes causantes de la resistencia a macrólidos (eritromicina) y lincosamidas (clindamicina) en las cepas de *Streptococcus agalactiae* de aislados de pacientes que acudieron a los hospitales de la ciudad de Quito.
- Identificar los factores de virulencia (genes) más comunes en las cepas de *Streptococcus agalactiae* aislados de pacientes que acudieron a los hospitales de la ciudad de Quito

1.4 MARCO TEÓRICO

El *Streptococcus agalactiae* o *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B es un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable. En la Figura 1.1 se presenta

un grupo de SGB. Este microorganismo puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre o suero favorecen su crecimiento. Tras 18-24 h de incubación en agar sangre las colonias son de unos 2 mm. de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de β -hemólisis. En la Figura 1.2 se presenta un cultivo de SGB en agar sangre de cordero, donde se puede observar la hemólisis beta que producen estas bacterias, aunque existen algunas cepas no hemolíticas. También, el empleo de medios selectivos favorece la recuperación de *Streptococcus agalactiae* y como agentes selectivos se emplea gentamicina, ácido nalidíxico, colistina o cristal violeta (Sutcliffe [et al.2005](#)).

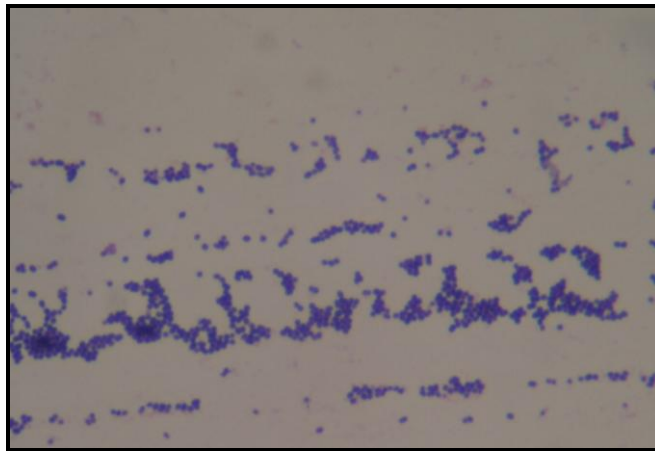
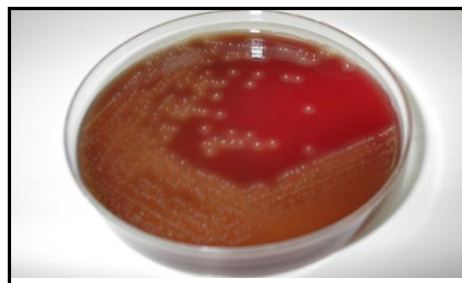


Figura 1.1 *Streptococcus* Beta-hemolítico del grupo B, usando la coloración de Gram. 100X (Herrera, 2007)



XII

Figura 1.2 *Streptococcus* Beta-hemolítico del grupo B, cultivado en agar sangre de cordero, (Herrera, 2005)

1.4.1 Identificación

Las pruebas bioquímicas más utilizadas son el CAMP-test, la hidrólisis del hipurato y la prueba de aglutinación por aglutinación y cotrimoxazol, aunque ninguna de ellas es específica. En la Figura 1.3 se presenta una gráfica de la prueba de CAMP-test. En medios de cultivos especiales, el *Streptococcus agalactiae* produce un pigmento de color rojo naranja que es característico y que permite su identificación directa sin necesidad de otras pruebas, las cepas no hemolíticas no producen pigmento. La identificación definitiva de *Streptococcus agalactiae* requiere la demostración del antígeno específico de grupo, por ejemplo, mediante la aglutinación con partículas de látex (Koneman [et al. 1999](#)).

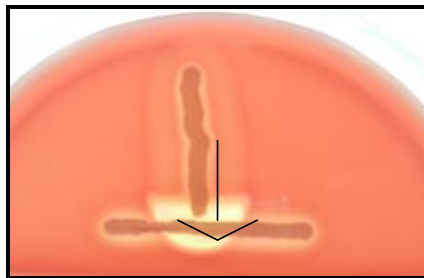


Figura 1.3 Prueba de Camp-test para identificar la producción de la proteína factor CAMP, propia de *Streptococcus* Beta-hemolítico del grupo B. En forma horizontal está sembrando *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, y verticalmente una cepa SGB (Herrera, 2007)

1.4.2 Importancia clínica

Durante los últimos años el *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B ha demostrado ser un agente etiológico importante en un amplio espectro de infecciones, sobre todo en neonatos y en adultos susceptibles como diabéticos,

alcohólicos y personas inmuno deprimidas. En estos individuos las manifestaciones más comunes son infecciones de la piel y los tejidos blandos y cada vez más se reconoce a este microorganismo como un problema de salud pública. El tracto gastrointestinal es el principal reservorio de este microorganismo. En los países industrializados es causa importante de infección neonatal. En neonatos la principal vía para transmitir el microorganismo consiste en el paso por el canal del parto colonizado, aunque también se puede adquirir por infección intrauterina y adquisición nosocomial postparto (Crespo [et al, 1996](#)).

En los neonatos es un patógeno importante que causa neumonía, sepsis y meningitis con una mortalidad alta. En las madres, se encuentra involucrado en infecciones intrauterinas, endometritis, infección urinaria y bacteriemia. Aunque la transmisión madre-hijo ocurre en 29% a 70% de los casos, no todos los neonatos desarrollan infecciones (Crespo [et al, 1996](#)).

1.4.3 Genes de virulencia en *Streptococcus agalactiae*

1.4.3.1 Gen *Bac*.

Streptococcus agalactiae, como mecanismo de virulencia sintetiza varias proteínas extracelulares de superficie. Entre estas, la proteína receptora Fc IgA (β -antígeno), codificada por el gen *bac* que se presenta en forma más frecuente en las cepas de los serotipos Ib y II. Actualmente el β -antígeno se considera como un factor de virulencia de mucha importancia para la resistencia que presenta el sistema inmunológico del huésped a esta bacteria. Al unirse la IgA a la superficie bacteriana, el microorganismo bloquea la unión de otros anticuerpos opsonizadores e inhibe la fagocitosis. El análisis de cepas positivas para el gen *bac* ha revelado que ellas son altamente homogéneas y presumiblemente pertenecen a un mismo linaje genético (Dimitriev et al, 2006).

1.4.3.2 Gen *Bca*.

La proteína α C codificada por el gen *bca* de *Streptococcus agalactiae* es un antígeno de superficie de mucha importancia. Aunque su función en relación a la biología y virulencia de este organismo no ha sido descrita, es opsónico y capaz de reducir la protección inmunológica. La proteína α C está altamente distribuida entre las muestras clínicas y es un potencial transportador proteico, así como también es un antígeno que puede ser usado en vacunas conjugadas, como portador potencial de la proteína y antígeno en vacunas conjugadas para provenir las infecciones por *Streptococcus* β hemolíticos del grupo B. La proteína codificada por el *bca* se relaciona a una clase de proteínas de superficie asociadas a cocos Gram positivos involucrados en la virulencia y la inmunidad. Una característica única del gen *bca* es que contiene 9 repeticiones tándem, cada una de 246 bp. A pesar de la diversidad genotípica y fenotípica de esta proteína y la gran variedad en su expresión entre cepas de este patógeno, no se sabe si la proteína está directamente relacionada con la virulencia (Jing et al,1997).

