

# MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

## VOLUMEN I

### Bacterias de Importancia Clínica

#### Editores

##### **HORACIO A. LOPARDO**

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría  
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.  
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,  
Asociación Argentina de Microbiología

##### **SILVIA C. PREDARI**

Jefa del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.  
Universidad de Buenos Aires

Directora de la Revista Argentina de Microbiología, publicación científica oficial de la Asociación  
Argentina de Microbiología

Coordinadora del Comité de Emergencias Biológicas de la Red de Hospitales e Institutos de la  
Universidad de Buenos Aires

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias, SADEBAC, Asociación Argentina de  
Microbiología

##### **CARLOS VAY**

Profesor Asociado de Microbiología Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Jefe Laboratorio de Bacteriología Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital de Clínicas  
"Gral. José de San Martín"

Director Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica. Facultad de Farmacia y  
Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

ISBN 978-987-26716-5-5



ISBN 978-987-26716-6-2



## EPÍGRAFE

La escritura de este manual tiene por objetivo principal poner a disposición de los lectores de habla hispana y especialmente de los microbiólogos argentinos de un material actualizado y completo que sirva de consulta y referencia en el campo de la Microbiología Clínica. La magnitud de esta tarea hace que después de varios años de elaboración, recién podamos publicar por partes el primero de los volúmenes: “Bacterias de importancia clínica”.

Para no demorar la llegada al público en general de esta invaluable información, hemos decidido publicarlo en la página *web* de la Asociación Argentina de Microbiología a medida que se vaya disponiendo de los capítulos que conformen temas comunes entre sí.

En esta instancia estamos publicando los capítulos de la Parte IIb.

Una vez completadas todas las partes se ensamblarán bajo la forma de un manual único que esperamos pueda ser publicado tanto como *e-book* como en papel.

## DEDICATORIA

Los editores dedicamos este volumen a nuestros maestros, que nos introdujeron en el campo de la Microbiología en general y/o en el de la Microbiología Clínica en particular: Dres. Ramón de Torres, Amalia Fernández, Oscar Grau, Fernando Marcenac y Etelvina Rubeglio

También queremos agradecer a quienes compartieron con nosotros nuestra dedicación a esta disciplina en los diversos ámbitos y muy especialmente a la Comisión Directiva de la Asociación Argentina de Microbiología por habernos permitido concretar esta tarea.

## INDICE GENERAL

### Parte I. Temas generales de Microbiología Clínica

Parte Ia. Taxonomía bacteriana

Parte Ib. Métodos generales de identificación bacteriana

### Partell. Microorganismos aerobios y anaerobios facultativos

Parte IIa. Cocos gram positivos

Parte IIa.1. Cocos gram positivos, catalasa positivos

Capítulo IIa.1.1. *Staphylococcus* spp.

Capítulo IIa.1.2. Otros géneros

Apéndice I. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIa.2. Cocos gram positivos, catalasa negativos

Capítulo IIa.2.1. Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos

Capítulo IIa.2.2. *Streptococcus pneumoniae*

Capítulo IIa.2.3. Estreptococos del grupo viridans

Capítulo IIa.2.4. *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*

Capítulo IIa.2.5. *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Aerococcus* y bacterias relacionadas

Apéndice II. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIb. Bacilos gram positivos

Parte IIb.1. Esporulados

Parte IIb.2. No esporulados

Capítulo IIb.2.1. *Corynebacterium* spp. y bacterias relacionadas

Capítulo IIb.2.2. *Listeria*

Capítulo IIb.2.3. *Nocardia*

Capítulo IIb.2.4. Bacilos gram positivos, catalasanegativos

Capítulo IIb.2.5. Micobacterias

Apéndice III. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIc. Bacilos gram negativos

Parte IIc.1. Enterobacterias

Capítulo IIc.1.1. *Escherichia coli*

Capítulo IIc.1.2. *Shigella* spp.

Capítulo IIc.1.3. *Salmonella*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*.

Capítulo IIc.1.3. Familia *Proteaceae*

Capítulo IIc.1.5. Otras enterobacterias.

Apéndice IV. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.2. Bacilos gram negativos no fermentadores

Capítulo IIc.2.1. *Pseudomonas*

Capítulo IIc.2.2. *Acinetobacter*

Capítulo IIc.2.3. *Burkholderia*

Capítulo IIc.2.4. *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Elizabethkingia*  
Capítulo IIc.2.5. *Stenotrophomonas*  
Apéndice V. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.3. Bacilos gram negativos oxidasa positivos y fermentadores de lactosa  
Capítulo IIc.3.1. *Vibrio*  
Capítulo IIc.3.2. *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Chromobacterium*  
Capítulo IIc.3.3. *Pasteurella*  
Apéndice VI. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.4. Bacilos gram negativos exigentes  
Capítulo IIc.4.1. *Haemophilus*  
Capítulo IIc.4.2. Bacilos gram-negativos del grupo ACEK  
Capítulo IIc.4.3. *Bordetella*  
Capítulo IIc.4.4. *Brucella*  
Capítulo IIc.4.5. *Helicobacter*, *Campylobacter* y *Arcobacter*  
Apéndice VII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIc. Cocos gram negativos  
Apéndice VIII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIe. Bacterias atípicas  
Capítulo IIe.1. *Bartonella* y *Afipia*.  
Capítulo IIe.2. *Legionella* Parte III.3.  
Parte IIe.4. *Chlamydia*  
Parte IIe.5. Micoplasmas  
Parte IIe.6. Rickettsias y otras bacterias relacionadas  
Apéndice IX. Métodos de identificación: fundamento y método.

### **Parte III Microorganismos anaerobios**

Parte IIIa. Métodos de cultivo e identificación de microorganismos anaerobios  
Parte IIIb. Cocos gram positivos anaerobios  
Parte IIIc. Bacilos gram positivos anaerobios esporulados  
Parte IIId. Bacilos gram positivos anaerobios no esporulados  
Parte IIId. Bacilos gram negativos anaerobios  
Parte IIIe. Cocos gram negativos anaerobios

Apéndice X. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

## **Parte II.a.2**

# **COCOS GRAM POSITIVOS CATALASA NEGATIVOS**

## **Editor responsable**

**HORACIO A. LOPARDO**

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría  
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.  
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,  
Asociación Argentina de Microbiología

## Índice

Capítulo	Título	Pág
	Epígrafe	2
	Dedicatoria	3
	Índice general	4
Parte IIa.2	<b>COCOS GRAM POSITIVOS CATALASA NEGATIVOS</b>	<b>6</b>
	<b>Índice</b>	7
	<b>Introducción</b>	13
	Aspectos taxonómicos	13
IIa.2.1	<b>Streptococos <math>\beta</math>-hemolíticos</b>	12
	<b><i>Streptococcus pyogenes</i></b>	16
	Características generales	16
	Hábitat	18
	Aspectos patogénicos, epidemiología y significado clínico	19
	Faringitis y sus complicaciones	19
	Infecciones invasivas	25
	Identificación a nivel de género y especie	28
	Sensibilidad a los antimicrobianos	32
	Prevención	34
	<b>Streptococos de los grupos C y G</b>	35
	<i>Streptococcus dygalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	37
	<i>Streptococcus dygalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	39
	<i>Streptococcus canis</i>	40
	<i>Streptococcus equi</i>	41
	<b><i>Streptococcus agalactiae</i></b>	43
	Identificación a nivel de género y especie	43
	Habitat, patogenia e importancia clínica	46
	Prevención	49
	Sensibilidad a los antibióticos	52
	<b>Otros <math>\beta</math>-hemolíticos</b>	55

	<i>Streptococcus iniae</i>	55
	<i>Streptococcus porcinus</i> y <i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	56
	<b>Bibliografía</b>	59
<b>Ila.2.2</b>	<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	82
	<b>Aspectos taxonómicos</b>	83
	<b>Hábitat/Transmisión</b>	84
	<b>Epidemiología</b>	84
	Vacunas polisacáridicas	87
	Vacunas polisacáridicas conjugadas	89
	Vacunas proteicas	90
	<b>Impacto clínico</b>	90
	<b>Factores de virulencia</b>	92
	<b>Patogénesis</b>	96
	Colonización	96
	Invasión	97
	Mecanismos de defensa del hospedador	98
	<b>Diagnóstico microbiológico</b>	99
	Examen directo	99
	Cultivo e identificación	101
	Determinación de tipos capsulares	106
	<b>Conservación y transporte</b>	108
	<b>Sensibilidad antimicrobiana</b>	110
	<b>Métodos de epidemiología molecular</b>	113
	Patrones de restricción de las PBP	113
	PspA	114
	BOX-PCR	114
	Electroforesis en campo pulsado	115
	Tipificación por secuencias multilocus de enzimas	115
	<b>Bibliografía</b>	116
<b>Ila.2.3</b>	<b>Estreptococos del grupo viridans</b>	132
	<b>Características generales, estructura y taxonomía</b>	133
	<b>Identificación a nivel de género, de grupo, de grupos de especies y de especies</b>	139
	Características culturales y microscópicas	139
	Pruebas bioquímicas	139
	Métodos automatizados y miniaturizados	141
	Métodos moleculares	142
	<b>Grupo <i>Streptococcus anginosus</i></b>	143
	<b>Grupo <i>Streptococcus mitis</i> (incluyendo al</b>	146



	<b>grupo <i>Streptococcus sanguinis</i>)</b>	
	<b>Grupo <i>Streptococcus bovis</i></b>	148
	<b>Grupo <i>Streptococcus salivarius</i></b>	151
	<b>Grupo <i>Streptococcus mutans</i></b>	151
	<b>Otros estreptococos</b>	153
	<i>Streptococcus suis</i>	153
	<i>Streptococcus hongkongensis</i>	157
	<b>Sensibilidad a los antibióticos y pautas de tratamiento</b>	157
	<b>Bibliografía</b>	160
<b>Ila.2.4</b>	<b>Enterococos y bacterias relacionadas</b>	<b>175</b>
	<b>Enterococos</b>	176
	Aspectos taxonómicos	176
	Hábitat	177
	Factores de virulencia	178
	Impacto clínico	181
	Identificación a nivel de género y especie	183
	Sensibilidad a los antimicrobianos y tratamiento	188
	Prevención	201
	<b><i>Vagococcus</i></b>	205
	<b><i>Lactococcus</i></b>	205
	Hábitat y significado clínico	206
	Identificación a nivel de género y especies	207
	Sensibilidad a los antibióticos	208
	<b>Bibliografía</b>	209
<b>Ila.2.5</b>	<b><i>Abiotrophia</i>, <i>Granulicatella</i>, <i>Gemella</i>, <i>Aerococcus</i> y bacterias relacionadas</b>	<b>223</b>
<b>II.a.2.5.1</b>	<b>Cocos gram positivos, catalasa negativos, distintos de estreptococos y enterococos, que se disponen en cadenas</b>	<b>224</b>
	<b><i>Abiotrophia</i> y <i>Granulicatella</i></b>	224
	Características generales, estructura y taxonomía	224
	Identificación a nivel de género y especie	228
	Hábitat, patogenia y significado clínico	231
	Sensibilidad a los antibióticos	234
	Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	235
	Pautas de tratamiento	237

	<b><i>Leuconostoc</i></b>	238
	Hábitat e importancia clínica	238
	Identificación a nivel de género y especie	238
	Sensibilidad a los antibióticos	240
	<b><i>Globicatella</i></b>	241
	Hábitat e importancia clínica	241
	Identificación a nivel de género y especie	241
	Sensibilidad a los antibióticos	241
	<b><i>Facklamia</i></b>	242
	Hábitat e importancia clínica	242
	Identificación a nivel de género y especie	242
	Sensibilidad a los antibióticos	243
	<b><i>Ignavigranum</i></b>	243
	Hábitat e importancia clínica	243
	Identificación a nivel de género y especie y sensibilidad a los antibióticos	244
	<b><i>Dolosicoccus</i></b>	244
<b>II.a.2.5.2</b>	<b>Cocobacilos gram positivos, catalasa negativos, que se disponen en pares y cadenas</b>	245
	<b><i>Weissella</i></b>	245
	Hábitat e importancia clínica	245
	Identificación a nivel de género y especie	245
	Sensibilidad a los antibióticos	246
<b>II.a.2.5.3</b>	<b>Cocos gram positivos, catalasa negativos, distintos de estreptococos y enterococos, que se disponen en tétradas y racimos</b>	246
	<b><i>Gemella</i></b>	247
	Características generales, estructura y taxonomía	247
	Identificación a nivel de género y especie	247
	Hábitat, patogenia e importancia clínica	248
	Sensibilidad a los antibióticos	249
	<b><i>Aerococcus</i></b>	249
	Hábitat, patogenia e importancia clínica	250
	Identificación a nivel de género y especie	251
	Sensibilidad a los antibióticos	252
	<b><i>Dolosigranulum pigrum</i></b>	254
	Hábitat e importancia clínica	254
	Identificación a nivel de género y especie	255
	Sensibilidad a los antibióticos	255
	<b><i>Helcococcus</i></b>	255
	Hábitat e importancia clínica	256
	Identificación a nivel de género y especie	257

Sensibilidad a los antibióticos	257
<b><i>Tetragenococcus</i></b>	258
<b>Pediococcus</b>	259
Hábitat e importancia clínica	259
Identificación a nivel de género y especie	259
Sensibilidad a los antibióticos	260
<b>Bibliografía</b>	262

---

<b>Apéndice II</b>	<b>Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.</b>	278
--------------------	---	-----

---

Prueba de la catalasa	278
Prueba de la bencidina	279
Prueba de Voges Proskauer	280
Prueba de la bacitracina	281
Sensibilidad a la optoquina	281
Solubilidad en bilis o en sales biliares	282
Crecimiento en caldo hipersalado (NaCl 6,5%)	284
Hidrólisis del hipurato	284
Prueba de bilis esculina	286
Prueba de la esculina	287
Pruebas de PYR (pirrolidonil- $\beta$ -naftilamidasa) y LAP (leucinaminopeptidasa)	287
Observación microscópica de la morfología de cocos en medio líquido	289
Sensibilidad a altos niveles de vancomicina	289
Prueba de CAMP	290
Almidón	291
Arginina dihidrolasa (ADH) y ornitina descarboxilasa (ODC)	292
Movilidad en medio SIM	293
Prueba de la ureasa	294
Pruebas de fermentación de azúcares	296
Pigmento amarillo	298
$\beta$ -glucuronidasa	298
Prueba del telurito	299
Prueba de utilización del piruvato	300

---

## **Capítulo Ila.2.1**

### **Estreptococos $\beta$ -hemolíticos**

#### **MÓNICA SPARO**

Profesora Adjunta de Microbiología Clínica. Departamento Clínico. Medicina  
Escuela Superior de Ciencias de la Salud,  
Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires  
Argentina

#### **EMMA G. SUTICH**

Profesora Asociada de la Cátedra de Bacteriología. Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario

Jefe del Servicio de Microbiología del Centro Médico IPAM, Rosario, Santa Fe  
Argentina

#### **HORACIO A. LOPARDO**

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría  
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.  
Universidad Nacional de La Plata

Miembro de la Comisión Directiva de SADEBAC,  
Asociación Argentina de Microbiología

## Introducción

Fue a fines del siglo XIX cuando se describieron cocos gram positivos que se disponían en cadenas en los medios líquidos o en los materiales clínicos originales (estreptococos, del griego *streptos* = cadena) y otros que lo hacían en tétradas o racimos (estafilococos, del griego *staphylos* = racimo). Posteriormente se observó que esta morfología era bastante coincidente con la reacción de uno y otro tipo de bacterias con el agua oxigenada en la prueba de catalasa. Los estafilococos eran catalasa positivos y los estreptococos, catalasa negativos.

## Aspectos taxonómicos

Se le atribuye a Billroth haber acuñado el nombre “*streptococcus*” a estas bacterias que se disponían en cadenas (*streptos* = cadena, *kokhos* = uvas, semillas). En 1919 Brown describió su capacidad de producir hemólisis tal como la definimos en la actualidad: alfa (parcial, con un halo verdoso), beta (total) y gamma (ausencia de hemólisis).

## Estreptococos $\beta$ -hemolíticos

En la década del 30 Lancefield desarrolló el sistema serológico de clasificación a través del estudio del polisacárido C de la pared celular. En su trabajo reconoció estreptococos con antígenos diferentes que fueron denominados con letras desde la A hasta la O<sup>17</sup>.

Luego subclasificó a los estreptococos del grupo A según la proteína M de la pared. Simultáneamente Griffith los diferenció en serotipos T por un procedimiento de aglutinación en portaobjetos<sup>57, 81</sup>.

Los  $\beta$ -hemolíticos más frecuentes en clínica humana son *Streptococcus pyogenes*, del grupo A y *Streptococcus agalactiae*, del grupo B. Más esporádicamente se encuentran *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* de los grupos C y G (colonia grande). Muy pocos microorganismos de esta especie aglutinan en forma cruzada con antisueros de los grupos A<sup>22</sup> y otros, que pueden aparecer como no tipificables por los métodos habituales, contienen el antígeno L<sup>226</sup>. Los estreptococos del grupo *S. anginosus* (pertenecientes al grupo viridans) y, en especial *Streptococcus constellatus*, pueden producir hemólisis beta y normalmente presentan el antígeno del grupo F, pero hay cepas que pueden aglutinar con antisueros de los grupos A, C o G. Otras, incluso, pueden resultar no tipificables por los métodos habituales (látex, coaglutinación, inmunocromatografía).

Dentro de los estreptococos de los grupos C y G a su vez hay especies animales, diferentes de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, que pueden infectar al hombre casi siempre por contacto con los mismos. Del grupo C están *S. equi* subsp. *equi*, ( $\beta$ -hemolítico) *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ( $\beta$ -hemolítico) y *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ( $\alpha$ -hemolítico). Del grupo G sólo podemos mencionar a *Streptococcus canis* ( $\beta$ -hemolítico) que, como su nombre lo sugiere, es parte de la microbiota habitual y patógeno oportunista de los perros, aunque también de otros animales<sup>60</sup>. Bacterias de esta especie también producen infecciones en seres humanos aunque con poca frecuencia<sup>25, 236</sup>.

Varios trabajos han comparado la frecuencia relativa de estos microorganismos en bacteriemias y en infecciones invasivas en general (Tabla 1).

**Tabla 1.** Frecuencia relativa de los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos en estudios de materiales tomados de sitios normalmente estériles y no estériles.

Estudio	Grupo A	Grupo B	Grupo C col. grande	Grupo G col. grande	Ggrupo <i>S. anginosus</i>
Ref. 231 <sup>a</sup> 1995-04 Bacteriemia N = 314	29,3	24,2	5,7	40,8	ND
Ref. 191 1987-94 Bacteriemia N = 88	43,2	27,3	3,4	26,1	ND
Ref. 197 1979-86 Bacteriemia N = 87	25,3	17,2	13,8	43,7	ND
Ref. 110 2005-6 Sitios no estériles	78,3	ND	4,7	17,0	ND
Ref. 129, 133 1998-99 Sitios estériles N = 95	44,7 <sup>b</sup>	38,2	3,9	13,2	ND

<sup>a</sup> Referencia bibliográfica; <sup>b</sup> Grupo A *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (1,1%)

## ***Streptococcus pyogenes***

### **Características generales**

*S. pyogenes* se presenta como cocos gram positivos agrupados en pares o en cadenas. Es una bacteria poco exigente desde el punto de vista nutricional; desarrolla en agar sangre, formando colonias blancas o grises (> 0,5 mm), rodeadas de una zona de hemólisis beta generada por dos hemolisinas, estreptolisinas S y O. Pertenecen al grupo A de Lancefield. Además de *S. pyogenes* sólo algunas cepas de *S. dysgalactiae* subsp *equisimilis* y de *S. anginosus* pueden aglutinar con antisueros específicos para grupo A. El antígeno del grupo A es un polisacárido complejo que se encuentra en la pared de la bacteria y está constituido por subunidades de L-ramnosa y N-acetil-D-glucosamina en una relación 2:1, unidas de forma covalente al peptidoglicano<sup>17</sup>.

En su superficie presentan la proteína M con estructura de espiral enrollada, cuyo extremo carboxiterminal está anclado al peptidoglicano de la pared celular y la región aminoterminal hipervariable se extiende hacia la superficie. La proteína M es un factor importante de virulencia ya que inhibe la fagocitosis de la bacteria por las células especializadas del sistema inmune. Las cepas que no tienen esta proteína no son virulentas<sup>82</sup>. El ácido lipoteicoico es otro componente de superficie que participa en la adhesión bacteriana a las células epiteliales del huésped. Algunas cepas presentan una cápsula de ácido hialurónico que permite a la bacteria evadir el reconocimiento por el sistema inmune. Está compuesta por unidades repetidas de disacáridos con uniones  $\beta$  (1-4) de ácido D-glucurónico y (1-3)- $\beta$ -D-N-acetilglucosamina. Se genera a partir de



enzimas con actividad de ácido hialurónico sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa y glucosa pirofosforilasa, codificadas por los genes, *hasA*, *hasB* y *hasC*<sup>47</sup>.

En la pared celular se encuentra la proteasa C5a que degrada al glucopéptido del mismo nombre y que es un componente del complemento quimiotáctico y activador de la respuesta del sistema bactericida oxidativo.

También *S. pyogenes* secreta factores de virulencia al medio extracelular como estreptoquinasa (lisis de coágulos de fibrina), hialuronidasa, estreptolisina O (lábil al oxígeno), estreptolisina S (estable al oxígeno) y la exotoxina pirogénica estreptocócica (Spe) que genera las manifestaciones cutáneas de la escarlatina. Se han descrito 7 serotipos (A, B, C, F, G, H y J). El serotipo SpeA produce una toxina que es un superantígeno y se lo relaciona con la producción del síndrome de *shock* tóxico estreptocócico (SSTE). Los genes para la exotoxina pirógena de los serotipos A y C (*speA* y *speC*) son codificados por bacteriófagos lisogénicos. Otras exotoxinas pirogénicas incluyen el factor mitogénico (SpeF), el superantígeno estreptocócico (SSA) y la exotoxina mitogénica estreptocócica Z (SMEZ)<sup>50</sup>. La exotoxina estreptocócica SpeA es similar a la toxina del síndrome de *shock* tóxico (TSST-1) de *Staphylococcus aureus* y tiene un mecanismo de acción idéntico, aunque sus genes codificantes tienen escasa homología. El *shock* tóxico producido por *S. aureus* es clínicamente similar al SSTE, sin embargo *S. pyogenes* se recupera más frecuentemente de hemocultivos y la mortalidad es diez veces mayor<sup>50</sup>.

Los estreptococos pueden evadir la fagocitosis inhibiendo la opsonización al destruir o inactivar quimiorreceptores derivados del complemento y opsoninas por parte de la C5a peptidasa. La proteína M, en ausencia de anticuerpos específicos de tipo, es

capaz de inhibir la fagocitosis por parte de polimorfonucleares y monocitos. También la cápsula de ácido hialurónico presente en algunas cepas mucoides es un factor antifagocítico.

La estreptolisina O es una citolisina lábil al oxígeno que se une al colesterol de las membranas celulares de las células eucarióticas (entre ellas los fagocitos) contribuyendo a su lisis por un mecanismo osmótico. En el huésped carente de inmunidad, la estreptolisina O, la exotoxina A, y otros componentes estimulan a las células humanas para producir el factor de necrosis tumoral y la interleuquina 1. Estas citoquinas inducen la hipotensión y estimulan la leucostasis y así dan lugar al *shock*, que se caracteriza por daño microvascular, falla multiorgánica y en algunos casos conduce a la muerte. Las toxinas pirogénicas y algunos fragmentos de la proteína M son capaces de inducir la proliferación clonal masiva de linfocitos T y la producción de factor de necrosis tumoral, interferón gamma e interleuquina 2.

La exotoxina B, presente en casi el 100% de las cepas de *S. pyogenes* podría jugar algún rol en la patogénesis de la fascitis necrotizante y la miositis<sup>50</sup>.

## **Habitat**

Los únicos reservorios conocidos en la naturaleza de *S. pyogenes* son la piel y las membranas mucosas del ser humano<sup>50</sup>. La portación asintomática es mayor en niños (15%-26%) que en adultos (5%)<sup>98</sup>. *S. pyogenes* es claramente un patógeno humano. La infección natural en animales es muy rara (prácticamente inexistente) y la

infección experimental requiere de inóculos extremadamente elevados. En institutos que atienden pacientes crónicos y en cuarteles militares la colonización puede llegar al 17%<sup>48, 59</sup>.

La bacteria puede encontrarse en el aire y en objetos inanimados, como polvo, ropa, muebles en sitios donde hay pacientes infectados con *S. pyogenes*. Puede sobrevivir en objetos inanimados hasta 4 semanas. Sin embargo, los objetos inanimados parecen no ser una fuente importante de transmisión al ser humano, probablemente porque la desecación podría disminuir la infectividad de estas bacterias<sup>239</sup>.

### **Aspectos patogénicos, epidemiología y significado clínico**

*Streptococcus pyogenes* es uno de los patógenos más importantes para el hombre. Es agente causal tanto de infecciones leves como la faringitis (en un 20-30% de los casos) y el impétigo, como así también de infecciones graves como sepsis, fascitis necrotizante y el SSTE. Por lo general las celulitis, las fascitis necrotizantes, las bacteriemias y el SSTE tienen como causa la ruptura de la barrera cutánea<sup>182</sup>.

### **Faringitis y sus complicaciones**

Los niños entre los 5 y los 7 años de edad tienen mayor susceptibilidad, con mayor ocurrencia durante el invierno o la primavera. El clima juega un rol importante:

epidemias de faringitis en invierno por factores de encierro (en escuelas o en cuarteles militares) e infecciones cutáneas en verano.

La adquisición faríngea o cutánea de *S. pyogenes* ocurre por transmisión de persona a persona a través de microgotas aerosolizadas o por contacto directo.

El tracto respiratorio superior y las lesiones de piel constituyen los reservorios y los principales focos primarios de infección por *S. pyogenes*. Esta bacteria puede ocasionar infecciones superficiales o profundas, mediadas por toxinas o por eventos inmunológicos. También puede adquirirse a través de los alimentos generando brotes a de faringitis y/o escarlatina partir de una fuente común. La leche no pasteurizada puede ser una de esas fuentes, pero también pueden serlo otros alimentos (p.ej. huevos, ensaladas) contaminados con secreciones respiratorias o a través de las manos de quienes los manipulan<sup>77</sup>. A diferencia de las faringitis transmitidas de persona a persona, los períodos de incubación de las transmitidas por alimentos son más cortos y la tasa de ataque mayor (50%–90%).

La faringitis es una inflamación de la faringe y la zona amigdalina adyacente. Dentro de las faringitis agudas la etiología bacteriana representa el 5-40%. *S. pyogenes* es la especie más frecuente y es la responsable del 20-30% de los episodios de faringitis en la edad pediátrica y aproximadamente el 10% de la población adulta<sup>79</sup>. Entre los niños con faringitis, en un 23% y un 58% se aísla *S. pyogenes* (17%–24% en niños menores de 5 años)<sup>98</sup>. El riesgo de transmisión desde un paciente con faringitis a sus contactos depende de la duración de la exposición y de la cercanía física<sup>234</sup>.

Luego de un período de incubación de 2 a 4 días, el inicio del cuadro clínico es generalmente súbito, con fiebre, odinofagia, cefalea, malestar general y dolor

abdominal. En ausencia de complicaciones la faringitis estreptocócica es autolimitada. El tratamiento antimicrobiano está indicado para evitar complicaciones supurativas locales (absceso periamigdalino, linfadenitis cervical y mastoiditis), prevenir la fiebre reumática, acelerar la mejoría clínica del paciente y limitar la cadena epidemiológica. Aproximadamente el 15% de los pacientes con faringitis estreptocócica se pueden convertir en portadores asintomáticos luego del tratamiento<sup>17</sup>.

### Complicaciones de las faringitis

Como complicaciones de la faringitis están las supurativas y las no supurativas. También se puede considerar a la escarlatina como una complicación tóxica.

#### *Complicaciones supurativas*

Las complicaciones supurativas son poco frecuentes en la era posantibiótica y consisten en abscesos periamigdalinos, abscesos retrofaríngeos, otitis media aguda, sinusitis aguda, linfadenitis, meningitis (muy rara), abscesos cerebrales (muy raros), neumonía, etc. y por lo general se originan por contigüidad a partir de faringitis mal curadas. La diseminación por vía hematógena puede producir artritis supurada y raramente meningitis<sup>173</sup>, endocarditis<sup>6</sup>, osteomielitis y abscesos.

### *Complicaciones no supurativas*

Las complicaciones no supurativas son la artritis reactiva, la fiebre reumática y la glomerulonefritis.

La fiebre reumática ocurre alrededor de tres semanas después de un episodio de faringitis. Este período de latencia es asintomático. La enfermedad se manifiesta como una reacción inflamatoria no purulenta de ciertos órganos, principalmente las articulaciones, el corazón y el cerebro. Si bien desde la década del '50 se conoce la asociación de la fiebre reumática con una infección estreptocócica previa, todavía se desconoce cuál es el mecanismo exacto que la origina. Lo que se sabe es que dentro de un grupo de personas, sólo unas pocas, portadoras de ciertos antígenos de histocompatibilidad, son susceptibles y dentro de más de 100 serotipos M de estreptococos, las cepas portadoras de sólo unos pocos de esos determinantes antigénicos han sido reconocidas como desencadenantes de esta enfermedad (especialmente M1, M3, M5, M6 y M18 mucoide).

La glomerulonefritis aparece entre una y tres semanas después de un episodio de faringitis o después de tres a seis semanas de una piodermatitis estreptocócica. Previamente a la glomerulonefritis el paciente puede presentar fiebre, persistir la faringitis o permanecer asintomático. La presentación clínica es variable: los síntomas más comunes son edema, hematuria macroscópica y dolor lumbar. En el comienzo son comunes algunos síntomas inespecíficos como anorexia, malestar general, náuseas y vómitos. La mitad de los pacientes padecen de oliguria (disminución del volumen miccional), pero raras veces de anuria (ausencia de micción). La hipertensión se

produce en un 60 - 80% de los pacientes, pero las complicaciones neurológicas derivadas de la misma son muy poco frecuentes (<1% de los pacientes con convulsiones o encefalopatías). Al igual que en el caso de la fiebre reumática, sólo unas pocas cepas de *Streptococcus pyogenes* son nefritogénicas (capaces de producir glomerulonefritis). El M12 es el de mayor frecuencia luego de una faringitis y el M49 es el que tiene mayor relación con pioderma. Una posible explicación para el desarrollo de la enfermedad es que estas cepas nefritogénicas producirían proteínas con determinantes antigénicos especiales, con afinidad por ciertos sitios ubicados en el glomérulo normal. Las bacterias las volcarían a la circulación desde la piel o la faringe, donde se encontrarían asentadas y llegarían a los glomérulos. Una vez adheridas a los glomérulos, interaccionarían con anticuerpos antiestreptocócicos circulantes y formarían inmunocomplejos.

Tanto en el caso de la fiebre reumática como en el de la glomerulonefritis es difícil rescatar a los estreptococos responsables a partir de exudados faríngeos practicados en el momento en que se efectúa el diagnóstico de cualquiera de estas dos complicaciones. Obviamente tampoco es posible aislarlos de otro tipo de muestras pues los estreptococos actuaron previamente y luego desaparecieron de los sitios iniciales (fauces o piel), pero nunca estuvieron presentes como tales en las articulaciones, el corazón, el cerebro o el riñón.

En pacientes pediátricos se ha asociado a *S. pyogenes* con desórdenes neuropsiquiátricos autoinmunes<sup>209</sup>. La corea de Sydenham es la manifestación neurológica de la fiebre reumática. También el síndrome de Tourette, los tics y los trastornos obsesivo-compulsivos se han vinculado a infecciones estreptocócicas. En

personas con corea de Sydenham y trastornos neuropsiquiátricos autoinmunes asociados con estreptococos se ha observado que los autoanticuerpos presentes en el suero y en el líquido cefalorraquídeo producen la activación de las neuronas y reaccionan con los receptores de dopamina D1 y D2<sup>49</sup>.

### *Escarlatina*

La escarlatina es una faringitis complicada por haberse producido con una cepa productora de toxina<sup>112</sup>. El microorganismo puede ser aislado de las fauces, mientras que las manifestaciones cutáneas de la enfermedad son asépticas. La infección por cepas productoras de exotoxinas pirogénicas A, B o C pueden producir una erupción escarlatiniforme (escarlatina clásica).

La escarlatina fue una enfermedad frecuente y con elevada mortalidad en casi todo el siglo XIX. Los brotes de escarlatina fueron perdiendo intensidad desde fines de dicho siglo, pero reemergieron en los últimos años. Estos cambios pudieron deberse a la inmunidad de rebaño, las mutaciones genéticas de los estreptococos circulantes o al reemplazo de ciertas cepas por otras. Recientemente se reportaron brotes en Vietnam (2009), Reino Unido (2011-2015), España (2011), China (2011-2012), EE.UU. (2012) y Canadá (2012), en algunos casos involucrando cientos de casos<sup>180</sup>.



## Infecciones invasivas

Como ya se mencionó, *S. pyogenes* también es responsable de infecciones graves como bacteriemia, sepsis, infecciones profundas de tejidos blandos (erisipela, fascitis necrotizante y celulitis). Con menor frecuencia produce miositis, osteomielitis, artritis séptica, neumonía, meningitis, endocarditis, pericarditis e infecciones neonatales graves. El SSTE es una patología de alta mortalidad que resulta del comportamiento de la toxina estreptocócica como superantígeno que induce la producción masiva de citoquinas y linfoquinas<sup>28, 50</sup>.

Las enfermedades invasivas por *S. pyogenes* ocurren más frecuentemente desde focos cutáneos, a partir de los cuales la bacteria invade sitios estériles como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural o tejidos profundos que pueden derivar en fascitis necrotizante o SSTE.

Desde mediados de la década de los 80 se ha observado un incremento mundial de infecciones graves y de SSTE, asociados de forma frecuente con fascitis necrotizante, con una mortalidad que oscila entre el 25 y el 50%<sup>28, 29, 202</sup>. Los serotipos M1 y M3 son los más frecuentes en los aislamientos provenientes de infecciones invasivas y están asociados con SSTE; aunque es importante destacar que los factores del hospedador y sus comorbilidades condicionan la gravedad<sup>135, 159, 164</sup>

La incidencia de SSTE es mayor en niños de corta edad (sobre todo leucémicos con varicela) y en gerontes. Otro grupo de riesgo lo integran los pacientes alcohólicos, con diabetes mellitus, enfermos crónicos pulmonares y cardíacos, infectados con VIH o drogadictos endovenosos. Se estima que los riesgos de infecciones invasivas en los

contactos es 200 veces mayor que en la población general, aunque la mayoría de los contactos colonizados permanecen asintomáticos<sup>54</sup>.

A pesar de los estudios que se han realizado en distintos países, las razones del resurgimiento agresivo de las infecciones causadas por *S. pyogenes* siguen sin develarse. Si bien se han hecho muchos esfuerzos por analizar los factores de virulencia de las cepas responsables de la enfermedad invasiva y la respuesta inmune generada por el paciente, sólo se pudo establecer una relación entre determinados tipos M y la producción de exotoxinas. La proteína M1 tiene propiedades proinflamatorias y es así que puede producir daño vascular y tisular mediante la interacción con el fibrinógeno<sup>137</sup>. Las cepas pertenecientes al serotipo M1T1, en los últimos 30 años, han sido responsables en todo el mundo de infecciones graves<sup>5</sup>. No obstante otros serotipos han estado implicados en casos de SSTE<sup>24, 133</sup>.

Los métodos convencionales de tipificación de cepas de *S. pyogenes* están basados en la especificidad antigénica de las proteínas de superficie T y M y el factor de opacidad sérica<sup>106</sup>.

La proteína T resistente a tripsina integra los *pili* de esta bacteria<sup>155</sup>. El tipo T puede identificarse mediante pruebas de aglutinación con reactivos comerciales. La variación de la secuencia del segmento N-terminal de la proteína M es la base de los sistemas de tipificación de cepas por precipitación. Se han validado 93 serotipos M (M1-M93) en la clasificación de Lancefield<sup>76</sup>. Más recientemente se utilizó la secuenciación del gen *emm*, codificante de la proteína M, como método de tipificación equivalente. Para este fin, se requiere realizar la amplificación génica (reacción en cadena de la polimerasa = PCR), purificación del amplicón y posterior secuenciación.

Las secuencias del gen *emm* correlacionan con los serotipos M de Lancefield y permiten por lo tanto la agrupación en serotipos/genotipos<sup>74, 76</sup>. Con esta metodología se describieron más de 170 tipos del gen *emm*<sup>36</sup>.

En la Argentina, en un estudio multicéntrico realizado durante 6 meses (1998-1999), en las infecciones invasivas causadas por *S. pyogenes* se detectaron 5 casos de SSTE y 4 muertes. Solo hubo 2 aislamientos del tipo M/*emm3* sobre un total de 55, y no estuvieron asociados a SSTE y a casos fatales. La mortalidad fue de 27,3% en adultos y 12,1% en niños. Los tipos observados en STSE fueron M/*emm1*, M/*emm12*, M/*emm82*, M/*emm43*, M/*emm75* y M/*emm92*<sup>133</sup>. En otro estudio más reciente el STSE se registró en 5 adultos and 4 niños, mientras que la mortalidad fue respectivamente de un 9,5% (*emm1*, *emm3* y *emm18* x2) y un 2,1% (*emm12*)<sup>219</sup>. Las infecciones de piel y tejidos blandos (68,0% en adultos y 45,0% en niños) y las osteoarticulares (11,4% en adultos y 25,0% en niños) fueron las más frecuentes. En niños la neumonía se registró en un 15,0% de casos. La diabetes (n=10) y la varicella (n=5) fueron las condiciones predisponentes en adultos y en niños, respectivamente. Se identificaron 20 diferentes tipos *emm*: en adultos predominaron el *emm3* (n=6, 18,2%), el *emm1* (n=5,15.2%) y el *emm12* (n=3, 9.1%); en niños, el *emm1* (n=15, 39.5%), el *emm12* (n=6,15,8%) y el *emm6* (n=4, 10,5%). Se describieron 19 perfiles diferentes de superantígenos y estaban asociados a determinados serotipos: los más frecuentes fueron ABFGJZ (n=17, *emm1*), BCFG (n=10, *emm2*, *emm6*, *emm43*, *emm89*), BCFGH (n=8, *emm12*) y ABFGssa (n=7, *emm3*).

Para establecer la relación entre aislamientos y cepas bacterianas se recurre a la epidemiología molecular. En *S. pyogenes* se ha validado la técnica de electroforesis

de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE). También en esta bacteria se ha desarrollado la técnica de secuencia de múltiples locus (*Multilocus Sequence Typing* = MLST) como marcador molecular de aplicación en epidemiología global<sup>71, 145, 159</sup>. Sólo en la mitad de los casos de SSTE pudo establecerse la puerta de entrada.