1.4.3.3 Gen *Lmb*

La adherencia a proteínas de matriz extracelular se considera como un factor importante en la patogénesis de la infección, pero las características genéticas de este proceso se mantienen desconocidas. A pesar de esto se ha identificado y secuenciado un gen que codifica una lipoproteína putativa que muestra homología significativa con la familia proteica Lral. Se ha demostrado que mutantes de este locus han tenido una adherencia sustancialmente reducida a la laminina humana inmovilizada. A partir de esto, la secuencia nucleotídica de este gen se designó como *lmb* (unión a la laminina de sus siglas en inglés) y ha mostrado que está presente en todos los serotipos comunes de *S. agalactiae*. Además, se ha demostrado que esta proteína es un mediador de la adherencia de *Streptococcus* β hemolítico del grupo B a la laminina humana, lo que puede

ser esencial para la colonización bacteriana del epitelio dañado y el paso de las bacterias al torrente sanguíneo (Spellerberg et al, 1999).

1.4.3.4 Gen *ScpB*.

La peptidasa C5a es una proteasa sérica localizada en la superficie que inactiva al C5a humano, un neutrófilo quimioatrayente producido durante la activación del complemento. Esta enzima se cree que contribuye a la virulencia al interferir en el reclutamiento de los neutrófilos y contribuye a la baja respuesta inflamatoria que se observa en los tejidos infectados. Además, información reciente muestra que la peptidasa C5a se une a fibronectina (Fn) y promueve la infección bacteriana en las células epiteliales. Esta peptidasa fue identificada primero en *S. pyogenes* y una enzima virtualmente idéntica fue subsecuentemente identificada en *S. agalactiae*. Estas dos proteínas fueron designada como *scpA* y *scpB*.

En el aspecto estructural, todas las cepas de *S. agalactiae* producen la proteína de superficie *scpB* (125 kDa), la cual es una proteasa sérica altamente específica con una triada catalítica conservada de Ser-Asp-His. La similitud existente entre *scpA* y *scpB* sugiere una transferencia horizontal de genes. (Lindahl et al, 2005)

1.4.4 Mecanismos de resistencia

Se describen dos mecanismos de resistencia a macrólidos en *S. agalactiae*: modificación del sitio blanco y eflujo activo. Además es necesario revisar un mecanismo de resistencia a lincosamidas por Inactivación enzimática; mecanismo que ha sido recientemente descrito

1.4.4.1 Modificación del sitio blanco (fenotipo MLS_B constitutivo o inductivo)

Se produce por la adquisición del gen *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) que codifica una enzima que N-dimetila un residuo específico de adenina en el 23S rARN, produciendo un cambio conformacional en el ribosoma que disminuye la afinidad a macrólidos, lincosamidas y streptogramina B, que son fármacos químicamente distintos pero con similar mecanismo y sitio de acción. Esta resistencia cruzada se conoce como resistencia fenotípica MLS_B (macrólidos, lincosamidas y streptogramina B) y se expresa en forma constitutiva o inducible. Cuando se presenta de forma constitutiva la cepa presenta resistencia a la eritromicina y clindamicina,. En la Figura 1.4 se presenta un ejemplo de este fenotipo. Si presenta la resistencia de forma inducida se produce resistencia a eritromicina y una aparente sensibilidad a la clindamicina, aunque se observa un achatamiento en el halo (Cavaliere et al, 2005).



Figura 1.4 SGB con fenotipo MLS_B constitutivo. (Herrera, 2007)

1.4.4.2 Eflujo activo (fenotipo M).

Este mecanismo se produce por la presencia del gen *mefA* (*macrolide efflux*) que codifica la síntesis de una bomba que media el eflujo en forma activa. Este eflujo activo solo confiere resistencia a macrólidos, por lo que se conoce como resistencia fenotípica M. Es el mecanismo de resistencia más frecuentemente descrito en *S. agalactiae* (Camponovo et al, 2002). En la Figura 1.5 se presenta un ejemplo del fenotipo M.

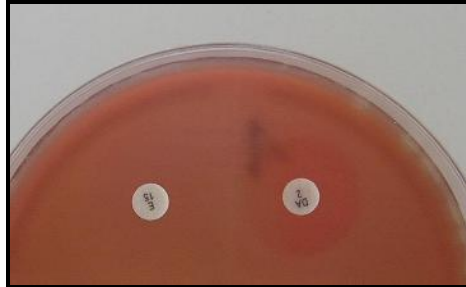


Figura 1.5 SGB con fenotipo M (Herrera, 2007)

1.4.4.3 Inactivación de lincosamidas (fenotipo L)

En *Staphylococcus* (*S. haemolyticus* y *S. aureus*) y en *Enterococcus* (*E. faecium*) se ha descrito la presencia de enzimas inactivantes de lincomicina (nucleotidiltransferasas), codificadas por los genes *linB*, actualmente designados *Inu(A)* (lincomycin nucleotidyltransferase) y *InuB*. Un estudio reciente confirmó la presencia del gen *Inu (B)* en una cepa de *S. agalactiae* con fenotipo L. Este es el primer caso en el que se describe un mecanismo de inactivación enzimática en *Streptococcus*. En la Figura 1.6 se presenta una cepa con el fenotipo L (Portillo, 2003)



Figura 1.6 SGB con fenotipo L (Herrera, 2007)

1.5 HIPÓTESIS

1.5.1 Hipótesis general

La resistencia a macrólidos y lincosamidas, en *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B es baja, y se ve modificada por la presencia de los factores de virulencia (*bac*, *bca*, *lmb*, *scp*) en aislamientos de procesos infecciosos de un sector de la población ecuatoriana

1.5.2 Hipótesis específicas

- El fenotipo de resistencia a eritromicina está ligado a la presencia de los genes *ermA*, *ermB*, *mefA*, o *mreA*.
- La resistencia a macrólidos es mayor que la resistencia a lincosamidas.
- Existen cepas de *Streptococcus agalactiae* con el fenotipo L entre los aislamientos de hospitales de la ciudad de Quito.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 COLABORADORES

La investigación se realizó con la colaboración del personal del área de microbiología de varios hospitales de la ciudad de Quito: Hospital Voz Andes, Hospital Militar y Hospital Carlos Andrade Marín. También se contó con la colaboración técnica del Director y Codirector asignados para dirigir esta tesis: el Doctor Ángel Guevara y el Doctor Marcelo Grijalva respectivamente. Adicionalmente se tuvo la ayuda de la codirectora externa, Doctora Jeannete Zurita, Médica Microbiología.

Además, se tuvo la colaboración de la Doctora Lúcia M. Teixeira del Instituto de Microbiología de la Universidad Federal de Río de Janeiro de Brasil, autora del artículo científico “Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Genes among Brazilian Group B Streptococci Recovered from Bovine and Human Sources”, quien amablemente y por su interés científico proporcionó las cepas control de los diferentes genes estudiados en este trabajo.

2.2 ZONA DE ESTUDIO

El proyecto se llevó a cabo en dos fases: la primera en la que se recolectaron todas las cepas de *Streptococcus* de los diferentes laboratorios de microbiología de los siguientes hospitales: Hospital Voz Andes, Hospital Carlos Andrade Marín y Hospital Militar. También se utilizó un grupo de cepas de un proyecto anterior, realizado por el Dr. Santiago Cárdenas. En la segunda fase se realizaron las pruebas de laboratorio en las áreas de Microbiología y Biología Molecular de Zurita&Zurita Laboratorios en la ciudad de Quito.

2.3 PERÍODO DE INVESTIGACIÓN

La recolección de las cepas tuvo un tiempo de duración de 31 meses, desde enero del 2005 hasta agosto del 2007. Se incluyeron en esta fase 34 cepas recolectadas entre marzo del 2001 hasta noviembre del 2002, provenientes de un estudio previo por Cárdenas y col (2002). La segunda fase, que consistió en la realización de las pruebas de laboratorio y análisis de datos, tuvo una duración de 12 meses desde enero hasta diciembre del 2007. El Proyecto en conjunto tuvo una duración de 43 meses.

2.4 DISEÑO

El estudio es descriptivo, transversal y prospectivo. El método estadístico usado para la recolección de muestras fue el muestreo no probabilístico o circunstancial. Se seleccionaron aquellas muestras provenientes de pacientes con cultivos positivos para *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B (Mendez, 2001).

Se analizaron 100 cepas obtenidas entre el 2005 y 2007, incluyendo las 34 cepas del estudio previo. Los resultados fueron analizados mediante estadística descriptiva con el uso de cuadros y gráficos.

2.5 PROCEDIMIENTO

2.5.1 Material biológico.

En la presente investigación se usaron cepas de *Streptococcus agalactiae* recolectadas de varios hospitales de la ciudad de Quito, obtenidas entre el 2005 y el 2007. Los controles positivos para genes de resistencia y factores de

virulencia fueron cepas proporcionadas por la Dra. Lúcia M. Teixeira del Instituto de Microbiología, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

2.5.2 Conservación de las cepas

Los cepas fueron conservadas en congelación a -20° C durante el desarrollo de la fase inicial, para lo cual se usaron crioviales. El momento de iniciada la fase de laboratorio las cepas fueron descongeladas mediante cultivo en caldo tripticasa soya (TSB) con una incubación a 33° C durante 24 horas.

2.5.3 Extracción de ADN

Previo a la extracción del ADN, se colocó 1 ml del caldo de cultivo TSB en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Se centrifugó a 16,000 rpm durante 2 minutos para obtener el botón celular, el cual fue resuspendido en 480 μ l de EDTA 50 mM a pH 8. Posteriormente, se adicionaron 120 μ l de una solución de 20 mg/ml de lisozima (Sigma, USA) para obtener una lisis eficiente. Se incubó la muestra a 37° C por 40 minutos, luego de lo cual se centrifugó por 2 minutos a 16,000 rpm y se removió el sobrenadante. Para la extracción y purificación del ADN se utilizó el kit comercial de extracción Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA).

2.5.4 Protocolo de PCR

Para confirmar mediante PCR la identificación previa de SGBs realizada por los laboratorios participantes, se usaron los cebadores Sag 59 y Sag 190 que identifican el gen *cfb* que codifica el factor CAMP, una proteína extracelular difundible producida por la gran mayoría de GBS (Ke et al, 2000). Además, se utilizaron varios cebadores para la detección de los diferentes genes según el método de Duarte y col (2005), con excepción de las temperaturas de hibridación las cuales variaron según el T_m proporcionado por el fabricante en

cada uno de los genes. Las secuencias de los cebadores, los tamaños de los fragmentos amplificados y las temperaturas de hibridación se describen en la Tabla 2.1.

Para la amplificación de los fragmentos mediante PCR, se utilizaron aproximadamente 600 ng de DNA en un volumen final de 20 μ L, que contenía 200 μ M de una mezcla de dNTPs (Invitrogen, USA), 1.5 mM de MgCl (Roche, Alemania), 10 mM de buffer 10X (Roche, Alemania), 0.5 μ M de cada primer (Roche, Alemania) y 0.5 UI *Taq* DNA polimerasa (Roche, Alemania).

Los ciclos de amplificación consistieron en 4 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguido por 32 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 2 minutos de hibridación a temperatura variable para cada gen y 2 minutos de extensión a 72°C complementado con extensión final a 72°C por 5 minutos.

Gen	Secuencia de cebador inicial	Secuencia de cebador reverso	bp	T. hibridación
Sag 59- Sag 190	5'TTT CAC CAG CTG TA TTA GAA GTA 3'	5' GTT CCC TGA ACA TTA TCT TTGAT 3'	153	51 °C
<i>Erm A</i>	5'GCA TGA CAT AAA CCT TCA 3'	5' AGG TTA TAA TGA AAC AGA 3'	206	50 °C
<i>Erm B</i>	5'GAA AAG G TACTC AAC CAA ATA 3'	5' AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC 3'	639	51 °C
<i>Mef A</i>	5'AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC 3'	5' TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG 3'	348	55 °C
<i>Mre A</i>	5'AGA CAC CTC GTC TAA CCT TCG CTC 3'	5' TTC AGT TAC TAC CAT GCC ACA GG 3'	416	63 °C
<i>Lin B</i>	5' CCT ACC TAT TGT TTG TGG AA 3'	5' ATA ACG TTA CTC TCC TAT TC 3'	944	53 °C
<i>Bac</i>	5' TGT AAA GGA CGA TAG TGT GAA GAC 3'	5' CAT TTG TGA TTC CCT TTT GC 3'	530	58 °C
<i>Bca</i>	5' CAG GAG GGG AAA CAA CAG TAC 3'	5' GTA TCC TTT GAT CCA TCT GGA TAC G 3'	183	60 °C
<i>Lmb</i>	5' GAC GCA ACA CAC GGC AT 3'	5' TGA TAG AGC ACT TCC AAA TTT G 3'	300	59 °C
<i>ScpB</i>	5' ACA ATG GAA GGC TCT ACT GTT C 3'	5' ACC TGG TGT TTG ACC TGA ACT A 3'	255	59 °C

Tabla 2.1 Secuencias de los cebadores, tamaños de los fragmentos amplificados y temperaturas de hibridación usados en el protocolo de PCR.

2.5.5 Corridas de electroforesis

Una alícuota de 8 μ l de cada reacción fue mezclada con loading buffer (Invitrogen, USA), analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,7 % teñido con bromuro de etidio (0.5 μ l/ 10ml) y visualizada en un transiluminador de luz UV. Fue utilizado el marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Market XIV (100-1500 bp) (Roche, Alemania).