La adherencia a la mucosa faríngea o a la piel es una condición necesaria para producir infecciones, pero no es suficiente, teniendo en cuenta que hay portadores asintomáticos. La adherencia se produce por interacciones complejas entre los epitelios y factores estreptocócicos como la proteína M, el ácido lipoteicoico, el peptidoglucano de la pared celular y las fimbrias. La proteína F (proteína de unión a fibronectina) contribuye a la adherencia y también a la internalización dentro de las células epiteliales, dando lugar a la portación prolongada y a las recurrencias.

## **Identificación a nivel de género y especie**

### Características culturales

Cuando se introdujeron los medios con base de agar, pronto se observó que el agregado de sangre permitía el desarrollo de algunos microorganismos más exigentes y a la vez podía observarse la alteración que las colonias producían sobre los glóbulos rojos (hemólisis). En 1919 Brown clasificó los tipos de hemólisis en alfa ( $\alpha$ ): hemólisis parcial, que deja algunos glóbulos intactos cerca de la colonia, lo que se traduce macroscópicamente en un halo verdoso alrededor de la misma; alfa prima ( $\alpha'$ ): hemólisis parcial, que deja algunos glóbulos intactos cerca de la colonia, pero no deja

glóbulos en una zona un poco más alejada. A ojo desnudo parece una hemólisis total pues el halo verdoso está muy pegado a la colonia y suele confundirse con parte de la misma; beta ( $\beta$ ): hemólisis total que no deja glóbulos alrededor de la colonia, quedando el medio totalmente transparente y gamma ( $\gamma$ ); ausencia de hemólisis.

La hemólisis depende de la composición del medio de cultivo y dentro de ella de:

(a) El origen de la sangre con que se prepara el medio: se ha trabajado históricamente con sangre humana, ovina, bovina, equina o de conejo. No obstante, al registrarse diferencias se adoptó universalmente el uso de la sangre ovina.

(b) La naturaleza del medio basal con que se prepara el agar sangre: éste debe ser un medio exento de carbohidratos como agar tripteína de soja o agar Columbia. Por lo tanto no deben usarse agar infusión cerebro corazón, que contiene glucosa ni agar Mueller Hinton que contiene almidón. Los carbohidratos, cuando son utilizados por las bacterias, se transforman en metabolitos ácidos y el descenso consiguiente del pH determina la inhibición de las hemolisinas, que son las enzimas responsables de la producción de hemólisis.

c) La atmósfera de incubación. Hubo muchas discusiones acerca de la conveniencia de incubar las placas de agar sangre en uno u otro tipo de atmósfera. La atmósfera anaeróbica, que es la que permite el desarrollo de una hemólisis de mayor intensidad, no es conveniente porque aumenta los costos y favorece la producción de  $\beta$ -hemólisis por bacterias normalmente  $\alpha$ -hemolíticas como *Streptococcus pneumoniae*. La microaerobiosis que parecería ser la atmósfera ideal, según algunos autores adolecería del defecto de poder inhibir la hemólisis de algunas bacterias por la formación de peróxidos al reaccionar ciertos compuestos con el CO<sub>2</sub> y el oxígeno

atmosférico. Es por ello que se prefiere fomentar el desarrollo subsuperficial de colonias a través de cortes producidos con el ansa en el agar sangre o utilizar cubreobjetos que reduzcan la concentración de oxígeno sin aumentar la de dióxido de carbono. No obstante, parecería no haber diferencias en incubar las placas en aerobiosis como en microaerobiosis.

Es importante destacar que existen cepas de *S. pyogenes* que son deficientes en hemolisina y no producen hemólisis o se presentan con hemólisis alfa en agar sangre<sup>62, 152</sup>.

Si bien la mayor parte de los microorganismos de importancia clínica pertenecientes a este grupo forman cadenas en medio líquido, es imperativo realizar la observación microscópica luego de un desarrollo en caldo tioglicolato de todo coco gram positivo catalasa negativo. De esta manera se podrán individualizar algunos géneros menos frecuentes.

Para poder llegar a establecer el género, como ya se dijo, bastan unas pocas pruebas bioquímicas sencillas: bilis esculina, tolerancia a CINA 6,5%, pirrolidonilarilamidasa (PYR), leucinaminopeptidasa (LAP), observación de cadenas, tetradas o racimos en caldo tioglicolato y determinación de su sensibilidad a vancomicina. Al partir de microorganismos  $\beta$ -hemolíticos las pruebas esenciales son PYR y sensibilidad a bacitracina. Si ambas son positivas se trata de *Streptococcus pyogenes* y solo se recomienda efectuar la prueba serológica con partículas de látex para confirmar que se trata de estreptococos del grupo A en casos de infecciones graves (Tabla 2).

**Tabla 2.** Identificación de los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos

Especie	Grupo	BAC	CAMP	VP	HIP	ARG	ALM	SBL
<i>S. pyogenes</i>	A	S	-	-	-	+	-	-
<i>S. agalactiae</i>	B	R	+	-	+	+	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	C, L	R	-	-	-	+	-	+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	A,C,G,L	R <sup>s</sup>	-	-	-	+	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	R	-	-	-	+	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	R	-	-	-	+	-	+
<i>S. canis</i>	G	R	-	-	-	+	-	-
<i>S. anginosus</i>	A,C,G, F, NT	R	-	+	-	+	-	-
<i>S. pseudoporcinus</i>	E,P,U,V, Otros, NT	R	+	V	+	+	-	+
<i>S. iniae</i>	NT	R	+	-	-	(-)	+	-

BAC = bacitracina, VP = Voges-Proskauer, HIP = hipurato, ARG = arginina, ALM = almidón, SBL = sorbitol, (-) = puede positivizarse a los 10 días de incubación.

### Pruebas serológicas

La determinación de anticuerpos antiestreptocócicos se utiliza para el diagnóstico de enfermedades posestreptocócicas como la fiebre reumática aguda y la glomerulonefritis<sup>194</sup>. Los niveles de anticuerpos están influidos por múltiples factores como el sitio y el tiempo de ocurrencia de la infección aguda, edad, terapia antimicrobiana y prevalencia de infecciones estreptocócicas<sup>4</sup>.

Los anticuerpos más utilizados son la antiestreptolisina O (ASTO) y la anti-DNasa B. *S. pyogenes* produce 4 tipos de anticuerpos anti-DNasa (A, B, C y D), sin embargo el anti-DNasa B es el que provoca mayor respuesta inmunológica en el humano. Los ASTO alcanzan un nivel máximo luego de 3-6 semanas de la infección aguda. Las infecciones de piel no aumentan en forma significativa estos anticuerpos. La presencia de títulos elevados de ASTO no son específicos de *S. pyogenes* ya que infecciones por *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* también pueden incrementarlos. Los anticuerpos anti-DNasa B aumentan de forma significativa luego de las infecciones de piel, alcanzan un nivel máximo a las 6-8 semanas después de una infección estreptocócica y permanecen mayor tiempo que los de ASTO. La terapia antimicrobiana precoz puede reducir el nivel de ASTO pero no inhibe su producción. En los portadores de *S. pyogenes* no se observa un aumento del título de anticuerpos. La prueba de hemaglutinación (*streptozyme test*) permite la detección de anticuerpos sobre múltiples productos estreptocócicos extracelulares. Se han comunicado problemas en su estandarización y especificidad<sup>91</sup>. La detección de anticuerpos sobre otras proteínas estreptocócicas no está disponible aún de forma comercial.

### **Sensibilidad a los antimicrobianos**

*S. pyogenes* continúa siendo sensible a penicilina, antimicrobiano de elección en el tratamiento empírico de las infecciones estreptocócicas.

Los macrólidos constituyen una alternativa terapéutica cuando los pacientes presentan alergia a la penicilina. El nivel de resistencia a los macrólidos se correlaciona



con el grado de su utilización en la práctica clínica. La resistencia a eritromicina en *S. pyogenes* ha surgido en el mundo como un problema creciente<sup>58</sup>.

Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a macrólidos es la dimetilación inducible o constitutiva de la metilasa, con actividad sobre la subunidad 23S ribosomal (genes *ermA* y *ermB*). El fenotipo resultante es el MLS<sub>B</sub> ya que afecta tanto macrólidos como lincosamidas y estreptograminas B. Otro mecanismo en *S. pyogenes* es el eflujo activo por el cual las moléculas de macrólidos de 14 y 15 miembros en el anillo macrolactona se expulsan de forma activa de las bacterias (gen *mefA*). El fenotipo resultante es el M ya que afecta solo a macrólidos de 14 y 15 miembros en el anillo macrolactona. También se han descrito mutaciones en la proteína L4 y en la subunidad 23S ribosomal, como responsables de resistencia a eritromicina<sup>139, 204</sup>.

En algunos países europeos prevalece el mecanismo MLS<sub>B</sub> tanto inducible como constitutivo<sup>16, 210</sup>. En la Argentina, sin embargo, el fenotipo más frecuente fue el M y el porcentaje promedio de resistencia a eritromicina en la Argentina, siempre fue bajo, de acuerdo a datos obtenidos de distintos centros (6,7% con un rango de 0,5-14,1%)<sup>131</sup>.

La resistencia a tetraciclinas puede ocurrir por distintos mecanismos. El más difundido es la protección ribosomal, mediada por genes *tetM*, *tetO*, *tetQ* o *tetT* aunque también ha sido descrita la presencia de un mecanismo de eflujo activo (*tetK* o *tetL*)<sup>148</sup>. La resistencia a cloranfenicol en *S. pyogenes* sucede a través de la inactivación de la droga por diacetilación<sup>158</sup>. En la Argentina la resistencia a tetraciclina (gen *tetM*) ha sido menor del 10%<sup>128, 132, 142</sup>.

Se ha documentado la presencia de cepas con alto nivel de resistencia a aminoglucósidos, aunque con baja frecuencia<sup>225</sup>.

## **Prevención**

### Vacunas

El desafío para la obtención de la vacuna es la identificación de epitopes que confieran protección contra la infección de *S. pyogenes*, que puedan generar anticuerpos para los distintos serotipos M, pero que no produzcan efectos adversos similares a los registrados en los casos de fiebre reumática o glomerulonefritis. El desarrollo de vacunas polivalentes se ha focalizado en el segmento variable de la proteína M. En la actualidad una vacuna recombinante 26-valente ha demostrado ser inmunogénica y bien tolerada en voluntarios adultos<sup>53</sup>.

La epidemiología molecular del gen *emm* es relevante, pues aunque la vacuna 26-valente es eficaz en EE.UU., sus resultados no pueden transferirse a algunos países en desarrollo<sup>28,29</sup>. Se han descubierto numerosos nuevos tipos y subtipos de gen *emm* en estos países, que no habían sido observados en naciones industrializadas<sup>149,199, 201</sup>.

También se ha propuesto el desarrollo de vacunas utilizando antígenos conservados de regiones constantes de proteína M, C5a peptidasa, proteínas de unión a fibronectina, cisteína proteasas, *pili* e hidratos de carbono estreptocócicos<sup>201</sup>.

## Estreptococos de los grupos C y G

Como ya se dijo estos microorganismos pertenecen al grupo de los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos piógenos. Su potencial patogénico es similar al de *Streptococcus pyogenes*.

El antígeno de grupo correspondiente al grupo C es un polisacárido compuesto de hexosamina y ramnosa. Difiere del antígeno de grupo A en que el determinante antigénico terminal para el grupo C es N-acetilglucosamina. Los estreptococos de los grupos C y G pueden dividirse en dos grupos morfológicos según el tamaño de su colonia: colonia chica y colonia grande. Las colonias grandes son similares a las de *S. pyogenes* ( $\geq 0,5$  mm de diámetro). Las del grupo C pertenecen a varias especies y subespecies. (Tabla 3). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* es la más frecuente en infecciones humanas y puede presentar carbohidratos de grupo C, de grupo G o más raramente de grupo A o L. Dentro del grupo C también encontramos especies y subespecies de origen animal algunas de las cuales, eventualmente pueden producir infecciones en humanos: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus equi* subsp. *equi* y *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Solo las cepas no hemolíticas o  $\alpha$ -hemolíticas quedaron incluidas en la otra subespecie (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*) de importancia en veterinaria<sup>230</sup>. En una revisión de 192 casos de bacteriemia por estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, 44 (22,9%) fueron causados por estreptococos del grupo G y sólo 7 (3,6%) por estreptococos del grupo C (colonia grande)<sup>30</sup>. Dentro del grupo G, además de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* está *Streptococcus canis*, que se ha aislado

principalmente de piel y mucosas de perros y bovinos, aunque también de gatos, ratas, arminios, conejos y zorros. En estos animales puede producir también infecciones de todo tipo, incluso SSTE y fascitis necrotizante. En humanos las infecciones por *S. canis* son raras aunque seguramente subestimadas por no efectuarse en todos los casos la identificación en forma completa<sup>236</sup>.

Hay microorganismos que aglutinan con anticuerpos anti-C y anti-G que forman colonias pequeñas (<0,5 mm) con halos de hemólisis cinco o más veces mayores que su propio diámetro. Se trata de variantes  $\beta$ -hemolíticas de estreptococos del grupo *Streptococcus anginosus*, que se describirán más adelante dentro de los estreptococos del grupo viridans. Además de las diferencias morfológicas también difieren en algunas pruebas bioquímicas: los estreptococos de los grupos C y G de colonia grande dan positiva la prueba de  $\beta$ -glucuronidasa y negativa la de Voges Proskauer a diferencia de los de colonia chica.

**Tabla 3.** Características fenotípicas de los estreptococos de los grupos C y G

Especie y grupo	Hem	LAC	SBL	TRE	GLY	RIB	TAG
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> grupos C y G	$\beta$	$\pm$	-	+	-	ND	+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	$\alpha/\gamma$	+	ND	ND	-	+	+
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> grupo C	$\beta$	$\pm$	+	-	+	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> grupo C	$\beta$	-	-	-	+	-	-
<i>S. canis</i> grupo G *	$\beta$	+	ND	-	ND	ND	ND

\* *S. canis* es  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa positiva.

LAC: lactosa, SBL: sorbitol, TRE: trehalosa, GLY: RIB: ribosa, GLY: glucógeno, TAG: tagatosa.

### ***Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis***

Desde su primera descripción en 1935 se creyó que los estreptococos de los grupos C y G no eran virulentos<sup>117</sup> y durante mucho tiempo quedó el concepto de que *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* era un colonizante habitual de las vías aéreas superiores incapaz de producir episodios de faringitis. Sin embargo, en un estudio de base poblacional se vio que su contribución en infecciones invasivas era similar a la de *S. pyogenes*. No es un colonizante frecuente de las vías aéreas superiores excepto en determinadas áreas geográficas<sup>21, 147</sup>. Por el contrario, aparece con bastante asiduidad en lesiones de piel, que son el principal reservorio para la producción de infecciones sistémicas.

Se han observado además brotes de faringitis tanto en adultos como en niños, algunos de origen alimentario, otros por transmisión entre personas<sup>13, 90</sup>.

Actualmente se reconoce que *Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis* grupo C o grupo G es un agente etiológico de faringitis tanto en niños como en adolescentes y adultos que puede originar hasta un 5% de todas las faringitis (10 – 20% de las faringitis estreptocócicas)<sup>41, 203, 221</sup>.

Existe solo un estudio de casos y controles y un estudio de cohortes que determinaron que los síntomas eran más leves que los de la faringitis por estreptococos del grupo A (GAS), mientras que cinco estudios observacionales (tres de cohortes y dos estudios de casos y controles) no encontraron diferencias en los cuadros clínicos

51, 85, 90, 124, 150, 220, 243.

Se publicaron además otros estudios originales (la mayoría reportes o series de casos) que describieron síntomas o complicaciones graves posteriores a faringitis agudas por GCS y GGS<sup>46, 65, 88, 156, 192, 221, 222</sup>. También se refirieron a casos de faringitis recurrente por GCS y un estudio de casos y controles en estudiantes de un colegio en el que se determinó que GCS se aislaba más frecuentemente de los casos que de los controles<sup>222</sup>. Se describieron además complicaciones de las faringitis por GGS o GCS tales como artritis reactiva<sup>242</sup>, empiema subdural<sup>92</sup>, síndrome de *shock* tóxico<sup>160</sup> y glomerulonefritis aguda<sup>93</sup>.

En 1997 en Inglaterra se reportaron casos de septicemia por GCS y GGS<sup>69</sup>. Si bien no se ha constatado el desarrollo de fiebre reumática posterior a faringitis por GCS o GGS hay estudios y opiniones de expertos que sugieren que estos microorganismos podrían contribuir a desencadenar esta complicación en sitios de alta incidencia de fiebre reumática<sup>97, 146</sup>.

Se ha visto que la faringitis por grupo C aumentaba los títulos de antiestreptolisina O y podía generar complicaciones supurativas y no supurativas, algunas de ellas graves (abscesos peritonsilares, artritis reactiva, glomerulonefritis)<sup>96, 150, 183, 224</sup>. Hay trabajos que reconocen la similitud de síntomas y signos clínicos en faringitis por estreptococos de los grupos A, C y G<sup>124</sup>. Aunque las guías de 2012 de la Infectious Diseases Society of America recomiendan sólo efectuar tratamiento de las faringitis por *S. pyogenes*, por todo esto, parece razonable tratar también a aquellas producidas por *S. dysgalactiae* subsp *equisimilis*<sup>130, 196</sup>.

*S. dysgalactiae* subsp *equisimilis* posee una proteína de pared similar a la M de *Streptococcus pyogenes*. De hecho, el sistema actual de tipificación se basa

principalmente en la comparación de secuencias *emm*, de las que se conocen alrededor de cincuenta y pueden encontrarse en el sitio ([ftp://ftp.cdc.gov/pub/infectious\\_diseases/biotech/tsemm/](ftp://ftp.cdc.gov/pub/infectious_diseases/biotech/tsemm/))<sup>1</sup>.

Otros factores de virulencia son proteínas que se unen a fibronectina (FnbA, FnbB, FnB, GfbA)<sup>111, 125</sup>, otras que se unen a plasminógeno<sup>167, 223</sup> y otras moléculas que permiten la unión a la vitronectina S humana<sup>38</sup> y a la laminina<sup>84</sup>. Todos estos factores facilitan la adherencia de los estreptococos a las células epiteliales y endoteliales humanas.

### ***Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae***

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* es un estreptococo del grupo C o L, que desarrolla bien en agar sangre, pero produce hemólisis alfa o gamma. Se trata de un agente reconocido de la mastitis bovina pero muy excepcionalmente descrito en infecciones humanas<sup>14</sup>. Pueden citarse un caso de meningitis neonatal tardía, dos casos de meningitis bacteriémicas en adultos, un caso de endocarditis en un drogadicto de 32 años con HIV y un caso de celulitis y bacteriemia en un paciente joven con espina bífida y úlceras recurrentes en miembros inferiores<sup>14</sup>. Al no presentar  $\beta$ -hemólisis, es posible que este microorganismo haya sido subdiagnosticado o mal diagnosticado como estreptococo del grupo viridans. Se diferencia de otras especies animales (*S. equi* subsp. *equi* y *S. equi* subsp. *zooepidemicus*) en que fermenta lactosa y ribosa pero no utiliza el glucógeno y de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* porque fermenta tagatosa.

## ***Streptococcus canis***

*S. canis* es una especie originalmente propuesta en 1986 para algunos estreptococos aislados como parte de la microbiota habitual de perros y ganado bovino que presentaban el antígeno G de Lancefield<sup>60</sup>. Esta especie ha sido aislada de otros animales (gatos, ratas, armiños, ratones, conejos y zorros). Posteriormente por estudios de proteínas totales y genéticos fueron claramente definidos como pertenecientes a una especie diferente de las conocidas y estrechamente relacionada a *S. pyogenes* y *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. También fueron reconocidos como agentes causales de diversas infecciones caninas, algunas de ellas graves<sup>153</sup>. En seres humanos se los ha asociado principalmente a infecciones a punto de partida de úlceras de miembros inferiores<sup>115</sup>. Se ha aislado de hemocultivos de un paciente de 76 años con con leucemia y de un hisopado de una herida en el oído de una mujer de 50 años<sup>236</sup>. También se han registrado posibles casos de meningitis y peritonitis<sup>104, 107</sup>.

Las pruebas bioquímicas que permiten separar a esta especie de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. del grupo G son  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y trehalosa (Tabla 4)<sup>236</sup>.

**Tabla 4.** Pruebas bioquímicas que permiten separar *S. canis* de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. del grupo G (adaptado de Whatmore et al. <sup>236</sup>)

Especie	$\alpha$ -galactosidasa	$\beta$ -galactosidasa	$\beta$ -glucuronidasa	trehalosa
<i>S. canis</i>	+	+	V	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+

V = variable



## ***Streptococcus equi***

*Streptococcus equi* es una especie de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos perteneciente al grupo C de Lancefield. Comprende al menos 3 subespecies que accidentalmente pueden infectar al hombre: *S. equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* y *S. equi* subsp. *ruminatorum*. Posee sustancias extracelulares que aumentan su poder patógeno como hemolisinas, fibrinolisin, hialuronidasas, etc.

*S. equi* subsp. *equi* y *S. equi* subsp. *zooepidemicus* tienen una homología de alrededor del 80% con *S. pyogenes*<sup>101</sup>.

*S. equi* subsp. *equi* causa una enfermedad de relevancia veterinaria en caballos llamada gurma (adenitis equina, paperas, *distemper* equino o *strangles*). Se caracteriza por abscedación de los ganglios linfáticos de la cabeza y el cuello del animal. La ruptura de esos abscesos conduce al estado de portación crónica, de gran importancia en la diseminación de la enfermedad.

Parece haber evolucionado desde otra de las subespecies, que sería una forma ancestral (*S. equi* subsp. *zooepidemicus*)<sup>101</sup>. *S. equi* presenta una proteína similar a la M, produce cuatro superantígenos: SeeH, SeeL y SeeM transportados por 2 profagos<sup>2, 179</sup>, dos proteínas que unen fibronectina (SFS y FNE)<sup>126, 127</sup> y un nuevo sistema no ribosomal de síntesis de péptidos involucrado en la adquisición de hierro<sup>100</sup>.

*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* es el microorganismo más frecuentemente aislado como patógeno oportunista de las vías respiratorias de los caballos<sup>240</sup> y presenta también la capacidad de liberar una serie de superantígenos (SzeF, SzeN SzeP)<sup>166</sup>. Produce además infecciones uterinas y queratitis ulcerativa en

equinos<sup>23, 200</sup>. Incluso también puede afectar a bovinos, ovinos, porcinos, monos y perros<sup>37, 120, 187, 193</sup>.

Son raros los casos humanos de infecciones por *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*<sup>83</sup>. Produce menos del 1% de todas las bacteriemias, pero ha sido descrito como el microorganismo más virulento dentro de los del grupo C para los seres humanos. Las tasas de mortalidad son el doble de las registradas para *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*<sup>20</sup>. Se han publicado informes de casos en forma esporádica<sup>18, 212</sup>, pero también hay reportes de grandes brotes epidémicos posteriores a la ingesta de productos lácteos<sup>67</sup>, desencadenando incluso episodios de glomerulonefritis<sup>10</sup>.

Las presentaciones clínicas fueron variadas: neumonía, septicemia<sup>11</sup>, meningitis<sup>63, 72, 157</sup>, pericarditis<sup>188</sup>, artritis<sup>86</sup>, endocarditis<sup>143</sup> y espondilodiscitis<sup>15</sup>. En la mayoría de los casos la probable vía de transmisión se ha dado por contacto directo con caballos infectados o por consumo de leche no pasteurizada<sup>69, 83, 134</sup>.

*S. equi* subsp. *ruminatorum* pertenece al grupo piógeno de los estreptococos del grupo C. Fue inicialmente reconocido como agente de mastitis en ovejas y cabras<sup>78</sup>. También se aisló de infecciones en animales salvajes. Desde 2007 se registraron al menos dos casos de infecciones graves en seres humanos adultos: una bacteriemia con meningitis e infección respiratoria fatal en un paciente HIV positivo y una espondilodiscitis adicionada de una endocarditis<sup>140, 151</sup>. Se diferencia de las otras subespecies por dar negativas las pruebas de esculina y fermentación de D-ribosa<sup>140,</sup>

151.

## ***Streptococcus agalactiae***

*Streptococcus agalactiae* fue descrito como patógeno humano por Fry en 1935, a partir de tres casos de sepsis puerperal<sup>87</sup>. Anteriormente Lancefield y Hare habían identificado este microorganismo en exudados vaginales de mujeres puérperas asintomáticas. Recién a principios de la década de 1970 se comenzaron a informar infecciones neonatales y de mujeres embarazadas y parturientas. *S. agalactiae* abarca a los estreptococos pertenecientes al grupo B de Lancefield (EGB)<sup>117</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especie**

*S. agalactiae* es un coco gram positivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable. Desarrolla fácilmente en los medios de cultivo comunes, pero mejor en aquellos suplementados con sangre. A las 18-24 h de incubación en agar sangre de carnero, las colonias son de unos 3-4 mm de diámetro, lisas, blanco-grisáceas y rodeadas por un halo de  $\beta$ -hemólisis, a veces tan estrecha que solo es detectable al levantar la colonia. También hay entre un 3 y un 5% de cepas no hemolíticas. Para mejorar el aislamiento en materiales donde se puede encontrar en bajo número en relación al de bacterias acompañantes como en el tracto genital o genitourinario, se emplean medios selectivos de enriquecimiento como caldo Todd Hewitt suplementado con ácido nalidíxico (15  $\mu\text{g/ml}$ ) + colistina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) o gentamicina (8  $\mu\text{g/ml}$ ). Con la primera combinación se logra un mayor rendimiento pues algunos EGB son sensibles a la

gentamicina a esa concentración. Posteriormente a partir del enriquecimiento entre 18 y 24 h se efectúa el pasaje a una placa de agar cromogénico para EGB o en agar sangre con lo que se logra una clara visualización de las colonias después de 24-48 h de incubación<sup>8, 68, 95, 227</sup>.

Otra característica particular de *S. agalactiae* es su propiedad de desarrollar colonias pigmentadas anaranjadas por la producción de un compuesto poliénico que presenta ornitina y ramnosa en sus extremos (granadaeno) y que se observa únicamente en los desarrollos anaeróbicos en un medio que contiene almidón (medio Granada). Las cepas no hemolíticas de EGB no producen el compuesto poliénico, pero se ha propuesto una variante con agregado de un disco de oxacilina para detectarlas<sup>161, 184</sup>.

Clásicamente, la identificación del EGB se ha basado en técnicas fenotípicas como biotipificación y serotipificación. El método serológico primario es el método por precipitación capilar que es la detección de antígeno polisacárido común que lo caracteriza como perteneciente al grupo B de Lancefield<sup>44</sup>. La diferenciación ulterior del polisacárido capsular permite a su vez la clasificación en serotipos. Actualmente se reconocen diez, denominados Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX. La identificación de los mismos es sumamente útil para fines epidemiológicos en el estudio de colonización e infección y para la elaboración de vacunas puesto que los anticuerpos con especificidad para el grupo B no son protectores, pero sí los dirigidos al polisacárido específico de tipo. Entre un 4 y un 7 % de las cepas no se logran tipificar por este método. Esto puede ser debido a mutaciones de los genes que codifican la cápsula, a

que la cepa se encuentre en la fase de variación no capsulada o a que tenga un tipo capsular aún no caracterizado<sup>103, 118, 119, 198</sup>.

Otros componentes proteicos de superficie como las  $\alpha$  y  $\beta$  proteínas c, Rib y las proteínas R (R1 a R4) se están estudiando como factores de virulencia y como complemento en el estudio epidemiológico de las infecciones por EGB<sup>176, 205</sup>.

Las pruebas fenotípicas permiten una identificación presuntiva del EGB. Una de las pruebas utilizadas es la de CAMP (Christie, Atkins and Munch-Petersen), sobre la base de que este estreptococo secreta una proteína extracelular (conocida como factor CAMP) que interactúa con la hemolisina  $\beta$  (esfingomielinasa) producida por *Staphylococcus aureus* y causa una hemólisis sinérgica sobre los eritrocitos de carnero<sup>39, 136</sup>.

Alrededor del 98% de las cepas de EGB dan positiva esta reacción, pero existen cepas fenotípicamente negativas al factor CAMP<sup>99</sup>. Esta es una prueba poco específica ya que *Listeria monocytogenes*, algunos bacilos gram positivos diferomorfos y un pequeño porcentaje de *S. pyogenes* pueden dar positiva esta reacción. La efectividad de cada tipo de sangre en la visualización de la prueba de CAMP depende de la relación lecitina : esfingomielina de la membrana de los respectivos eritrocitos. En sangre equina es de 3:1, en sangre humana y de conejo es de 3:2 y en sangre de oveja, la mejor para esta prueba, es de 1:12.

La hidrólisis del hipurato de sodio es otra característica fisiológica que se utiliza para la identificación presuntiva de EGB ya que más del 95% de las cepas dan positiva la reacción. También un porcentaje importante de los enterococos la dan, pero se

descartan con las pruebas de bilis esculina y pirrolidónilarilamidasa (PYR) que son negativas para *S. agalactiae*<sup>75, 232, 238</sup>.

El carbohidrato C específico de los EGB es común a todas las cepas de este serogrupo y es rico en ramnosa y glucosamina<sup>117</sup>. Para estas determinaciones se emplean anticuerpos monoclonales y policlonales, Desde el laboratorio clínico solamente se efectúa la identificación de especie (grupo). La serología confirma lo hallado con las pruebas fenotípicas dado que no hay otras bacterias que posean antígeno B. No obstante, algunas cepas de *S. porcinus* o *S. pseudoporcinus* pueden dar aglutinación inespecífica con algunos reactivos.

En la actualidad se está desarrollando la genotipificación y la detección de genes específicos de virulencia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para estudios epidemiológicos se emplean la electroforesis de campo pulsado (PFGE), el análisis de patrones de amplificación al azar (RAPD) y la tipificación de secuencias de *multilocus* (MLST)<sup>122, 123</sup>.

Con métodos moleculares se han logrado clasificar algunos EGB no tipificables por los métodos serológicos actuales<sup>40, 113, 177, 181</sup>.

### **Habitat, patogenia e importancia clínica**

Los EGB forman parte de la microbiota del tracto genital femenino y del tracto gastrointestinal. Su frecuencia varía entre 5-40 % según la sensibilidad y especificidad del método de aislamiento e identificación ensayado y también de las condiciones intrínsecas de las poblaciones estudiadas (edad, prácticas sexuales, condiciones

higiénicas, etc). En la Argentina de acuerdo a reportes de distintos centros la portación vaginal-rectal varía del 5 al 20 %<sup>26, 31, 165, 227</sup>.

La portación perianal es más frecuente que la vaginal, pero un resultado negativo de cualquiera de las dos localizaciones no excluye la posibilidad de colonización en la otra. Por esto, para estudios de portación en embarazadas se propone efectuar ambos análisis<sup>32,190</sup>.

Esta colonización es un factor de riesgo importante para la infección neonatal ya que el recién nacido puede adquirir el microorganismo en forma vertical a partir de la colonización vaginal:

1) Infección intrauterina ascendente poco antes del parto (a través de las membranas rotas o intactas).

2) Invasión microbiana de la cavidad amniótica durante el trabajo de parto.

3) Invasión durante el pasaje a través del canal de parto.

Los aislamientos pareados en madres y en sus neonatos concuerdan en serotipos que demuestran esta adquisición vertical<sup>205</sup>. La transmisión horizontal (tanto hospitalaria como extranosocomial) ha podido explicar posibles brotes intrahospitalarios y ciertas infecciones de inicio tardío<sup>170</sup>.

Entre el 40% y el 70 % de las mujeres colonizadas transmiten el EGB a sus recién nacidos durante el parto y entre el 1 y el 2% de los recién nacidos colonizados desarrollan una infección precoz.

Esta transmisión al neonato puede originar una infección de comienzo temprano: en las primeras horas de nacido hasta los 7 días o de comienzo tardío que ocurre en

niños de una semana a dos meses de edad. En estos casos produce neumonía, sepsis y meningitis neonatal con un 5 % de morbimortalidad<sup>9, 80</sup>.

En las mujeres embarazadas y puérperas, la colonización genital puede causar infecciones en las vías urinarias e infecciones puerperales como endometritis, bacteriemia postcesárea, corioamnionitis, infección de la herida quirúrgica y en escaso número complicaciones fatales como meningitis, abscesos intraabdominales, endocarditis y fascitis necrotizante<sup>114</sup>. Hay varios factores obstétricos que se asocian con un mayor riesgo de infección del recién nacido, fundamentalmente: prematuridad (<37 semanas), ruptura prolongada de membranas (>18 horas), existencia de fiebre intraparto (>38°C), haber tenido un hijo anterior con infección por EGB y la presencia de bacteriuria durante el embarazo causada por este microorganismo. La estrategia de buscar el EGB en todas las muestras de orina sembrando agar sangre, aún en cultivos polimicrobianos tiene un mayor rendimiento en la detección de mujeres colonizadas, por lo tanto candidatas a recibir profilaxis<sup>175</sup>. También las tasas de colonización por EGB son mayores en los recién nacidos de madres que presentan una alta densidad de portación vaginal, y en los nacidos de gestantes que presentan un bajo título de anticuerpos frente a la cepa colonizante de EGB<sup>19</sup>. Aunque la existencia de factores de riesgo obstétricos aumenta la probabilidad de infección en el recién nacido, solo en menos de la mitad de los casos de una sepsis neonatal, se identifica algún factor de riesgo en la madre<sup>61, 206</sup>.

En los últimos años se ha producido un notable incremento de las infecciones por EGB en adultos, fuera del período postparto: neumonía, artritis, infecciones de piel y tejidos blandos, endocarditis e infecciones urinarias. Muchos factores incrementan el



riesgo de desarrollar una enfermedad invasiva entre los que se destacan la susceptibilidad del hospedador, factores de virulencia del microorganismo, inóculo elevado, etc. Especialmente se ha aislado en pacientes con diabetes, hepatopatías y neoplasias<sup>241</sup>.

La adherencia de las bacterias a las células del hospedador constituye un paso importante de la patogénesis. El EGB puede adherirse por interacciones inespecíficas, así, el nivel de hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana juega un rol importante en la adherencia a las células endoteliales y epiteliales<sup>237</sup>. Entre los factores de virulencia se considera la presencia del gen *hyl* B que codifica para la enzima hialuronatoliasa que hidroliza el ácido hialurónico, componente de la matriz extracelular. De esta manera facilita la invasión del microorganismo<sup>178</sup>.

La mayoría de los EGB produce una  $\beta$ -hemolisina, enzima que posee actividad citotóxica sobre las células humanas y así destruye barreras epiteliales y endoteliales<sup>162</sup>. También poseen una serie de proteínas de superficie que tienen la capacidad de adherir a las proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, fibrinógeno y laminina. La fibronectina está en altas concentraciones en el líquido amniótico y favorece la unión de la bacteria y posterior ascenso desde el tracto genital inferior hacia el cérvix generando corioamniomnitis, infección intraútero y nacimiento pretérmino<sup>163, 176, 189, 215, 216</sup>.

## **Prevención**

Entre 1996 y 1997, el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología, el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de USA (CDC) y la Academia Americana de

Pediatría comenzaron a efectuar recomendaciones para la prevención perinatal de infecciones por EGB. En el año 2002 el CDC elaboró una guía que recomendaba el estudio de colonización de EGB en la madre entre las semanas de gestación 35 y 37, dado que se había demostrado que la portación era intermitente. En ella se estableció la profilaxis antibiótica de toda mujer colonizada<sup>34, 228</sup>.

Aunque las dos estrategias propuestas por el CDC se consideran válidas, los casos de infección neonatal que pueden prevenirse se estiman en un 78% para la prevención basada en el cultivo y en un 41% cuando la política se basa en factores de riesgo<sup>185</sup>.

En la Argentina, la Cámara de Senadores de la Nación aprobó en abril de 2008 la Ley 26.369 (B.O. 07/05/2008) que establece el carácter obligatorio del control y prevención mediante la realización del examen de detección del EGB a todas las embarazadas con edad gestacional entre las semanas 35 y 37 que presenten o no condiciones de riesgo. La administración endovenosa de antibióticos intraparto a las gestantes portadoras de EGB, iniciada cuatro horas o más antes del nacimiento, es la única medida eficaz actualmente aceptada para interrumpir la transmisión vertical del EGB y evitar la sepsis neonatal. Para esto se indica el uso de penicilina o ampicilina. Para mujeres alérgicas a penicilina sin una historia de anafilaxia, angioedema, dificultad respiratoria o urticaria, el antibiótico preferido es la cefazolina. En caso de mujeres con alto riesgo de anafilaxia por alergia a la penicilina, se recomienda eritromicina, clindamicina o vancomicina. Se considera que la administración de eritromicina y clindamicina logra niveles importantes de protección en la madre pero no así en los tejidos fetales.

La administración oral o intramuscular de antibióticos durante la gestación resulta ineficaz para erradicar la colonización vaginal, ya que, al suprimir el tratamiento, la vagina puede volver a colonizarse a partir del recto<sup>7, 208</sup>.

La importancia de establecer la colonización por EGB en la madre que no ha sido estudiada previamente y la necesidad de un diagnóstico rápido en el momento del trabajo de parto, ha conducido al desarrollo de varios métodos que posibilitan un diagnóstico presuntivo inmediato, tales como la contraelectroforesis, aglutinación con partículas de látex, la coagulación, el inmunoensayo óptico, etc. Estos métodos se basan en el uso de antisuero hiperinmune específico para el grupo B a fin de detectar antígenos del estreptococo en material genital y en diversos líquidos corporales. Honest y col. estudiaron con profundidad varios de estos métodos analizando la sensibilidad, especificidad y tiempo del resultado. Dentro de los métodos rápidos se incluye la investigación del EGB en el material clínico por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que es uno de los mejores métodos por sensibilidad, especificidad y rapidez<sup>68, 102, 217</sup>.

Desde que se introdujo el estudio prenatal y la quimioprofilaxis, la incidencia de infección neonatal temprana por EGB ha disminuído hasta casi un 90 % en la Argentina pero no ha logrado reducir la infección neonatal tardía, como lo mencionaban otros autores. En diferentes partes del mundo se han intentado desarrollar vacunas para prevenir la sepsis neonatal precoz y principalmente la tardía e infecciones en pacientes inmunosuprimidos. Los intentos de crear una vacuna han incluido la utilización de polisacáridos del EGB tanto puros como asociados a proteínas como el toxoide tetánico. También se han usado proteínas específicas de la cápsula que tienen

potencial efectividad como factores inmunogénicos. Esto ha constituido un gran reto para los investigadores porque hay distintos serotipos de EGB en las diferentes distribuciones geográficas. En Estados Unidos, se ha visto que los serotipos más frecuentemente asociados a enfermedad neonatal son el tipo Ia, tipo III y más recientemente el tipo V. El porcentaje restante corresponde principalmente a Ib y II y menos frecuentemente a los otros serotipos<sup>168</sup>. En Portugal predomina el serotipo Ia<sup>144</sup>. En Chile, los serotipos más prevalentes son el Ia, II y III. El tipo III es el más frecuentemente asociado a colonización vaginal en embarazadas y sepsis neonatal. En Rosario (Argentina) se aislaron serotipos Ia, Ib/c, II, III y V en embarazadas (período 1994-1995) y en un estudio multicéntrico en procesos invasivos sobre aislamientos aportados por centros de diferentes provincias argentinas predominaron los serotipos Ia, II y III<sup>165, 214</sup>.