2.6 ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva, con el programa Microsoft Excel para crear tablas y gráficos de barras.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 CONTROL DE IDENTIFICACIÓN DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Con respecto a la corrida de PCR para detectar el gen *cfb* e identificar los SGBs, se obtuvo un 75% de cepas correctamente identificadas. De esta manera, solo las cepas con reacción positiva fueron utilizadas para los pruebas de resistencia y factores de virulencia. En la Figura 3.1 se presenta el resultado de una de esta corridas de PCR:

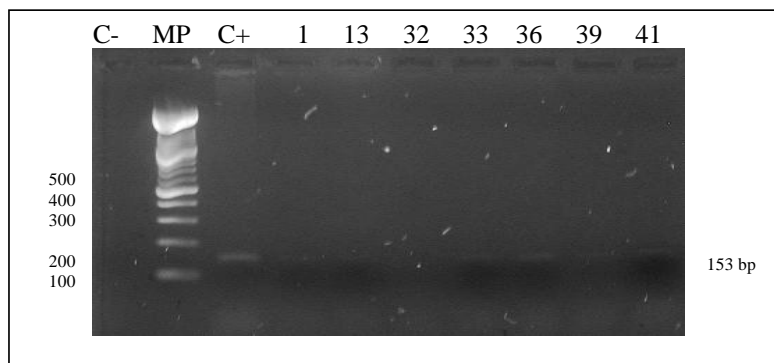


Figura 3.1. Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *cfb*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.2 FACTORES DE VIRULENCIA

3.2.1 Gen *bac*

Un 12 % de las cepas analizadas presentaron el gen *bac*, siendo así el gen productor de un factor de virulencia con menor prevalencia. Se comprobó

que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, de 530 pb (Figura 3.2)

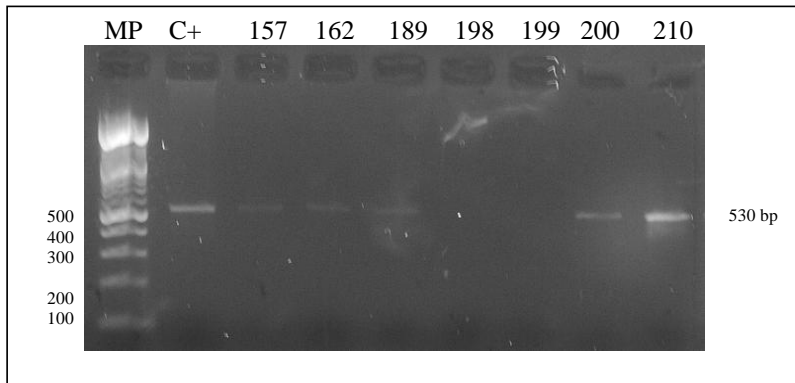


Figura 3.2. Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *bac*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.2.2 Gen *bca*

Se obtuvo un 72% de cepas portadoras del gen *bca*. Se comprobó que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, 183 pb. En la Figura 3.3. se presenta el resultado de una corrida de PCR para este gen.

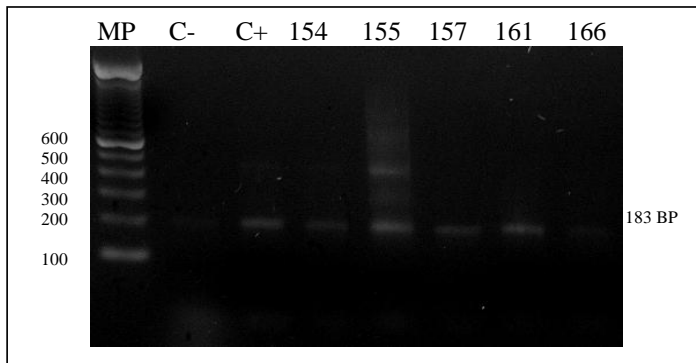


Figura 3.3. Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *bca*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.2.3 Gen *Imb*

Se obtuvo un 92% de cepas portadoras del gen *Imb*. Se comprobó que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, 300 pb. En la Figura 3.4. se presenta el resultado del análisis de el gen mencionado.

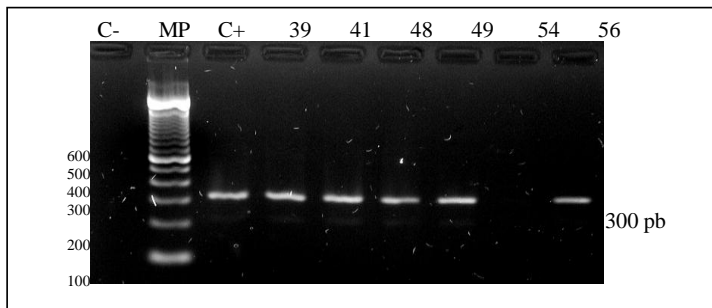


Figura 3.4 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *Imb*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.2.4 Gen *scpB*

Se obtuvo un 81.33% de cepas portadoras del gen *scpB*. Se comprobó que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, 255 pb (Figura 3.5).

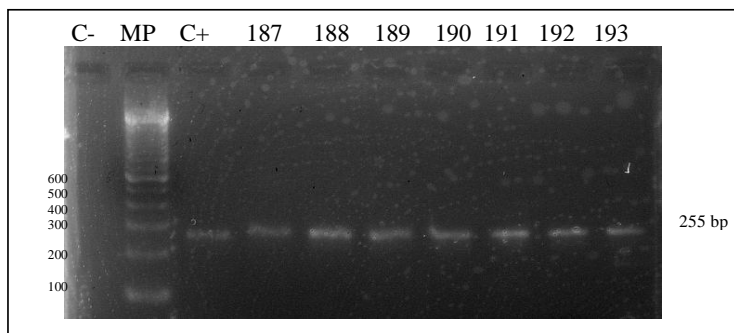


Figura 3.5 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *scpB*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.2.5 Resultados combinados de los factores de virulencia

En la Tabla 3.1 se presentan las diferentes combinaciones de los factores de virulencia que presentaron los SGBs estudiados, donde se aprecia que el grupo 9 es el que tiene una mayor frecuencia.

GRUPO	Perfil de virulencia	Frecuencia (%)
1	<i>bca</i> ⁺ <i>lmb</i> ⁺ <i>scpB</i> ⁺ <i>bac</i> ⁺	6 (8,00)
2	<i>bca</i> ⁻ <i>lmb</i> ⁺ <i>scpB</i> ⁺ <i>bac</i> ⁺	1 (1,33)
3	<i>bca</i> ⁻ <i>lmb</i> ⁻ <i>scpB</i> ⁻ <i>bac</i> ⁻	2 (2,67)
4	<i>bca</i> ⁻ <i>lmb</i> ⁺ <i>scpB</i> ⁻ <i>bac</i> ⁻	1 (1,33)
5	<i>bca</i> ⁺ <i>lmb</i> ⁻ <i>scpB</i> ⁻ <i>bac</i> ⁻	2 (2,67)
6	<i>bca</i> ⁺ <i>lmb</i> ⁺ <i>scpB</i> ⁻ <i>bac</i> ⁻	7 (9,33)
7	<i>bca</i> ⁻ <i>lmb</i> ⁺ <i>scpB</i> ⁺ <i>bac</i> ⁻	17 (22,67)
8	<i>bca</i> ⁺ <i>lmb</i> ⁻ <i>scpB</i> ⁻ <i>bac</i> ⁺	1 (1,33)
9	<i>bca</i> ⁺ <i>lmb</i> ⁺ <i>scpB</i> ⁺ <i>bac</i> ⁻	36 (48,00)
10	<i>bca</i> ⁺ <i>lmb</i> ⁻ <i>scpB</i> ⁺ <i>bac</i> ⁻	1 (1,33)
11	<i>bca</i> ⁺ <i>lmb</i> ⁺ <i>scpB</i> ⁻ <i>bac</i> ⁺	1 (1,33)

Tabla 3.1 Combinaciones de factores de virulencia

3.3 GENES DE RESISTENCIA

3.3.1 Fenotipos presentes en las cepas estudiadas

Las cepas de *Streptococcus agalactiae* fueron analizadas con el método de difusión por disco, según las normas CLSI (antes NCCLS) para los antibióticos eritromicina y clindamicina. Se consideró necesario incluir el análisis de este segundo antibiótico, puesto que, los genes que estaban en estudio aportaban fenotipos que afectaban la sensibilidad de la bacteria frente a

este agente antimicrobiano. De la población inicial de 75 cepas confirmadas de SGBs, 39 presentaron sensibilidad ante los dos antibióticos estudiados, 32 el fenotipo MLS_B constitutivo resistente a eritromicina y a clindamicina, una el fenotipo MLS_B inducible resistente a eritromicina y sensible a clindamicina con achatamiento, dos el fenotipo L sensible a eritromicina y resistente a clindamicina y una el fenotipo M resistente a eritromicina y sensible a clindamicina sin achatamiento. En la Figura 3.6 se presentan las proporciones de los fenotipos mencionados en los SGBs.

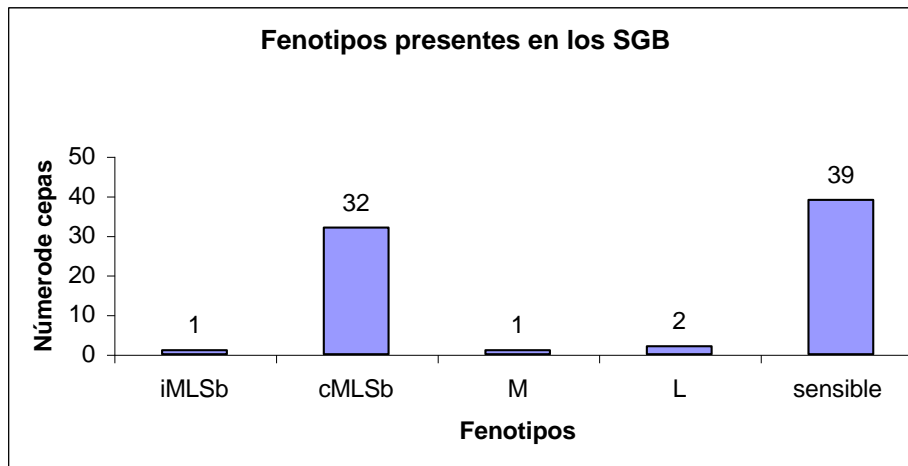


Figura 3.6 Distribución de los fenotipos de los SGBs

3.3.2. Genotipos presentes en las cepas estudiadas

Todas las cepas de SGBs fueron corridas para los 4 genes causantes de la resistencia a eritromicina y clindamicina sin considerar su fenotipo, con excepción del gen *mreA* para el cual se corrieron 10 cepas con fenotipos sensibles tomadas de forma aleatoria. A continuación, se detallan los resultados de las diferentes corridas de PCR.

3.3.2.1 Gen *ermA*

Se obtuvo un 86.11% de cepas portadoras del gen *ermA*. Se comprobó que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, 206 pb. En la Figura 3.7 se presenta una corrida de PCR.

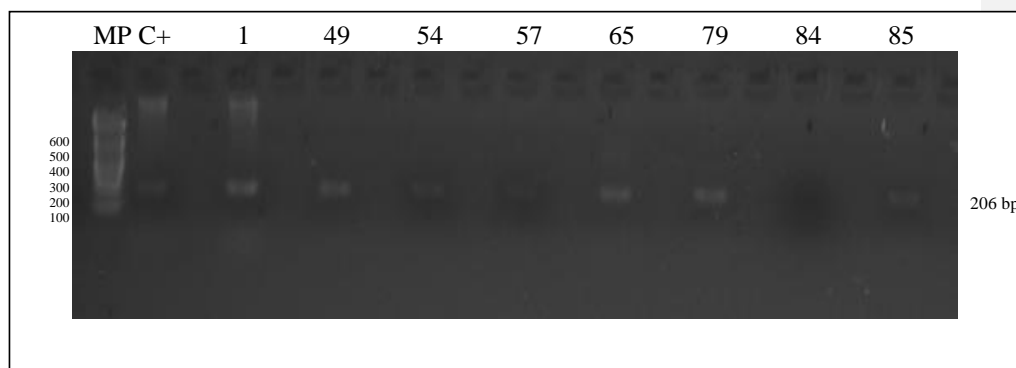


Figura 3.7 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *ermA*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.3.2.2 Gen *ermB*

Se obtuvo un 75,00% de cepas portadoras del gen *ermB*. Se comprobó que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, 639 pb. En la Figura 3.8 se observa el resultado del análisis.

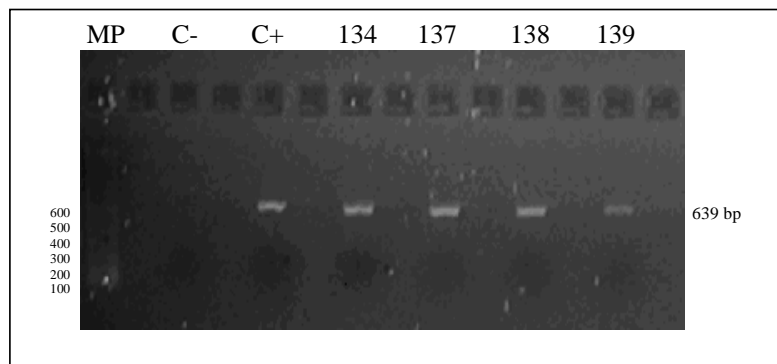


Figura 3.8 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *ermB*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.3.2.3.Gen *mefA*

Se obtuvo un 2,78% de cepas portadoras del gen *mefA*. Se comprobó que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, 348 pb (Figura 3.9).