Al ser la sepsis neonatal una complicación grave aún no controlada óptimamente, la creación de una vacuna contra este patógeno administrada en el último trimestre del embarazo podría generar anticuerpos en niveles suficientes para lograr la prevención pasiva de la infección invasiva en los neonatos<sup>8, 27, 35, 56, 68</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

Hasta hace poco tiempo, los EGB eran uniformemente sensibles in vitro a la penicilina. Recientemente se ha informado la aparición de cepas no sensibles a este antibiótico con CIM de 0,25 a 1,0 µg/ml, valores que se consideran como de

sensibilidad intermedia. Se demostró una mutación puntual en el gen *pbp2x* (Q557E) que codifica en el EGB, la proteína ligadora de penicilina PBP 2X. También se observó la disminución en la cantidad de esta proteína comparada a las cepas sensibles<sup>108</sup>. Inicialmente la resistencia a eritromicina (ERI), clindamicina (CLI) y claritromicina se observó en un 1 a 3 % de los aislamientos. Estos porcentajes se han ido incrementando en nuestro medio y han llegado a valores de más del 50% en Italia<sup>116</sup>.

Uno de los mecanismos de resistencia a la ERI es la producción de una metilasa del ARNr 23S, que altera la unión al sitio de acción del antibiótico, codificada por genes *erm* (*ermA*; *ermB*). Esta metilasa también genera resistencia a lincosamidas y estreptograminas B (fenotipo MLS<sub>B</sub>) de expresión constitutiva (cMLS<sub>B</sub>) o inducible (iMLS<sub>B</sub>). Otro mecanismo es el de eflujo activo (fenotipo M). Los genes *mefA/E* codifican una bomba de expulsión (mecanismo de eflujo) que expresa resistencia de bajo nivel a ERI y sensibilidad a lincosamidas.

Debido a que estos genes son transportados por plásmidos y/o transposones, la transmisión puede ser tanto de manera vertical como horizontal, por lo que es necesario el estudio continuo de la evolución de la resistencia del EGB a los macrólidos. También ha sido descrita la resistencia a CLI por inactivación enzimática (gen *InuB*, fenotipo L)<sup>3</sup>.

El estudio fenotípico de esta resistencia se realiza por difusión en agar Mueller Hinton con 5 % sangre de carnero según el método de Kirby y Bauer de acuerdo a las guías del CLSI con la prueba de inducción con discos de ERI (15 µg) y CLI (2 µg) separados 20 mm entre sí. Se pueden determinar cuatro fenotipos posibles de acuerdo con los resultados de la prueba:

a) Fenotipo S (ERI y CLI sensibles).

b) Fenotipo M (ERI resistente y CLI sensible sin achatamiento de su halo de inhibición).

c) Fenotipo  $MLS_B$  inducible ( $iMLS_B$ : ERI resistente y CLI sensible con achatamiento de su halo de inhibición).

d) Fenotipo  $MLS_B$  constitutivo ( $cMLS_B$ : ERI y CLI resistentes)<sup>42, 55</sup>.

La determinación de los genotipos de resistencia a macrólidos se realiza con ensayos de PCR y secuenciación. Esto permite detectar la coexistencia de genes de resistencia y determinar la diversidad clonal entre estos estreptococos resistentes. Esta diversidad muestra la necesidad de efectuar una vigilancia epidemiológica regional de los aislamientos de EGB para poder ajustar los tratamientos empíricos iniciales en algunos casos<sup>3, 129, 154, 218</sup>.

Los EGB son uniformemente resistentes al ácido nalidíxico, trimetoprima-sulfametoxazol y a bajos niveles de aminoglucósidos y son sensibles a vancomicina y teicoplanina.

La administración inicial de ampicilina más un aminoglucósido para efectuar el tratamiento de un caso de bacteriemia o meningitis neonatal presuntamente causadas por estreptococos del grupo B se basan en tratar de lograr un descenso rápido del inóculo bacteriano por acción sinérgica. La metodología empleada en los enterococos para detectar altos niveles de resistencia a aminoglucósidos solo sirve para predecir la falta de sinergia entre el aminoglucósido y el  $\beta$ -lactámico en los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos. Hay cepas que presentan bajos niveles de CIM para gentamicina pero igualmente poseen la enzima bifuncional que impide la sinergia. Por esto se propone el

empleo de discos de kanamicina de 1000 µg para la detección de altos niveles de resistencia a gentamicina o kanamicina en EGB. Si se obtienen halos de inhibición iguales o mayores de 12 mm se considera que la la sinergia es factible<sup>94, 129, 186</sup>. Actualmente se ha detectado un aumento importante de EGB resistentes a altos niveles de aminoglucósidos en la Argentina<sup>230</sup>.

## Otros beta hemolíticos

### *Streptococcus iniae*

*S. iniae* fue aislado por primera vez a partir de pus de un absceso subcutáneo de un delfín de agua dulce en los Estados Unidos en 1976<sup>171</sup>. Luego se lo describió como un patógeno importante en peces como la tilapia, la trucha y el salmón ya que produjo brotes epidémicos en Japón, Taiwan, Israel y Estados Unidos<sup>70, 109, 174</sup>. Algunos de estos peces pueden ser portadores asintomáticos de esta bacteria.

*S. iniae* fue reconocido como patógeno humano en Canadá cuando se describieron 9 casos de celulitis bacteriémicas producidos por bacterias clonalmente relacionadas<sup>33</sup>. Uno de los pacientes presentó endocarditis, meningitis y artritis. Retrospectivamente se reconocieron otros dos casos: un paciente en Texas con celulitis bacteriémica y otro en Ottawa con artritis de rodilla<sup>233</sup>.

Más recientemente se describieron una celulitis bacteriémica y una osteomielitis en la China<sup>121</sup>. El rango de edades fue de 40 a 81 años y sólo 5 de 11 pacientes

evaluados tenían enfermedad de base (enfermedades cardiovasculares 3, diabetes 3, insuficiencia renal 1). Todos los pacientes evaluados (N=11) curaron con tratamiento antibiótico (penicilina, cloxacilina, ampicilina, cefuroxima, o amoxicilina-ácido clavulánico, solos o en combinación con otros antibióticos)

Todos los pacientes del brote canadiense habían manipulado pescados y 8 de ellos manifestaron haber sufrido heridas en esa tarea.

Los extractos antigénicos obtenidos por el método de Lancefield no reaccionan con ninguno de los antisueros de grupo conocidos. En el CDC de Atlanta, USA, se ensayaron infructuosamente los antisueros A, B, C, D, E, F; G, L, M, P, U y V (Facklam RR. Comunicación personal). Por pruebas bioquímicas puede confundirse con *S. pyogenes* y *S. porcinus* debido a que son LAP y PYR positivos. *S. pyogenes* reacciona con antisuero A y da positiva la prueba de bacitracina y esto lo diferencia de *S. iniae*. *S. porcinus* da positiva la prueba de hidrólisis de almidón y negativa la de fermentación de sorbitol, mientras que *S. iniae* las da negativa y positiva respectivamente.

Los microorganismos aislados no pudieron ser identificados o fueron incorrectamente identificados por sistemas comerciales (Vitek GPI, ID32 STREP, api 20 STREP)<sup>233</sup>.

### ***Streptococcus porcinus* y *Streptococcus pseudoporcinus***

Algunos estreptococos  $\beta$ -hemolíticos aislados de cerdos desde 1937 fueron clasificados en la especie *Streptococcus porcinus* en 1984. Estas bacterias estaban relacionadas fisiológicamente y pertenecían a los grupos E, P, U y V, además de a



otros tres grupos designados como C1, 5916T y 7155<sup>a</sup> <sup>43</sup>. Los miembros de esta especie históricamente han sido aislados de infecciones del cerdo (linfadenitis, neumonía, aborto, endocarditis y sepsis), de otros animales como bovinos, ovinos, cobayos, conejos y perros e incluso a partir de animales sanos<sup>235</sup>. Desde 1960 hasta 2007 se describieron 32 casos de infecciones humanas por *S. porcinus* (probablemente *Streptococcus pseudoporcinus*), 22 en mujeres, 3 en varones y 7 sin especificar el género<sup>45, 64, 66, 73,141, 169</sup>.

Dieciocho cepas provenían del tracto genitourinario femenino (líquido amniótico, placenta, endocérvix, vagina u orina), 6 de heridas, 3 de sangre, una de secreción umbilical y la restante de sitio desconocido. Estaban asociadas a corioamnionitis, endometritis posparto, infecciones de piel y tejidos blandos y septicemia. El grupo de Lancefield fue C1 en 23 casos, E en dos, P en tres y en el resto no fue determinado.

Recientemente se agregó más evidencia a su rol en las complicaciones del embarazo y el parto<sup>172</sup>.

En 2006 se observó en cepas de origen humano una divergencia del 2,1% por secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal, hecho que justificó el cambio de especie. El nombre *Streptococcus pseudoporcinus* se propuso entonces por primera vez para las cepas humanas<sup>12</sup>. Las pruebas bioquímicas no obstante, no difieren demasiado de las que presenta *S. porcinus*. Estas pueden resultar de utilidad para separar a esta especie de las que pueden confundirse por el uso de equipos comerciales (*S. dysgalactiae* subsp *equisimilis* y *S. uberis*) o de *S. agalactiae* que ocupa el mismo nicho ecológico y que presenta el antígeno B con el cual podría dar reacciones cruzadas si se emplean ciertos reactivos de aglutinación

como Patho Dx. Strep kit (Remel)<sup>211</sup>. La colonia es más pequeña que la de *S. agalactiae* y el halo de hemólisis de mayor diámetro. En la Tabla 5 puede apreciarse que la producción del factor CAMP, las reacciones de Voges Proskauer, manitol y sorbitol permiten separar *S. pseudoporcinus* de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* y *S. uberis*<sup>138</sup>.

En un estudio reciente se estudiaron 97 cepas de *S. porcinus* y *S. pseudoporcinus*. Diecinueve pertenecían a la especie *S. porcinus* y 18 de ellas provenían de animales. La restante era de una trabajadora de un frigorífico. Entre las correspondientes a la especie *S. pseudoporcinus*, 72 eran de origen humano y 6 de productos lácteos. Estas cepas fueron estudiadas por hibridación ADN-ADN, secuenciación de la subunidad 16S ribosomal y del gen *rpoB*, pruebas bioquímicas convencionales, perfiles obtenidos con el Rapid ID32 Strep, serotipificación con Patho Dx. Strep kit y sensibilidad antibiótica. Se vio que las cepas humanas y las lácteas diferían entre sí en pruebas bioquímicas y secuencias 16S y *rpoB*, por lo que se propuso la división en dos subespecies: *S. pseudoporcinus* subsp. *hominis* y *S. pseudoporcinus* subsp. *lactis*<sup>195</sup>.

Tanto *S. pseudoporcinus* como *S. porcinus* presentan una elevada frecuencia a la tetraciclina, a través de los genes *tet M* y *tet O*, aunque para las cepas humanas la CIM 50 es más elevada. No se ha detectado resistencia a,  $\beta$ -lactámicos, rifampicina, cotrimoxazol, cloranfenicol, ni fluoroquinolonas<sup>64</sup>. Sólo se informaron cuatro cepas resistentes a macrólidos y CLI: una de *S. pseudoporcinus* (con el gen *erm(A)*) y dos de *S. porcinus*, una portadora del gen *erm(B)* y las otras dos por algún mecanismo no determinado<sup>89, 195</sup>.

**Tabla 5.** Características fenotípicas de *S. pseudoporcinus* y bacterias relacionadas modificada de Mahlen & Clarridge<sup>138</sup> y Shewmaker PL et al.<sup>195</sup>

Característica fenotípica	<i>S. pseudoporcinus</i>		<i>S. porcinus</i>	SDSE	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. uberis</i>
	<i>hominis</i>	<i>lactis</i>				
Hipurato	+	-	-	-	+	+
Voges-Proskauer	V	+	V	-	V	ND
PYR	V	+	V	-	-	-
Esculina	+	+	+	V	-	+
Lactosa	-	+	V	V	V	+
Manitol	+	+	+	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	V	-	+
CAMP	+	+	+	-	+	-

SDSE: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

## Bibliografía

1. Ahmad Y, Gertz RE, Zhongya L, Sakota V, Broyles LN, Van Beneden C, Facklam R, Shewmaker PL, Reingold A, Farley MM, Beall BW. Genetic relations deduced from *emm* and multilocus sequence typing of invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and *S. canis* recovered from isolates collected in the United States. J Clin Microbiol. 2009;47:2046-54.
2. Alber J, El-Sayed A, Estocpangstic S, Lammler C, Zschock M. Dissemination of the superantigen coding genes *seeL*, *seeM*, *szeL* and *szeM* in *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Vet Microbiol. 2005;109:135-41.
3. Artiles Campelo F, Cañas Pedrosa A, Álamo Antúnez I, Lafarga Capuz B. Fenotipos y mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas en aislados de *Streptococcus agalactiae* con significación clínica en un período de ocho años (2002-2010). Rev Esp Quimioter. 2012;25 :42-6

4. Ayoub EM, Nelson B, Shulman ST, Barrett DJ, Campbell JD, Armstrong G, Lovejoy J, Angoff GH, Rockenmacher S. Group A streptococcal antibodies in subjects with or without rheumatic fever in areas with high or low incidences of rheumatic fever. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:886-90.
5. Aziz RK, Kotb M. Rise and persistence of global M1T1 clone of *Streptococcus pyogenes*. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1511-7.
6. Baddour LM. The Infection Diseases Society of America's Emerging Infections Network. Infective endocarditis caused by  $\beta$ -hemolytic streptococci. *Clin Infect Dis.* 1998;26:66-71.
7. Baecher L, Grobman W. Prenatal antibiotic treatment does not decrease group B streptococcus colonization at delivery. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008;101:125-8.
8. Baker CJ, Clark DJ, Barreth FF. Selective broth medium for isolation of group B streptococci. *Appl Microbiol.* 1973;26:884-5
9. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. En: Remington JS, Klein JO, (ed.) *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* The W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1990, p 742-811.
10. Balter S, Benin A, Pinto SWL, Teixeira LM, Alvim GG, Luna E, Jackson D, LaClaire L, Elliott J, Facklam R, Schuchat A. Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil, 1998. *Lancet.* 2000;355:1776-80.
11. Barnham M, Cole G, Efstratiou A, Tagg JR, Skjold SA. Characterization of *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C) from human and selected animal infections. *Epidemiol Infect.* 1987; 98:171–82.
12. Bekal S, Gaudreau C, Laurence RA, Simoneau E, Raynal L. *Streptococcus pseudoporcinus* sp. nov., a novel species isolated from the genitourinary tract of women. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2584–6
13. Benjamin JT, Perriello VA. Pharyngitis due to group C hemolytic streptococci in children. *Pediatr.* 1976;89:254-6.
14. Bert F, Lambert-Zechovsky N. A case of bacteremia caused by *Streptococcus dysgalactiae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997;16:324-6.
15. Bhatia R, Bhanot N. Spondylodiskitis secondary to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*. *Am J Med Sci.* 2012;343:94-7

16. Bingen E, Bidet P, Mihaila-Amrouche L, Doit C, Forcet S, Brahim N, Bouvet A, Cohen R. Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3559-62.
17. Bisno AL, Stevens DL. *Streptococcus pyogenes* (including streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5<sup>th</sup> ed. Churchill-Livingstone, New York, 2000; p. 2101-17.
18. Boucher C, Higgins R, Nadeau M, Vincent C. A case of zoonosis associated with *Streptococcus equi* ssp. *zoepidemicus*. *Can Vet J.* 2002;43:123-4.
19. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Burd LI, Gotoff SP. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal Group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. *J Infect Dis.* 1983;148:802-9.
20. Bradley SF, Gordon JJ, Baumgartner DD, Marasco WA, Kauffman CA. Group C streptococcal bacteremia: analysis of 88 cases. *Rev Infect Dis.* 1991;13:270-80.
21. Brahmachari PV, Kaul AY, McMillan DJ, Shaila MS, Karmakar MG, Sriprakash KS. Disease burden due to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (group G and C streptococcus) is higher than that due to *Streptococcus pyogenes* among Mumbai school children. *J Med Microbiol.* 2010;59:220-3.
22. Brandt CM, Haase G, Schnitzler N, Zbinden R, Lütticken R. Characterization of blood culture isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. *J Clin Microbiol.* 1999;37:4194-7
23. Brooks DE, Andrew SE, Biros DJ, Denis HM, Cutler TJ, Strubbe DT, Gelatt KN. Ulcerative keratitis caused by beta-hemolytic *Streptococcus equi* in 11 horses. *Vet Ophthalmol.* 2000; 3:121-5.
24. Brown CC, Olsen RJ, Fittipaldi N, Morman ML, Fort PL, Neuwirth R, Majeed M, Woodward WB, Musser JM. Spread of virulent group A streptococcus type emm59 from Montana to Wyoming, USA. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:679-81.
25. Broyles LN, Van Beneden C, Beall B, Facklam RR, Shewmaker L, Malpedi P, Daily P, Reingold A, Farley MM. Population-based study of invasive disease caused by beta-hemolytic streptococci of groups other than A and B. *Clin Infect Dis.* 2009;48:706-12.

26. Camissa L, Fando E. *Streptococcus agalactiae*. Estudio de portación en embarazada y Ley nacional N° 26.369/2008. Estrategia de Prevención. Investigación epidemiológica descriptiva-Ministerio de Salud de la Pcia de Córdoba – Villa Caieiro, Córdoba – Argentina.
27. Campodónico L, Doren A, Cruz M, Abarzúa F. Profilaxis de sepsis neonatal precoz por *Streptococcus agalactiae* (grupo B) basada en vacunas: revisión de la literatura. Rev Chil Obstet Ginecol. 2008;73:411-8.
28. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet Infect Dis. 2005;5:685-94.
29. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK. The current evidence for the burden of group A streptococcal diseases. Department of Child and Adolescent Health and Development, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2005.
30. Carmeli Y, Ruoff KL. Report of cases and taxonomic considerations for large-colony-forming Lancefield group C streptococcal bacteremia. J Clin Microbiol. 1995;33:2114-7.
31. Cecchini L, Pereyra R, Ottaviano S. Prevalencia y sensibilidad de *Streptococcus agalactiae* aislados en mujeres embarazadas en el Hospital Zonal de Ezeiza. VII Congreso de SADEBAC, P160. Buenos Aires, 25-30 de junio de 2012, Rev Argent Microbiol. 2012; 44 (Supl. 1): 70.
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51(RR-11):1-22
33. Centers for Disease Control and Prevention. Invasive infection due to *Streptococcus iniae*—Ontario, 1995–1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1996;45:650–3
34. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcus disease: a public health perspective. MMWR. 1996;45 (RR-7): 1-24
35. Centers for Disease Control and Prevention. Adoption of hospital policies for prevention of perinatal group B streptococcal disease - United States, 1997. MMWR. 1998;47:665-70.
36. Centers for Disease Control and Prevention. *Streptococcus pyogenes emm* sequence database.2006 [Online] <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/emmtypes.htm>
37. Chalker VJ, Brooks HW, Brownlie J. The association of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* with canine infectious respiratory disease. Vet Microbiol. 2003;95:149–156.

38. Chhatwal GS, Preissner KT, Muller-Berghaus G, Blobel H. Specific binding of the human S protein (vitronectin) to streptococci, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1987;55:1878-83.
39. Christie R, Atkins NE, Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1944;22:197-200.
40. Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodriguez S, Fahey J, Wessels MR, Rubens CR. Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infect Immun*. 2005;73:3096-103.
41. Cimolai N, Morrison BJ, MacCulloch L, Smith DF, Hlady J. Beta-haemolytic non-group A streptococci and pharyngitis: a case-control study. *Eur J Pediatr*. 1991;150:776-9.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25<sup>th</sup> Informational Supplement, 2015; M100-S25, Wayne, PA, EE.UU.
43. Collins MD, Farrow JAE, Katic V, Kandler O. Taxonomic studies on streptococci of serological groups E, P, U, and V: description of *Streptococcus porcinus* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 1984;5:402–13.
44. Colman G. Typing of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988;7:226-31.
45. Colman G, Ball LC. Identification of streptococci in a medical laboratory. *J Appl Bacteriol*. 1984;57,1–14.
46. Corson AP, Garagusi VF, Chretien JH. Group C  $\beta$ -hemolytic streptococci causing pharyngitis and scarlet fever. *South Med J*. 1989; 82:1119–21.
47. Crater DL, van de Rijn I. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A streptococci. *J Biol Chem*. 1995;270:18452-8.
48. Crum NF, Russell KL, Kaplan EL, Wallace MR, Wu J, Ashtari P, Morris DJ, Hale BR. Pneumonia outbreak associated with group A *Streptococcus* species at a military training facility. *Clin Infect Dis*. 2005;40:511–8.
49. Cunningham MW, Swedo S, Ben-Pazi H, Brimberg L, Lotan D, Joel D, Zuccolo J, Cox CJ. Anti-neuronal autoantibodies in Sydenham chorea and pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders

associated with streptococci. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 2014, Resumen 0287, Buenos Aires, Argentina.

50. Cunningham, MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:470-511.

51. Dagnelie CF, Touw-Otten FW, Kuyvenhoven MM, Rozenberg-Arska M, de Melker RA. Bacterial flora in patients presentin with sore throat in Dutch general practice. *Fam Pract.* 1993;10:371-7

52. Dahesh S, Hensler ME, VanSorge NM, Gertz RE Jr, Schrag S, Nizet V, Beall BW. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2915–8

53. Dale JB. Current status of group A streptococcal vaccine development. *Adv Exp Med Biol.* 2008;609:53-63.

54. Davies HD, McGeer A, Schwartz B, Green K, Cann D, Simor AE, Low DE. Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. *N Engl J Med.* 1996;335:547-54.

55. De Azavedo JCS, McGavin M, Duncan C, Low DE, McGeer A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B streptococcus isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;5:3504-8.

56. de Cueto M, Sánchez MJ, Moltó L, Miranda JA, Herruzo AJ, Ruiz-Bravo A, de la Rosa-Fraile M. Efficacy of a universal screening program for the prevention of neonatal group B streptococcal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995;14:810-2.

57. Denny FW. History of hemolytic streptococci and associated diseases. En: Stevens DL, Kaplan EL, editors. *Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis.* Oxford University Press, NY, EE.UU, 2000, p. 1-18.

58. Desjardins M, Delgaty KL, Ramotar K, Seetaram C, Toye B. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in group A and group B *Streptococcus*: implications for reporting susceptibility results. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5620-3.

59. Deutscher M, Schillie S, Gould C, Baumbach J, Mueller M, Avery C, Van Beneden CA. Investigation of a group A streptococcal outbreak among residents of a long-term acute care hospital. *Clin Infect Dis.* 2011;52:988–94.



60. Devriese LA, Hommez J, Klipper Bälz R, Schleifer KH. *Streptococcus canis* sp. nov.: a species of group G streptococci from animals. Int J Syst Bacteriol. 1986; 36: 422-5.
61. Di Bartolomeo S, Gentile M, Priore G, Valle S, Di Bella A. *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. Rev Argent Microbiol. 2005;37:142-4.
62. Dierksen KP, Tagg JR. Haemolysin-deficient variants of *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* may be overlooked as etiological agents of pharyngitis. J Med Microbiol. 2000;49:811-6.
63. Downar J, Willey BM, Sutherland JW, Mathew K, Low DE. Streptococcal meningitis resulting from contact with an infected horse. J Clin Microbiol. 2001;39:2358-9.
64. Duarte S, Barros RR, Facklam RR, Teixeira LM. Phenotypic and genotypic characteristics of *Streptococcus porcinus* isolated from human sources. J Clin Microbiol. 2005;43:4592–601.
65. Dudley JP, Sercarz J. Pharyngeal and tonsil infections caused by nongroup A streptococcus. Am J Otolaryngol. 1991;12:292–6.
66. Duma RJ, Weinberg AN, Medrek TF, Kunz LJ. Streptococcal infections. A bacteriologic and clinical study of streptococcal bacteremia. Medicine 1969;48:87–127.
67. Edwards AT, Roulson M, Ironside MJ. A milk-borne outbreak of serious infection due to *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C). Epidemiol Infect. 1988;101:43-51.
68. Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) en: Mandell GL, Benett JE, Dolin R (Eds). Principles and practice of infectious diseases (5ta ed.) Editorial Médica Panamericana Buenos.Aires. p. 2615-28, 2004.
69. Efstratiou A. Pyogenic streptococci of Lancefield groups C and G as pathogens in man. Soc Appl Bacteriol Symp Ser. 1997;26:72S–79S.
70. Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Curr Microbiol. 1994;28:139–43.
71. Enright MC, Spratt BG, Kalia A, Cross JH, Bessen DE. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. Infect Immun. 2001;69:2416-27.

72. Eyre DW, Kenkre JS, Bowler IC, McBride SJ. *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* meningitis - a case report and review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29:1459-63
73. Facklam R, Elliott J, Pigott N, Franklin AR. Identification of *Streptococcus porcinus* from human sources. J Clin Microbiol. 1995;33:385-8
74. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev. 2002;15:613-30.
75. Facklam RR, Padula JF, Thacker LG, Wortham EC, Sconyers BJ. Presumptive identification of group A, B and D streptococci. Appl Microbiol. 1974;27:107-13.
76. Facklam, RR, Martin DR, Lovgren M, Johnson DR, Efstratiou A, Thompson TA, Gowan S, Kriz P, Tyrrell GJ, Kaplan E, Beall B. Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: *emm103* to *emm124*. Clin Infect Dis. 2002;34:28-38.
77. Falkenhorst G, Bagdonaite J, Lisby M, Madsen SB, Lambertsen L, Olsen KE, Mølbak K. Outbreak of group A streptococcal throat infection: don't forget to ask about food. Epidemiol Infect. 2008;136:1165–71.
78. Fernández E, Blume V, Garrido P, Collins MD, Mateos A, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54: 2291-6.
79. Fernández Guerrero ML, de la Rosa Fraile M. Infecciones estreptocócicas. En: Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, (ed.). Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1ª ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, 2006. p. 263-82.
80. Ferrieri P. GBS infections in the new-born infant: diagnosis and treatment. Antibiot Chemother. 1985; 35: 211-4
81. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Gram positive pathogens. ASM Press, Washington DC, EE.UU. 2000.
82. Fischetti VA. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. Clin Microbiol Rev. 1989; 2:285-314.

83. Francis AJ, Nimmo GR, Efstratiou A, Galanis V, Nuttall N. Investigation of milk-borne *Streptococcus zooepidemicus* infection associated with glomerulonephritis in Australia. *J Infect.* 1993; 27, 317–23.
84. Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, Lämmler C, Podbielski A, Lütticken R, Spellerberg B. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-hemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *Imb*. *Mol Microbiol.* 2001;41:925-35.
85. Fretzayas A, Moustaki M, Kitsiou S, Nychtari G, Nicolaidou P. The clinical pattern of group C streptococcal pharyngitis in children. *J Infect Chemother.* 2009;15:228–32.
86. Friederichs J, Hungerer S, Werle R, Militz M, Bühren V. Human bacterial arthritis caused by *Streptococcus zooepidemicus*: report of a case. *Int J Infect Dis.* 2010;14 (Suppl 3):e233-5.
87. Fry RM. Fatal infections by haemolytic streptococcus group B. *Lancet* 1938;1:199-201.
88. Fulginiti VA, Ey JL, Ryan KJ. Recurrent group C streptococcal tonsillitis in an adolescent male requiring tonsillectomy. *Clin Pediatr. (Philad)* 1980;19:829–30.
89. Gaudreau C, Simoneau E, Labrecque O, Laurence RA, Laferrière C, Miller M, Raynal L, Rallu F. Epidemiological, biochemical and antimicrobial susceptibility characteristics of *Streptococcus pseudoporcinus* isolated in Quebec, Canada, from 1997 to 2006. *J Med Microbiol.* 2007;56:1620-4
90. Gerber MA, Randolph MF, Martin NJ, Rizkallah MF, Cleary PP, Kaplan EL, Ayoub EM. Community-wide outbreak of group G streptococcal pharyngitis. *Pediatrics.* 1991;87:598–603.
91. Gerber MA, Wright LL, Randolph MF. Streptozyme test for antibodies to group A streptococcal antigens. *Pediatr Infect Dis.* 1987;6:36-40.
92. Gettler JF, el-Sadr W. Group C streptococcal subdural empyema in a healthy man: possible complication of pharyngitis. *Clin Infect Dis.* 1993; 16: 726–7.
93. Gnann JW Jr, Gray BM, Griffin FM Jr, Dismukes WE. Acute glomerulonephritis following group G streptococcus infection. *J Infect Dis* 1987;156:411-2.
94. Granlund M, Axemo P, Bremme K, Bryngelsson AL, Carlsson Wallin M, Ekström CM, Håkansson S, Jacobsson B, Källén K, Spetz E, Tessin I, The Swedish Working Group for the Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Infections. Antimicrobial resistance in colonizing group B streptococci before the

implementation of a Swedish intrapartum antibiotic prophylaxis program. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:1195–201.

95. Gupta C, Briski LE. Comparison of two culture media and three sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B streptococcus in pregnant women. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3975–7.

96. Gupta N, Lovvorn J, Centor RM. Peritonsillar abscess requiring intensive care unit admission caused by group C and G streptococcus: a case report. *Cases J*. 2009;2:6808.

97. Haidan A, Talay SR, Rohde M, Sriprakash KS, Currie BJ, Chhatwal GS. Pharyngeal carriage of group C and group G streptococci and acute rheumatic fever in an aboriginal population. *Lancet* 2000;356:1167–9.

98. Haikh N, Leonard E, Martin JM. Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2010;126:e557–64.

99. Hassan A A, Akineden O, Lämmier C, Huber-Schienstedt R. Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *J Vet Med*. 2002;B 49:257-9.

100. Heather Z, Holden MT, Steward KF, Parkhill J, Song L, Challis GL, Robinson C, Davis-Poynter N, Waller AS. A novel streptococcal integrative conjugative element involved in iron acquisition. *Mol Microbiol*. 2008;70:1274-92

101. Holden MTG, Heather Z, Paillot R, Steward KF, Webb K, Ainslie F, Jourdan T, Bason NC, Holroyd NE, Mungall K, Quail MA, Sanders M, Simmonds M, Willey D, Brooks K, Aanensen DM, Spratt BG, Jolley KA, Maiden MCJ, Kehoe M, Chanter N, Bentley SD, Robinson C, Maskell DJ, Parkhill J, Waller AS. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS Pathogens* 2009;5:e1000346

102. Honest H, Sharma S, Khan KS. Rapid test for group B streptococcus colonization in laboring women: a systematic review. *Pediatrics* 2006;117:1055-66.

103. Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *J Microbiol Methods* 2010;80:212-4.

104. Jacobs JA, de Kron MCT, Kellens JTC, Stobberingh EE. 1993. Meningitis and sepsis due to the Group G streptococcus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 12:224–5.
105. Jansen TL, Janssen M, de Jong AJ. Reactive arthritis associated with group C and group G  $\beta$ -hemolytic streptococci. *J Rheumatol.* 1998; 25:1126–30.
106. Johnson DR, Kaplan EL. A review of the correlation of T-agglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. *J Med Microbiol.* 1993;38:311-5.
107. Khan JA, Evans HE, Macabuhay MR, Lee YE, Werner R. Primary peritonitis due to Group G streptococcus: a case report. *Pediatrics* 1975; 56:1078–9.
108. Kimura K, Suzuki S, Wachino JI, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Nagano N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2890–7.
109. Kitao T, Aoki T, Sakoh R. Epizootic caused by beta-hemolytic streptococcus species in cultured freshwater fish. *Fish Pathol.* 1981;19:173–80.
110. Kittang BR, Langeland N, Mylvaganam H. Distribution of *emm* types and subtypes among noninvasive group A, C, and G streptococcal isolates in western Norway. *APMIS* 2008;116:457-64.
111. Kline JB, Xu S, Bisno AL, Collins CM. Identification of a fibronectin-binding protein (GfbA) in pathogenic group G streptococci. *Infect Immun.* 1996;64:2122-9
112. Kohler W, Gerlach D, Knoll H. Streptococcal outbreaks and erythrogenic toxin type A. *Zentralbl Bakteriell Microbiol Hyg.* 1987;266:104-15
113. Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes. *J Clin Microbiol.* 2002;40:620-6.
114. Krohn MA, Hillier SI, Baker CJ. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. *J Infect Dis.* 1999;179:1410-5.
115. Lam MM, Clarridge III JE, Young EJ, Mizuki S. The other group G streptococcus: increased detection of *Streptococcus canis* ulcer infections in dog owners. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2327-9.

116. Lambiase A, Agangi A, Del Pezzo M, Quaglia F, Testa A, Rossano F, Martinelli P, Catania MR In vitro resistance to macrolides and clindamycin by group B streptococcus isolated from pregnant and nonpregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012; 2012: 913603.
117. Lancefield RC, Hare R. The serological differentiation of pathogenic and nonpathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *J Exp Med.* 1935;61:335-49.
118. Lancefield RC, McCarty M, Everly WN, Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. *J Exp Med.* 1975;142:165-79.
119. Lancefield RC. Two serological types of Group B hemolytic streptococci with related, but not identical, type specific substances. *J Exp Med.* 1938;67:25-40
120. Las Heras A, Vela AI, Fernández E, Legaz E, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1106–8.
121. Lau SKP, Patrick CY, Woo PCY, Tse H, Leung KW, Wong SSY, Yuen KY. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1004–9.
122. Limansky A, Guardati MC, Sutich EG, Toresani I, Bogado I, Joannas G, Viale AM. Characterization of clinical isolates of group B streptococci by random amplified polymorphic DNA using degenerate oligonucleotides. *Medicina (Buenos Aires).* 1995;55:681-4.
123. Limansky A, Sutich E, Guardati MC, Toresani I, Viale A. Genomic diversity among *Streptococcus agalactiae* isolated detected by a degenerate oligonucleotide-primed amplification assay. *J Infect Dis.* 1998;1:1308-13.
124. Lindbæk M, Høiby EA, Lermark G, Steinsholt IM, Hjortdahl P. Clinical symptoms and signs in sore throat patients with large colony variant  $\beta$ -haemolytic streptococci groups C or G versus group A. *Brit J Gen Pract.* 2005;55:615-9.
125. Lindgren PE, Signäs C, Rantamäki L, Lindberg M. A fibronectin-binding protein from *Streptococcus equisimilis*: characterization of the gene and identification of the binding domain. *Vet Microbiol.* 1994;41:235-47.

126. Lindmark H, Guss B. SFS, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus equi* subspecies *equi* inhibits the binding between fibronectin and collagen. *Infect Immun*. 1999;67:2383-8.
127. Lindmark H, Nilsson M, Guss B. Comparison of the fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus equi* subspecies *equi* with FNZ from *Streptococcus equi* subsp *zoepidemicus* reveals a major and conserved difference. *Infect Immun*. 2001;69:3159-63.
128. Lopardo H, Hernández C, Vidal P. Resistencia de *Streptococcus pyogenes* a los antibióticos. Experiencia de once años en un hospital pediátrico de Buenos Aires. *Acta Bioq Clin Latinoam*. 2004;38:151-7.
129. Lopardo H, Vidal P, Jeric P, Centrón D, Paganini H, Facklam RR, The Argentinian Streptococcus Study Group, Elliott J. Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4688-94.
130. Lopardo H. Faringitis por estreptococos de los grupos C y G. *Medicina (Buenos Aires)*. 2013;73:605-6.
131. Lopardo HA, Hernández C, Vidal P, Vázquez M, Rosaenz L, Rubinstein G, Smayevsky J, Tokumoto M, Fernández Lausi A, Daher O, Kaufman S, Soriano SV, Brasili S, Bottiglieri M, Carranza MC. Erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 2004;64:143-5.
132. Lopardo HA, Venuta ME, Vidal P, Rosaenz L, Corthey C, Farinati A, Couto E, Sarachian B, Sparo M, Kaufman S, De Mier CA, Gubbay L, Scilingo V, Villaverde P, The Argentinian Streptococcus Study Group. Argentinian collaborative study on prevalence of erithromycin and penicillin sucetibility in *Streptococcus pyogenes*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997;28:29-32.
133. Lopardo, HA, Vidal P, Sparo M, Jeric P, Centron D, Facklam RR, Paganini H, Pagniez NG, Lovgren M, The Argentinian Streptococcus Study Group, Beall B. Six-month multicenter study on invasive infections due to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Argentina. *J Clin Microbiol*. 2005;43:802-7.
134. Low DE, Young MR, Harding GKM. Group C streptococcal meningitis in an adult: probable acquisition from a horse. *Arch Intern Med*. 1980;140:977-8.
135. Luca-Harari B, Darenberg J, Neal S, Siljander T, Strakova L, Tanna A, Creti R, Ekelund K, Koliou M, Tassios PT, van der Linden M, Straut M, Vuopio-Varkila J, Bouvet A, Efstratiou A, Schalén C,

- Henriques-Normark B, Strep-EURO Study Group, Jasir A. Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1155-65.
136. Mac Faddin JE. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA 2000.
137. Macheboeuf P, Buffalo C, Chi-Yu F, Zinkernagel AS, Cole JN, Johnson JE, Nizet V, Ghosh O. Streptococcal M1 protein constructs a pathological host fibrinogen network. *Nature*. 2011;472:64-8.
138. Mahlen SD, Clarridge JE. Thumb infection caused by *Streptococcus pseudoporcinus*. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3041–2.
139. Malbruny B, Nagai K, Coquemont M, Bozdogan B, Andrasevic AT, Hupkova H, Leclercq R, Appelbaum PC. Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49:935-9.
140. Marchandin H, Jumas-Bilak E, Boumzebra A, Vidal D, Jonquet O, Corne P. Fatal *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* infection in a man. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1964-6.
141. Martin C, Fermeaux V, Eyraud JL, Aubard Y. *Streptococcus porcinus* as a cause of spontaneous preterm human stillbirth. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4396-8
142. Martínez S, Amoroso A, Famiglietti A, de Mier C, Vay C, Gutkind G, Working group of Carrera de Especialización en Bacteriología. Genetic and phenotypic characterization of resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* from Argentina. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:95-8.
143. Martínez-Luengas F, Inclan GM, Pastor A, Montejo M, Barron J, Baroja A, Aguirre C. Endocarditis due to *Streptococcus zooepidemicus*. *Can Med Assoc J*. 1982;127:13.
144. Martins ER, Melo-Cristino J, Ramirez M and the Portugese Group for the Study of Streptococcal infections. Dominance of serotype Ia among group B streptococci causing invasive infections in nonpregnant adults in Portugal. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:1219-27.
145. Mazon A, Gil-Setas A, Sota de la Gandara LJ, Vindel A, Sáez-Nieto JA. Transmission of *Streptococcus pyogenes* causing successive infections in a family. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:554-9.
146. McDonald M, Currie BJ, Carapetis JR. Acute rheumatic fever: a chink in the chain that links the heart to the throat? *Lancet Infect Dis*. 2004;4:240-5.