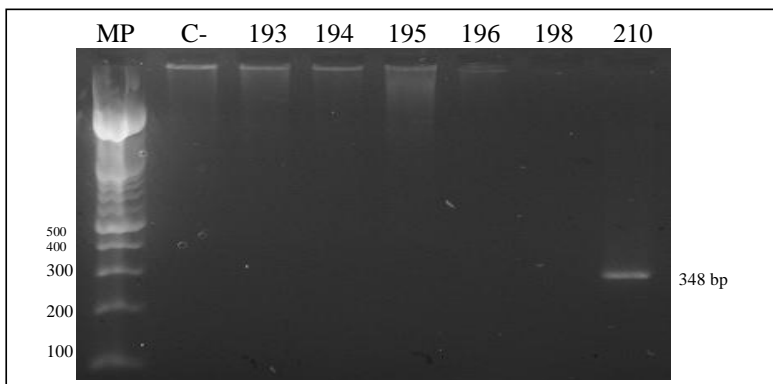


Figura 3.9 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *mefA*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.3.2.4.Gen *mreA*

Se obtuvo un 97,20% de cepas con el fenotipo resistente que son portadoras del gen *mreA*, además se analizaron 10 cepas elegidas al azar con fenotipo de sensibilidad a eritromicina y clindamicina, de las cuales el 100% fueron positivas para este gen. Se comprobó que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, de 416 pb como se observa en la Figura 3.10.

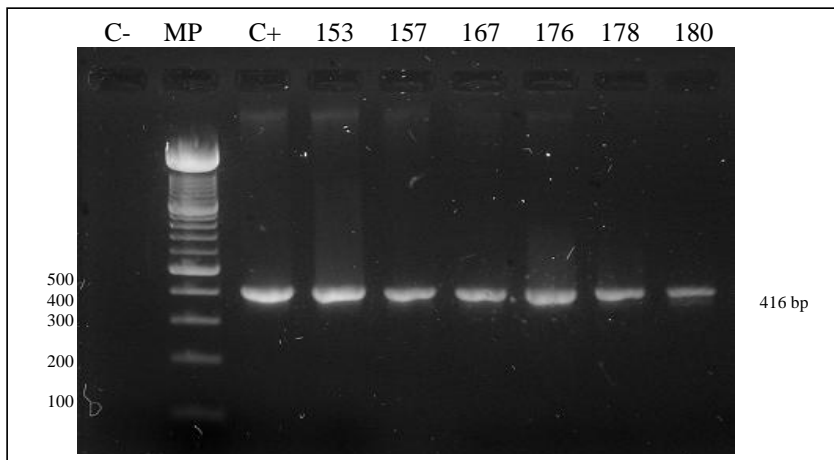


Figura 3.10 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *mreA*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.3.2.5 Gen *linB*

Se obtuvo un 2,78 % de cepas portadoras del gen *linB*. Se comprobó que la banda pertenece al gen buscado por el tamaño de la misma, 944 pb. En la Figura 3.11 se presenta una corrida de PCR.

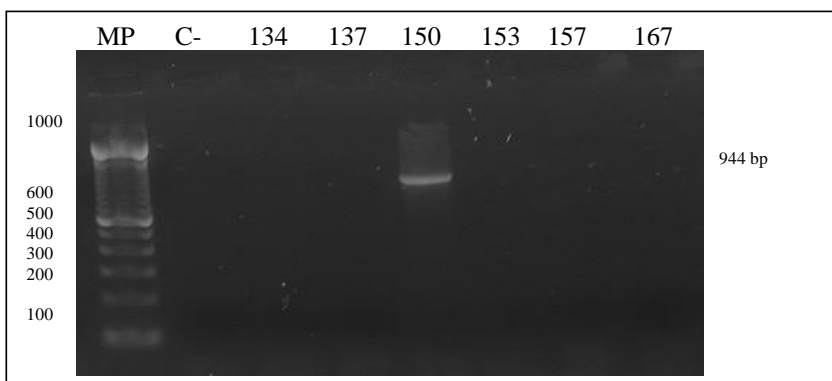


Figura 3.11 Corrida de PCR que muestra una reacción positiva para la presencia del gen *linB*, en gel de agarosa visualizado en una cámara de luz UV (Herrera,2007)

3.3.3 Fenotipos y genotipos de cepas resistentes

A partir de los datos obtenidos, se estudió la relación entre los fenotipos y los genotipos de las diferentes cepas resistentes a eritromicina y/o clindamicina. En la Tabla 3.2 se puede observar que en todas las cepas hubo concordancia entre el fenotipo y el genotipo, con excepción de 3 cepas: dos con el fenotipo cMLS_B y una con el fenotipo L, las cuales no amplificaron para los genes correspondientes para estos fenotipos.

Fenotipo	ErmA	ErmB	MefA	MreA	LinB
iMLS _B	1	1	0	1	0
cMLS _B	28	26	0	31	0
M	1	0	1	1	0
L	1	0	0	2	1

Tabla 3.2 Relación entre los fenotipos y los genotipo de los SGBs

3.3.4 Distribución de cepas con resistencia a eritromicina y clindamicina por año.

Las cepas recolectadas fueron obtenidas en un periodo amplio de tiempo, desde el 2005 hasta el 2007 y en cantidades reducidas por año. Además fueron incluidas cepas de años pasados, 2001 y 2002, esto podría justificar los altos niveles de resistencia a eritromicina y clindamicina como se observa en la Figura 3.12.

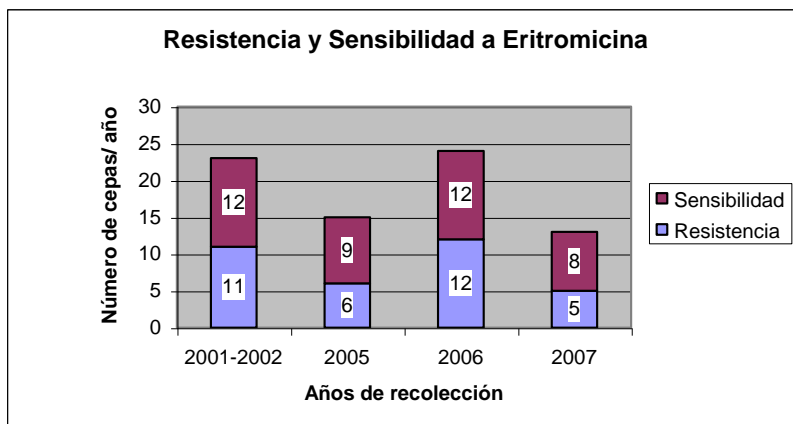


Figura 3.12 Distribución de los SGBs en los diferentes años de recolección

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1 CONTROL DE IDENTIFICACIÓN DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

El porcentaje de error en la identificación de los SGBs por métodos manuales se puede considerar alto y puede atribuirse a errores humanos, como falta de controles positivos y negativos para los procedimientos de rutina usados, puesto que métodos como aglutinación de látex, si bien está recomendado en normas como NCCLS, no tienen controles con los que se pueden confirmar la efectividad de la prueba.

4.2 FACTORES DE VIRULENCIA

De acuerdo a los resultados de este estudio con respecto a los factores de virulencia, los genes *scpB* (81,33%) y *Imb* (92%) son los factores más frecuentes en los SGBs, lo que concuerda con estudios como los realizados por Duarte, 2005, aunque las proporciones que el autor en mención obtuvo son superiores a las de este estudio.

Estos dos genes han sido estudiados con el fin de descubrir las secuencias de los espacios intergénicos y relacionarlos para obtener un criterio de clasificación adicional. Para tal fin, se debe asumir que un 100 % de los SGBs poseen estos genes, lo que no ocurre en las cepas estudiadas (Dmitriev, 2004).

Otro factor de virulencia analizado fue el *bac*, que fue el gen de menor frecuencia puesto que solo un 12% de las cepas estudiadas eran portadoras. La proteína codificada por este gen es una candidata para la producción de vacunas por su impacto sobre la producción de anticuerpos que protegen de infecciones a los animales modelo (Manning, 2006). Aunque, como lo reconoce el mismo autor y se comprueba en este estudio, su efectividad se vería afectada por la frecuencia que tiene este gen en los SGBs. Otro gen que sería de mayor relevancia para este fin podría ser el *bca*, que tiene facultades similares a las del *bac* pero se presenta en mayor proporción en *Streptococcus agalactiae*.

Los factores de virulencia que fueron objeto de estudio en este trabajo son algunos de los más frecuentes presentes en los SGBs, y las combinaciones de estos genes también son comunes. Por ejemplo, la combinación *bac*⁻ *bca*⁺, *lmb*⁺, *scpB*⁺ estuvo presente en 36 cepas y la combinación *bca*⁻, *bac*⁻, *lmb*⁺, *scpB*⁺ en 17 cepas. Pero, también existen SGBs que no presentan algunos de los factores estudiados: en este estudio se presentaron dos cepas, lo que también ocurre en otros estudios como el de Duarte (2005).

4.3 GENES DE RESISTENCIA

En todas las cepas estudiadas el fenotipo coincidió con el genotipo, con excepción de 3 cepas: dos con fenotipo MLS_B constitutivo y una el genotipo L. Un mecanismo alternativo para las cepas con cMLS_B puede ser una mutación puntual en el gen 23S rRNA o riboproteína L4 y L2, las cuales han sido previamente descritas en organismos Gram negativos y Gram positivos y los genes no son detectables con los cebadores usados (Vester, 2001 y Firrell, 2003). Para la cepa con fenotipo L se puede tratar de cepas mutantes, puesto que presentaron un halo de inhibición de 13 mm, es decir que existen clones sin el gen que pudieron ser las estudiadas por PCR.

El gen *mreA* es responsable de un mecanismo de eflujo para resistencia a macrólidos, pero no está descrito cómo se activa o inactiva puesto que está presente en cepas sensibles a macrólidos, lo que excluye su papel en el fenotipo resistente. Este resultado concuerda con los de Azavedo, 2001,

Se conoce que los genes *erm* son los causantes del fenotipo MLS_B (Aranzazu, 2003) pero aún no se esclarece qué genes específicos causan el fenotipo inducible y constitutivo. En la actualidad se está estudiando un nuevo gen, el *ermTR*, que es un subtipo del *ermA* como un posible causante de la resistencia inducida para las lincosamidas, pero este gen también se ha encontrado en cepas constitutivas. (Gygax, 2006). En nuestro estudio solo se encontró una cepa con el fenotipo inducible, lo que no facilitó resultados que pudieran identificar algún gen causante del fenotipo.

4.4 DISTRIBUCIÓN DE CEPAS RESISTENCIA A ERITROMICINA Y CLINDAMICINA POR AÑO.

Se recolectaron 24 cepas resistentes a eritromicina en 3 años seguidos, además de incluir 12 cepas de un estudio realizado en 1 año. Esto, se debió a que el estudio no contó con el suficiente apoyo de los laboratorios de Microbiología para recolectar un número significativo de cepas por año, los que pudo afectar las tasas de resistencia encontradas. Betriu, 2004, obtuvo 107 cepas resistentes en un periodo de 6 años (1994 a 2001), lo que da un total de 17 cepas resistentes por año y concuerda con los resultados de este estudio.

CAPITULO V: CONCLUSIONES

1. El fenotipo de identificación manual no se correlaciona con el genotipo en un 25 % de las cepas analizadas.
2. El fenotipo de la resistencia a macrólidos y lincosamidas no se correlaciona con el genotipo en un 4% de las cepas analizadas.
3. El nivel de resistencia en este estudio alcanzó un nivel del 48%.
4. La proteína *bca* puede ser una opción para la producción de vacunas por su impacto sobre el sistema inmunológico humano y la prevalencia expuesta en este estudio (72%) .
- 3-5. El *linB* está presente en 5,5 % de las cepas aislados en Quito, lo que es poco común pero debe ser considerado al momento de identificar los SGBs, puesto que al ser un fenotipo casi desconocido, podría dar lugar a confusiones en la identificación de los *Streptococcus agalactiae*.
6. Se encontraron cepas con posibles mutaciones de los genes de resistencia.

Con formato: Numeración y viñetas

7. Se puede atribuir a la familia de genes *erm* el fenotipo MLS_B pero no se puede diferenciar entre los genes específicos para el fenotipo inducible o constitutivo.
8. Los genes *scpB* y *lmb* no están presentes en todas las cepas de SGB aisladas de este estudio.

CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

Se debe realizar un estudio epidemiológico completo para analizar la resistencia a macrólidos en SGBs, puesto que en este estudio se demostró la presencia de cepas resistentes.

De igual manera se recomienda realizar un estudio epidemiológico para establecer los factores de virulencia más frecuentes en las cepas aisladas en el Ecuador, para así tener bases para aprobar o rechazar la realización o utilización de vacunas.

Se deberían analizar las cepas que no fueron positivas para ninguno de los genes de resistencia y virulencia estudiados, para establecer la posibilidad de existencia de nuevos genes de resistencia y factores de virulencia.

CAPITULO VII: BIBLIOGRAFIA

AZAVEDO J., MCGAVIN M., DUNCAN C., LOW E. Y MCGEER A.(2001), Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B Streptococcus Isolates from Ontario, Canada, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 45: 3504–3508

Benchetrit L., Fracalanza S., Peregrino H., Camelo A. y Sánchez L. (1982). Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. *J Clin Microbiol* 15: 787-790.

Betriu C., Culebras E., Gómez M., Rodríguez-Avial I., Sánchez A., Agreda M., y Picazo J. (2003). Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 1112–1114.

Betriu C., Culebras E., Rodríguez-Avial I., Gomez M., Sanchez B. y Picazo J. (2004). In Vitro Activities of Tigecycline against Erythromycin-Resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*: Mechanisms of Macrolide and Tetracycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 323–325.