147. McDonald M, Towers RJ, Andrews RM, Carapetis JR, Currie BJ. Epidemiology of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in tropical communities, Northern Australia. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1694-700.
148. McMurry LM, Levy SB. Tetracycline resistance in gram-positive bacteria. En: Fischetti V, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, editors. *Gram-positive pathogens*. Washington DC, ASM Press, 2000; p.660-77.
149. McNeil SA, Halperin SA, Langley JM, Smith B, Warren A, Sharratt GP, Baxendale DM, Reddish MA, Hu MC, Stroop SD, Linden J, Fries LF, Vink PE, Dale JB. Safety and immunogenicity of 26-valent group A *Streptococcus* vaccine in healthy adult volunteers. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1114-22.
150. Meier FA, Centor RM, Graham L, Dalton HP. Clinical and microbiological evidence for endemic pharyngitis among adults due to group C streptococci. *Arch Intern Med.*1990;150:825-9.
151. Meyer A, Messer L, De Briel D, Moreau P. Second reported case of human infection with *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum*. *Joint Bone Spine.* 2011;78:303-5
152. Miho Y, Murayama SY, Sunaoshi K, Wajima T, Takahashi M, Masaki J, Kurokawa I, Ubukata K. Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* isolates that lack large regions of the *sag* operon mediating streptolysin S production. *J Clin Microbiol.*2010;48:635-8.
153. Miller CW, Prescott JF, Mathews KA, Betschel SD, Yager JA, Guru V, DeWinter L, Low DE. Streptococcal toxic shock syndrome in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209:1421-6.
154. Mollerach A, Méndez E, Massa R, Di Conza J. *Streptococcus agalactiae* aislados en Santa Fe, Argentina: estudio de la sensibilidad a los antibióticos de uso clínico y mecanismos de resistencia a eritromicina y clindamicina. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:67-8.
155. Mora M, Bensi G, Capo S, Falugi F, Zingaretti C, Manetti AG, Maggi T, Taddei AR, Grandi G, Telford JL. Group A streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:15641-6.
156. Morgan MC, Rice LI. Recurrent group C streptococcal tonsillopharyngitis in an adolescent. *J Adolesc Health Care.* 1989;10:421-2.
157. Mori N, Guevara JM, Tilley DH, Briceno JA, Zunt JR, Montano SM. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* meningitis in Peru. *J Med Microbiol.* 2013; 62(Pt 2):335-7.

158. Murray IA. Chloramphenicol resistance. En: Fischetti V, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, editors. Gram positive pathogens. Washington DC, ASM Press, 2000. p. 678-84.
159. Musser JM, Kapur V, Szeto J, Pan X, Swanson DS, Martin DR. Genetic diversity and relationships among *Streptococcus pyogenes* strains expressing serotype M1 protein: recent intercontinental spread of a subclone causing episodes of invasive disease. *Infect Immun*. 1995;63:994-1003.
160. Natoli S, Fimiani C, Faglieri N, Laurenzi L, Calamaro A, Frasca AM, Arcuri E. Toxic shock syndrome due to group C streptococci. A case report. *Intensive Care Med*.1996;22:985-9.
161. Nickmans S, Verhoye E, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H. Possible solution to the problem of nonhemolytic group B streptococcus on Granada medium. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1132-3.
162. Nizet V, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, Rubens CE. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun*.1996; 64:3818-26.
163. Nizet V, Rubens C. Pathogenic mechanisms and virulence factors of group B streptococci. En: Gram positive pathogens (Multimedia version). Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J, editors. ASM Press, 2000.
164. O'Brien KL, Beall B, Barrett NL, Cieslak PR, Reingold A, Farley MM, Danila R, Zell ER, Facklam R, Schwartz B, Schuchat A. Epidemiology of invasive group A *Streptococcus* disease in the United States, 1995-1999. *Clin Infect Dis*. 2002;35:268-76.
165. Oviedo P, Laczeski M, Pegels E, Quiroga M, Vergara M. Serotipificación, distribución y susceptibilidad a macrólidos en *Streptococcus agalactiae*: primeros hallazgos en Misiones de serotipo IX. *Rev Argent Microbiol*. 2012;44(Supl.1): 18.
166. Paillot R, Darby AC, Robinson C, Wright NL, Steward KF, Anderson E, Webb K, Holden MTG, Efstratiou A, Broughton K, Jolley KA, Priestnall SL, Marotti Campi MC, Margaret A, Hughes MA, Radford A, Erles K, Waller AS. Identification of three novel superantigen-encoding genes in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *szeF*, *szeN*, and *szeP*. *Infect Immun*. 2010;78:4817-27.
167. Pancholi V, Fischetti VA.  $\alpha$ -enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem*.1998;273:14503-15

168. Paoletti LC, Madoff LC. Vaccines to prevent neonatal GBS infection. *Semin Neonatal.* 2002;7:315-23.
169. Parker MT, Ball LC. Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. *J Med Microbiol.* 1976;9:275–302.
170. Pass MA, Gray BM, Khare S, Dillon HJ. Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. *J Pediatr.* 1979;95:437-43.
171. Peir GB, Madin SH. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int J Syst Bacteriol.* 1976;26:545-53
172. Pereira N, Powell A, Nyirjesy P, Plante L. Vagino-rectal *Streptococcus porcinus* in pregnancy: an emerging pathogen? *J Low Genit Tract Dis.* 2013;17:e18-e21.
173. Perera N, Abulhoul L, Green MR, Swann RA. Group A streptococcal meningitis: case report and review of the literature. *J Infect.* 2005;51:e1-e4
174. Perera RP, Johnson SK, Collins MD, Lewis DH. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* and *T. aurea* hybrids. *J Aquat Anim Health.* 1994;6:335–40.
175. Pérez J, Ebner G, Limansky A, Toresani I, Sutich E. Detección de *Streptococcus agalactiae* en urocultivos de embarazadas. Libro de Resúmenes 6to. Expo Congreso Bioquímico Rosario 2012, 7-9 junio de 2012. Resumen P 42, p. 27.
176. Pérez J, Limansky A, Toresani I, Ebner G, Di Bartolomeo S, De Inocenti I, Pretto G, Salazar N, Laferrara M, Bottiglieri M, Ballester M, Morales M, Rivera L, Cacace ML, Castro C, Roldán L, Notario R, Borda N, Cera G, Spoletti MJ, Gregorini E, Sutich EG. Distribución de tipo capsular y sensibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* productores de infecciones en Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2004;36:63-7.
177. Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, Billoet A, Tavares N, Raymond J, Trieu-Cuot P. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococcus. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1985-8.
178. Pritchard DG, Lin B, Willingham TR, Baker JR. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch Biochem Biophys.* 1994;315:431-7.

179. Proft T, Webb PD, Handley V, Fraser JD. Two novel superantigens found in group A and group C *Streptococcus*. *Infect Immun*. 2003; 71: 1361-9.
180. ProMED-mail disponible en <http://www.promedmail.org>.(acceso 13/06/2015).
181. Ramaswamy SV, Ferrieri P, Flores AE, Paoletti LC. Molecular characterization of nontypeable group B streptococcus. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2398–403.
182. Rantala S, Vuopio-Varkila J, Vuento R, Huhtala H, Syrjänen J. Clinical presentations and epidemiology of  $\beta$ -haemolytic streptococcal bacteremia: a population-based study. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:286-8.
183. Reid HF, Bassett DC, Poon-King T, Zabriskie JB, Read SE. Group G streptococci in healthy school-children and in patients with glomerulonephritis in Trinidad. *J Hyg. (Lond)* 1985;94:61-8.
184. Rosa-Fraile M, Rodríguez-Granger J, Haidour-Benamin A, Cuerva JM, Sampedro A. Granadaene: proposed structure of group B streptococcus polyenic pigment. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:6367-70.
185. Rosenstein NE, Schuchat A. Neonatal GBS Study Group. Opportunities for prevention of perinatal group B streptococcal disease: A multistate surveillance analysis. *Obstet Gynecol*. 1997;90:901-6.
186. Sahm DF, Torres C. High-content aminoglycoside disks for determining aminoglycoside-penicillin synergy against *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol*. 1988;26:257-60.
187. Salasia SI, Wibawan IW, Pasaribu FH, Abdulmawjood A, Lammler C. Persistent occurrence of a single *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* clone in the pig and monkey population in Indonesia. *J Vet Sci*. 2004; 5:263–5.
- 188.** Salazar L, Herrero C, Lantero M, Castañares MJ, Borque L. Pericarditis infecciosa por estreptococo beta hemolítico grupo C (*S. zooepidemicus*). *Enferm Infecc Microbiol Clín*. 1994;12:223-4.
189. Schubert A, Zalkikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, Eikmanns B, Reinscheid D. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect Immun*. 2004;72:6197-205.
190. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:497-513.

191. Schugk J, Harjola V-P, Sivonen A, Vuopio-Varkila J, Valtonen M. A clinical study of beta-haemolytic groups A, B, C and streptococcal bacteremia in adults over an 8-year period. *Scand J Infect Dis.* 1997; 29:233-8.
192. Shah M, Centor RM, Jennings M. Severe acute pharyngitis caused by group C streptococcus. *J Gen Intern Med.* 2007;22:272–4.
193. Sharp MW, Prince MJ, Gibbens J. *S. zooepidemicus* infection and bovine mastitis. *Vet Rec.*1995;137:128.
194. Shet A, Kaplan EL. Clinical use and interpretation of group A streptococcal antibody tests: a practical approach for the pediatrician or primary care physician. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21:420-6.
195. Shewmaker PL, Steigerwalt AG, Whitney AM, Morey RE, Graziano JC, Facklam RR, Musser KA, Merquior VL, Teixeira LM. Evaluation of methods for identification and determination of the taxonomic status of strains belonging to the *Streptococcus porcinus-Streptococcus pseudoporcinus* complex isolated from animal, human, and dairy sources. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3591-7.
196. Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G, Martin JM, Van Beneden C. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2012;55:e86–102.
197. Skogberg K, Simonen H, Renkonen O-V, Valtonen VV. Beta-haemolytic group A, B, C and G streptococcal septicemia: a clinical study. *Scand J Infect Dis.* 1988;20:119-25.
198. Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2929–36.
199. Smeesters PR, Vergison A, Campos D, De Aguiar E, Deyi VYM, Van Melderden L. Differences between Belgian and Brazilian group A *Streptococcus* epidemiologic landscape. *PLoS One.* 2006;1:e10.
200. Smith KC, Blunden AS, Whitwell KE, Dunn KA, Wales AD. A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. *Equine Vet J.* 2003;35:496–501.
201. Steer AC, Batzloff MR, Mulholland K, Carapetis JR. Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22:544-52.
202. Stevens DL. Invasive streptococcal infections. *J Infect Chemother.* 2001;7:69-80.

203. Stryker WS, Fraser DW, Facklam RR. Foodborne outbreak of group G streptococcal pharyngitis. *Am J Epidemiol.* 1982;116:533-40.
204. 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;40:1817-24.
205. Sutich E, Limansky A, Toresani I, Bogado I, Guardati M, Notario R, Castelli M, Dubois A, Viale A. Estudio de la transmisión materno-neonatal de *Streptococcus agalactiae* mediante serotipificación y análisis del polimorfismo del ADN. *Infect & Microbiol Clin.* 1996;8:14-20.
206. Sutich E, Notario R, Salgado C, Montedoro H, Dubois A, Castelli B, Santorum G, Desana R, Versan D, De Risso S, Torresani I, Ebner G, Bogado I, Limansky A. Análisis de factores de riesgo en 7 casos de infección neonatal por *Streptococcus agalactiae*. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, 17 -21 octubre 2004. Resumen 218.
207. Sutich E. Investigación de estreptococo grupo B en embarazadas. 5to. Expo Congreso Bioquímico 2010, Rosario, 2010.
208. Sutich E. Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en flora vaginal de mujeres embarazadas. Transmisión al neonato. Análisis por epidemiología molecular. *Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers,* 1996.
209. Swedo SE, Leonard HL, Mittleman BB, Allen AJ, Rapoport JL, Dow SP, Kanter ME, Chapman F, Zabriskie J. Identification of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections by a marker associated with rheumatic fever. *Am J Psychiatry.* 1997;154:110-2.
210. Szczypa K, Sadowy E, Izdebski R, Hryniewicz W. A rapid increase in macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Poland during 1996-2002. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:828-31.
211. Thompson T, Facklam RR. Cross reactions of reagents from streptococcal grouping kits with *Streptococcus porcinus*. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1885-6
212. Thorley AM, Cambell D, Moghal NE, Hudson S. Post streptococcal acute glomerulonephritis secondary to sporadic *Streptococcus equi* infection. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:597-9.

213. Tiwari R, Qin A, Artiushin SC, Boschwitz JS. Se18.9, an antiphagocytic factor H binding protein of *Streptococcus equi*. *Vet Microbiol*. 2007;121:105-15.
214. Toresani I, Limansky A, Bogado I, Guardati C, Viale A, Sutich E. Phenotypic and genotypic study of *Streptococcus agalactiae* in vagina of pregnant women in Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 2001;61;295-300.
215. Toresani I, Limansky A, Francois S, Ebner G, Viale A, Sutich E. Análisis de determinantes de virulencia de una población de *Streptococcus agalactiae*. XLV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y XLVIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología. *Medicina (Buenos Aires)*. 2000;60:839-40.
216. Toresani I, Limansky A, Pérez J, Ebner G, Viale A, Sutich E . Marcadores de invasividad en cepas de *Streptococcus agalactiae*. XIII Congreso Argentino de Microbiología. *Rev Argent Microbiol*. 2010;42(Supl 1):159-60.
217. Toresani I, Limansky AS, Francois S, Sutich EG, Ebner G, Viale A. Diagnóstico específico de *Streptococcus agalactiae* en exudados vaginales mediante PCR. IX Jornadas Argentinas de Microbiología, Córdoba, 2002.
218. Toresani I, Romero M, Grasso P, Sutich E, Limansky A. Distribución de genes de resistencia a macrólidos y clindamicina en *Streptococcus agalactiae*. Diversidad clonal entre aislamientos resistentes. *Rev Argent Microbiol*. 2012;44(Supl 1):10-1 .
219. Traverso F, Villalón P, Blanco MA, Beratz N, Sáez Nieto JA, Lopardo H. Invasive infections due to group A streptococci in Argentina (2011-2012). Abstract 0314. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Buenos Aires, 9-12 de noviembre de 2014.
220. Turner JC, Fox A, Fox K, Addy C, Garrison CZ, Herron B, Brunson C, Betcher G. Role of group C  $\beta$ -hemolytic streptococci in pharyngitis: epidemiologic study of clinical features associated with isolation of group C streptococci. *J Clin Microbiol*. 1993;31:808–11.
221. Turner JC, Hayden FG, Lobo MC, Ramirez CE, Murren D. Epidemiologic evidence for Lancefield group C beta-hemolytic streptococci as a cause of exudative pharyngitis in college students. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1–4.

222. Turner JC, Hayden FG, Lobo MC, Ramirez CE, Murren D. Epidemiologic evidence for Lancefield group C  $\beta$ -hemolytic streptococci as a cause of exudative pharyngitis in college students. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1–4.
223. Turner JC, Hayden GF, Kiselica D, Lohr J, Fishburne CF, Murren D. Association of group C  $\beta$ -hemolytic streptococci with endemic pharyngitis among college students. *JAMA.* 1990;264:2644–7.
224. Ullberg M, Karlsson I, Wiman B, Kronvall G. Two types of receptors for human plasminogen on group G streptococci. *APMIS.* 1992;100:21-8.
225. Vacca A, Garau P, Piga M, Mathieu A. Post streptococcal arthritis associated with group G streptococcal pharyngitis. *J Clin Rheumatol.* 2010;16:411.
226. Van Asselt GJ, Vliegenthart JS, van de Klundert JA, Mouton RP. High-level aminoglycoside resistance among enterococci and group A streptococci. *J Antimicrob Chemother.* 1992;30:651-9.
227. Vandamme P, Pot B, Falsen E, Kersters K, Devriese LA. Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46:774-81.
228. Vera Garate MV, Morano ST, Ahumada C, Nagel A, Méndez EA. Prevalencia de portación de estreptococo grupo B en la mujer embarazada. Optimización de su detección. *Rev Argent Microbiol.* 2012;44( Supl 1):16.
229. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease revised guidelines from CDC, 2010 – *MMWR.* 2010; 59:( RR-10):1-32.
230. Vieira VV, Teixeira LM, Zahner V, Momen H, Facklam RR, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Castro AC. Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:1231-43.
231. Villar HE, Jugo MB. Emergencia de *Streptococcus agalactiae* con resistencia de alto nivel a gentamicina y estreptomina en Buenos Aires, Argentina. *Rev Esp Quimioter.* 2013;26:112-5.
232. Vuopio-Varkila J, Vuento R, Huhtala H, Syrjänen S. Clinical presentations and epidemiology of beta-hemolytic streptococcal bacteremia: a population-based study. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:286-8.
233. Waitkins SA. Evaluation of rapid methods of identifying group B streptococci. *J Clin Pathol.* 1980;33:302-5



234. Weinstein MR, Litt M, Kertesz DA, Wyper P, Rose D, Coulter M, McGeer A, Facklam R, Ostach O, Willey BM, Borczyk A, Low DE. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. N Engl J Med. 1997;337:589–94.
235. Weiss K, Laverdière M, Lovgren M, Delorme J, Poirier L, Béliveau C. Group A streptococcus carriage among close contacts of patients with invasive infections. Am J Epidemiol. 1999;149:863–8.
236. Wessman GE. Biology of the group E streptococci. Vet Microbiol. 1986; 12: 297-328.
237. Whatmore AM, Engler KH, Gudmundsdottir G, Efstratiou A. Identification of isolates of *Streptococcus canis* infecting humans. J Clin Microbiol. 2001;39:4196-9.
238. Wibawan IWT, Lämmler CH, Pasaribu FH. Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. J Gen Microbiol. 1992;138:1237-42.
239. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman - Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. 6a ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2008.
240. Wong SS, Yuen KY. *Streptococcus pyogenes* and re-emergence of scarlet fever as a public health problem. Emerg Microbes Infect. 2012;1:e2.
241. Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. J Clin Microbiol. 2005;43:120–6.
242. Yanai H, Hamasaki H, Tsuda N, Adachi H, Yoshikawa R, Moriyama S, Masui Y, Mishima S. Group B streptococcus infection and diabetes: a review. J Microbiol Antimicrob. 2012;4:1-5.
243. Young L, Deighton CM, Chuck AJ, Galloway A. Reactive arthritis and group G streptococcal pharyngitis. Ann Rheum Dis. 1992;51:1268.
244. Zwart S, Ruijs GJ, Sachs AP, van Leeuwen WJ, Gubbels JW, de Melker RA. Beta-haemolytic streptococci isolated from acute sore throat patients: cause or coincidence? A case–control study in general practice. Scand J Infect Dis. 2000;32:377–84.

## **Capítulo Ila.2.2**

### ***Streptococcus pneumoniae***

**MARÍA SOFÍA FOSSATI**

Bioquímica del Servicio de Bacteriología Clínica, Departamento de Bacteriología  
INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires  
Argentina  
(e-mail: [sfossati@anlis.gov.ar](mailto:sfossati@anlis.gov.ar))

**LAURA BONOFILIO**

Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Universidad de Buenos Aires, Argentina  
(e-mail: [lbonofi@ffyb.uba.ar](mailto:lbonofi@ffyb.uba.ar))

## Aspectos taxonómicos

*Streptococcus pneumoniae* (también llamado neumococo) es un microorganismo microaerófilo que pertenece al género *Streptococcus* de la familia *Streptococcaceae*. La caracterización fenotípica y los criterios taxonómicos lo incluyen dentro del grupo *Streptococcus mitis*, con el que presenta una identidad nucleotídica mayor al 99% en la secuencia del ARNr 16S. El neumococo es un coco gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa negativo y citocromooxidasa negativo. Los estreptococos clínicamente relevantes son homofermentadores y el producto final de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico. Generalmente se encuentra formando cadenas cortas o se disponen en pares (diplococos) en medios líquidos. Como el resto de los microorganismos del género presenta un bajo porcentaje de G+C. Cuando se cultiva en placas de agar sangre en aerobiosis presenta una marcada  $\alpha$ -hemólisis pero, si es incubado en anaerobiosis, se observa una  $\beta$ -hemólisis debida a la acción de la neumolisina. El neumococo es soluble en desoxicolato debido a que este detergente dispara la acción descontrolada de la principal autolisina (LytA) que degrada la pared celular en un proceso dependiente de colina. Los requerimientos nutricionales del neumococo son obtenidos con el agregado de sangre o suero al medio de cultivo.

## Hábitat y transmisión

Aunque *S. pneumoniae* es un importante agente causal de infecciones, su nicho ecológico natural es la nasofaringe humana. La mucosa del tracto respiratorio superior puede ser colonizada por este microorganismo desde los primeros días posteriores al nacimiento y se considera que, virtualmente, cualquier individuo ha estado colonizado con neumococos en alguna etapa de su vida. Se ha descrito que existe una relación inversa entre el estado de portador y la edad, de forma que entre la población infantil el número de portadores es mayor que en la edad adulta<sup>6</sup>. La mayoría de las infecciones neumocócicas ocurren, en general, luego de la adquisición de un nuevo serotipo y no después de un estado de portación prolongado. Esto sugiere que el estado inmune del huésped en el momento de la colonización, así como la virulencia de la cepa en particular, determinará la relación entre portación e invasividad del neumococo.

## Epidemiología

Han sido descritos más de 90 serotipos capsulares de neumococos, diferentes entre sí sobre la base de diferencias inmunológicas de la cápsula. La nomenclatura danesa los clasifica en serogrupos y serotipos de acuerdo a las características antigénicas, designados del 1 al 48. Cada serogrupo consiste en 2 a 5 serotipos, diferenciados por letras (A, B, C, etc, o F, de “*first*”, por ser el primero que se identificó).

Los primeros 80 serotipos fueron identificados en 1957; sólo tres más fueron adicionados durante los siguientes 28 años. En 1985, Austrian descubrió el serotipo 16A<sup>7</sup>. El descubrimiento de los tipos 10B, 10C, 11D, 12B, 25A y 33D fueron publicados por Henrichsen en 1995<sup>57</sup>. En el año 2007 Park y col. detectaron el serotipo 6C<sup>108</sup> y en el año 2009 se identificó el serotipo 6D<sup>15,67</sup>.

La distribución de serotipos que causan infección varía con la edad, con la gravedad de la enfermedad, con la región geográfica y con el tiempo<sup>34,60</sup>. Los brotes de enfermedades neumocócicas son poco frecuentes, pero pueden ocurrir en poblaciones cerradas, tales como hogares de ancianos, centros de cuidado infantil u otras instituciones.

De los aproximadamente 8,8 millones de muertes mundiales anuales entre los niños menores de 5 años de edad durante el año 2008, la OMS estima que 476.000 (333.000 - 529.000) fueron causadas por infecciones neumocócicas<sup>145</sup>. Las tasas de enfermedad y mortalidad son más altas en los países en desarrollo que en los países industrializados<sup>101</sup>.

Algunos serotipos se encuentran asociados a enfermedad invasiva con mayor frecuencia que otros<sup>50</sup>. En Latinoamérica por ejemplo, los serotipos prevalentes que están asociados a neumonía son el 14, el 1, el 5 y el 6B y los asociados a meningitis son el serotipo 14, el 6B, el 18C, el 19F, el 23F y el 5<sup>23,37,47</sup>.

En la Argentina, el orden de prevalencia de neumococos aislados de niños menores de 5 años con enfermedad invasiva se ha modificado en los últimos años, principalmente luego de la introducción de la vacuna conjugada 13-valente (PCV13) al Calendario Nacional de Vacunación<sup>45</sup>. Al comparar la distribución de serotipos de S.

*pneumoniae* recuperados de niños menores de 2 años con enfermedad invasiva durante un período prevacunal (2010-11) respecto de un período posvacunal (2013-14) se observó una disminución significativa de los serotipos incluidos en la PCV13 (de 86,3% a 42,4%), como así también un aumento de los serotipos no vacunales (de 12,8% a 57,1%). Este aumento estuvo principalmente asociado a los serotipos 24, 12F, 16F y 23B<sup>44</sup>. La prevalencia de serotipos hallados en portación nasofaríngea difiere de la de los aislados a partir de enfermedades invasivas. La distribución de serotipos de aislamientos de portación recuperados de niños menores de 3 años no vacunados, en la Argentina, en un estudio realizado en el período 2007-2008 fue la siguiente: serotipo 6A (12%), 15B (10%), 19F (9%), 14 (8%), 6B (7%), 23F (7%), 9V (6%), 19A (4%), 15C (4%) y 11A (4%). Al comparar poblaciones similares, en el mismo período de tiempo, fue observada una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los serotipos 5, 1, 7F, 12F y 18C, prevalentes en enfermedad invasiva pero no en portación nasofaríngea. Los serotipos 15B, 23F, 9V, 15C y 11<sup>a</sup>, en cambio, fueron prevalentes en portación nasofaríngea<sup>29</sup>.

En muchos países, el uso rutinario de las vacunas neumocócicas conjugadas ha reducido drásticamente la incidencia de enfermedad neumocócica invasiva. En algunos lugares, aquellas enfermedades producidas por serotipos vacunales prácticamente han desaparecido, incluso en los grupos de edad hacia los que no está dirigido el programa de inmunización, debido al efecto de inmunidad de rebaño<sup>3,33,142</sup>.

La introducción de la antibioticoterapia también redujo la morbilidad de las infecciones neumocócicas. Si bien tuvo un fuerte impacto en el control de la enfermedad, lamentablemente contribuyó en la emergencia de la resistencia a distintos

antibióticos<sup>105</sup>. La necesidad de buscar estrategias de prevención con amplio impacto en la salud pública fue tomando importancia y el esfuerzo comenzó a focalizarse en el desarrollo de una vacuna efectiva contra todos los neumococos. El neumococo está rodeado del polisacárido capsular (PC) y la existencia de más de 90 serotipos capsulares, con diferentes composiciones químicas y diferente impacto inmunológico y epidemiológico en los distintos grupos etarios, complica el desarrollo y evaluación del efecto de las vacunas<sup>11</sup>. Esta situación se suma a la diferente prevalencia en distintos países y grupos etarios.

En 2007, la OMS publicó una recomendación para la introducción de vacunas antineumocócicas en los programas de inmunización, en los países en desarrollo, con el objetivo de prevenir las infecciones causadas por este microorganismo. Al día de hoy la vacunación antineumocócica se basa en la vacuna polisacarídica 23-valente y en las vacunas conjugadas (10- o 13-valente) dependiendo de las recomendaciones de cada país. La vacuna conjugada 10-valente está siendo paulatinamente retirada del mercado argentino, desde la introducción al Calendario Nacional de Vacunación de la PCV13 en nuestro país.

### **Vacunas polisacarídicas**

En la década del 70 se aprobó una vacuna que incluía polisacáridos de 14 serotipos a la que luego se le incorporaron más antígenos. Posteriormente, en 1983 fue licenciada la vacuna que se utiliza actualmente que incluye polisacáridos de los 23 serotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F,

20, 22F, 23F, 33F) responsables de la mayoría de las infecciones neumocócicas<sup>116</sup>. Esta vacuna está indicada en adultos y niños mayores de 2 años con una patología de base que los hace vulnerables a las infecciones neumocócicas invasivas (VIH, enfermos con afecciones pulmonares crónicas, asplénicos, etc) y en mayores de 65 años.

El PC es un antígeno que genera anticuerpos mediante una respuesta de tipo T-independiente y sólo puede activar linfocitos B maduros. Los niños menores de 2 años poseen solamente linfocitos B inmaduros y al no ser activados por este tipo de epitopes no generarán anticuerpos. En cambio, en los adultos jóvenes, la respuesta ante al antígeno polisacárido (T-independiente) se manifiesta con la producción de anticuerpos de tipo IgM. Es importante recordar que los antígenos T-independientes no producen cambio de clase de inmunoglobulinas, por lo que la respuesta será siempre de tipo IgM.

Entre las desventajas de las vacunas polisacáridicas se puede mencionar que, debido a la diferente prevalencia de serotipos en las distintas áreas geográficas, brindará una protección variable (cobertura del 90% para USA y Europa pero del 60% en algunos países del tercer mundo). Además esta vacuna es poco inmunogénica en niños menores de 2 años<sup>41,62,127</sup> y si los individuos que la reciben poseen otras enfermedades, la respuesta será pobre y en algunos casos la inmunidad conferida ocurrirá solamente contra algún serotipo determinado<sup>106</sup>. Debido a que la cobertura de la vacuna no es eficiente en la población de mayor riesgo, el diseño de una vacuna más apropiada para disminuir o evitar las infecciones causadas por neumococos, es



una estrategia necesaria. En la revisión de Vila-Córcoles se discuten algunos aspectos relacionados con la efectividad clínica de esta vacuna<sup>141</sup>.

### **Vacunas polisacáridicas conjugadas**

Estas vacunas son obtenidas por conjugación del polisacárido con transportadores proteicos (antígeno de tipo T-dependiente) que permiten conferir una respuesta inmunológica de tipo IgG<sup>40</sup>.

Desde el año 2009 se encuentra disponible la vacuna PCV10 y desde el 2010, la vacuna PCV13. La PCV10 está compuesta por polisacáridos capsulares purificados de 10 serotipos: 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados con la proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipificable, excepto los serotipos 18C y 19F que están conjugados a los toxoides tetánico y diftérico, respectivamente. La PCV13 contiene antígenos polisacáridos de 13 serotipos, en donde se agregan los serotipos 3, 6A, 19A a los ya mencionados y están conjugados con una variante no toxigénica de la toxina diftérica (CRM<sub>197</sub>).

En la Argentina, la vacuna PCV13 se introdujo al Calendario Nacional de Vacunación en enero de 2012 con un esquema 2 + 1 (2 dosis iniciales a los 2 y 4 meses de edad y un refuerzo a los 12 meses de edad), (Ministerio de Salud 2011).

## **Vacunas proteicas**

Si bien el principal factor de patogenicidad es la cápsula, varias proteínas contribuyen a la virulencia de *S. pneumoniae* y son capaces también de generar una respuesta inmune protectora. Las vacunas proteicas presentan la ventaja de ofrecer protección independientemente de los serotipos<sup>103</sup>. Entre los posibles candidatos a ser incluidos se encuentran la proteína de superficie A (PspA) y la neumolisina (Ply)<sup>11,16,18</sup>. Dada la importancia de las vacunas proteicas, en Latinoamérica fue estudiada la probable cobertura de una vacuna basada en PspA<sup>14, 81, 90, 140</sup>.

En la literatura se pueden encontrar varias revisiones que aportan nueva información acerca del impacto de las vacunas conjugadas y el reemplazo de serotipos<sup>56, 85</sup>.

## **Impacto clínico**

*S. pneumoniae* es el agente causal de una amplia variedad de infecciones especialmente en niños y adultos. Puede transmitirse por aspiración o por penetración en la mucosa de las vías respiratorias para producir infecciones no invasivas como neumonía no bacteriémica, otitis media, sinusitis y conjuntivitis; puede invadir el torrente sanguíneo y producir infecciones invasivas como meningitis, neumonía bacteriémica o sepsis. Con baja incidencia, puede producir pericarditis, peritonitis y artritis<sup>11</sup>. Es el agente principal de peritonitis primaria que se da especialmente en pacientes con patología hepática o renal (síndrome nefrótico) subyacente.

El neumococo es la primera causa de meningitis bacteriana desde la introducción de la vacuna conjugada de *H. influenzae* tipo b. La OMS estima que aproximadamente 1,6 millones de individuos, incluyendo hasta 1 millón de niños menores de 5 años, mueren por enfermedad neumocócica invasiva cada año<sup>146</sup>, principalmente en los países en vías de desarrollo<sup>124</sup>. En Latinoamérica y el Caribe, las revisiones publicadas en 2007 y 2008 mostraron que alrededor de 18.000 niños menores de 6 años de edad mueren cada año debido a enfermedades neumocócicas invasivas<sup>27,129</sup>.

La mayoría de las neumonías adquiridas de la comunidad no son bacteriémicas, lo que dificulta la identificación del neumococo con los métodos de diagnóstico convencionales. Esto lleva a estimar una incidencia de neumonía neumocócica mayor que la documentada. Si bien la mayoría de las neumonías son causadas por virus, las bacterias producen las formas más graves de esta enfermedad.

Respecto de la meningitis, el neumococo es el principal agente causal en todas las edades menos la neonatal y en la mayoría de los casos puede llevar a la muerte o discapacidad permanente, que es mayor en comparación con otras meningitis bacterianas (sordera, convulsiones, retraso mental y problemas de movimiento).

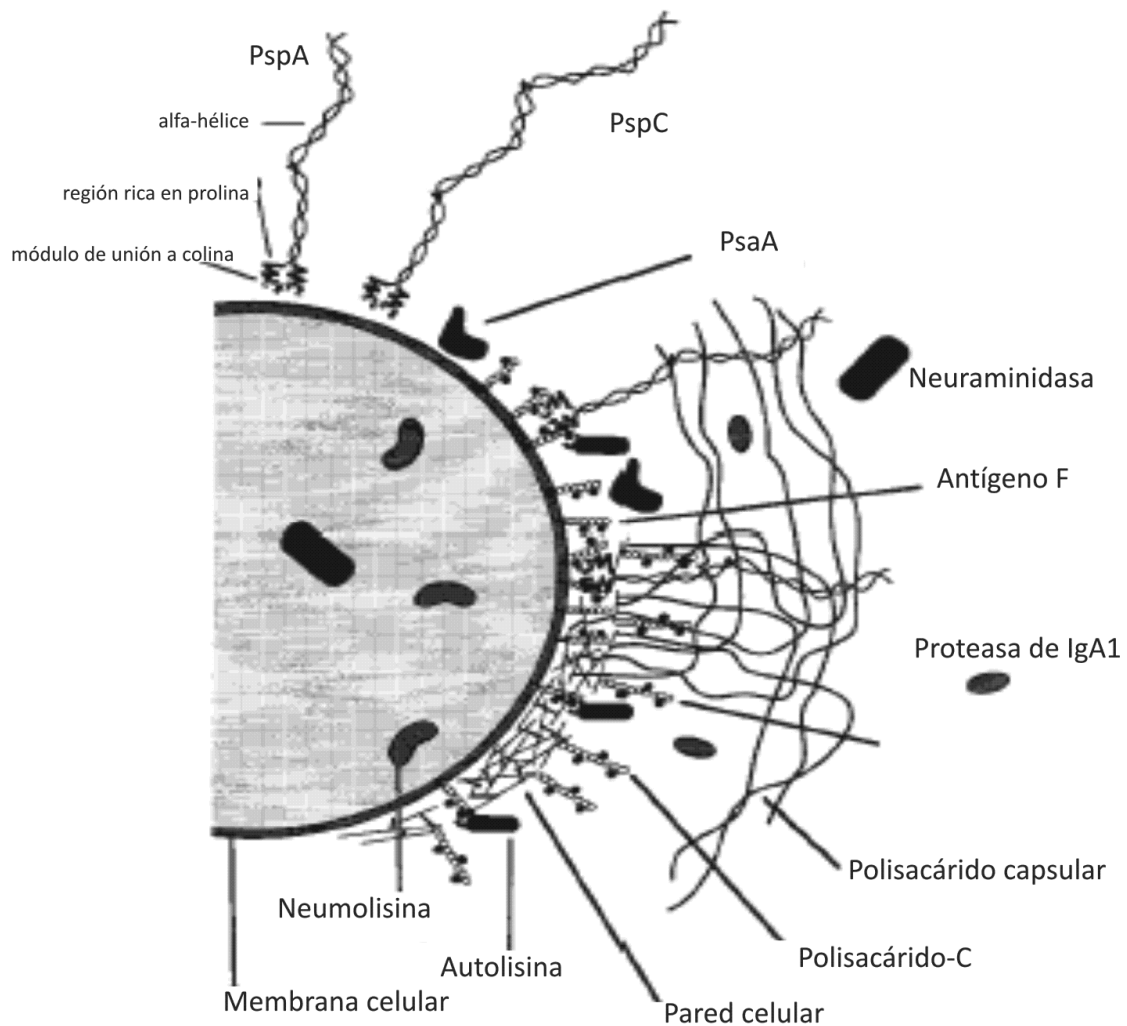
El neumococo también provoca sepsis, que puede progresar rápidamente a *shock* séptico y falla multiorgánica debido a la falta de suministro de oxígeno a órganos importantes del cuerpo.

Los factores de riesgo para enfermedad neumocócica incluyen la edad (niños entre 2 y 23 meses), asplenia anatómica o funcional, enfermedad de células falciformes, inmunocompromiso congénito o adquirido y enfermedades crónicas

(enfermedad pulmonar o cardíaca crónica, implante coclear, pérdida de líquido cefalorraquídeo y diabetes mellitus)<sup>100</sup>.

## Factores de virulencia

El neumococo posee múltiples factores de virulencia que le permiten poder sobrevivir en el hospedador y proseguir con la infección (Figura 1).



**Figura1:** Factores de virulencia de *S. pneumoniae* (Adaptado de Briles et al.<sup>18</sup>)

## Cápsula

El polisacárido capsular es reconocido como el principal factor de virulencia desde que Griffith puso de manifiesto que la inoculación de neumococos capsulados en ratones les producía su muerte, mientras que la inyección de una cepa no capsulada derivada de la anterior era inocua<sup>49</sup>. Es el primer punto de contacto entre la bacteria y los componentes del sistema inmune e impide la unión de los anticuerpos y la fijación de los componentes del sistema de complemento a la superficie celular<sup>70,89</sup>. De esta manera se evita la fagocitosis<sup>72</sup>. Además la cápsula reduce la posibilidad de que la matriz extracelular de los neutrófilos atrape al neumococo<sup>143</sup>. El polisacárido capsular también tiene la propiedad de facilitar la adhesión a superficies, de realizar el reconocimiento de moléculas<sup>75</sup>, de intervenir en la formación de *biofilms*<sup>93</sup> y de contribuir a la tolerancia antibiótica<sup>43</sup>.

## Pared

Los fragmentos del peptidoglicano provocan inflamación debido a la activación de la vía alterna del complemento y a la producción de interleuquinas (IL-1). El ácido teicoico es también efectivo en la activación de la vía alterna del complemento y en la producción de citoquinas. Esta inflamación produce daño en el hospedador pero no la eliminación de la bacteria.

## Proteínas

La neumolisina (Ply) es una citotoxina no secretable que actúa sobre las membranas que contienen colesterol en las que forman poros y lisan la bacteria<sup>10</sup>. Interviene en los primeros pasos de la infección ya que causa daño en el epitelio respiratorio. Actualmente se postula que puede activar la vía clásica del complemento<sup>136</sup>.