Camponovo R.; (2002). Problemas de resistencia en *Streptococcus beta hemolítico del grupo B*. *Revista Chilena De Infectología* 19: 107-110.

Cardenas G., Benitez C., Zurita J., Zurita C., Gomez R., Bermeo E., Torres F., Jijon A.(2002). Prevalencia de *Streptococcus beta hemolítico del grupo B (SGB)* en mujeres gestantes entre las 35 y 37 semanas en los hospitales de la ciudad de Quito., Tesis doctoral de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Cavaliere S., Rankin I., Harbeck R., Sautter R., McCarter Y., Sharp S., Ortez J., Spiegel C. (2005) Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. American Society for Microbiology, pag:147-148

Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn. (1992). Guidelines for prevention of group B *Streptococcal* (GBS) infection by chemoprophylaxis. *Pediatrics* 90: 775-778.

Crespo M., Vélez J. (1996) Importancia clínica del *Streptococcus agalactiae* como causante de infección. *Colombia Médica* 27: 53-58.

De Mouy D., Cavallo J.; Leclercq R. y Fabre R.(2001). Antibiotic Susceptibility and Mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: french multicenter study. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 45: 2400–2402.

Di Bartolomeo S., Gentile M., Priore G., Valle S. y Di Bella A. (2005). *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. Revista Argentina de Microbiología 37:142-144.

Dmitriev A., Shen L., Tkacokova, I., Mikula Y. H. y Yang Y. H. (2004). Structure of scpB-lmb Intergenic region as criterion for additional classification of human and bovine group B streptococci. Acta Vet. Brno 73: 215-220.

Dmitriev A., Yang Y., Shen D. y Totolian A. (2006). Adjacent location of the *bac* gene and two-component regulatory system genes within the putative *Streptococcus agalactiae* pathogenicity island. Folia Microbiol 51: 229-235.

Duarte R., Bellei B., Miranda O., Brito M., y Teixeira L. (2005). Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Genes among Brazilian Group B Streptococci Recovered from Bovine and Human Sources. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 49: 97–103

Faile D. y López C. (2005). *Streptococcus agalactiae*. Revista Argentina de Microbiología. 37:142-144.

Gygax S., Schuyler J., Kimmel L., Trama J., Mordechai E. y Adelson M. (2006) Erythromycin and Clindamycin Resistance in Group B Streptococcal Clinical Isolates. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 50 1875–1877.

Hsueh P., Teng L., Lee L., Ho S., Yang P. y Luh K. (2001). High Incidence of Erythromycin Resistance among Clinical Isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan; Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45: 3205-3208.

Jing L., Kasper D., Ausubel F., Rosner B. y Michel J. (1997). Inactivation of the a C protein antigen gene, *bca*, by a novel shuttle suicide vector results in

attenuation of virulence and immunity in group B *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 13251–13256.

Ke D., Ménard C., Picard F., Boissinot M., Ouellette M. Roy P., y Bergeron M. (2000). Development of Conventional and Real-Time PCR Assays for the Rapid Detection of Group B Streptococci. *Clinical Chemistry* 46:3 324–331.

Ko W., Yan J.; Lee N.; Wu H. y Wu J. (2004). Microbial Drug Resistance Polyclonal Spread of Erythromycin-Resistant *Streptococcus agalactiae* in Southern Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10: 306 –312.

Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W. (1999) *Diagnóstico microbiológico Texto y atlas color*. Panamerica. Argentina, 596-597.

Lindahl G., Sta^olhammar-Carlemalm G. y Areschoug T. (2005). Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 102–127.

Manning S., Ki M., Marrs C., Kugeler K., Borchardt S, Baker C. y Foxman B. (2006). The frequency of genes encoding three putative group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates. *BMC Infectious Diseases* 6 (116): 1471-1474.

Martínez M., Ovalle A., Durán C, Reid I, Urriola G, Garay B., Cifuentes M., Dmitriev A., Shen L., Tkacokova I., Mikula Y. y Yang Y. (2004). Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae*, Structure of scpB-lmb Intergenic region as criterion for additional classification of human and bovine group B streptococci; *Revista Médica de Chile* 132: 549-555.

Méndez C. (2001). Metodología diseño y desarrollo del proceso de investigación, McGraw Hill interamericana, Colombia.

Pérez J., Limansky A., Toresani I. Ebner G., Di Bartolomeo S. y De Inocente I. (2004). Distribución de tipo capsular y sensibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* productores de infecciones en Argentina. Revista Argentina de Microbiología 36: 63-67.

Pichichero M.E., MacLinn S.E., Gooch W.M., Rodríguez W., Goldfarb J., Reindenberg B.E. y Members of the Ceftibuten Pharyngitis Internacional Study Group (1995). Ceftibuten vs. penicillin V in group A β -hemolytic streptococcus pharyngitis. *Pediatr. J. Infect. Dis.* 14 (suppl 7): S102-S107.

Portillo A. (2003). Mecanismo de resistencia a antibióticos macrolidos, lincosamidas y estreptograminas en *Streptococcus* y *Enterococcus*. . Extraído el 14 de diciembre, 2006 de: <http://www.unirioja.es/servicios/sp/tesis/tesis09.shtml>
Riera L., Benavides G. y Morillo N. (1993). Colonización por *Streptococcus* grupo B en embarazadas a término y recién nacidos en una comunidad de Venezuela. Enferm Infecc Microbiol Clin 11: 295-97.

Romeo S., Rodríguez, M., Calderón-Jaimes E.,Gómez-Barreto D. y Espinosa-de los Monteros L. (2000). Características de la resistencia antimicrobiana de una colección clínica de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B. Salud Pública de México 42.

Soriano S., Brasili S., Saiz M., Carranza C., Vidal P., Calderon J. y Horacio A. (2000). *Streptococcus pyogenes*: sensibilidad a penicilina y eritromicina en las ciudades de Neuquen y Cipolletti. Medicina 60: 487-490.

Spellerberg B., Rozdzinski E., Martin S.,Weber-Heynemann J. Schnitzler N.,Ticken R. y Podbielski A. (1999). Lmb, a Protein with Similarities to the Lral Adhesin Family, Mediates Attachment of *Streptococcus agalactiae* to Human Laminin; Infection And Immunity 67: 871–878.

Suara R., Adegbola R., Baker C., Secka O., Mulholland E. y Greenwood B. (1994). Carriage of group B Streptococci in pregnant Gambian mothers and their infants. *J. Infect Dis* 170: 1316-19.

Sutcliffe J., Grebe T., Tait-Kamradt A. y Wondrack L. (1996). Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2562–2566.

Tait-Kamradt A., Clancy J., Cronan M., Dib-Hajj F., Wondrack L., Yuan W. y Sutcliffe J. (1997) . *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant m phenotype in *streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 41 (10): 2251–2255.

Weisner A., Johnson A., Lamagni T., Arnold E., Warner M., Heath P. y Efstration A. (2004). Characterization of Group B Streptococci Recovered from Infants with Invasive *Disease in England and Wales* 38: 1203-1206.