La PspA está presente en todas las cepas de neumococo y tiene un papel importante en la interacción bacteria-hospedador, debido a que interfiere en el mecanismo de eliminación mediado por complemento<sup>114</sup> y una lactoferrina humana<sup>126</sup>.

Las autolisinas clivan las uniones covalentes del peptidoglicano. La LytA desencadena una fuerte respuesta inflamatoria<sup>138</sup> y libera componentes citotóxicos del microorganismo como la Ply y la neuraminidasa<sup>9</sup>. El rol de las demás autolisinas está relacionado con la colonización de la nasofaringe<sup>96</sup>.

Las neuraminidasas actúan sobre glucoproteínas, glucolípidos y oligosacáridos de las superficies celulares liberando residuos de ácido siálico. De esta manera se exponen los receptores del huésped para las adhesinas del neumococo. Además se les ha asignado un rol en la supervivencia del neumococo en el tracto respiratorio y en la sangre<sup>77</sup>.

La hialuronidasa se encuentra unida al peptidoglicano de todos los neumococos, degrada al ácido homónimo de la matriz extracelular de los tejidos y permite la invasión y diseminación del neumococo<sup>9</sup>.

La proteasa de IgA1 cliva a IgA<sup>21</sup>. Otras proteasas de superficie degradan al factor 3 del complemento y evitan la opsonización de la bacteria. La proteína de superficie C interviene en la adherencia y colonización de la nasofaringe<sup>8</sup>. Interactúa con el factor H de la vía alterna del complemento y el componente C3 para evadir la acción del complemento<sup>32,113</sup>. La adhesina de superficie del neumococo (PsaA) contribuye a la adquisición de Mn<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> que le confiere resistencia ante el estrés oxidativo producido tanto por el metabolismo del propio neumococo como por la respuesta inmune innata<sup>82</sup>.

Por último, existe un nuevo grupo de factores de virulencia identificados a partir de la secuencia de los genomas de diferentes cepas de *S. pneumoniae* entre las que se incluye a la proteína de la familia Pht (“pneumococcal histidine triad”)<sup>1</sup> y otras proteínas que se transportan fuera de la célula<sup>115</sup>.

La contribución de cada factor de virulencia variará dependiendo de la localización *in vivo* de la bacteria. Estudios recientes revelan que, cuando *S. pneumoniae* infecta al hospedador, muestra dos patrones diferentes de expresión de genes, uno es característico de la infección en sangre y el otro de la bacteria en tejidos. El estudio de estos patrones de expresión de los genes permitió postular que el neumococo podría producir enfermedades de dos maneras diferentes: cuando infecta los tejidos (como en una neumonía o meningitis) tiene un modo de crecimiento que se asemeja al del *biofilm*, mientras que la bacteria en la sangre se asemeja al modelo *in vitro* de crecimiento en medio líquido (llamado estado de crecimiento planctónico)<sup>102</sup>. El entendimiento de estas modalidades de producir infección permitirá profundizar los

conocimientos de la patogénesis neumocócica ya que no están dilucidados claramente los mecanismos fisiopatológicos generales de la infección<sup>42,46,65,68,88</sup>.

## **Patogénesis**

A pesar de que *S. pneumoniae* es una causa importante de enfermedad y mortalidad, es normalmente un comensal de la nasofaringe de portadores asintomáticos<sup>83</sup>. El éxito en la colonización involucra mecanismos que le permiten persistir en la nasofaringe en competencia con la abundante microbiota presente. Podemos mencionar a las bacteriocinas que son pequeños péptidos antimicrobianos que produce el neumococo y que logran disminuir la presencia de los otros microorganismos presentes en su hábitat. Además, la permanencia por largo tiempo en la nasofaringe le permite, gracias a su capacidad de adquirir competencia natural, incorporar ADN exógeno de otros neumococos o especies relacionadas genéticamente.

## **Colonización**

Unos minutos después de que el neumococo alcanza la cavidad nasal, se encuentra con la secreción mucosa. La presencia de la cápsula impide que sea atrapado por el *mucus* y de esta manera puede llegar a las células epiteliales<sup>98</sup>. Allí ocurren distintas interacciones que permiten su adherencia por medio de distintas adhesinas<sup>68</sup>. Además, el neumococo experimenta variaciones de fase entre dos formas que pueden ser distinguidas por la morfología de las colonias (opaca o transparente).



Estas colonias distintas muestran diferencias en las proteínas o carbohidratos de superficie que pueden intervenir en la adherencia del neumococo a los tejidos. En los primeros estadios de la colonización, el neumococo expresa la variante transparente que se caracteriza por una menor producción de cápsula.

## **Invasión**

Los eventos que conducen al proceso de invasión no están aún muy claros. Hace algunos años se había propuesto que los mediadores de la inflamación podrían tener un papel importante. En modelos murinos y en estudios en seres humanos se ha visto que las variantes opacas, que expresan gran cantidad de cápsula, son las que se observan durante el pasaje de la superficie mucosa a la sangre<sup>17, 53</sup>. Si bien la máxima expresión de la cápsula es esencial para la virulencia, otros factores como ciertas adhesinas pueden contribuir en esta etapa.

El acceso del neumococo a las vías respiratorias bajas puede ocurrir mediante aspiración<sup>8</sup>. En el pulmón la pared de los alvéolos tiene neumocitos y una variante de éstos presenta disacáridos en la superficie que pueden actuar como receptores de adherencia. Además la unión del neumococo a células del hospedador, a través de receptores de superficie del factor activador de plaquetas y de las inmunoglobulinas, le permite pasar la barrera mucosa<sup>8,137</sup>. Por esta ruta la bacteria entra a la submucosa y al sistema vascular, permitiendo el crecimiento del neumococo y provocando bacteriemia. Una vez en la sangre, la bacteria puede pasar la barrera hematoencefálica y entrar al líquido cefalorraquídeo (LCR) ocasionando meningitis. El pasaje al LCR se debe a la

inflamación en ese sitio como consecuencia de la interacción entre componentes de la bacteria (como el peptidoglicano, ácido lipoteicoico y diversas proteínas) con células del hospedador, desencadenando la activación de citoquinas y quemoquinas<sup>125</sup>.

### **Mecanismos de defensa del hospedador**

Durante la colonización los neutrófilos migran hacia los sitios en donde se encuentra el neumococo. Sin embargo el proceso inflamatorio desencadenado no elimina el estado de portación y la bacteria persistirá aún luego de la resolución de la inflamación. La IgA de las mucosas es degradada por la proteasa de IgA secretada por el neumococo. Es así que la disminución de la colonización podría ocurrir debido a la producción de anticuerpos de tipo IgG que no son sustratos de esa enzima y que son activados mediante la vacunación. Además, como parte del proceso inflamatorio, la proteína C reactiva se unirá a la fosforilcolina y luego interaccionará con el complemento activando la vía clásica<sup>68</sup>.

En la infección neumocócica, la respuesta inmunitaria es la fagocitosis y la opsonización mediada por C3b o por IgG. Cuando la opsonización está mediada por C3b, las proteínas del complemento se unen al microorganismo y pueden provocar la opsonización por unión de los receptores del complemento a neutrófilos y macrófagos, pero no provocan la lisis de *S. pneumoniae* sino que producen la adhesión de la bacteria. Cuando la opsonización está mediada por IgG, ocurre el reconocimiento por parte de las células fagocíticas de la porción Fc de los anticuerpos unidos a la superficie bacteriana. Hay que tener en cuenta que los anticuerpos también pueden activar las vías clásicas y alternas del complemento. Actualmente se propone que la

activación del complemento podría prevenir la diseminación de los neumococos de los pulmones a la sangre<sup>147</sup>.

## Diagnóstico microbiológico

### Examen directo

#### Morfología microscópica

*S. pneumoniae* es un coco gram positivo inmóvil, no capsulado y no esporulado. Las células son ovaladas o lanceoladas de aproximadamente 0,5 a 1,25  $\mu\text{m}$ . Cuando crecen en medio líquido, con el microscopio óptico, se observa que se disponen en pares o en cadenas cortas (Figura 2).



**Figura 2:** Tinción de gram de un cultivo de *S. pneumoniae*

### Detección de antígeno en LCR

Durante las últimas décadas, las pruebas comerciales de aglutinación con partículas de látex que detectan antígenos del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* se han utilizado ampliamente, aunque su uso ha sido controvertido. Sobre todo se ha desestimado su utilidad clínica como reemplazo de la tinción de Gram y el cultivo<sup>86,99,135</sup>. La utilidad estaría dada en muestras de pacientes que recibieron tratamiento antibiótico previo para las cuales la coloración de Gram y el cultivo fueron negativos. Existen varios equipos comerciales para la prueba de aglutinación con partículas de látex.

### Detección de antígeno urinario

En el mercado hay disponible un equipo comercial para la detección de antígeno urinario. Consiste en una prueba inmunocromatográfica rápida que detecta el polisacárido C de la pared celular, antígeno que se encuentra en todas las cepas de *S. pneumoniae*. En muestras de orina de pacientes adultos esta prueba tiene una sensibilidad del 70-80% y una especificidad mayor al 90% en la detección de neumonía neumocócica<sup>19,130</sup>. Dada la sensibilidad de la detección, esta prueba debería ser usada conjuntamente con otros métodos diagnósticos. Se ha observado que la vacunación neumocócica puede producir resultados falsamente positivos<sup>97</sup> y se ha detectado persistencia de resultados positivos durante varias semanas<sup>78,95</sup>. En muestras de niños, la utilidad de esta técnica aún no es clara debido a que se han observado altos

porcentajes de resultados falsamente positivos probablemente debido a la colonización nasofaríngea con neumococos<sup>30,52</sup>. Algunas de sus limitaciones son su costo relativamente alto y la reacción cruzada con algunos estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos orales<sup>71</sup>.

En los últimos años, esta prueba se está utilizando a partir de muestras distintas a las de orina. Por ejemplo, para el diagnóstico rápido de meningitis neumocócica a partir de muestras de LCR la prueba tiene una sensibilidad de 95-100% y una especificidad del 100%<sup>122,123</sup>. Esta prueba además se utiliza a partir de muestras de líquido pleural obtenidas de niños y adultos con neumonía<sup>111,112</sup> y de lavado broncoalveolar, en este último caso con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 87%<sup>63</sup>. La prueba también puede proporcionar una rápida identificación presuntiva de *S. pneumoniae* en hemocultivos positivos con subcultivos negativos<sup>110</sup>.

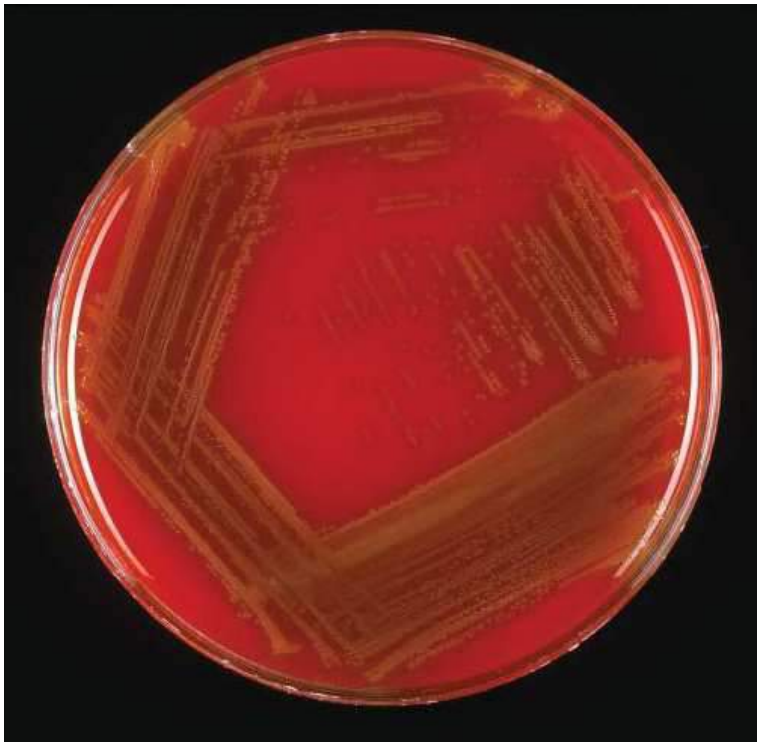
## **Cultivo e Identificación**

En el laboratorio no siempre es sencillo identificar a *S. pneumoniae*. Si se lo encuentra en sitios normalmente estériles es confirmatorio del causante de la infección. Sin embargo cuando las muestras a analizar provienen de material respiratorio, la dificultad en obtener una muestra de alta calidad que permita diferenciar infección invasiva de colonización, complica el diagnóstico.

Hay que tener en cuenta que el trabajo con aislamientos de *S. pneumoniae* requiere el uso de las prácticas de nivel de bioseguridad 2<sup>25,104</sup>.

### Crecimiento y descripción de las colonias

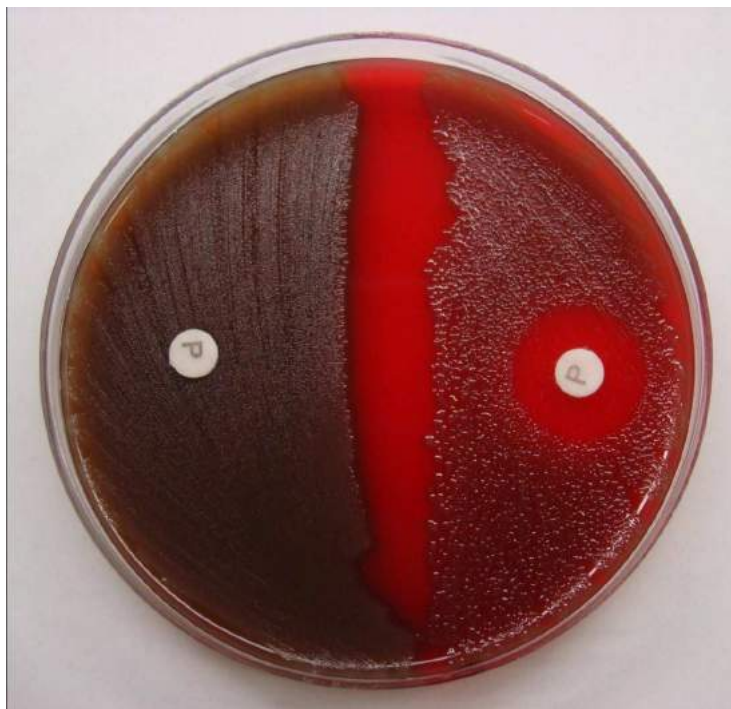
Debido a las exigencias nutricionales, *S. pneumoniae* debe ser cultivado en agar sangre ovina e incubado a 35-37°C en aerobiosis o, mejor, en ambientes con 5% de CO<sub>2</sub>. En esas condiciones, las colonias observadas son lisas, pequeñas, mucosas y rodeadas por un halo verde de  $\alpha$ -hemólisis (Figura 3). Algunos neumococos requieren inicialmente de una atmósfera anaeróbica para su crecimiento y en esas condiciones las colonias observadas son  $\beta$ -hemolíticas.



**Figura 3:** Colonias  $\alpha$ -hemolíticas de *S. pneumoniae* en agar sangre (adaptado de Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2<sup>a</sup> edición)

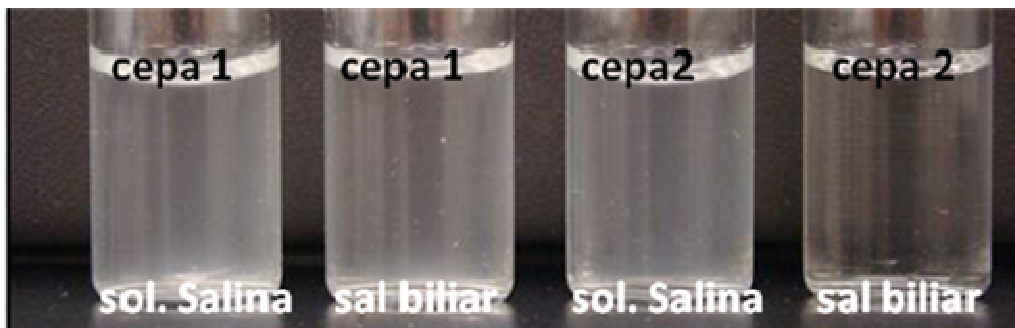
## Pruebas bioquímicas

La identificación en el laboratorio de *S. pneumoniae* incluye el reconocimiento de la morfología característica y el resultado de unas pocas pruebas fenotípicas. La evaluación microscópica y macroscópica realizada por una persona entrenada permite una identificación presuntiva. Para confirmar la identidad se requiere de las pruebas de sensibilidad a optoquina (Fig. 4) y solubilidad en sales biliares que permitirán diferenciarlo de otros estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos.



**Figura 4.** Prueba de sensibilidad a la optoquina (Adaptado de Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2<sup>o</sup> edition).

La mayoría de los aislamientos de *S. pneumoniae* son sensibles a optoquina y solubles en bilis. Sin embargo, un pequeño porcentaje pueden ser resistentes a optoquina<sup>69</sup> y se han descrito otros estreptococos con sensibilidad a optoquina que no pertenecen a la especie *S. pneumoniae*<sup>80</sup>. En consecuencia, debe realizarse la prueba de solubilidad en bilis como confirmatoria. La especie *S. pseudopneumoniae* es fenotípicamente y genéticamente distinta de *S. pneumoniae* pero puede ser identificada incorrectamente como *S. pneumoniae*. Algunas de las características son la ausencia de cápsula e insolubilidad en bilis. La prueba de optoquina debe realizarse en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por que en esas condiciones *S. pseudopneumoniae* da la prueba negativa o indeterminada. Sin embargo, si la incubación se realiza en atmósfera normal este microorganismo puede ser sensible a optoquina.



**Figura 5.** Prueba de solubilidad en bilis (adaptado de Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2<sup>o</sup> edition)



## Técnicas para la detección de ácidos nucleicos: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras clínicas

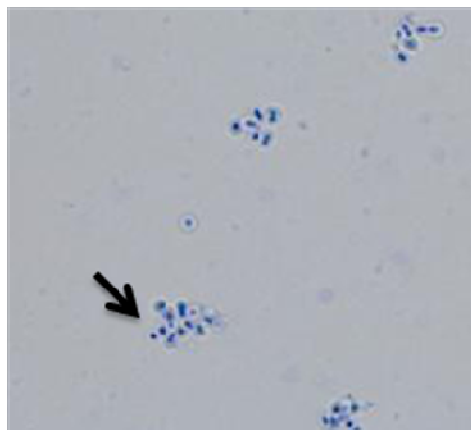
Debido a las dificultades que representa la identificación mediante los métodos bioquímicos mencionados, se han comenzado a utilizar ensayos moleculares, que proveen mejor sensibilidad y especificidad, aún en muestras de pacientes que recibieron tratamiento antibiótico. Entre estos métodos, podemos mencionar los basados en PCR que detectan los genes *ply*, *lytA* y *psaA* que son considerados específicos para neumococo<sup>22</sup>. De estos, la amplificación del gen *lytA* es considerada la más específica para detectar *S. pneumoniae*<sup>87</sup>. Si bien este método presenta mayor sensibilidad que las pruebas bioquímicas convencionales, sería de utilidad solo en el caso de muestras que provengan de sitios normalmente estériles. La PCR de muestras de sitios no estériles puede arrojar resultados falsamente positivos debido a que los estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos orales poseen el gen *lytA*<sup>94,134</sup>. Teniendo en cuenta esto, se describieron otras PCR que mejoran la especificidad. Una de ellas basada en la amplificación de una región del gen *lytA* que es característica del neumococo<sup>76</sup> y la otra basada en la amplificación de una región específica del RNAr 16S<sup>38</sup>. Además fue desarrollada una PCR en tiempo real que además de ser más sensible, permite la detección de varios genes en la misma reacción e identifica *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae*<sup>22</sup>.

## Determinación de tipos capsulares

La determinación de tipos capsulares es esencial para el estudio epidemiológico de *S. pneumoniae* debido a que permite conocer la prevalencia de los serotipos circulantes en una región determinada.

### Técnica de Neufeld-Quellung

La reacción de Neufeld-Quellung, descrita en 1902 por Franz Neufeld, continúa siendo el *gold standard* para la tipificación capsular <sup>5,133</sup>. Se utilizan sueros comerciales que reaccionan con el polisacárido capsular (antígeno), haciendo visible la cápsula cuando se observa al microscopio óptico (Figura 6).



**Figura 6:** Reacción de Neufeld-Quellung.(adaptado de Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2<sup>o</sup> edition).

Catorce *pools* y 46 antisueros (25 antisueros de tipo y 21 antisueros de grupo) se encuentran disponibles comercialmente en el Statens Serum Institut en Copenhague, Dinamarca. El antisuero de "tipos" representa una fórmula antigénica simple para cada tipo. El antisuero usado para identificar el "grupo" representa una colección de serotipos cada uno con diferente fórmula antigénica. Una técnica simplificada para la serotipificación de *S. pneumoniae* fue estandarizada en el año 1993<sup>132</sup>. El sistema usa 12 *pools* y un tablero de identificación. Con este sistema se pueden identificar 8 serotipos y 13 serogrupos que son los que más frecuentemente se hallan distribuidos en el mundo. Para identificar los serotipos incluidos en cada serogrupo existen 64 antisueros (denominados factores).

### Látex

Esta técnica sigue el mismo principio que la reacción de Neufeld-Quellung. Es un equipo comercial (Pneumotest-Latex, Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca) que permite la detección rápida de varios de los serotipos/serogrupos de *S. pneumoniae* mediante la aglutinación con partículas de látex usando el método del tablero de identificación. Consta de 14 viales donde cada uno corresponde a uno de los *pools* y contienen partículas de látex unidas con antisuero neumocócico obtenido en conejos.

## Métodos moleculares

La reacción de Neufeld-Quellung presenta algunos inconvenientes como el alto costo de los antisueros y la subjetividad en la interpretación. Es por ello que se han desarrollado sistemas de tipificación capsular basados en PCR simple<sup>20</sup> y en PCR múltiple para determinar los serotipos de neumococos a partir de aislamientos y de muestras clínicas (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>)<sup>35,107</sup>. Por otra parte, se han descrito ensayos de PCR en tiempo real que permiten la detección e identificación de *S. pneumoniae* en muestras clínicas. Estos ensayos presentan mayor sensibilidad y permiten la detección mejorada de *S. pneumoniae* en el LCR y en muestras de sangre<sup>79,91</sup>. Si bien estos enfoques moleculares parecen prometedores, por el momento solo permiten identificar un número limitado de serotipos.

## **Conservación y transporte**

*S. pneumoniae* es un microorganismo muy frágil y esto trae aparejado que la conservación no sea una tarea sencilla en un laboratorio clínico. El método elegido dependerá sobre todo de la disponibilidad de los equipamientos a ser utilizados (*freezers*, heladeras, equipo liofilizador)<sup>128</sup>.

En la conservación por congelamiento el inóculo se prepara en caldo con glicerol al 20%, sangre de carnero o leche descremada al 4% estérilizada mediante autoclave a media atmósfera. Mediante esta forma neumococo mantiene la viabilidad luego de ser conservado a -20°C hasta 18 meses<sup>128</sup>. En cambio si se conserva a -80°C la viabilidad

se mantiene durante varios años. En ambos casos no conviene descongelar el criovial sino utilizar una porción del congelado. Además, en el caso de la conservación a -80°C hay que tener en cuenta que *S. pneumoniae* puede volverse resistente a la optoquina luego de 12 meses y/o luego de varios subcultivos <sup>117</sup>.

La liofilización, aunque es costosa, es otra de las opciones de conservación a largo plazo. Mediante esta metodología, los microorganismos mantienen su viabilidad aproximadamente 20 años. Este método junto con el congelado a -80°C son los ideales para la conservación a largo plazo<sup>128</sup>.

Otra posibilidad es tomar el desarrollo bacteriano de una placa de agar sangre de carnero al 5% con hisopo estéril y colocarlo en un tubo seco con tapa a rosca y guardarlo a -20°C. En estas condiciones la viabilidad se mantiene aproximadamente 1 mes. Los aislamientos de *S. pneumoniae* pueden también guardarse por períodos cortos en hisopos, almacenados en paquetes de sílica gel; de esta forma, los aislamientos durarán dos semanas aproximadamente a temperatura ambiente. Los paquetes son económicos y fáciles de utilizar<sup>109</sup>.

Para el transporte de cultivos de *S. pneumoniae*, se usa el medio de Amies modificado con carbón activado. La viabilidad se mantiene por 10 días<sup>55</sup>. Otra forma de transporte de aislamientos y conservación a corto plazo es la utilización de un cultivo en agar sangre transportado a temperatura ambiente.

## Sensibilidad antimicrobiana

La penicilina ha sido el tratamiento de elección para las infecciones neumocócicas por más de cuatro décadas<sup>31</sup>. Las primeras cepas de *S. pneumoniae* resistentes a este antibiótico fueron aisladas en Australia a fines de los años 60<sup>54</sup>. Desde la década del 80 la prevalencia de neumococos resistentes a la penicilina ha ido aumentando en el mundo<sup>64</sup>. El mecanismo principal de resistencia a la penicilina es la modificación de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) que además confieren resistencia cruzada a cefalosporinas de tercera generación<sup>51</sup>. Estas mutaciones se acumulan en los estreptococos orales y luego se transmiten a otros estreptococos incluyendo al neumococo. En este caso el microorganismo aprovecha su extraordinaria capacidad de adquirir ADN exógeno por transformación.

La resistencia a penicilina está basada en los puntos de corte para el ensayo de concentración inhibitoria mínima según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI, los cuales fueron modificados en el año 2008, teniendo en cuenta el modo de administración (oral o parenteral) y el tipo de enfermedad (meníngea o no meníngea)<sup>144</sup>. De esta manera, el porcentaje de resistencia que uno encuentra en la literatura varía según si se mencionan aislamientos recuperados antes o después del 2008 lo cual limita la capacidad de compararlos. El cambio de puntos de corte implica que la penicilina sigue siendo la droga de elección para el tratamiento empírico de la neumonía en niños.

En Latinoamérica, el 30,5% de los aislamientos meníngeos y el 38,8% de aislamientos no meníngeos presentaron resistencia a penicilina durante el período

2000-2005<sup>23</sup>. En los Estados Unidos, la proporción de aislamientos resistentes a penicilina de focos meníngeos aumentó del 10,7% antes del cambio de puntos de corte al 27,5% con los nuevos puntos de corte<sup>24</sup>. En la Argentina, los niños mayores de 4 años con neumonía reciben amoxicilina o penicilina; esta terapia también es utilizada en otros países de la región. Además, cefotaxima o ceftriaxona siguen siendo las drogas de elección para el tratamiento de las bacteriemias y meningitis en niños<sup>45,120</sup>.

El uso de macrólidos y quinolonas en el tratamiento de la neumonía adquirida de la comunidad y en el tratamiento empírico de infecciones respiratorias altas seleccionó aislamientos resistentes<sup>121</sup>. En nuestro país distintos estudios revelaron que el porcentaje de resistencia a macrólidos variaba entre el 16% y el 3,5% en aislamientos recuperados en el año 2000 (de adultos y niños respectivamente) en ambos casos, a expensas del fenotipo M<sup>12,28</sup> y a la presencia de clones multirresistentes<sup>13,28</sup>. Este aumento se siguió observando en aislamientos recuperados entre los años 2000-2011 en la Argentina<sup>45</sup> y se ha evidenciado en otros países del mundo<sup>131</sup>. Además la resistencia a eritromicina se correlaciona con la resistencia a otra clase de agentes como la tetraciclina, quinolonas y trimetoprima-sulfametoxazol<sup>131</sup>, en algunos casos debido a la presencia de elementos móviles<sup>26</sup>. La vancomicina es entonces, el antibiótico utilizado como último recurso para casos de cepas multirresistentes en infecciones neumocócicas graves. Sin embargo se ha documentado tolerancia a este compuesto<sup>92,118</sup>. Actualmente se han introducido nuevos antibióticos como linezolid, telitromicina o la estreptogramina sintética quinupristina-dalfopristina que por el momento son efectivos contra los neumococos<sup>66</sup>.

La selección de mutantes resistentes intratratamiento con terapia antibiótica, es poco común y esto se debe a que la selección de cepas resistentes no ocurre por mutaciones puntuales en los determinantes de resistencia, excepto para las quinolonas donde aún la prevalencia de la resistencia es baja<sup>61,74</sup>. La resistencia está mediada por procesos de transformación y por la presencia de transposones conjugativos. Estos procesos además están favorecidos cuando los neumococos se encuentran colonizando la nasofaringe. De esta manera, la estrategia de esta bacteria parecería ser la diseminación de un número restringido de clones multirresistentes y se ha evidenciado que son los responsables del 85% de las enfermedades causadas por neumococos resistentes a penicilina<sup>119</sup>. Esta situación refuerza la necesidad de la realización de estudios epidemiológicos periódicos para poder establecer la prevalencia de clones resistentes y diseñar políticas de consumo de antibióticos dado que está ampliamente demostrada su relación con el aumento de la resistencia en *S. pneumoniae*<sup>4,131</sup>.

El estudio de las cepas resistentes a los antibióticos, estimuló el desarrollo de la epidemiología molecular del neumococo e incentivó la creación de una base de datos internacional sobre los genotipos hallados en distintas partes del mundo. En el año 1997 se formó La Red de Epidemiología Molecular de Neumococos (PMEN)<sup>84</sup> que se ocupa de verificar y registrar la emergencia de clones internacionales. Esta red tiene depositados hasta abril de 2006 (fecha de su última actualización) 43 clones diseminados mundialmente que tienen resistencia a penicilina y a otros antibióticos (<http://www.sph.emory.edu/PMEN>). El sistema para la denominación de clones incluye el nombre del país en donde se aisló inicialmente, el serotipo al que pertenecen los



primeros aislamientos y el número correlativo que indica el orden de identificación por la red.

## **Métodos de epidemiología molecular**

La epidemiología molecular emplea métodos de biología molecular fenotípicos y genotípicos para identificar subtipos bacterianos y establecer relaciones entre aislamientos. Los estudios de epidemiología molecular de *S. pneumoniae* han adquirido cada vez mayor importancia debido a la aparición de cepas resistentes a uno o más antibióticos, a la diseminación de clones multirresistentes en distintas regiones y a la necesidad de conocer la cobertura de las vacunas actualmente licenciadas o en desarrollo.

Los métodos fenotípicos ya han sido mencionados en los apartados anteriores.

Se han descrito diferentes métodos genotípicos que poseen distinto poder de discriminación que además aportan diferente tipo de información. A continuación se comentan los métodos usados con mayor frecuencia.

### **Patrones de restricción de las PBP**

Los genes *pbp1a*, *pbp2b* y *pbp2x* son amplificados por PCR y los productos se digieren con las enzimas de restricción HaeIII+DdeI (*pbp1a*) y HaeIII+RsaI (*pbp2b* y *pbp2x*)<sup>48</sup>. Luego se comparan los patrones entre sí y con los descritos previamente como pertenecientes a un clon. Esta técnica además permite entender el mecanismo

de la resistencia a penicilina de la cepa en estudio. Esta técnica está recomendada por la red PMEN para la asignación de un clon.

## **PspA**

Se utiliza como método de tipificación debido a que una región del gen *pspA* presenta polimorfismos y permite la clasificación en familias y grupos<sup>59</sup>. La determinación de familias de PspA puede realizarse mediante PCR con oligonucleótidos específicos de familia y mediante *dot-blot* con anticuerpos específicos. Alternativamente se puede secuenciar la región variable del gen y comparar el polimorfismo de los alelos y/o analizar el patrón de restricción<sup>36</sup>.

Los datos obtenidos se utilizan para proveer información de cobertura de una posible vacuna basada en PspA.

## **BOX-PCR**

BOX-PCR es la amplificación mediante PCR de las secuencias repetitivas y palindrómicas BOX presentes en el genoma de neumococo. Este método es muy utilizado como primera técnica de epidemiología molecular. La técnica es sencilla, económica, posee un elevado poder de discriminación y ha sido aplicada con éxito en el estudio de poblaciones de *S. pneumoniae*<sup>58,139</sup>. Los patrones de bandas de cada aislamiento dependen de la distribución en el genoma de las secuencias BOX y los mismos son comparados en un dendrograma que permite agruparlos según la similitud<sup>84</sup>.

## **Electroforesis en campo pulsado**

La electroforesis en campo pulsado (PFGE)<sup>73</sup> es otra de las técnicas incluidas para la asignación de clones por la Red PMEN. Los patrones de banda son obtenidos cuando los ADN genómicos de las cepas en estudio son digeridos con enzimas de restricción de baja frecuencia. De esta manera se generan fragmentos grandes de ADN que deben ser resueltos utilizando un equipo específico para PFGE. La separación de los fragmentos requiere de una corrida en un gel hexagonal sobre el que se aplican pulsos de corriente durante aproximadamente 24 h. Esta técnica es más cara y más laboriosa que la BOX-PCR. Una vez realizado el experimento, la relación entre los aislamientos se compara en un dendrograma al igual que en el caso de BOX-PCR. La PFGE continúa siendo utilizada como la técnica de referencia en la asignación de clones dado que tiene mucha reproducibilidad en los resultados.

## **Tipificación por secuencias multilocus de enzimas**

La tipificación por secuencias multilocus de enzimas (MLST) está incluida para la asignación de un clon por la Red PMEN<sup>39</sup>. La misma involucra la secuenciación de fragmentos de siete genes conservados que codifican productos involucrados en el metabolismo (*housekeeping*) utilizando oligonucleótidos específicos diseñados para el microorganismo en estudio. Las mismas se vuelcan en la base de datos del MLST ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) y se obtiene el secuenciotipo correspondiente (compuesto por los 7 alelos secuenciados). El espíritu del MLST es que todo dato nuevo tenga la posibilidad

de ser depositado en la base y de esta forma toda la comunidad científica pueda conocer la aparición o diseminación de clones. Además tiene como ventaja permitir la comparación de los resultados con los clones internacionales depositados y la posibilidad de obtener información de cepas relacionadas sin necesidad de poseerlas en el laboratorio. En este sentido, la aplicación de MLST permite analizar la diseminación de clones y predecir sus ancestros. En la actualidad es utilizado como método de elección en estudios de epidemiología global.

La combinación de métodos moleculares de tipificación ha permitido analizar la clonalidad de aislamientos sensibles y resistentes a penicilina y a otros antibióticos, estudiar su diseminación y realizar el análisis de las relaciones evolutivas de los clones resistentes. En la Argentina, se han realizado distintos estudios utilizando las técnicas mencionadas<sup>2,13,28</sup>. La aplicación conjunta de estos métodos ha evidenciado que la evolución de la resistencia a penicilina y la multirresistencia es un fenómeno al que contribuyen la ganancia o pérdida de genes de resistencia por intercambio genético, la remodelación de blancos moleculares por recombinación, además de la diseminación de clones resistentes.

## **Bibliografía**

1. Adamou JE, Heinrichs JH, Erwin AL, Walsh W, Gayle T, Dormitzer M, Dagan R, Brewah YA, Barren P, Lathigra R, Langermann S, Koenig S, Johnson S. Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. *Infect. Immun.* 2001; 69: 949-58.

2. Albarracín Orio AG, Cortés PR, Tregnaghi M, Piñas GE, Echenique JR. A new serotype 14 variant of the pneumococcal Spain9V-3 international clone detected in the central region of Argentina. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 992-9.
3. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. Recommendations for the prevention of *Streptococcus pneumoniae* infections in infants and children: use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). *Pediatrics* 2010; 126: 186-90.
4. Arason VA, Sigurdsson JA, Erlendsdottir H, Gudmundsson S, Kristinsson KG. The role of antimicrobial use in the epidemiology of resistant pneumococci: A 10-year follow up. *Microb. Drug Resist.* 2006; 12: 169-76.
5. Austrian R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. *Mt Sinai J Med.* 1976; 43: 699-709.
6. Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother.* 1986; 18: 35-45.
7. Austrian R, Boettger C, Dole M, Fairly L, Freid M. *Streptococcus pneumoniae* type 16A, a hitherto undescribed pneumococcal type. *J Clin Microbiol.* 1985; 22: 127-8.
8. Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2002; 70: 2526-34.
9. Berry AM, Paton JC. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun.* 2000; 68: 133-40.
10. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Membrane damage by pore-forming bacterial cytolysins. *Microb Pathog.* 1986; 1: 5-14.
11. Bogaert D, Hermans PW, Adrian PV, Rumke HC, de Groot R. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine* 2004; 22: 2209-20.
12. Bonofiglio L, Ojeda MI, Mier Cd, Vay C, Famiglietti A, Gutkind G, Mollerach M. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from adult

patients with community-acquired pneumonia in an Argentinian teaching hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 260-3.

13. Bonofiglio L, Regueira M, Pace J, Corso A, Garcia E, Mollerach M. Dissemination of an erythromycin-resistant penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* Poland(6B)-20 clone in Argentina. *Microb Drug Resist.* 2011; 17: 75-81.

14. Brandileone MC, Andrade AL, Teles EM, Zanella RC, Yara TI, Di Fabio JL, Hollingshead SK. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. *Vaccine* 2004; 22: 3890-6.

15. Bratcher PE, Park IH, Hollingshead SK, Nahm MH. Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. *Microbiology* 2009; 155: 576-83.

16. Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, Benjamin WH, Jr. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 2003; 188: 339-48.

17. Briles DE, Novak L, Hotomi M, van Ginkel FW, King J. Nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci. *Infect Immun.* 2005; 73: 6945-51.

18. Briles DE, Tart RC, Swiatlo E, Dillard JP, Smith P, Benton KA, Ralph BA, Brooks-Walter A, Crain MJ, Hollingshead SK, McDaniel. LS. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 645-57.

19. Briones ML, Blanquer J, Ferrando D, Blasco ML, Gimeno C, Marin J. Assessment of analysis of urinary pneumococcal antigen by immunochromatography for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13: 1092-7.

20. Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2378-84.

21. Camilli R, Pettini E, Grosso MD, Pozzi G, Pantosti A, Oggioni MR. Zinc metalloproteinase genes in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: association of the full array with a clonal cluster comprising serotypes 8 and 11A. *Microbiol.* 2006; 152: 313-21.

22. Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, Steigerwalt A, Whaley M, Facklam RR, Fields B, Carlone G, Ades EW, Dagan R, Sampson JS. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2460-6.
23. Castañeda E, Agudelo CI, Regueira M, Corso A, Brandileone MC, Brandao AP, Maldonado A, Hormazábal JC, Martínez IT, Llanes R, Sánchez J, Feris JM, Echaniz-Avilés G, Carnalla-Barajas MN, Terrazas MG, Monroy IH, Chamorro G, Weiler N, Camou T, Gabarrot GG, Spadola E, Payares D, Gabastou JM, Di Fabio JL, de la Hoz F. Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries: a SIREVA II project, 2000-2005. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28: e265-70.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae*-United States, 2006-2007. *MMWR* 2008; 57: 1353-5.
25. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Fifth Edition. U. S. Government Printing Office Washington, 2007.
26. Cochetti I, Tili E, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP. *erm(B)*-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between *Tn1545* and *Tn6003*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 1285-90.
27. Constenla D, Gómez E, de la Hoz FP, O'Loughlin R, Sinha A, Valencia JE, Valenzuela MT. The burden of pneumococcal disease and cost-effectiveness of a pneumococcal vaccine in Latin America and the Caribbean: a review of the evidence and a preliminary economic analysis. 2007. [on line] <http://sabin.org>.
28. Corso A, Faccone D, Galletti P, Pace J, Regueira M. Prevalence of *mef* and *ermB* genes in invasive pediatric erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2009; 41: 29-33.
29. Corso A, Fossati S, Galletti P, Prieto N, Rodríguez M, Sorhouet C, Lamy P, Regueira M, Gentile A. Comparison between invasive disease and nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae* among non vaccinated Argentinean children during 2007/08. ISPPD, 2012, Foz de Iguazú, Brasil.

30. Charkaluk ML, Kalach N, Mvogo H, Dehecq E, Magentie H, Raymond J, Gendrel D, Kremp O, Decoster A. Assessment of a rapid urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal infection in children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 55: 89-94.
31. Chenoweth CE, Saint S, Martinez F, Lynch JP, Fendrick AM. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: implications for patients with community-acquired pneumonia. *Mayo Clin Proc*. 2000; 75: 1161-8.
32. Dave S, Carmicle S, Hammerschmidt S, Pangburn MK, McDaniel LS. Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. *J Immunol*. 2004; 173: 471-7.
33. Desai AP, Sharma D, Crispell EK, Baughman W, Thomas S, Tunali A, Sherwood L, Zmitrovich A, Jerris R, Satola S, Beall B, Moore MR, Jain S, Farley MM. Decline in pneumococcal nasopharyngeal carriage of vaccine serotypes after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children in Atlanta, Georgia. *Pediatr Infect Dis J*. 2015; 34:1168-74
34. Di Fabio JL, Castañeda E, Agudelo CI, De La Hoz F, Hortal M, Camou T, Echaniz-Avilés G, Noemi M, Barajas C, Heitmann I, Hormazábal JC, Brandileone MC, Dias Vieira VS, Regueira M, Ruvinski R, Corso A, Lovgren M, Talbot JA, De Quadros C. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20: 959-67.
35. Dias CA, Teixeira LM, Carvalho M da G, Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 1185-8.
36. Dicuonzo G, Gherardi G, Gertz RE, D'Ambrosio F, Goglio A, Lorino G, Recchia S, Pantosti A, Beall B. Genotypes of invasive pneumococcal isolates recently recovered from Italian patients. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3660-5.
37. Dos Santos MS, Azevedo J, Menezes AP, Cordeiro SM, Escobar EC, Lima JB, Campos LC, Carvalho M da G, Reis MG, Ko AI, Reis JN. Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2015; 15: 302.



38. El Aila NA, Emler S, Kaijalainen T, De Baere T, Saerens B, Alkan E, Deschaght P, Verhelst R, Vaneechoutte M. The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. BMC Infect Dis. 10: 104.
39. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. Microbiology 1998; 144 (Pt 11): 3049-60.
40. Eskola J. Immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccines. Pediatr Infect Dis J. 2000; 19: 388-93.
41. Fedson DS, Musher DM. Pneumococcal polysaccharide vaccine. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines, 6th edición, 2003.
42. Feldman C, Anderson R. Recent advances in our understanding of *Streptococcus pneumoniae* infection. F1000Prime Rep 2015; 6: 82.
43. Fernebro J, Andersson I, Sublett J, Morfeldt E, Novak R, Tuomanen E, Normark S, Normark BH. Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. J Infect Dis. 2004; 189: 328-38.
44. Fossati S. *Streptococcus pneumoniae*: serotipos y resistencia en la era de la vacunación. Mesa redonda: Nuevas evidencias en infecciones por estreptococos. SADI 2015 Buenos Aires, Argentina, 2015.
45. Fossati S, Gagetti P, Reijtman V, Rodríguez M, Ruvinsky R, Regueira M, SIREVA-II-Working-Group-Argentina, Corso A. Serotype distribution, antibiotic resistance and coverage of pneumococcal conjugate vaccines (PCV) before their introduction in the National Schedule: Argentina 2000-2011. ISPPD, 2012, Foz de Iguazú, Brasil.
46. García-Suárez M. del M, Vázquez F, Méndez FJ. *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: An update. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006; 24: 512-7.
47. Garcia Gabarrot G, Lopez Vega M, Pérez Giffoni G, Hernández S, Cardinal P, Félix V, Gabastou JM, Camou T. Effect of pneumococcal conjugate vaccination in Uruguay, a middle-income country. PLoS One 2014; 9: e112337.

48. Gherardi G, Whitney CG, Facklam RR, Beall B. Major related sets of antibiotic-resistant pneumococci in the United States as determined by pulsed-field gel electrophoresis and *pbp1a-pbp2b-pbp2x-dhf* restriction profiles. *J Infect Dis.* 2000; 181: 216-29.
49. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hygiene* 1928; 27: 113-59.
50. Hakanson A, Roche H, Mirza S, McDaniel L, Brooks-Walter A, Briles DE. Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. *Infect Immun.* 2001; 69: 3372-81.
51. Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A. Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980; 17: 364-71.
52. Hamer DH, Egas J, Estrella B, MacLeod WB, Griffiths JK, Sempertegui F. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1025-8.
53. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Muller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73: 4653-67.
54. Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. *Lancet.* 1967; 2: 264-5.
55. Hare KM, Stubbs E, Beissbarth J, Morris PS, Leach AJ. Swab transport in Amies gel followed by frozen storage in skim milk tryptone glucose glycerol broth (STGGB) for studies of respiratory bacterial pathogens. *J Microbiol Methods.* 2010; 81: 253-5.
56. Hausdorff WP, Hoet B, Adegbola RA. Predicting the impact of new pneumococcal conjugate vaccines: serotype composition is not enough. *Expert Rev Vaccines.* 2015; 14: 413-28.
57. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2759-62.
58. Hermans P, Sluijter M, Hoogenboezem T, Heersma H, Belkum A, de Groot R. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1606-12.
59. Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2000; 68: 5889-900.

60. Imohl M, Reinert RR, van der Linden M. New penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* and their effects on susceptibility categorisation in Germany (1992-2008). *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34: 271-3.
61. Iraurgi P, Torres MJ, Aznar J. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistance in invasive clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Seville. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30: 180-3.
62. Jackson LA, Neuzil KM, Yu O, Benson P, Barlow WE, Adams AL, Hanson CA, Mahoney LD, Shay DK, Thompson WW. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. *N. Engl J Med*. 2003; 348: 1747-55.
63. Jacobs JA, Stobberingh EE, Cornelissen EI, Drent M. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in bronchoalveolar lavage fluid samples by a rapid immunochromatographic membrane assay. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 4037-40.
64. Jacobs MR, Good CE, Beall B, Bajaksouzian S, Windau AR, Whitney CG. Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 982-90.
65. Jedrzejewski MJ. Extracellular virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci*. 2004; 9: 891-914.
66. 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; 7: 1.
67. Jin P, Kong F, Xiao M, Oftadeh S, Zhou F, Liu C, Russell F, Gilbert GL. First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. *J Infect Dis*. 2009; 200: 1375-80.
68. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6: 288-301.
69. Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, Gibbs JL, Smith MC. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3373-5.

70. Kerr AR, Paterson GK, McCluskey J, Iannelli F, Oggioni MR, Pozzi G, Mitchell TJ. The contribution of PspC to pneumococcal virulence varies between strains and is accomplished by both complement evasion and complement-independent mechanisms. *Infect Immun*. 2006; 74: 5319-24.
71. Klugman KP, Madhi SA, Albrich WC. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2008;47 (Suppl 3):S202-6.
72. Kraiczy P, Wurzner R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol*. 2006; 43: 31-44.
73. Lefevre JC, Faucon G, Sicard AM, Gasc AM. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2724-8.
74. López H, Sader H, Amabile C, Pedreira W, Muñoz Bellido JL, García Rodríguez JA. In vitro activity of moxifloxacin against respiratory pathogens in Latin America. *Rev Esp Quimioter*. 2002; 15: 325-34.
75. López R, García E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev*. 2004; 28: 553-80.
76. Llull D, Lopez R, Garcia E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 1250-6.
77. Manco S, Hernon F, Yesilkaya H, Paton JC, Andrew PW, Kadioglu A. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infect Immun*. 2006; 74: 4014-20.
78. Marcos MA, Jiménez de Anta MT, de la Bellacasa JP, González J, Martínez E, García E, Mensa J, de-Roux A, Torres A. Rapid urinary antigen test for diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults. *Eur Respir J*. 2003; 21: 209-14.
79. Marchese A, Esposito S, Coppo E, Rossi GA, Tozzi A, Romano M, Da Dalt L, Schito GC, Principi N. Detection of *Streptococcus pneumoniae* and identification of pneumococcal serotypes by real-time polymerase chain reaction using blood samples from Italian children  $\leq$  5 years of age with community-acquired pneumonia. *Microb Drug Resist*. 2011; 17: 419-24.
80. Martin-Galiano AJ, Balsalobre L, Fenoll A, de la Campa AG. Genetic characterization of optochin-susceptible viridans group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 3187-94.

81. Mayoral C, Della-Bianca M, Baroni MR, Giani R, Regueira M, Zalazar F. Familias de la proteína de superficie PspA de *Streptococcus pneumoniae*. Relación con serotipos y localización. *Medicina (Buenos Aires)* 2010; 70: 437-41.
82. McAllister LJ, Tseng HJ, Ogunniyi AD, Jennings MP, McEwan AG, Paton JC. Molecular analysis of the psa permease complex of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2004; 53: 889-901.
83. McDaniel DO, Swiatlo E. Pneumococcal disease: pathogenesis, treatment, and disease. *Infect Dis Clin Pract.* 2004; 12: 93-8.
84. McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefevre JC, Tomasz A, Klugman KP. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2565-71.
85. Mehr S, Wood N. *Streptococcus pneumoniae*--a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatr Respir Rev.* 2012; 13: 258-64.
86. Mein JLum G. CSF bacterial antigen detection tests offer no advantage over Gram's stain in the diagnosis of bacterial meningitis. *Pathology.* 1999; 31: 67-9.
87. Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 49: 249-54.
88. Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 411-8.
89. Mizrachi Nebenzahl Y, Porat N, Lifshitz S, Novick S, Levi A, Ling E, Liron O, Mordechai S, Sahu RK, Dagan R. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* may be determined independently of capsular polysaccharide. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 233: 147-52.
90. Mollerach M, Regueira M, Bonofiglio L, Callejo R, Pace J, Di Fabio JL, Hollingshead S, Briles D. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity. *Epidemiol Infect.* 2004; 132: 177-84.
91. Moore CE, Sengduangphachanh A, Thaojaikong T, Sirisouk J, Foster D, Phetsouvanh R, McGee L, Crook DW, Newton PN, Peacock SJ. Enhanced determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes

associated with invasive disease in Laos by using a real-time polymerase chain reaction serotyping assay with cerebrospinal fluid. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83: 451-7.

92. Moscoso M, Domenech M, Garcia E. Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol Microbiol.* 2010;

93. Moscoso M, García E, López R. Pneumococcal biofilms. *Int Microbiol.* 2009; 12: 77-85.

94. Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Fleming AM, Laing RT, Town GI, Mills GD, Chambers ST, Jennings LC. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 63-6.

95. Murdoch DR, Laing RT, Cook JM. The NOW *S. pneumoniae* urinary antigen test positivity rate 6 weeks after pneumonia onset and among patients with COPD. *Clin Infect Dis.* 2003; 37 153-4.

96. Musher DM, Breiman RF, Tomasz A. *Streptococcus pneumoniae*: at the threshold of the 21st century. En: Tomasz A, editor. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology and mechanisms of disease, New York, Mary Ann Liebert, INC., 2000.

97. Navarro D, Garcia-Maset L, Gimeno C, Escribano A, Garcia de Lomas J. Performance of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen assay for diagnosis of pneumonia in children with underlying pulmonary diseases in the absence of acute pneumococcal infection. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4853-5.

98. Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun.* 2007; 75: 83-90.

99. Nunes AA, Camargos PA, Costa PR, Campos MT. Antigen detection for the diagnosis of pneumonia. *Pediatr Pulmonol.* 2004; 38: 135-9.

100. Nuorti JP, Whitney CG. Prevention of pneumococcal disease among infants and children-use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). 2010; 59 RR-11.

101. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009; 374: 893-902.
102. Oggioni MR, Trappetti C, Kadioglu A, Cassone M, Iannelli F, Ricci S, Andrew PW, Pozzi G. Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol*. 2006; 61: 1196-210.
103. Ogunniyi AD, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2000; 68: 3028-33.
104. OPS. Manual de bioseguridad para el procesamiento de muestras y cepas relacionadas con el diagnóstico de laboratorio de las neumonías y meningitis por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Documentos Técnicos. Tecnología, Atención en Salud e Investigación. THR/EV-2008/002. 2008;
105. Ortqvist A, Hedlund J, Kalin M. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Semin Respir Crit Care Med*. 2005; 26: 563-74.
106. Ortqvist A, Henckaerts I, Hedlund J, Poolman J. Non-response to specific serotypes likely cause for failure to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in the elderly. *Vaccine*. 2007; 25: 2445-50.
107. Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 124-31.
108. Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1225-33.
109. Pell CL, Williams MJ, Dunne EM, Porter BD, Satzke C. Silica desiccant packets for storage and transport of *Streptococcus pneumoniae* and other clinically relevant species. *PLoS One* 2013; 8: e72353.
110. Petti CA, Woods CW, Reller LB. *Streptococcus pneumoniae* antigen test using positive blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 2510-2.

111. Ploton C, Freydiere AM, Benito Y, Bendridi N, Mazzocchi C, Bellon G, Vandenesch F. *Streptococcus pneumoniae* thoracic empyema in children: rapid diagnosis by using the Binax NOW immunochromatographic membrane test in pleural fluids. *Pathol Biol.* 2006; 54: 498-501.
112. Porcel JM, Ruíz-González A, Falguera M, Nogués A, Galindo C, Carratalá J, Esquerda A. Contribution of a pleural antigen assay (Binax NOW) to the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Chest.* 2007; 131: 1442-7.
113. Quin LR, Carmicle S, Dave S, Pangburn MK, Evenhuis JP, McDaniel LS. In vivo binding of complement regulator factor H by *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 2005; 192: 1996-2003.
114. Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun.* 2004; 72: 114-22.
115. Rigden DJ, Galperin MY, Jedrzejewski MJ. Analysis of structure and function of putative surface-exposed proteins encoded in the *Streptococcus pneumoniae* genome: a bioinformatics-based approach to vaccine and drug design. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2003; 38: 143-68.
116. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, Rastogi SC, Schiffman G, Henrichsen J, Makela PH, Broome CV, Facklam RR, Tiesjema RH. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis.* 1983; 148: 1136-59.
117. Robson RL, Essengue S, Reed NA, Horvat RT. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* induced by frozen storage in glycerol. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58: 185-90.
118. Rodriguez CA, Atkinson R, Bitar W, Whitney CG, Edwards KM, Mitchell L, Li J, Sublett J, Li CS, Liu T, Chesney PJ, Tuomanen EI. Tolerance to vancomycin in pneumococci: detection with a molecular marker and assessment of clinical impact. *J Infect Dis.* 2004; 190: 1481-7.
119. Rudolf D, Michaylov N, van der Linden M, Hoy L, Klugman KP, Welte T, Pletz MW. International pneumococcal clones match or exceed the fitness of other strains despite the accumulation of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 4915-7.
120. Ruvinsky RO, Regueira M, Fossati MS, Gagetti P, Pace J, Rodriguez M, Gabastou JM, Corso A. Surveillance of invasive in *Streptococcus pneumoniae* in Argentina 1994–2007: Changes in serotype



distribution, serotype coverage of pneumococcal conjugate vaccines and antibiotic resistance. *J Pediatr Infect Dis.* 2010; 5: 263–9.

121. Rzesutek M, Wierzbowski A, Hoban DJ, Conly J, Bishai W, Zhanel GG. A review of clinical failures associated with macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 95-104.

122. Saha SK, Darmstadt GL, Yamanaka N, Billal DS, Nasreen T, Islam M, Hamer DH. Rapid diagnosis of pneumococcal meningitis: implications for treatment and measuring disease burden. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24: 1093-8.

123. Samra Z, Shmueli H, Nahum E, Paghis D, Ben-Ari J. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 45: 237-40.

124. Scott JA. The preventable burden of pneumococcal disease in the developing world. *Vaccine.* 2007; 25: 2398-405.

125. Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. *J Infect Dis.* 2002; 186: S225-33.

126. Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, Jr, Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun.* 2004; 72: 5031-40.

127. Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, Schroeder D, Parcels V, Margolis A, Adair RK, Clemmens JD. Protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med.* 1991; 325: 1453-60.

128. Siberry G, Brahmadathan KN, Pandian R, Lalitha MK, Steinhoff MC, John TJ. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull World Health Organ.* 2001; 79: 43-7.

129. Sinha A, Constenla D, Valencia JE, O'Loughlin R, Gomez E, de la Hoz F, Valenzuela MT, de Quadros CA. Cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination in Latin America and the Caribbean: a regional analysis. *Rev Panam Salud Pública.* 2008; 24: 304-13.

130. Smith MD, Derrington P, Evans R, Creek M, Morris R, Dance DA, Cartwright K. Rapid diagnosis of bacteremic pneumococcal infections in adults by using the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test: a prospective, controlled clinical evaluation. J Clin Microbiol. 2003; 41: 2810-3.
131. Song JH, Dagan R, Klugman KP, Fritzell B. The relationship between pneumococcal serotypes and antibiotic resistance. Vaccine. 2012; 30: 2728-37.
132. Sorensen UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2097-100.
133. Sorensen UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2997-100.
134. Suzuki N, Yuyama M, Maeda S, Ogawa H, Mashiko K, Kiyoura Y. Genotypic identification of presumptive *Streptococcus pneumoniae* by PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae*. J Med Microbiol. 2006; 55: 709-14.
135. Tarafdar K, Rao S, Recco RA, Zaman MM. Lack of sensitivity of the latex agglutination test to detect bacterial antigen in the cerebrospinal fluid of patients with culture-negative meningitis. Clin Infect Dis. 2001; 33: 406-8.
136. Thornton J, McDaniel LS. THP-1 monocytes up-regulate intercellular adhesion molecule 1 in response to pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2005; 73: 6493-8.
137. Tuomanen E. The biology of pneumococcal infection. Pediatr Res. 1997; 42: 253-8.
138. Tuomanen E. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. Curr Opin Microbiol. 1999; 2: 35-9.
139. van Belkum A, Sluijter M, de Groot R, Verbrugh H, Hermans PW. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1176-9.
140. Vela-Coral M, Fonseca N, Di Fabio JL, Castañeda E. Presence of international multiresistant clones of *Streptococcus pneumoniae* in Colombia. Microb Drug Resist. 2001; 7: 153-64.
141. Vila-Córcoles A. Advances in pneumococcal vaccines: what are the advantages for the elderly? Drugs Aging. 2007; 24: 791-800.

142. Waight PA, Andrews NJ, Ladhani NJ, Sheppard CL, Slack MP, Miller E. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2015; 15: 629.
143. Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 1162-71.
144. Weinstein MP, Klugman KP, Jones RN. Rationale for revised penicillin susceptibility breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: coping with antimicrobial susceptibility in an era of resistance. *Clin Infect Dis.* 2009; 48: 1596-600.
145. WHO. Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age, 2008. [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/burden/Pneumo\\_hib\\_estimates/en/index.html](http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/Pneumo_hib_estimates/en/index.html) 2008;
146. WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2007; 82: 93-104
147. Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol.* 2005; 175: 1813-9.

## **Capítulo Ila.2.3**

### **Estreptococos del grupo viridans**

**HORACIO A. LOPARDO**

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría  
"Prof Dr Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.  
Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Correspondencia. E-mail: [hlopar25@gmail.com](mailto:hlopar25@gmail.com)

## Características generales, estructura y taxonomía

Los estreptococos del grupo viridans (EGV) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se encuentran colonizando la mucosa orofaríngea, el tracto gastrointestinal y el genitourinario del hombre y de algunos animales. Normalmente viven en armonía con otros comensales de dichos sitios, desde donde pueden pasar a colonizar la piel en forma transitoria o a desarrollar infecciones en calidad de microorganismos oportunistas.

Habitualmente se los considera como de bajo poder patógeno para individuos con inmunidad normal. Sin embargo, son capaces de causar enfermedades graves: endocarditis, absceso cerebral, hepático o pulmonar y en ciertas circunstancias también pueden provocar el síndrome de *shock* tóxico. Si bien la sensibilidad a los antibióticos es variable, son casi universalmente sensibles a la vancomicina y por lo general presentan bajos niveles de concentración inhibitoria mínima (CIM) de penicilina, excepto los agrupados como *Streptococcus mitis*.

La identificación a nivel de especie es sumamente dificultosa tanto con la utilización de métodos manuales, para los que resulta prácticamente imposible, como con el uso de métodos automatizados. Incluso presenta dificultades su caracterización por métodos moleculares. Por ello, actualmente, los laboratorios de microbiología han optado por tratar de definir al menos cinco grupos de especies, lo cual cubre los principales requerimientos desde el punto de vista clínico.

Una de las primeras clasificaciones de los estreptococos fue la realizada por Andrewes y Horder en 1906, quienes incluyeron dentro de un grupo llamado *Streptococcus mitis* a tres presuntas especies no hemolíticas. Otros estreptococos  $\alpha$ -

hemolíticos posteriormente recibieron el nombre de “*Streptococcus viridans*” justamente por presentar un halo verdoso (viridans = verde). Luego, se vio que se trataba de varias especies que podían ser alfa, gamma y, en algunos casos, hasta  $\beta$ -hemolíticas: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus salivarius* y la controvertida *Streptococcus bovis* que aglutinaba con el grupo D de Lancefield<sup>30</sup>. El sistema serológico de Lancefield de poco sirvió en la clasificación para el resto de este grupo de bacterias.

Por de pronto, los estreptococos del grupo viridans (EGV) deben ser diferenciados a nivel de género de otros cocos gram positivos relacionados a través de su disposición en cadenas y mediante pruebas bioquímicas simples (*Gemella*, *Aerococcus*, etc.) (Tabla 1). Los escasos aislados que dan  $\beta$ -hemólisis (todos ellos del grupo *S. anginosus*) deben diferenciarse de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, estreptococos de los grupos A y C o G respectivamente, con cuyos antígenos pueden dar reacciones cruzadas. Por otra parte, tanto los alfa como los  $\gamma$ -hemolíticos deben distinguirse de los enterococos (Tablas 1, 2 y 3). Los  $\alpha$ -hemolíticos, a su vez, deben separarse especialmente de los neumococos utilizando las pruebas de optoquina (R) y solubilidad en bilis (negativa) (ver Capítulo IIb.2. *S. pneumoniae*). A causa de los casos excepcionales de EGV sensibles y de neumococos resistentes a la optoquina, es necesario realizarla en una atmósfera enriquecida con 5% de CO<sub>2</sub> y complementarla rutinariamente con la prueba de solubilidad en bilis que tiene mayor especificidad (Tabla 2)<sup>7, 23, 89</sup>.

**Tabla 1.** Diferenciación de estreptococos del grupo viridans (EGV) de otros microorganismos alfa o  $\gamma$ -hemolíticos

Microorganismo	PYR	LAP	Cadenas	NaCl 6,5%	BE	VAN
EGV	-	+	+	-	v	S
<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	+	S/R
<i>Abiotrophia/Granulicatella</i>	+	+	+	-	-	S
<i>Gemella</i>	+	v	v	-	-	S
<i>Pediococcus</i>	-	+	-	v	v	R
<i>Helcococcus</i>	+	-	-	v	+	S
<i>Tetragenococcus</i>	-	+	-	+	+	S
<i>Aerococcus viridans</i>	+	-	-	+	v	S
<i>Aerococcus urinae</i>	-	+	-	+	v	S
<i>Aerococcus christensenii</i>	-	+	-	+	v	S
<i>Aerococcus urinaehominis</i>	-	-	-	+	v	S
<i>Leuconostoc</i>	-	-	+	v	v	R
<i>Lactococcus</i>	v	+	+	v	v	S
<i>Vagococcus</i>	+	+	+	+	+	S
<i>Rothia mucilaginosa</i>	+	+	-	+	-	S
<i>Globicatella</i>	+	-	S	+	+	S

PYR: pirrolidónil arilamidasa. LAP: leucinaminopeptidasa. NaCl 6,5%: tolerancia a 6,5% de NaCl, BE: desarrollo de colonias negras en medio de bilis esculina. VAN: sensibilidad a vancomicina.

**Tabla 2.** Diferenciación de estreptococos del grupo viridans y *S. pneumoniae*

Especie o grupo de especies	Optoquina	Solubilidad en bilis	Aglutinación con omniserum
Estreptococos del grupo viridans	R	-	- <sup>+</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	S	+	+

**Tabla 3.** Diferenciación de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos del grupo viridans (grupo *S. anginosus*) respecto de *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* y *S. agalactiae*

Especie o grupo de especies	Grupo	Colonia	BAC	PYR	$\beta$ -GUR	VP	ESC
<i>S. pyogenes</i>	A	grande	S	+	-	-	V
<i>S. agalactiae</i>	B	grande	R	-	-	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	C, G	grande	R <sup>S</sup>	-	+	-	+
Grupo <i>S. anginosus</i>	A,C,F,G, NT	chica	R <sup>S</sup>	-	-	+	+

BAC: sensibilidad a 0,04U de bacitracina. PYR: pirrolidonil arilamidasa.  $\beta$ -GUR: beta-glucuronidasa. VP: Voges

Proskauer. ESC: desarrollo de colonias negras en agar esculina. NT: no tipificable por método serológico. V: variable



Existe una especie denominada *Streptococcus pseudopneumoniae* perteneciente al grupo *S. mitis* que comparte algunas características con los neumococos. No obstante, si se utiliza una concentración de desoxicolato de sodio superior al 1% para la prueba de solubilidad en bilis (normalmente se usa al 10%) y si, como se indicó previamente, la incubación de la prueba de optoquina se realiza en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>, la identificación se efectúa en forma correcta<sup>5, 54</sup>.

**Tabla 4.** Especies que constituyen cada uno de los grupos

Grupo de especies	Especies
Grupo <i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. rattii</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. ferus</i> , <i>S. macacae</i> , <i>S. downei</i> , <i>S. hyovaginalis</i>
Grupo <i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. cristatus</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. peroris</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. goirdonii</i> , <i>S. sinensis</i> , <i>S. pseudopneumoniae</i> , <i>S. orisratti</i>
Grupo <i>S. anginosus</i>	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i>
Grupo <i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. hyointestinalis</i> , <i>S. termophiulus</i>
Grupo <i>S. bovis</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> (ex- <i>S. bovis</i> I), <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (ex- <i>S. bovis</i> II.2), <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> (ex- <i>S. bovis</i> II.1), <i>S. lutetiensis</i> ( <i>S. infantarius</i> subsp. subsp. <i>coli</i> ), <i>S. alactolyticus</i> <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i> <i>S. equinus</i>

Con el advenimiento de los métodos moleculares, pudo precisarse que cada una de estas supuestas especies era a su vez un grupo de especies (Tabla 4), pero que la

conservación de esta clasificación seguía siendo de utilidad práctica para poder definir sus tendencias a la producción de cierto tipo de infecciones o de presentar determinados marcadores de resistencia antibiótica (Tabla 5). En la tabla 4 pueden verse las más de 30 especies reconocidas dentro del grupo “viridans”.

**Tabla 5.** Grupos de especies y tendencias diferenciales en la patogenia y en la resistencia a los antibióticos

Grupo	Resistencia a $\beta$ -lactámicos	Patogenia
<i>S. anginosus</i>	baja	Colecciones purulentas. Abscesos de órganos sólidos
<i>S. bovis</i>	baja	Endocarditis, asociación con patología oncológica intestinal <sup>a</sup> o hepática <sup>b</sup> . Meningitis <sup>b</sup> . Infección urinaria <sup>b</sup> .
<i>S. mitis</i>	alta	Endocarditis. Bacteriemia en pacientes neutropénicos. Bacteriemia transitoria.
<i>S. mutans</i>	baja	Endocarditis. Caries dentales
<i>S. salivarius</i>	moderada	Bacteriemia transitoria. Endocarditis. Infecciones de las vías biliares. Meningitis iatrogénica

<sup>a</sup> *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, <sup>b</sup> *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*

## **Identificación a nivel género, de grupo, de grupos de especies y de especies**

### **Características culturales y microscópicas**

Si bien algunos aislados de EGV pueden desarrollar en medios de cultivo sin sangre (agar Columbia, agar BHI, CLDE), la mayoría crecen muy bien en agar sangre y agar chocolate a temperatura ambiente o en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>. Son anaerobios facultativos y algunos de ellos desarrollan mejor en atmósferas con concentración disminuida de oxígeno. En agar sangre pueden producir hemólisis alfa, gamma e incluso beta (algunos aislados de *Streptococcus constellatus*). Las colonias son rugosas y pequeñas (aproximadamente de 1 mm de diámetro)

Su transporte y conservación puede realizarse del mismo modo que se realiza con *S. pneumoniae*.

Al microscopio óptico se ven como cocos gram positivos en pares y cadenas, especialmente si la muestra es una gota de un desarrollo en caldo tioglicolato. La forma de los cocos es irregular e incluso a veces pueden tomar una cierta morfología bacilar.

### **Pruebas bioquímicas**

Como ya se mencionó, la identificación de las especies de EGV es prácticamente imposible a partir de métodos convencionales. Esto se debe a la falta de reproducibilidad de las técnicas y a que la variabilidad para cada prueba entre las

diferentes cepas de una misma especie es muy frecuente<sup>9</sup>. Por ello se optó por la identificación a nivel de grupo de especies con unas pocas pruebas (Tabla 6).

**Tabla 6:** Identificación a nivel de grupos de especies por pruebas bioquímicas convencionales

Grupos de especies	Urea	VP	ARG	ESC	MAN	SBL
<i>S. anginosus</i>	-	+ (-)	+	+ (-) <sup>(a)</sup>	- (+)	- (+)
<i>S. mitis</i>	-	-	- (+) <sup>(b)</sup>	- (+) <sup>(c)</sup>	-	- (+) <sup>(d)</sup>
<i>S. mutans</i>	-	+	-	- (+) <sup>(e)</sup>	+	+ (-) <sup>(f)</sup>
<i>S. salivarius</i>	+ (-) <sup>(g)</sup>	+ (-) <sup>(h)</sup>	-	+ (-) <sup>(i)</sup>	-	-
<i>S. bovis</i>	-	+	-	+ (-)	+(-) <sup>(j)</sup>	-

+ Más del 90% de los aislados da la prueba positiva, - Más del 90% de los aislados da la prueba negativa, (+) ó (-) Una minoría de los aislados da la prueba positiva o negativa. VP: Voges –Proskauer, ARG: arginina dihidrolasa, ESC: esculina, MAN: manitol, SBL: sorbitol.

<sup>(a)</sup> *S. constellatus* subsp. *constellatus* da la prueba de esculina en forma variable

<sup>(b)</sup> Las especies *S. cristatus*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis* y *S. sanguinis* dan positiva la prueba de arginina

<sup>(c)</sup> *S. sanguinis* biotipos 1 y 2 y *S. gordonii* dan positiva la prueba de esculina, *S. parasanguinis* y *S. oralis* la dan en forma variable y *S. sanguinis* biotipo 3, *S. crista*, *S. mitis*, *S. peroris* y *S. infantis* dan la prueba negativa.

<sup>(d)</sup> *S. sanguinis* biotipos 1 y 2 dan variable la prueba de sorbitol.

<sup>(e)</sup> *S. mutans* da la prueba de esculina en forma variable

<sup>(f)</sup> *S. sobrinus* da la prueba de sorbitol en forma variable

<sup>(g)</sup> *S. salivarius* da la prueba de urea en forma variable

<sup>(h)</sup> *S. vestibularis* da negativa la prueba de Voges-Proskauer

<sup>(i)</sup> *S. vestibularis* da la prueba de esculina en forma variable

<sup>(j)</sup> *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* da positiva la prueba de manitol. El resto de las especies la da negativa.

Utilizando las pruebas de NaCl 6,5%, bilis esculina, pirrolidónilamidasasa (PYR), leucinaminopeptidasa (LAP), observación de cadenas en caldo tioglicolato y sensibilidad a vancomicina (ver apéndice) podemos separar a los EGV de microorganismos de otros géneros (enterococos y otras bacterias relacionadas). Con optoquina y solubilidad en bilis podemos diferenciarlos de *S. pneumoniae* (ver apéndice y capítulo II.2 *Streptococcus pneumoniae*). Para la identificación a nivel de grupo de especies se pueden utilizar las pruebas de arginina dihidrolasa, ureasa, manitol, sorbitol, esculina y Voges Proskauer con la posibilidad de identificar correctamente hasta aproximadamente un 80% de las cepas.

Ruoff y Ferraro a mediados de la década del 80 lograban diferenciar los estreptococos del grupo *S. anginosus* del resto de los EGV en 5 horas con pruebas miniaturizadas de producción de acetoina, hidrólisis de arginina y fermentación del sorbitol<sup>92</sup>. No obstante ni estos métodos, ni los comerciales, ni los automatizados han podido resolver el problema de la identificación a nivel de especie en la mayoría de los casos<sup>45</sup>.

### **Métodos automatizados y miniaturizados**

El método de api (api 20 Strep) es ligeramente mejor que el Rapid ID32 Strep. No obstante, ninguno de los dos identifica correctamente a estas bacterias especialmente por déficit de su base de datos. No obstante, pueden utilizarse las pruebas individuales para llegar manualmente a mejores resultados. Como ya se dijo

previamente, los métodos basados en pruebas fenotípicas son incapaces de identificar correctamente a estos microorganismos a nivel de especie.

Los sistemas automatizados también presentan problemas a este nivel y son incluso más inadecuados que los métodos manuales por no discriminar entre grupos de especies<sup>13</sup>.

### **Métodos moleculares**

Se intentó la identificación con métodos moleculares simples (PCR) pero resolvían el problema en forma parcial<sup>35</sup>. Más recientemente se han aplicado otros métodos moleculares para definir especies de EGV al menos dentro de alguno de esos cinco grupos. Por ejemplo, Olson y col. desarrollaron un método de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en tiempo real para identificar las especies que conforman el grupo *S. anginosus* tanto a partir de cultivo puro como de muestras de esputo de pacientes fibroquísticos<sup>80</sup>. No obstante es posible apelar a métodos moleculares más complejos (dos o tres métodos consecutivos o simultáneos, secuenciación, etc.), para poder identificar fehacientemente todos los EGV a nivel de especie<sup>28, 109</sup>. Se han desarrollado métodos basados en la secuenciación de genes específicos para la identificación de las especies correspondientes al grupo viridans. Los blancos moleculares utilizados fueron el gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal, la región espaciadora intergénica 16S-23S rRNA<sup>18</sup>, el gen de la D-alanina-D-alanina ligasa<sup>35</sup>, los genes de la hialuronato liasa<sup>108</sup> y el de la glucosiltransferasa<sup>46</sup>. Todos ellos presentan la dificultad de no poder diferenciar las

secuencias correspondientes a *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pseudopneumoniae* y *S. pneumoniae*, las que presentan más de un 99% de homología.

Los genes *sodA*<sup>87</sup> y *groESL*<sup>19</sup> fueron utilizados exitosamente como blancos en ensayos de PCR combinados con secuenciación y determinación de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de estreptococos del grupo *S. bovis*.

También se han ensayado otras metodologías como la espectrometría de masas, la que ha dado resultados promisorios para la diferenciación de algunas especies: *S. mitis/oralis*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. anginosus*, *S. intermedius* y *S. constellatus*<sup>4, 33</sup>.

## **Grupo *Streptococcus anginosus***

Los estreptococos del grupo *S. anginosus*, mal llamados también *Streptococcus milleri* o estreptococos del grupo milleri, son comensales habituales de la orofaringe, del tracto urogenital y forman parte de la microbiota gastrointestinal. Comprenden tres especies, *S. anginosus* propiamente dicho, *Streptococcus intermedius* y *S. constellatus*<sup>105</sup>.

Las colonias de estos estreptococos son pequeñas (no más de 0,5 mm de diámetro) y se caracterizan por presentar tanto hemólisis alfa, como beta o gamma y porque aglutinan con el antisuero F de Lancefield. Algunas cepas pueden hacerlo en forma cruzada con antisueros A, C, G o directamente no aglutinan con ninguno<sup>120</sup>.

Una característica de gran utilidad para la sospecha inicial es que, en alrededor de un 80% de los casos, sus colonias despiden un olor a caramelo característico<sup>14</sup>. Este olor se atribuye a la producción de diacetilo en concentraciones mayores de 22 mg/L<sup>20</sup>.

La mayoría de los integrantes de la especie *S. intermedius* carecen de antígenos de grupo (no serotificables). Los aislados  $\beta$ -hemolíticos en su mayoría pertenecen a la especie *S. constellatus* y se caracterizan porque las colonias son muy pequeñas (menos de 1 mm de diámetro) y el halo de hemólisis supera en cinco o más veces su diámetro.

Es notable la tendencia de las tres especies a producir infecciones piógenas: abscesos, empiemas, etc.<sup>92</sup>. Es importante este hecho para poder advertir al médico de la posible existencia de alguna colección purulenta cuando se aíslan estos microorganismos a partir de hemocultivos (posible absceso cerebral, pulmonar, hepático, etc.) o de líquido cefalorraquídeo (LCR) (posible absceso cerebral o empiema subdural). En la formación de abscesos se ha observado que los estreptococos del grupo *S. anginosus* estimulan la migración de neutrófilos en un grado inferior al que lo hacen otros EGV y *Staphylococcus aureus*. Incluso se constató que este fenómeno era más evidente en las especies *S. constellatus* y *S. intermedius* que en *S. anginosus*.

La inhibición de la quimiotaxis contribuye a su virulencia dado que produce la demora de la llegada de los polimorfonucleares al sitio de la infección. Éstos fagocitan mayor número de *S. anginosus* que de *S. aureus*, pero los matan más lentamente y no producen su destrucción completa. Esta resistencia a la acción de los leucocitos es esperable en microorganismos productores de abscesos<sup>115</sup>. Esto es coincidente con la



menor participación de *S. anginosus* respecto de *S. intermedius* y *S. constellatus* en la generación de abscesos. Según Clarridge y col. casi todos los aislados de *S. intermedius* y la mayoría de los de *S. constellatus* se asocian con abscesos, a diferencia de *S. anginosus* que sólo lo hace en un 19%<sup>21</sup>.

Antes de la década del 90, los EGV causaban entre un 30 y un 50% de los episodios de endocarditis infecciosa de válvula nativa<sup>90, 112</sup>. Aún actualmente siguen siendo la segunda causa de endocarditis infecciosa después de *Staphylococcus aureus* y representan el 23% de los casos<sup>74</sup>. Sin embargo, si contamos sólo los casos producidos por estreptococos del grupo *S. anginosus*, esa cifra cae al 1-2%. En un estudio de endocarditis por microorganismos de este grupo, se observó que en un 25% de los casos había un foco supurativo extracardíaco, en un 14% se produjeron abscesos intracardíacos y el 90% de los pacientes tenía regurgitación valvular<sup>61</sup>. Cuando se los detecta como agentes etiológicos de endocarditis es necesario descartar la presencia de abscesos perivalvulares<sup>2</sup>.

Como patógenos de cabeza y cuello, además de los ya mencionados abscesos cerebrales, pueden producir periodontitis, abscesos odontogénicos y sinusitis<sup>40</sup>. Se los ha aislado de abscesos esplénicos, hepáticos, pulmonares y de tejidos blandos, de neumonía, de abscesos peritoneales, colangitis, apendicitis, celulitis, osteomielitis e infecciones de heridas, solos o acompañados de otros patógenos<sup>38, 40, 58, 66, 85</sup>. En un estudio canadiense se observó que los miembros de este grupo eran responsables de tantas infecciones invasivas piógenas como el resto de los estreptococos tomados en conjunto<sup>60</sup>. *S. anginosus* frecuentemente se aísla de muestras urogenitales o gastrointestinales<sup>40</sup>, mientras que *S. constellatus* se obtiene a menudo de muestras

respiratorias como empiemas por complicaciones de neumonías adquiridas en la comunidad y *S. intermedius* de abscesos hepáticos y cerebrales<sup>118</sup>.

Actualmente se ha valorizado su rol en las exacerbaciones bronquiales en pacientes con fibrosis quística<sup>83, 102, 103</sup>.

Entre sus factores de virulencia se cuentan proteasas, glucosidasas (sialidasa), hialuronidasa, una proteína mitogénica de células B (inmunosupresora), una proteína que se une a la albúmina y una hemolisina (intermedilisina)<sup>75</sup> que es una citolisina específica de *S. intermedius* y está asociada a cepas obtenidas de sitios profundos<sup>101</sup>.

Se describió una subespecie, *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, asociada a faringitis aguda, cuyo impacto en este contexto es todavía incierto<sup>119</sup>. En 2013 se propusieron otras dos nuevas subespecies  $\beta$ -hemolíticas que fueron aisladas de las fauces y aglutinan con el antisuero C de Lancefield: *S. anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. y *S. constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov.<sup>50</sup> No obstante, los aislados correspondientes son escasos como para poder establecer cuál es la importancia de su diferenciación.

### **Grupo *Streptococcus mitis* (incluyendo al grupo *Streptococcus sanguinis*)**

El grupo *S. mitis* se caracteriza por ser bioquímicamente inerte. Esto dificulta la identificación por métodos fenotípicos. Si bien hay autores que separan a los grupos *S. sanguinis* y *S. mitis*, no es importante hacerlo, dado que las características clínicas de

uno y otro no parecen ser demasiado diferentes y se eliminan problemas taxonómicos que de otra manera podrían conducir a errores mayores<sup>26</sup>.

Es el grupo más frecuentemente aislado de hemocultivos de pacientes con endocarditis de válvula nativa, pero también se los aísla en casos de bacteriemia no significativa o seudobacteriemia (bacteriemia transitoria, contaminación a partir del sitio de punción). La bacteriemia es un hecho corriente en pacientes con cáncer que presentan mucositis y neutropenia causada por la toxicidad de los tratamientos antineoplásicos. En este contexto, los EGV aparecen entre los microorganismos más frecuentemente aislados y a su vez, dentro de éstos, prevalecen los del grupo *S. mitis*<sup>41</sup>,<sup>81</sup>. Estas bacteriemias pueden conducir a un síndrome de *shock* tóxico e incluso a la muerte<sup>81</sup>.

En la literatura se encuentran solo unos pocos casos de meningitis neonatal por estreptococos este grupo<sup>10, 42</sup>. También se los ha descrito en adultos en casos de meningitis primaria y en meningitis secundarias a anestesia espinal, pero en este contexto son más frecuentes los estreptococos del grupo *S. salivarius*<sup>73</sup>.

Dentro de este grupo, como ya se mencionó en el capítulo anterior, está la especie *Streptococcus pseudopneumoniae*, que, como su nombre lo indica, puede confundirse con *S. pneumoniae*, de mayor virulencia. En un estudio de 43 cepas de *S. mitis* y *S. pseudopneumoniae* se observó la presencia de entre un 67 y un 92% de genes de virulencia homólogos a los de *Streptococcus pneumoniae*, respectivamente<sup>51</sup>.

## Grupo *Streptococcus bovis*

Los estreptococos del grupo *S. bovis* son parte de la microbiota intestinal de un 5 a un 10% de los adultos sanos. Se diseminan por vía sanguínea desde su nicho ecológico habitual, el intestino y producen entre un 7 y un 14% de las endocarditis, además de casos puntuales de meningitis, artritis séptica y endoftalmitis. También son colonizantes intestinales de algunos animales<sup>114</sup>. Algunos de sus integrantes son relevantes en la industria alimentaria<sup>49</sup> y en la patología infecciosa de algunos animales<sup>24</sup>.

Actualmente se reconocen diversas especies y subespecies dentro de este grupo en base a sus características fenotípicas y genotípicas (Tabla 7): (a) *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, antiguamente denominado *S. bovis* I, (b) *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, previamente *S. bovis* II.2, (c) *Streptococcus infantarius*, que formaba parte del biotipo II/1 de *S. bovis*, con dos subespecies, *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* y *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. Esta especie y sus subespecies fueron definidas primeramente por Schlegel y col. en 2000 en base a hibridación ADN-ADN, ribotipificación y pruebas bioquímicas<sup>97</sup>. Dos años más tarde, Poyart y col., basados en las secuencias del gen que codifica para la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*sodA*) llegaron a la conclusión que *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* no era una subespecie sino una especie y la denominaron *Streptococcus luletiensis*<sup>87</sup>. Otras especies que pertenecen al grupo *S. bovis*, pero que han sido raramente relacionadas con infecciones humanas son

*Streptococcus equinus*, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* y *Streptococcus alactolyticus*<sup>67, 96, 111</sup>.

**Tabla 7.** Diferenciación de las especies del grupo *S. bovis*, de interés en clínica humana, por pruebas bioquímicas convencionales

Especie	Manitol	Almidón	Esculina	β - GUR
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> (ex bovis I)	+	+	+	-
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (ex-bovis II/2)	-	-	+	+
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> (ex- bovis II/1)	-	+	v	-
<i>S. lutetiensis</i> o <i>S. infantarius</i> subsp. <i>coli</i> (ex-bovis II/1)	-	v	+	-

Modificada de (Schlegel L et al. 2004)<sup>98</sup>  
 β - GUR: β - glucuronidasa

La endocarditis por EGV del grupo *S. bovis* se da principalmente en adultos mayores de 50 años (media 67 años), con frecuencia requiere de intervención quirúrgica (más del 70%) y presenta una elevada mortalidad (más del 40%)<sup>57</sup>. Es clásica la asociación de endocarditis por *S. bovis* con carcinoma de colon, especialmente el antiguo *S. bovis* I, actualmente denominado *S. gallolyticus* subsp.

*gallolyticus*<sup>37, 57</sup>. En un trabajo bastante reciente se demostró que *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* es portador de factores de virulencia que permiten su invasión al torrente circulatorio a través de lesiones colónicas premalignas, su evasión de los mecanismos innatos de inmunidad del paciente y la formación de vegetaciones en sitios ricos en colágeno (válvulas cardíacas dañadas y sitios precancerosos con desplazamiento de epitelios)<sup>11</sup>. Otro trabajo atribuyó a *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* un rol etiológico respecto del cáncer de colon. Sus fundamentos fueron: el potencial proinflamatorio de esta bacteria y sus propiedades procarcinogénicas, su capacidad selectiva de adherirse a tejidos tumorales, su colonización selectiva de células tumorales, el microambiente apropiado de los tumores para su proliferación, la capacidad de ruptura de tejidos y capilares para pasar al torrente sanguíneo y su capacidad de inducción de liberación de citoquinas y factores transcripcionales<sup>1</sup>.

*S. infantarius*, sin discriminar entre subespecies se encontró asociado a bacteriemia en pacientes portadores de cáncer no colónico, especialmente de páncreas e hígado<sup>22</sup>. También se describieron casos raros de meningitis por estreptococos del grupo *S. bovis* en neonatos como complicaciones de septicemia y más raramente aún en adultos. *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* ha sido una de las subespecies más implicadas en este tipo de infecciones<sup>32, 55, 104, 108</sup>. En un estudio de bacteriemias por estreptococos del grupo *S. bovis*, se vio que ninguno de los 17 aislamientos de *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* estaba asociado a endocarditis<sup>8</sup>. Otro estudio muy reciente describió a *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* como patógeno de las vías urinarias, a diferencia de otras especies y subespecies del grupo *S. bovis*<sup>69</sup>.

## **Grupo *Streptococcus salivarius***

Dentro de este grupo se encuentran tres especies: *S. salivarius* propiamente dicha, *Streptococcus thermophilus* y *Streptococcus vestibularis*. En materiales clínicos humanos sólo se describieron *S. salivarius* y *S. vestibularis*.

Los estreptococos del grupo *S. salivarius* son habitantes del dorso de la lengua<sup>53</sup> y contaminantes habituales de las muestras de hemocultivos. No obstante, son agentes causales de bacteriemias y endocarditis y son los microorganismos más frecuentemente aislados de meningitis secundarias a punciones lumbares<sup>6</sup>. Se describieron también algunos casos de meningitis posteriores a la aplicación de anestesia peridural vinculados a la presencia de la misma cepa en el líquido cefalorraquídeo del paciente y entre la microbiota oral del anestesista<sup>99</sup>. Su aislamiento a partir de hemocultivos se ha asociado en alguna medida a neoplasias<sup>94</sup>.

*S. vestibularis* solo ha sido documentado solo en un caso de endocarditis de válvula nativa y espondilodiscitis<sup>113</sup>.

## **Grupo *Streptococcus mutans***

Dentro del grupo *S. mutans* se incluyen *Streptococcus mutans* propiamente dicho y *Streptococcus sobrinus* como las dos especies más comúnmente aisladas a partir de infecciones en seres humanos. Estos microorganismos son comensales

habituales de la cavidad oral. Otras especies (*S. criceti*, *S. rattii* y *S. downei*) sólo ocasionalmente fueron aisladas de infecciones humanas. *S. ferus*, *S. macacae*, *S. hyovaginalis* y *S. devriesei* sólo se obtuvieron de animales<sup>105</sup>. Originalmente los microorganismos de la especie *S. mutans* se clasificaron en cuatro serotipos: *c*, *e*, *f* y *k* en base a sus polímeros de ramnosa con cadenas laterales de glucosa<sup>77</sup>.

La patología más frecuentemente asociada con los EGV de este grupo es la caries dental. Se calcula que a los 18 años el 85% de la población ha padecido al menos una vez de caries<sup>105</sup>. Ocasionalmente también se los aisla a partir de hemocultivos de pacientes con bacteriemia y endocarditis infecciosa subaguda<sup>34, 79</sup>. La presencia de estreptococos del grupo *S. mutans* en sangre es prácticamente sinónimo de esta entidad clínica. El paso inicial se piensa que es su supervivencia prolongada en la sangre. Nakano y col. observaron que un gen regulador de la formación de biofilms (*brpA*) estaría involucrado en la virulencia de *S. mutans* debido a su correlación con la sensibilidad a la fagocitosis y a su propiedad de producir agregación plaquetaria<sup>76</sup>. Investigadores del mismo grupo sugirieron que cepas de *S. mutans* con proteínas ligadoras de colágeno pero que no expresaban el antígeno proteico de 190 kDa podrían ser más aptas para la producción de endocarditis<sup>78</sup>.

Los estreptococos del grupo *S. mutans* se caracterizan por producir polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa y por su capacidad de fermentar diversos carbohidratos. Estas bacterias pueden presentar una morfología atípica, irregular al microscopio, que fue lo que dio origen a su nombre. En agar sangre las colonias de la especie *S. mutans* suelen ser adherentes, duras y  $\alpha$ -hemolíticas<sup>105</sup>. Bajo condiciones anaeróbicas los microorganismos pueden presentar hemólisis beta. Por su



parte, principalmente las colonias de *S. sobrinus*, no producen hemólisis, aunque pueden ser ocasionalmente  $\alpha$ -hemolíticas.

## Otros estreptococos

### *Streptococcus suis*

*S. suis* no ha sido considerado como componente del grupo de los EGV. Su característica de presentar hemólisis alfa o gamma en agar sangre ovina hace que tengamos que describirlo en este capítulo. No obstante, al presentar hemólisis beta en agar sangre humana, también lo incluimos en las tablas diferenciales de los  $\beta$ -hemolíticos (capítulo IIb.1. Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos)

Se trata de un patógeno que afecta principalmente al ganado porcino. El primer caso humano de una infección por *S. suis* fue reportado en Dinamarca en 1968<sup>84</sup>. Luego se describieron casos puntuales, especialmente en Europa y en Asia<sup>65, 117</sup>.

Las infecciones por *S. suis* constituyen actualmente un problema económico importante para la industria del ganado porcino a nivel mundial. Las infecciones humanas se dan esporádicamente en personas que trabajan con cerdos o con sus derivados. No obstante, el brote de infecciones ocurrido en China en 2005 que afectó a más de 200 personas con una mortalidad del 20% ha cambiado la perspectiva en lo que concierne a la epidemiología de las infecciones humanas<sup>39</sup>. Comúnmente produce meningitis purulenta, aunque también se aisló como agente causal de endocarditis, celulitis, peritonitis, rabdomiolisis, artritis, espónidilodiscitis, neumonía, uveítis y

endoftalmitis. Lo más notable del brote de China fue la alta incidencia de enfermedad sistémica con un muy bajo número de casos de meningitis. Principalmente se trató de casos de septicemia y *shock* séptico, de características similares a las del *shock* tóxico estreptocócico<sup>117</sup>.

Los factores de virulencia fueron estudiados en cepas del serotipo 2, el más frecuente en infecciones humanas. El factor más crítico comprobado de virulencia es el polisacárido capsular, aunque hay cepas no virulentas no capsuladas. Esto indica que deben existir otros factores de virulencia también esenciales. Otros probables factores de virulencia son: una proteína liberada por la muramidasa (MRP), la proteína 1 de superficie, un factor similar al de opacidad sérica de *S. pyogenes*, y una proteasa de superficie similar a la subtilisina<sup>39</sup>.

Se describieron cuatro complejos clonales principales (CC; CC–ST1, CC–ST16, CC–ST25, y CC–ST27). Entre ellos, el CC–ST1, es el más virulento e incluye el ST1, que se diseminó en casi todo el mundo y el ST7, responsable del brote epidémico ocurrido en China<sup>121</sup>.

*S. suis* desarrolla rápidamente en los medios habitualmente utilizados para hemocultivos o cultivos de LCR. Sin embargo, si no se lo sospecha, puede llegar a confundirse con enterococos, EGV, neumococos y hasta con *Listeria*. En muchos casos los cocos gram positivos capsulados que se observan en la coloración de Gram hacen presumir la presencia de *S. pneumoniae*.

Producen hemólisis en agar sangre humana pero no en agar sangre ovina. Los determinantes antigénicos de su pared comparten epitopes con el grupo D de Lancefield y es así que puede dar reacciones de aglutinación cruzadas con este grupo

en pruebas con partículas de látex. A diferencia de los enterococos, dan negativas las pruebas de bilis esculina y tolerancia a 6,5% de NaCl, pero dan positivas las pruebas de pirrolidónilarginilamidasa (PYR) y leucinaminopeptidasa (LAP). Además de por la prueba de PYR se diferencian de los estreptococos del grupo *S. bovis* por dar negativa la prueba de Voges-Proskauer y la de bilis esculina, aunque dan positiva la prueba de amilasa<sup>64</sup>.

Los métodos miniaturizados (API 20 Strep, BBL Crystal Gram-p ositive ID kit) y automatizados (Vitek, Phoenix) en algunos casos pueden dar resultados incorrectos de identificación. Recientemente han sido introducidas técnicas de PCR para detectar *S. suis* directamente de LCR. Lamentablemente sólo detectan cepas del serotipo 2 y éste no es el único serotipo capaz de producir infecciones en el hombre. El serotipo 14 ha producido infecciones en Tailandia y recientemente en los Estados Unidos y se vieron casos esporádicos producidos por cepas de los serotipos 4, 1 y 16.

En general son sensibles a penicilinas y cefalosporinas de tercera generación, antibióticos utilizados en el tratamiento empírico inicial de meningitis. No obstante se han detectado aislados resistentes a penicilina en humanos<sup>100</sup> y en cerdos<sup>68, 122</sup>. El mecanismo involucrado es la modificación de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP)<sup>15</sup>. También se detectado la resistencia a cefalosporinas de tercera generación<sup>47</sup> y muy frecuentemente la resistencia a altos niveles de aminoglucósidos<sup>44, 68, 116</sup>. También se ha observado la resistencia a los inhibidores del folato, raramente a cloranfenicol, ocasionalmente a fluoroquinolonas y altísimos porcentajes de resistencia a tetraciclinas (>90%) y a los macrólidos (>70%) en bacterias obtenidas de cerdos, pero también en humanos<sup>44</sup>. Por análisis de secuencias de su ADN se han identificado

determinantes de resistencia para tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, inhibidores de la síntesis de folatos y cloranfenicol. Estos genes se encontraron en elementos genéticos integrativos y conjugativos (transposones, islas genómicas, fagos, etc.) similares a los que se describieron en *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus agalactiae*<sup>82</sup>.

Es importante sospechar la presencia de *S. suis* cuando se aísla un estreptococo  $\alpha$ -hemolítico en muestras de sangre y especialmente de LCR de pacientes con antecedentes epidemiológicos compatibles.

Ante la sospecha de que el agente causal de una meningitis purulenta primaria pueda tratarse de un EGV, es imprescindible descartar que se trate de *S. pneumoniae* con características anómalas o de *S. suis*.

En una revisión de 20 años de meningitis estreptocócica, sin considerar a los neumococos, Møller y col. describieron cuatro casos producidos por estreptococos del grupo *S. mitis*, 2 por grupo *S. anginosus* y uno del grupo *S. bovis*, al margen de tres no identificados, todos en pacientes adultos. Dos del grupo *S. mitis* estaban asociados a anestesia espinal o epidural, pero los otros dos no tenían factores predisponentes y uno de ellos falleció. De los dos del grupo *S. anginosus*, uno comenzó con una periodontitis que condujo a un absceso cerebral y el otro era un paciente diabético con enfermedad de Parkinson e infección urinaria. El único caso debido a *S. bovis*, se dio en una paciente con carcinoma de mama. La bacteria no fue identificada a nivel de especie<sup>73</sup>. No obstante, hay informes de casos que asocian meningitis iatrogénicas con otros grupo de especies: *S. salivarius*<sup>16, 36, 48</sup> y *S. bovis*<sup>36</sup>. Gelfand et al. también encontraron que los del grupo *S. mitis* podían aislarse en meningitis posteriores a

mielografías (N=5)<sup>35</sup>. La diferenciación es importante porque la meningitis por *S. suis* tiene por secuela frecuente a la hipoacusia y es con frecuencia una enfermedad profesional que puede ser recurrente si continua la exposición a este agente<sup>100</sup>.

### ***Streptococcus hongkongensis***

Recientemente se propuso el nombre de *Streptococcus hongkongensis* para designar a un estreptococo aislado de una herida infectada producida por la aleta de un pez marino<sup>59</sup>. Esta bacteria no produce hemólisis en agar sangre ovina, se dispone en cadenas y es ureasa y Voges-Proskauer negativa. Aglutina con antisuero del grupo G de Lancefield, crece en bilis esculina y en NaCl al 5%. El análisis de la secuencia de su gen 16S rRNA indicó que la bacteria tenía un 98,2%, un 97,7%, un 97,4% y un 97.1 % de identidad de nucleótidos respecto de *Streptococcus iniae*, *Streptococcus pseudoporcinus*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis*, respectivamente. Estas últimas especies son patógenas para el ganado bovino. Otros dos aislados de *S. hongkongensis* fueron obtenidos de sendos peces marinos. El análisis filogenético demostró que estos aislados formaban una rama separada dentro del género *Streptococcus* relacionada con *S. parauberis*.

### **Sensibilidad a los antibióticos y pautas de tratamiento**

Durante mucho tiempo se consideró que los EGV eran uniformemente sensibles a la penicilina (PEN). Sin embargo, antes del uso clínico de este antibiótico, Fleming ya

había observado que algunos aislamientos pertenecientes a este grupo presentaban menor sensibilidad en comparación con otros estreptococos. En la década del 40 se describieron algunos aislamientos de EGV con sensibilidad disminuida a PEN<sup>52</sup>. Bourgault et al., en 1979, describieron hasta un 10% de EGV con CIM superiores a 0,06 µg/ml<sup>12</sup>. Otros autores en diferentes países publicaron el hallazgo de EGV resistentes a PEN, con CIM relativamente más elevadas como parte de la microbiota oral de pacientes que habían recibido profilaxis con este antibiótico<sup>43, 106</sup>. Más tarde se registraron porcentajes muy altos de EGV no sensibles a PEN, especialmente en centros donde atendían a pacientes inmunocomprometidos<sup>17, 27, 31, 72</sup>. En la Argentina se observaron porcentajes significativos de EGV no sensibles a la PEN (desde 38% hasta 66% en sendos trabajos de un hospital pediátrico que atiende numerosos pacientes oncológicos)<sup>63, 95</sup>. Sin embargo, cuando se realizó un estudio multicéntrico nacional esos porcentajes cayeron en forma significativa (27,5%)<sup>62</sup>. La resistencia está asociada principalmente a los estreptococos del grupo *S. mitis*, grupo que estuvo más representado en los dos primeros que en el tercero (multicéntrico) de los trabajos argentinos.

La resistencia a macrólidos ha estado muy asociada con la resistencia a penicilina, tanto en otros países como en la Argentina. En el estudio multicéntrico argentino se registró un 28,2% de EGV no sensibles a eritromicina y un 24,1% de no sensibles a clindamicina<sup>62</sup>.

Se han encontrado principalmente los fenotipos cMLS<sub>B</sub> y M, con la presencia de los genes *ermB* y *mefA*, respectivamente<sup>29</sup>. No obstante, en el estudio multicéntrico argentino la resistencia a macrólidos estuvo casi equivalentemente representada por

los fenotipos cMLS<sub>B</sub> (30%), iMLS<sub>B</sub> (33%) y M (36%)<sup>62</sup>. En *S. lutetiensis* se describió la portación del gen *InuB* que determina la resistencia a lincosamidas sin afectar a los macrólidos<sup>3</sup>.

También como un hecho puntual se publicó el hallazgo de una cepa de *S. sanguinis* con una CIM de 32 µg/ml para linezolid por presentar mutaciones en la subunidad 23S del ARN ribosomal y en la proteína L22<sup>70</sup>.

Se ha visto que la resistencia a tetraciclina estaba principalmente determinada por los genes *tetM* y *tetO* y que la resistencia a fluoroquinolonas, menos frecuente, por los genes *parC*, *parE*, *gyrA* y *gyrB*<sup>72</sup>.

Por primera vez se publicó el supuesto hallazgo de una cepa de *S. mitis* resistente a vancomicina en Eslovaquia en 1996<sup>56</sup>. Si bien los autores reportaron el hallazgo de una cepa con CIM de 32 µg/ml de teicoplanina y de vancomicina, no mencionaron cómo se realizaron esas pruebas de sensibilidad. La identificación a nivel de especie también pudo ser errónea dado que fue realizada con un método automatizado (Vitek Jr.) y no por secuenciación de genes específicos. Tampoco hay indicios de que la cepa se hubiera enviado a algún centro de referencia.

La resistencia a vancomicina (Van B) se observó fehacientemente en una cepa del grupo *S. bovis* (*S. lutetiensis*) obtenida de materia fecal de un ser humano<sup>86</sup>. También fueron varios los aislamientos de *S. gallolyticus* y *S. lutetiensis* obtenidos de ganado vacuno que portaban los genes *van A*, *van B* y ambos a la vez<sup>25, 71</sup>. Recientemente se describió el hallazgo de una cepa de *S. anginosus* resistente a vancomicina, aislada de una muestra de orina. Se determinó que era portadora del mecanismo VanG. El marcador genético *vanG1* presentaba homología con el

encontrado en *Enterococcus faecalis* y con uno de dos aislamientos recientes de *Streptococcus agalactiae*<sup>107</sup>.

## Bibliografía

1. Abdulmir AS, Hafidh RR, Abu Bakar F. The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. J Expl Clin Cancer Res. 2011; 30:11.
2. Adolf W, Karchmer AW, Torchiana DF, Chae CU, Afridi, NA, Houser SL. Case 29-2004: a 75-year-old woman with acute onset of chest pain followed by fever. N Engl J Med. 2004;351:1240-8.
3. Almuzara M, Bonofiglio L, Cittadini R, Vera Ocampo C, Montilla A, Del Castillo M, Ramírez MS, Mollerach M, Vay C. First case of *Streptococcus lutetiensis* bacteremia involving a clindamycin-resistant isolate carrying the *InuB* gene. J Clin Microbiol. 2013;51:4259-61
4. Angeletti S, Dicuonzo G, Avola A, Crea F, Dedej E, Vailati F, Farina C, De Florio L. Viridans group streptococci clinical isolates: MALDI-TOF mass spectrometry versus gene sequence-based identification. PLoS ONE. 2015;10: e0120502.
5. Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho MGS, Steigerwalt AG, Morey RE, Jackson D, Davidson RJ, Facklam RR. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and a description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4686-96.
6. Baer ET. Iatrogenic meningitis: the case for face masks. Clin Infect Dis. 2000; 31: 519-21.



7. Balsalobre L, Hernández Madrid A, Llull D, Martín Galiano AJ, García E, Fenoll A, de la Campa AG. Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4163-71.
8. Beck M, Frodl R, Funke G. Comprehensive study of strains of previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2966-72.
9. Beighton D, Hardie JM, Whitley RA. A scheme for the identification of viridans streptococci *J Med Microbiol.* 1991; 35: 367-72.
10. Bignardo GE, Isaacs D. Neonatal meningitis due to *Streptococcus mitis*. *Rev Infect Dis.* 1989; 11: 86-88.
11. Boleij A, Muijtjens CMJ, Bukhari SI, Cayet N, Glaser P, Hermans PWM, Swinkels DW, Bolhuis A, Tjalsma H. Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with colorectal cancer. *J Infect Dis.* 2011; 203: 1101-9.
12. Bourgault AM, Wilson WR, Washington JA 2nd. Antimicrobial susceptibilities of species of viridans streptococci. *J Infect Dis.* 1979;140:316-21.
13. Brigante G, Luzzaro F, Bettaccini A. Use of Phoenix automated system for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3263-7.
14. Brogan O, Malone J, Fox C, Whyte AS. Lancefield grouping and smell of caramel for presumptive identification and assessment of pathogenicity in the *Streptococcus milleri* group. *J Clin Pathol.* 1997; 50: 332-5.
15. Cain D, Malouin F, Dargis M, Harel J, Gottschalk M. Alterations in penicillin-binding proteins in strains of *Streptococcus suis* possessing moderate and high levels of resistance to penicillin. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 130: 12-7.

16. Carley N. *Streptococcus salivarius* bacteriemia and meningitis following upper gastrointestinal endoscopy and cauterization for gastric bleeding. Clin Infect Dis. 1992; 14: 947-8.
17. Carratalá J, Alcaide F, Fernández-Sevilla A, Corbella X, Liñares J, Gudiol F. Bacteremia due to viridans streptococci that are highly resistant to penicillin: increase among neutropenic patients with cancer. Clin Infect Dis. 1995; 20: 1169-73.
18. Chen CC, Teng LJ, Chang TC. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. J Clin Microbiol. 2004;42:2651-7.
19. Chen H-J, Tsai J-C, Chang T-C, Hung W-C, Tseng S-P, Hsueh P-R, Teng L-J. PCR-RFLP assay for species and subspecies differentiation of the *Streptococcus bovis* group based on *groESL* sequences. J Med Microbiol. 2008;57:432-8.
20. Chew TA, Smith JMB. Detection of diacetyl (caramel odor) in presumptive identification of the "*Streptococcus milleri*" group. J Clin Microbiol. 1992; 30: 3028-9
21. Clarridge JE, Attorri S, Musher DM, Hebert J, Dunbar S. *S. intermedius*, *S. constellatus*, and *S. anginosus* ("*Streptococcus milleri* group") are not equally associated with abscess. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1511-5.
22. Corredoira J, Alonso M del P, Varela J. Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/1) bacteremia and noncolonic cancer. J Clin Microbiol. 2008; 46: 1570.
23. Cortés PR, Albarracín Orio AG, Regueira M, Piñas GE, Echenique J. Characterization of in vitro-generated and clinical optochin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentina. J Clin Microbiol. 2008; 46:1930-4.
24. Counihan KL, Gill VA, Miller MA, Burek-Huntington KA, LeFebvre RB, Byrne BA. Pathogenesis of *Streptococcus infantarius* subspecies *coli* isolated from sea otters with infective endocarditis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2015;40:7-17

25. Dahl KH, Sundsfjord A. Transferable *vanB2 Tn5382*-containing elements in fecal streptococcal strains from veal calves. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2579-83.
26. Doern CD, Burnham CA. It's not easy being green: the viridans group streptococci with a focus on pediatric clinical manifestations. *J Clin Microbiol.* 48:3829-35.
27. Doern GV, Ferraro MJ, Brueggemann AB, Ruoff KL. Emergence of high rates of antimicrobial resistance among viridans group streptococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 891-4.
28. Drancourt M, Roux V, Fournier PE, Raoult D. *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 497–504.
29. Ergin A, Ercis S, Hasçelik G. Macrolide resistance mechanisms and in vitro susceptibility patterns of viridans group streptococci isolated from blood cultures. *J Antimicrob Chemother.* 2006 57:139-41.
30. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 613-30.
31. Farber BF, Eliopoulos GM, Ward JI, Ruoff KL, Syriopoulou V, Moellering RC Jr. Multiply resistant viridans streptococci: susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics and comparison of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 24: 702-5.
32. Floret N, Bailly P, Thouverez M, Blanchot C, Alez-Martin D, Menget A, Thiriez G, Hoen B, Talon D, Bertrand X. A cluster of bloodstream infections caused by *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* that involved 5 preterm neonates in a university hospital during a 2-month period. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010; 31: 194-6.
33. Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K. Rapid identification of viridians streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2392-7.

34. Fujiwara T, Nakano K, Kawaguchi M, Ooshima T, Sobue, Kawabata S, Nakagawa I, Hamada S. Biochemical and genetic characterization of serologically untypable *Streptococcus mutans* strains isolated from patients with bacteremia. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109: 330-4.
35. Garnier F, Gerbaud G, Courvalin P, Galimand M. Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2337-41.
36. Gelfand MS, Abolnik IZ. Streptococcal meningitis complicating diagnostic myelography: three cases and review. *Clin Infect Dis.* 1995; 20: 582-7.
37. González-Juanatey C, González-Gay MA, Llorca J, Testa A, Corredoira J, Vidán J, Mayo J, González-Juanatey JR. Infective endocarditis due to *Streptococcus bovis* in a series of nonadict patients: clinical and morphological characteristics of 20 cases and review of the literature. *Can J Cardiol.* 2003; 19: 1139-45.
38. Gossling J. Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. *Rev Infect Dis.* 1988; 10: 257-85.
39. Gottschalk M, Xu J, Lecours MP, Grenier D, Fittipaldi N, Segura M. *Streptococcus suis* infections in humans: what is the prognosis for Western countries. *Clin Microbiol Newsl.* 2010; 32: 89-102.
40. Gray T. *Streptococcus anginosus* group: clinical significance of an important group of pathogens. *Clin Microbiol Newsl.* 2005; 27: 155-9.
41. Han XY, Kamana M, Rolston KVI. Viridans streptococci isolated by culture from blood of cancer patients: clinical and microbiologic analysis of 50 cases. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 160-5.
42. Hellwege HH, Ram W, Scherf H, Fock R. Neonatal meningitis caused by *Streptococcus mitis*. *Lancet.* 1984; i:743-4.
43. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Jouy E, Butaye P, Franco A, Utinane A, Amado A, Moreno M, Greko C, Stärk K D, Berghold C, Myllyniemi AL, Hosszowski A, Sunde M, Aarestrup FM. Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator

- bacteria in pigs in different European countries from year 2002–2004: the ARBAO-II study. *Acta Vet Scand.* 2008;50:19.
44. Hess J, Holloway Y, Dankert J. Penicillin prophylaxis in children with cardiac disease: postextraction bacteremia and penicillin-resistant strains of viridans streptococci. *J Infect Dis.* 1983; 147: 133-6.
  45. Hinnebusch CJ, Nikolai DM, Bruckner DA. Comparison of API Rapid STREP, Baxter Microscan Rapid Pos ID panel, BBL Minitek Differential Identification system, IDS RapID STR system and Vitek GPI to conventional biochemical tests for identification of viridans streptococci. *Am J Clin Pathol.* 1991; 96: 459-63.
  46. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 48: 195-9.
  47. Hu P, Yang M, Zhang A, Wu J, Chen B, Hua Y, Yu J, Xiao J, Jin M. Comparative genomics study of multi-drug-resistance mechanisms in the antibiotic-resistant *Streptococcus suis* R61 strain. *PLoS One.* 2011;6(9):e24988.
  48. Idigoras P, Valiente A, Iglesias L, Trieu-Cuot P, Poyart C. Meningitis due to *S. salivarius*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3017.
  49. Jans C, Lacroix C, Meile L. A novel multiplex PCR/RFLP assay for the identification of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members from dairy microbial communities based on the 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;326:144-50.
  50. Jensen A, Hoshino T, Kilian M. Taxonomy of the anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(Pt 7):2506-19.

51. Johnston C, Hinds J, Smith A, van der Linden M, Van Eldere J, Mitchell TJ. Detection of large numbers of pneumococcal virulence genes in streptococci of the mitis group. J Clin Microbiol. 2010; 48: 2762-9.
52. Kaye D, McCormack RC, Hook EW. Bacterial endocarditis: the changing pattern since the introduction of penicillin therapy. Antimicrob Agents Chemother. 1962; 1:37-46.
53. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. J Clin Microbiol. 2003; 41: 558-63.
54. Keith ER, Podmore RG, Anderson TP, Murdoch DR. Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples. J Clin Microbiol 2006; 44: 923-7.
55. Klatte JM, Clarridge III JE, Bratcher D, Selvarangan R. A longitudinal case series description of meningitis due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* in infants. J Clin Microbiol. 2012; 50: 57-60.
56. Krcmery V Jr., Spanik S, Trupl J. First report of vancomycin-resistant *Streptococcus mitis* bacteremia in a leukemic patient after prophylaxis with quinolones and during treatment with vancomycin. J Chemother. 1996; 8: 325-6.
57. Kupferwasser I, Darius H, Müller AM, Mohr-Kahaly S, Westermeier T, Oelert H, Erbel R, Meyer J. Clinical and morphological characteristics in *Streptococcus bovis* endocarditis: a comparison with other causative microorganisms in 177 cases. Heart. 1998; 80: 276-80.
58. Lamothe M. *Streptococcus milleri*. An important but unappreciated pathogen. Infect Dis Newsl. 1990; 9: 52-5.
59. Lau SK, Curreem SO, Lin CC, Fung AM, Yuen KY, Woo PC. *Streptococcus hongkongensis* sp. nov., isolated from a patient with an infected puncture wound and from a marine flatfish. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(Pt 7):2570-6.

60. Laupland KB, Ros T, Church DL, Gregson DB. Population-based surveillance of invasive pyogenic streptococcal infection in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12: 224-30.
61. Lefort A, Lortholary O, Casassus P, Selton-Suty C, Guillevin L, Mainardi JL, Beta-Hemolytic Streptococci Infective Endocarditis Study Group. Comparison between adult endocarditis due to beta-hemolytic streptococci (serogroups A, B, C, and G) and *Streptococcus milleri*: a multicenter study in France. *Arch Intern Med.* 2002;162:2450-6.
62. Lopardo H, Blanco A, Vigliarolo L, Gagetti P, Corso A, y grupo colaborativo de la Red WHONET. Estudio multicéntrico nacional de resistencia a los antibióticos en estreptococos del grupo viridans. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología, Rosario, 9-11 de octubre de 2008.
63. Lopardo H, Vidal P, Bottero D, Moviglia AM, Gobet LM. Is the diffusion method appropriate to determine the susceptibility to penicillin of viridans group streptococci? Resumen T-287. *Rev Esp Quimioter.* 2000;13(Supl. 2):104. 3rd European Congress of Chemotherapy, Madrid, 7 –10 de mayo de 2000.
64. Lopreto C, Lopardo H, Bardi MC, Gottschalk M. Meningitis primaria por *Streptococcus suis*: primer caso en humanos descrito en América Latina. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2005; 23: 110-2.
65. Lun Z. R., Wang Q. P., Chen X. G., Li A. X., Zhu X. Q. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:201-9.
66. Maliyil J, Caire W, Nair R, Bridges D. Splenic abscess and multiple brain abscesses caused by *Streptococcus intermedius* in a young healthy man. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 2011; 24: 195-9.
67. Malkin J, Kimmitt PT, Ou HY, Bhasker PS, Khare M, Deng Z, Stephenson I, Sosnowski AW, Perera N, Rajakumar K. Identification of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* as the etiological agent in a case of culture-negative multivalve infective endocarditis by 16S rDNA PCR analysis of resected valvular tissue. *J Heart Valve Dis.* 2008;17:589-92.

68. Marie J, Morvan H, Berthelot-Hérault F, Sanders P, Kempf I, Gautier-Bouchardon AV, Jouy E, Kobisch M. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:201-9.
69. Matesanz M, Rubal D, Iñiguez I, Rabuñal R, García Garrote F, Coira A, García País MJ, Pita J, Rodríguez Macías A, López Álvarez MJ, Alonso MP, Corredoira J. Is *Streptococcus bovis* a urinary pathogen? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34:719-25.
70. Mendes RE, Deshpande LM, Kim J, Myers DS, Ross JE, Jones RN. *Streptococcus sanguinis* isolate displaying a phenotype with cross-resistance to several rRNA-targeting agents. *J Clin Microbiol.* 2013; 51:2728-31.
71. Mevius D, Devriese L, Butaye P, Vandamme P, Verschure M, Veldman K. Isolation of glycopeptide resistant *Streptococcus gallolyticus* strains with *vanA*, *vanB*, and both *vanA* and *vanB* genotypes from faecal samples of veal calves in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:275-6.
72. Moet GJ, Dowzicky MJ, Jones RN. Tigecycline (GAR-936) activity against *Streptococcus gallolyticus (bovis)* and viridans group streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57:333-6.
73. Møller K, Frederiksen EH, Wandall JH, Skinhøj P. Meningitis caused by streptococci other than *Streptococcus pneumoniae*: a retrospective clinical study. *Scand J Infect Dis.* 1999; 31: 375-81.
74. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG Jr, Bayer AS, Karchmer AW, Olaison L, Pappas PA, Moreillon P, Chambers ST, Chu VH, Falcó V, Holland DJ, Jones P, Klein JL, Raymond NJ, Read KM, Tripodi MF, Utili R, Wang A, Woods CW, Cabell CH; International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study (ICE-PCS) Investigators. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century. *Arch Intern Med.* 2009;169:463-73.



75. Nagamune H, Whiley RA, Goto T, Inai Y, Maeda T, Hardie JM, Kourai H. Distribution of the *intermedilysin* gene among the anginosus group streptococci and correlation between *intermedilysin* production and deep-seated infection with *Streptococcus intermedius*. J Clin Microbiol. 2000; 38: 220-6.
76. Nakano K, Fujita K, Nishimura R, Ooshima T. Contribution of biofilm protein A of *Streptococcus mutans*, to systemic virulence. Microbes Infect. 2005; 7: 1246-55.
77. Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Mukai T, Yoshioka H, Shudo Y, Hata H, toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of novel serotype *k* *Streptococcus mutans* in infective endocarditis patients. J. Med Microbiol. 2007; 56: 1413-5.
78. Nomura R, Naka S, Nemoto H, Otsugu M, Nakamura S, Ooshima T, Nakano K. Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. Arch Oral Biol. 2013;58:1627-34.
79. Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, Taniguchi K, Takeda M, Yoshioka H, Amano A, Ooshima T. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. J Med Microbiol. 2006; 55: 1135-40.
80. Olson AB, Sibley CD, Schmidt L, Wilcox MA, Surette MG, Corbett CR. Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* group from cystic fibrosis clinical specimens by targeting the *cpn60* and 16S rRNA genes. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1150-60.
81. Paganini H, Staffolani V, Zubizarreta P, Casimir L, Lopardo H, Luppino V. Viridans streptococci bacteraemia in children with fever and neutropenia: a case-control study of predisposing factors. Eur J Cancer. 2003; 39: 1284-9.
82. Palmieri C, Varaldo PE, Facinelli B. *Streptococcus suis*, an emerging drug-resistant animal and human pathogen. Front Microbiol. 2011;2:235.

83. Parkins MD, Sibley CD, Surette MG, Rabin HR. The *Streptococcus milleri* group-an unrecognized cause of disease in cystic fibrosis: a case series and literature review. *Pediatr Pulmonol.* 2008; 43:490-7.
84. Perch B, Kristjansen P, Skadhauge K. Group R streptococci pathogenic for man: two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1968;74:69-76.
85. Piscitelli SC, Shwed J, Schreckenberger P, Danziger LH. *Streptococcus milleri* group: renewed interest in an elusive pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992; 11: 491-8
86. Poyart C, Quesne G, Trieu-Cuot P. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* as *Streptococcus luletiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52: 1247-55.
87. Poyart C, Pierre C, Quesne G, Pron B, Berche P, Trieu-Cuot P. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:24-9.
88. Quinn JP, Di Vincenzo C, Lucks DA, Luskin RL, Shatzer KL, Lerner SA. Serious infections due to penicillin-resistant strains of viridans streptococci with altered penicillin-binding proteins. *J Infect Dis.* 1988; 157: 764-9.
89. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV. Accuracy of phenotypic methods for identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates included in surveillance programs. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2184-8.
90. Roberts RB, Krieger AG, Schiller NL, Gross KC. Viridans streptococcal endocarditis: the role of various species, including pyridoxal-dependent streptococci. *Rev Infect.Dis.* 1979;1:955-66.

91. Romero B, Morosini MI, Loza E, Rodríguez Baños M, Navas E, Cantón R. Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? J Clin Microbiol. 2011; 49: 3228-33.
92. Ruoff KL, Ferraro MJ. Presumptive identification of "*Streptococcus milleri*" in 5 h. J Clin Microbiol. 1986; 24: 495-7.
93. Ruoff KL, Miller SI, Garner CV, Ferraro MJ, Calderwood SB. Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates. J Clin Microbiol. 1989;27:305-8.
94. Ruoff KL. *Streptococcus anginosus* ("*Streptococcus milleri*"): the unrecognized pathogen. Clin Microbiol Rev. 1988; 1: 102-8.
95. Santander C, Lopardo H, Vidal P, Ruboglio E. Viridans streptococci vs. antibiotics used for the treatment of febrile neutropenic patients. 94th General Meeting of the American Society for Microbiology. Las Vegas, mayo de 1994.
96. Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PAD, Bouvet A. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53(Pt 3):631-45
97. Schlegel L, Grimont F, Collins MD, Régnault B, Grimont PAD, Bouvet A. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50:1425-34.
98. Schlegel L, Grimont F, Grimont PAD, Bouvet A. New group D streptococcal species. Indian J Med Res. 2004; 119 (Suppl): 252-6.

99. Shewmaker PL, Gertz RE, Kim CY, de Fijter S, DiOrio M, Moore MR, Beall B. *Streptococcus salivarius* meningitis case strain traced to oral flora of anesthesiologist. J Clin Microbiol. 2010;48:2589-91.
100. Shneerson JM, Chattopadhyay B, Murphy MF, Fawcett IW. Permanent perceptive deafness due to *Streptococcus suis* type II infection. J Laryngol Otol. 1980;94:425-7.
101. Sibley CD, Grinwis M, Field TR, Parkins MD, Noorgard JC, Gregson DB, Rabin HR, Surette M. Mc Kay agar enables routine quantification of the "*Streptococcus milleri*" group in cystic fibrosis patients. J Med Microbiol. 2010; 59: 534-40.
102. Sibley CD, Parkins MD, Duan K, Norgaard JC, Rabin HR, Surette MG. A polymicrobial perspective of pulmonary exacerbations exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105: 15070-5.
103. Sibley CD, Sibley KA, Leong TA, Grinwis ME, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG. The *Streptococcus milleri* population of a cystic fibrosis clinic reveals patient specificity and intraspecies diversity. J Clin Microbiol. 2010; 48: 2592-4.
104. Smith AH, Sra HK, Bawa S, Stevens R. *Streptococcus bovis* meningitis and hemorrhoids. J Clin Microbiol. 2010; 48: 2654-5.
105. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed.). Manual of Clinical Microbiology, 10 ed., ASM Press, Washington DC, EE.UU, 2011.
106. Spencer WH, Thornsberry C, Moody MD, Wenger NK. Rheumatic fever chemoprophylaxis and penicillin-resistant gingival organisms. Ann Intern Med. 1970;73:683-7.
107. Srinivasan V, Metcalf BJ, Knipe KM, Ouattara M, McGee L, Shewmaker PL, Glennen A, Nichols M, Harris C, Brimmage M, Ostrowsky B, Park CJ, Schrag SJ, Frace MA, Sammons SA, Beall B. *vanG* element insertions within a conserved chromosomal site conferring vancomycin resistance to *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus anginosus*. mBio 2014;5:e01386-14.

108. Sturt AS, Yang L, Sandhu K, Pei Z, Cassai N, Blaser MJ. *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* (biotype II/2), a newly reported cause of adult meningitis. J Clin Microbiol. 2010;48:2247-9.
109. Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 2004;233:83-9
110. Teng L-J, Hsueh P-R, Tsai J-C, Chen P-W, Hsu J-C, Lai H-C, Lee C-N, Ho S-W. *groESL* sequence determination, phylogenetic analysis, and species differentiation for viridans group streptococci. J Clin Microbiol. 2002;40:3172-8.
111. Toepfner N, Shetty S, Kunze M, Orłowska-Volk M, Krüger M, Berner R, Hentschel R. Fulminant neonatal sepsis due to *Streptococcus alactolyticus* - A case report and review. APMIS. 2014;122:654-6.
112. Tuazon CU, Gill V, Gill F. Streptococcal endocarditis: single vs. combination antibiotic therapy and role of various species. Rev Infect Dis. 1986;8:54-60.
113. Tufan MA, Hamide KK, Duygu EB, Ozlem A, Kadir T, Eftal YA. Spondylodiscitis and endocarditis caused by *S. vestibularis*. Braz J Infect Dis. 2010;14:377-9.
114. Vahjen W, Pieper R, Zentek JJ. Increased dietary zinc oxide changes the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets. Anim Sci. 2011;89:2430-9.
115. Wanahita A, Goldsmith EA, Musher DM, Clarridge JE 3rd, Rubio J, Krishnan B, Trial J. Interaction between human polymorphonuclear leukocytes and *Streptococcus milleri* group bacteria. J Infect Dis. 2002;185:85-90.
116. Wasteson Y, Høie S, Roberts MC. Characterization of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*. Vet Microbiol 1994;41:41-9.
117. Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultsz C. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. Clin Infect Dis. 2009; 48: 617-25.

118. Whiley RA, Beighton D, Winstanley TG, Fraser HY, Hardie JM. *S. intermedius*, *S. constellatus*, and *S. anginosus* ("Streptococcus milleri group"): association with different body sites and clinical infections. *J Clin Microbiol.* 1992;30:243-4.
119. Whiley RA, Hall LM, Hardie JM, Beighton D. A study of small-colony, beta-hemolytic, Lancefield group C streptococci within the anginosus group: description of *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* subsp. nov. associated with the human throat and pharyngitis. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:1443-9.
120. Willcox MDP, Knox KW Surface-associated properties of *Streptococcus milleri* group strains and their potential relation to pathogenesis. *J Med Microbiol.* 1990;31:259-70.
121. Ye C., Zhu X., Jing H., Du H., Segura M., Zheng H., Kan B., Wang L., Bai X., Zhou Y., Cui Z., Zhang S., Jin D., Sun N., Luo X., Zhang J., Gong Z., Wang X., Wang L., Sun H., Li Z., Sun Q., Liu H., Dong B., Ke C., Yuan H., Wang H., Tian K., Wang Y., Gottschalk M., Xu J. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1203-8
122. Zhang C, Ning Y, Zhang Z, Song L, Qiu H, Gao H. In vitro antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. *Vet Microbiol.* 2008;131:386-92.

## **Capítulo Ila.2.4.**

### **Enterococos y bacterias relacionadas**

#### **HORACIO A. LOPARDO**

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P. Garrahan", Buenos Aires, Argentina

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Argentina

#### **MARÍA ALEJANDRA BLANCO**

Bioquímica del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P. Garrahan", Buenos Aires, Argentina

## ***Enterococos***

### **Aspectos taxonómicos**

En 1899 Thiercelin encontró como parte de la microbiota habitual del intestino a cocos que se disponían en cadenas y que eran similares a los que habían sido reconocidos como agentes causales de infecciones graves como la fiebre puerperal, la fascitis necrotizante, etc., luego llamados *Streptococcus pyogenes*. Por su localización intestinal los denominó “enterococos”<sup>90</sup>.

Cuando se hicieron las primeras clasificaciones fueron incluidos dentro del género *Streptococcus*. Más tarde se observó que producían hemólisis alfa en agar sangre ovina o no producían hemólisis. Posteriormente fueron reconocidos como pertenecientes al grupo D de Lancefield aunque no por poseer el polisacárido C de pared que diferencia a los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, sino por presentar ácido teicoico como antígeno de grupo. Finalmente, en 1984, se los agrupó en un nuevo género: *Enterococcus*<sup>113</sup>.

Varias especies fueron reconocidas dentro de este nuevo género, pero las antiguamente denominadas *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium*, y ahora designadas como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* respectivamente, son las que dan cuenta de alrededor del 90% de los aislamientos clínicos. Los géneros *Lactococcus* y *Vagococcus* se incluyen en este capítulo por su similitud fenotípica y genotípica con los enterococos. Ambos presentan ácido teicoico como antígeno de grupo (grupo N de Lancefield)<sup>114</sup>. Las especies de *Vagococcus* son móviles y son



capaces de dar reacciones positivas con sondas de ADN específicas para enterococos<sup>36</sup>.

## Hábitat

Los enterococos se encuentran en la tierra, en los alimentos, en el agua y como parte de la microbiota habitual del intestino de animales y del ser humano. Su concentración en el intestino oscila entre las  $10^5$  y las  $10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) de materia fecal. En un 5 a un 35% de los individuos también pueden aislarse de vagina, uretra anterior, piel, conductos biliares e incluso orofaringe.

La exposición de los pacientes a los antibióticos inactivos frente a los enterococos (cefalosporinas, isoxazolilpenicilinas) produce grandes cambios en la microbiota intestinal y genera el predominio de estas bacterias.

En el hospital, las úlceras cutáneas, las superficies de las heridas, los tubos endotraqueales y por supuesto la zona perianal de los pacientes pueden ser reservorios de enterococos.

Por su resistencia a condiciones adversas del ambiente y a los desinfectantes, pueden permanecer durante bastante tiempo colonizando superficies inanimadas dentro del hospital.

*E. faecalis* es la especie más abundante como colonizante intestinal. No obstante, en el medio hospitalario cada vez es más importante la colonización con *E. faecium* y en especial con aislados resistentes a vancomicina. *Enterococcus*

*casseliflavus*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus gallinarum* también se pueden encontrar en el contenido intestinal del hombre, pero no en todos los individuos. Cuando están presentes, se los encuentra en concentraciones bajas.

En general, *E. faecalis* ha sido históricamente la especie aislada con más frecuencia en infecciones humanas. *E. faecium* se aísla menos asiduamente y en menores concentraciones en materia fecal, pero actualmente se encuentra en franco aumento dentro del medio hospitalario, especialmente a expensas de esos aislados resistentes a vancomicina previamente mencionados.

Varios son los factores de riesgo para desarrollar una infección por enterococos resistentes a vancomicina (VRE): internación prolongada, proximidad a pacientes infectados o colonizados con VRE, múltiples tratamientos con antibióticos, internación en áreas quirúrgicas o de cuidados intensivos, trasplante de órganos sólidos o de médula ósea, diabetes, insuficiencia renal, sonda urinaria<sup>7</sup>.

### **Factores de virulencia**

Una importante revisión acerca de la virulencia de los enterococos fue publicada en 1994<sup>56</sup>. Dados los conocimientos disponibles en esa época, esa revisión estuvo principalmente focalizada a los factores de virulencia de *E. faecalis*.

En 1899 se demostró que una presunta cepa de *E. faecalis* obtenida de un caso fatal de endocarditis era productora de una citolisina (hemolisina) y de una proteinasa (gelatinasa)<sup>90</sup>. La citolisina enterocócica es capaz de lisar glóbulos rojos humanos, de conejo, de equinos y de bovinos, pero no de ovinos. También lisa células retinales y

fagocitos<sup>52</sup>. Sin embargo su espectro de actividad es más amplio e incluye otras células de eucariontes e incluso de procariontes. La citolisina aumenta la virulencia de *E. faecalis* luego de la inoculación peritoneal a ratones<sup>52</sup>.

Otras enzimas ligadas a la virulencia son la gelatinasa y la hialuronidasa, comúnmente asociadas en otros contextos a la capacidad de invasión a tejidos, translocación intestinal, adherencia, formación de biopelículas, etc.<sup>125</sup>.

La adherencia es el paso inicial de toda infección, por lo que las bacterias que presentan ventajas en este aspecto, seguramente tendrán más posibilidades de producir infecciones. En un principio, a las sustancias de agregación de los enterococos sólo se las asociaba con la unión entre bacterias afines para realizar el intercambio genético<sup>32</sup>. Hoy, sin embargo, se sabe que tienen un rol importante en la adherencia a células renales e intestinales y a la superficie de las válvulas cardíacas<sup>20</sup>, en la supervivencia intracelular dentro de los fagocitos y en la internalización en células epiteliales<sup>133</sup>.

Pillai y col. encontraron una asociación francamente significativa entre el gen *fsr* y los aislamientos de *E. faecalis* provenientes de endocarditis<sup>95</sup>: 100% vs. 53% en aislamientos de materia fecal. Su función es eminentemente regulatoria respecto de la producción de otros factores de virulencia enzimáticos como la gelatinasa y las serinoproteasas.

Hasta fines de la década del 80 *E. faecium* estaba considerado como una bacteria de baja virulencia. Algunas cepas incluso fueron incorporadas a los alimentos como probióticos. Sin embargo, actualmente se lo ha encontrado cada vez más

frecuentemente produciendo infecciones. Algunas de ellas pueden ser graves y de difícil tratamiento, dada su tendencia a la multirresistencia.

Esta bacteria no posee algunos factores de virulencia que parecen ser la clave de la actividad infecciosa de *Enterococcus faecalis*: hemolisina, gelatinasa y el locus *fsr*. La sustancia de agregación dependiente de feromonas también parece ser infrecuente en aislamientos de *E. faecium*. El gen *hyl<sub>Efm</sub>*, que codifica una proteína similar a la hialuronidasa, apareció en un 36% de 264 cepas de *E. faecium* aisladas de infecciones y en ninguna de 186 cepas de origen fecal<sup>104</sup>. Incluso este gen ha sido asociado a aislamientos del complejo clonal CC17, al que pertenecen la mayoría de los aislados clínicamente significativos de *E. faecium*<sup>127</sup>. Varias adhesinas codificadas por genes diferentes (*fms*) han sido también descritas en *E. faecium* asociadas a cepas de origen hospitalario<sup>47</sup>.

Tanto *E. faecalis* como *E. faecium* tienen la capacidad de producir biopelículas. Éstas consisten en poblaciones de bacterias adheridas en forma irreversible a superficies vivas o inertes y contenidas dentro de una matriz hidratada de sustancias diversas: exopolímeros, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos<sup>23</sup>. La producción de biopelículas por los enterococos ha sido asociada a su capacidad para unirse a sondas uretrales, catéteres intravasculares y otros dispositivos utilizados en el medio hospitalario<sup>111</sup>. Los enterococos, al igual que otras bacterias, cuando se encuentran formando una biopelícula, son más resistentes a la fagocitosis, más difíciles de erradicar y entre 10 y 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que sus congéneres planctónicos<sup>72</sup>. La formación de biopelículas está relacionada a la presencia de los determinantes *gelE* (gelatinasa), *perA*, *Esp* y *Ebp* de *E. faecalis*,

*Esp<sub>m</sub>*, y *Ebp<sub>fm</sub>* de *E. faecium*. También contribuyen los genes *srtA* (sortasa A), el cluster *epa*, *bop* y el gen que codifica el glucolípido DGlcDAG<sup>7</sup>. En *E. faecalis*, varios factores como la sortasa A, el ADN extracelular y la autolisina principal juegan roles cruciales en el desarrollo de biopelículas, tanto en condiciones estáticas como en condiciones hidrodinámicas<sup>45</sup>.

Además, se han descrito otros factores como Gls24, peroxidasas y MsrAB en *E. faecalis* y Gls20, Gls33 y megaplásmidos en *E. faecium* que contribuyen a su resistencia a los fagocitos y a la colonización del tracto gastrointestinal<sup>7</sup>.

Los enterococos se caracterizan por presentar una alta capacidad de transferencia de marcadores genéticos, lo que les permite adaptarse a diferentes ambientes clínicos y modificar sus propiedades patogénicas y su resistencia a los antibióticos. Una isla de patogenicidad (PAI) que codifica para varios factores de virulencia (*esp*, *cyl*, *asm*, hidrolasa de sales biliares, proteínas de superficie, etc) fue descrita en el año 2002<sup>115</sup>. Esta isla de patogenicidad está ampliamente distribuida entre aislamientos de distinto origen, tipos clonales y complejos que evolucionaron probablemente por ganancia o pérdida de grupos de genes internos<sup>82</sup>. Puede transferirse incluso a otras especies probablemente con la ayuda de elementos conjugativos, como por ejemplo plásmidos de resistencia<sup>67</sup>.

## **Impacto clínico**

Como ya se mencionó, en 1899 se describió por primera vez a los enterococos como habituales colonizantes del intestino humano. No obstante, en el mismo año,

MacCallum y Hastings relataron un caso fatal de endocarditis infecciosa producido por una bacteria que denominaron *Micrococcus zymogenes*, pero que hoy se supone que era una cepa de *Enterococcus faecalis*<sup>116</sup>. Con el paso del tiempo, se comprobó que los enterococos también eran capaces de producir infección urinaria<sup>38</sup> y ser parte de infecciones polimicrobianas de origen abdominal o biliar presuntamente de carácter endógeno<sup>44, 61, 90</sup>. Menos frecuentemente se los aisló a partir de infecciones del sistema nervioso central<sup>12</sup>, tracto respiratorio inferior<sup>13</sup>, piel y tejidos blandos<sup>51</sup> y senos paranasales<sup>31</sup>. Desde la década del 30 se los asoció a infecciones consideradas intrahospitalarias por definición, pero aparentemente originadas por microbiota colonizante del huésped. Recién en 1987 se comprobó su rol como verdaderos patógenos hospitalarios diseminados por transmisión horizontal<sup>138</sup>. Se demostró su presencia en el ambiente y en objetos inanimados y se jerarquizó el intestino de los pacientes como reservorio de estos microorganismos en los centros de internación. No obstante, cada vez son más frecuentes las infecciones asociadas a catéteres o elementos protésicos. En los EE.UU. se los cuenta en segundo lugar entre los patógenos más frecuentemente productores de infecciones asociadas a catéteres, infecciones urinarias y de piel y tejidos blandos en el ámbito hospitalario<sup>49, 112</sup>. Incluso se ha documentado la transmisión de enterococos al tracto respiratorio de pacientes intubados en salas de cuidados intensivos<sup>77</sup>.

En los EE.UU., entre los años 2009 y 2010, los enterococos en general, y los resistentes a vancomicina en particular, fueron responsables del 13% y del 3% de todas las infecciones asociadas al cuidado de la salud, respectivamente<sup>118</sup>. En Grecia e Irlanda, desde 2007 hasta 2011, se informó un aumento de infecciones graves por *E. faecium* resistente a vancomicina, que llegó al 25%<sup>35</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especie**

Son cocos gram positivos catalasa negativos que se disponen en pares o cadenas cortas. Pueden tomar formas cocobacilares cuando se los obtiene de medios sólidos. A las 24 horas de incubación, las colonias suelen tener un diámetro de 1 a 2 mm, aunque puede haber variantes más pequeñas. No producen hemólisis en agar sangre de carnero, aunque se han reportado excepciones en *E. faecalis* y *E. durans*. Cerca de un tercio de los cultivos de *E. faecalis* son  $\beta$ -hemolíticos en agar sangre de conejo, de caballo o humana<sup>123</sup>. Los enterococos son homofermentativos, con la liberación de ácido láctico como producto terminal y son capaces de desarrollar tanto a 10°C como a 45°C.

Todo coco gram positivo catalasa negativo  $\alpha$ - o  $\gamma$ -hemolítico debe ser identificado a nivel de género con unas pocas pruebas manuales: bilis esculina, tolerancia a 6,5% de NaCl, pirrolidónilarginilamidasa (PYR), leucinaminopeptidasa (LAP), sensibilidad a vancomicina, observación de cadenas, tétradas o racimos en caldo tioglicolato y en el caso de los  $\alpha$ -hemolíticos, también optoquina y solubilidad en bilis. Los enterococos dan positivas las cuatro primeras pruebas, pueden presentar

resistencia adquirida a vancomicina, se disponen en cadenas cortas y dan negativas las pruebas de optoquina y solubilidad en bilis. Estas dos últimas prácticamente no se realizan en este contexto debido a la gran diferencia que existe habitualmente en la morfología de las colonias de los enterococos y de los neumococos.

**Tabla 1.** Características fenotípicas usadas para la clasificación inicial de los enterococos más frecuentemente aislados a partir de materiales clínicos humanos

Especies y grupos	ARG	MAN	ARA	TEL	MOV	PIG	MGP
<i>E. faecalis</i>	+	+/-	-	+	-	-	-
<i>E. faecium</i>	+	+/-	+	-	-	-	-
<i>E. gallinarum</i>	+/-	+	+	-	+	-	+
<i>E. casseliflavus</i>	+/-	+	+	+/-	+	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	-	-	+	-
Grupo I	-	+	-/+	-	-	-/+	+/-
Otros Grupo II	+	+	-	-	-	-	-
Grupo III	+	-	-	-	-	-	-/+
Grupo IV	-	-	-	-	-	-	+/-
Grupo V	-	+/-	-	-	-/+	-	+

ARG: arginina dihidrolasa, MAN: manitol, ARA arabinosa, TEL: telurito, MOV: movilidad, PIG: pigmento, MGP: α-D-glucopiranosido.

La serología puede resultar de ayuda en la identificación, pero solo un 80% de los aislamientos aglutinan con el antisuero para grupo D. Hay que tener en cuenta que también pueden aglutinar estreptococos del grupo *S. bovis*, *Vagococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*<sup>123</sup>.

Sólo dos especies son móviles: *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* y solo algunas son pigmentadas: *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. sulfureus*, *E. gilvus* y *E. pallens*.



**Tabla 2.** Enterococos y vagococos arginina negativos (grupos I, IV y V) alguna vez aislados a partir de materiales clínicos humanos

Especie	ARA	RAF	MOV	SAC	PYU	MGP	MAN
<i>E. avium</i>	+	-	-	+	+	V	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	V	+
<i>E. gilvus</i>	-	+	-	+	+	+	+
<i>E. pallens</i>	-	+	-	+	-	-	+
<i>E. malodoratus</i>	-	+	-	+	+	V	+
<i>E. pseudoavium</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. hawaiiensis</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>E. cecorum</i>	-	+	-	+	+	-	-
<i>E. caccae</i>	-	-	-	+	+	(+)	-
<i>E. italicus</i>	-	-	-	+	+	+	V
<i>Vagococcus fluvialis</i>	-	-	+	+	-	+	+

ARA: arabinosa, RAF: rafinosa, MOV: movilidad, SAC: sacarosa, PYU: piruvato, MAN: manitol, MGP:  $\alpha$ -D-glucopiranosido.

Como se mencionó previamente, las especies más frecuentes (95% del total) son *E. faecalis* y *E. faecium*. Éstas, junto a *E. mundtii*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* se pueden definir correctamente con 7 pruebas bioquímicas: arginina dihidrolasa, manitol, arabinosa, telurito,  $\alpha$ -metil-D-glucopiranosido, movilidad y pigmento (Tabla 1). Cuando las pruebas no se condicen con estas especies, se deberán agregar otras pruebas adicionales que pueden ser cotejadas con las tablas 2 y 3 o con la tabla general (Tabla 4) para orientarse según los distintos grupos establecidos que comprenden 30 especies de enterococos, *Lactococcus* spp. y *Vagococcus fluvialis*<sup>123</sup>.

Los sistemas automatizados y miniaturizados han sido históricamente deficientes en la identificación de especies diferentes de *E. faecium* y *E. faecalis*<sup>15</sup>. Al corregir sus bases de datos, es posible que hayan mejorado su performance, pero en los estudios

comparativos incluyen mayoritariamente cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*<sup>1</sup>. El método de espectrometría de masas, correlaciona muy bien con los métodos de referencia<sup>4</sup>.

**Tabla 3.** Características fenotípicas usadas para la clasificación de otros enterococos y lactococos arginina positivos infrecuentemente aislados a partir de materiales clínicos humanos (grupos II y III)

Especie	MAN	RAF	SAC	PYU	MGP	TEL
<i>E. sanguinicola</i>	+	-	+	-	-	V
<i>Lactococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	-
<i>E. dispar</i>	-	+	+	+	+	-
<i>E. hirae</i>	-	+	+	-	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	-	-	-	-

MAN: manitol, RAF: rafinosa, SAC: sacarosa, PYU: piruvato, MGP: α-D- glucopiranosido, TEL: telurito.

**Tabla 4.** Esquema general para identificar especies de enterococos y otros géneros relacionados

Especies	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOV	PIG	SAC	PYU	MGP
Grupo I												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. sacharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hawaiiensis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-

Especies	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOV	PIG	SAC	PYU	MGP
Grupo II												
<i>E. faecium</i>	+ <sup>a</sup>	-	+	+	V	V	-	-	-	+ <sup>a</sup>	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+ <sup>a</sup>	+	V	+	- <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	V	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+ <sup>a</sup>	+	-	+	-	+ <sup>a</sup>	-	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	+ <sup>a</sup>	-	+ <sup>a</sup>	-	+	-	+	-	-	+ <sup>a</sup>	+	-
<i>E. haemoperoxidus</i>	+ <sup>b</sup>	-	+ <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>E. sanguinicola</i>	+	-	+	-	-	-	+ <sup>c</sup>	-	-	+	-	-
<i>Lactococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
Grupo III	-											
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo IV												
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. phoeniculicola</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. caccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+ <sup>b</sup>
Grupo V												
<i>E. canis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. moraviensis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hermanni</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. italicus</i>	V	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+
<i>Vagococcus</i> spp.	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

MAN: manitol, SOR: sorbose, ARG: arginina dihidrolasa, ARA arabinosa, SBL: sorbitol, RAF: rafinosa TEL: telurito, MOV: movilidad, PIG: pigmento, SAC: sacarosa, PYU: piruvato, MGP: α-D- glucopiranosido.

<sup>a</sup> Excepciones ocasionales (< 3% de los aislados pueden presentar reacciones aberrantes)

<sup>b</sup> Reacción positiva tardía (3 o más días de incubación)

<sup>c</sup> Reacción débil

## Sensibilidad a los antimicrobianos y tratamiento

### Resistencia natural

Los enterococos tienen sensibilidad disminuida a las penicilinas y aminopenicilinas y son naturalmente resistentes a las cefalosporinas y a las isoxazolilpenicilinas por la baja afinidad de sus proteínas ligadoras de penicilina (PBP) a dichos antibióticos. También son intrínsecamente resistentes a las lincosamidas, a trimetoprima-sulfametoxazol (in vivo)<sup>139</sup>, a las polimixinas y a bajos niveles de aminoglucósidos. *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* presentan una resistencia natural a bajos niveles de glucopéptidos que es específica de esas especies y *E. faecalis* presenta resistencia intrínseca a quinupristina-dalfopristina. Por su parte, *E. faecium* es resistente natural a altos niveles de kanamicina, tobramicina, sisomicina y netilmicina por producción de una acetiltransferasa AAC(6')-II activa sobre los cuatro antibióticos y una metiltransferasa EfmM que actúa sobre la subunidad 16S del ARN ribosomal<sup>41</sup>. También produce una fosfotransferasa APH(3')-IIIa que codifica alta resistencia a kanamicina y una nucleotidiltransferasa ANT(4'')-Ia, que le confiere resistencia a tobramicina, ampicacina y kanamicina. A pesar de resultar resistentes a la sinergia de  $\beta$ -lactámicos y glucopéptidos con ampicacina, las CIM de este antibiótico son relativamente bajas (64 – 256 mg/L)<sup>21</sup>.

La sensibilidad disminuida a la penicilina en *Enterococcus* es considerada como un fenómeno natural en este género desde mucho tiempo atrás. En realidad, los enterococos son sólo naturalmente resistentes a la actividad bactericida de los  $\beta$ -

lactámicos y en forma relativa (valores de CIM más elevados) respecto de sus bacterias relacionadas, los estreptococos. Sus PBP presentan menor afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, pero normalmente (a excepción de las cefalosporinas) no llegan a generar valores de CIM superiores al punto de corte farmacológico y por lo tanto no llevan a comprometer un tratamiento antimicrobiano in vivo que no requiera actividad bactericida. Lo que puede comprometer el tratamiento de las endocarditis, meningitis u osteomielitis es justamente que los enterococos se comportan como resistentes a la acción bactericida de los  $\beta$ -lactámicos e incluso de los glucopéptidos<sup>60</sup>. Esta tolerancia está asociada a la presencia de la PBP5, una PBP de baja afinidad por ampicilina y cefalosporinas<sup>119</sup>. Esto conduce a que en casos como en las infecciones nombradas se prefiera el uso de combinaciones con aminoglucósidos, las que frecuentemente presentan actividad bactericida frente a los enterococos. El mecanismo probable de esta sinergia sería la facilitación de la entrada de los aminoglucósidos por acción de los inhibidores de la síntesis de la pared<sup>85</sup>.

### Resistencia adquirida

#### *Resistencia a $\beta$ -lactámicos*

La resistencia adquirida a penicilina y ampicilina puede deberse a alguno de los siguientes mecanismos: (I) producción de  $\beta$ -lactamasas (poco frecuente pero detectado en la Argentina a principios de los 90)<sup>88,89</sup> y (II) resistencia por modificación del sitio de

acción (PBP). Este último fenómeno es frecuente en *E. faecium* y *E. raffinosus* y excepcional en otras especies<sup>103</sup>.

I)  $\beta$ -lactamasa

La producción de  $\beta$ -lactamasa se vio principalmente en *E. faecalis*. Es una enzima derivada de los estafilococos. El gen *blaZ*, responsable de este mecanismo, a diferencia de lo que sucede en estafilococos, en los enterococos se expresa en forma constitutiva y en un nivel mucho más bajo, lo que genera un importante efecto inóculo. Tal es así que en los ensayos de dilución, en los que se utilizan concentraciones relativamente bajas de los microorganismos (generalmente  $1 \times 10^5$  ufc/ml), los enterococos producen tan poca cantidad de enzima que exhiben valores de CIM que suelen estar dentro de los parámetros de sensibilidad<sup>74</sup>.

II) Modificación de la expresión y la secuencia de las PBP

*E. faecalis* y *E. faecium* producen al menos 6 proteínas ligadoras de penicilina (PBP). Tres de ellas, denominadas de clase A, son bifuncionales ya que son a la vez transpeptidasas y transglucosilasas y las otras 3, de clase B, que son solamente transpeptidasas. El aumento de la transpeptidasa PBP5, de clase B, genera niveles de resistencia a la ampicilina en *E. faecium* que pueden superar los 128  $\mu\text{g/ml}$  de concentración inhibitoria mínima (CIM). No obstante estas cepas que exhiben altos niveles de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos tienen otros factores que se suman al aumento de la PBP5, como son las mutaciones puntuales cerca del residuo de serina (sitio activo) de esta transpeptidasa<sup>84</sup>.

A comienzos de la década del 70 se observó la resistencia a altos niveles de estreptomycinina (CIM > 2.000 mg/l) en cepas de *E. faecalis* y, posteriormente, a altos

niveles de gentamicina (CIM > 500 mg/l)<sup>83, 141</sup>. Esta resistencia elevada, puede ser de origen enzimático, por modificación de los aminoglucósidos (fosforilación, adenilación o acetilación) para todos los aminoglucósidos o por modificación del sitio de acción para estreptomicina<sup>90</sup>. La modificación de las moléculas de los aminoglucósidos anula la sinergia entre éstos y los  $\beta$ -lactámicos o los glucopéptidos. Los aislados de *E. faecium* que poseen solo sus enzimas naturales (AAC(6')-Ii, APH(3')-IIIa, y ANT(4'')-Ia) pueden ser sensibles a la actividad sinérgica con gentamicina, siempre que no contengan la enzima bifuncional AAC(6')-Ie – APH( 2'')-Ia. La resistencia a altos niveles de estreptomicina puede originarse por modificación ribosomal por una mutación simple de una proteína o puede ser enzimática por producción de ANT(6')-Ia o ANT(3'')-Ia<sup>21</sup>.

La presencia de estas enzimas modificadoras o las mutaciones en el sitio de acción generan resistencia a altos niveles de los correspondientes aminoglucósidos (> 512  $\mu$ g/ml) que puede ser fácilmente detectable con discos de alta carga: gentamicina 120  $\mu$ g, estreptomicina 300  $\mu$ g y kanamicina 120  $\mu$ g<sup>72a</sup>. Algunas cepas, a pesar de producir estas enzimas inactivantes, presentan valores de CIM inferiores a los habitualmente considerados como de alta resistencia (CIM de gentamicina  $\geq$  512 $\mu$ g/ml o CIM de estreptomicina  $\geq$  2.000  $\mu$ g/ml). Las combinaciones con  $\beta$ -lactámicos en estos casos no resultan bactericidas<sup>72a, 97a</sup>.

Para poder lograrse la sinergia, la concentración del  $\beta$ -lactámico en el sitio de la infección deberá superar o al menos igualar la CIM<sup>75</sup>.

### *Resistencia a vancomicina*

La resistencia a vancomicina apareció en Europa a fines de los 80<sup>70, 130</sup>. Su frecuencia en los EE.UU. en la década siguiente alcanzó niveles alarmantes. Mientras que en Europa la transmisión intrahospitalaria había sido despreciable y se registraba la aparición de múltiples clones de origen animal, en los EE.UU. la diseminación fue eminentemente nosocomial. Esta resistencia tardó casi diez años en aparecer en la Argentina después de su primera descripción en Europa<sup>80</sup> y al poco tiempo llegó a presentar una prevalencia de colonización de más del 5% en hospitales del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires<sup>76</sup>. Su frecuencia como microorganismos colonizantes intestinales al igual que como infectantes creció en forma sostenida desde entonces.

La resistencia a vancomicina se observa principalmente en *E. faecium* y en menor medida en *E. faecalis*. También hubo informes, incluso de infecciones graves, por otras especies<sup>26, 54, 136</sup>.

El gen más involucrado en esta resistencia en enterococos es el *vanA* y se lo ha detectado en la mayoría de las especies de interés clínico: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. durans* y *E. hirae*. En Europa se ha observado últimamente un aumento significativo de microorganismos portadores del genotipo *vanB*, con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de vancomicina relativamente bajas (CIM = 4µg/ml y hasta 2 µg/ml).

Desde la detección de la resistencia a vancomicina, se describieron 9 operones que confieren esa resistencia de acuerdo a las características del gen de la ligasa, que



codifica la enzima para D-alanil-D-lactato (*vanA*, *vanB*, *vanD* y *vanM*) o para D-alanil-D-serina (*vanC1*, *vanC2*, *vanC3*, *vanE*, *vanG*, *vanL* y *vanN*)<sup>8, 24, 69, 93</sup>.

El gen *vanA* confiere resistencia a altos niveles de vancomicina y resistencia moderada a teicoplanina. Los otros marcadores se caracterizan por codificar una resistencia moderada a vancomicina pero no a teicoplanina. Como se dijo previamente, el gen *vanC* es característico y natural en *Enterococcus gallinarum* (*vanC1*), *Enterococcus casseliflavus* (*vanC2*) y *Enterococcus flavescens* (*vanC3*). El *vanC1* se pensaba que por ser cromosómico y natural de *E. gallinarum*, podía servir como marcador para la identificación molecular de esa especie<sup>101</sup>. Sin embargo hay informes que indican su presencia en *E. faecalis* aislados de animales y en *E. faecium* aislados de humanos<sup>27, 28, 121</sup>.

Históricamente se ha minimizado el rol de los enterococos como agentes causales de infecciones graves. No obstante, algunos autores han comprobado que la mortalidad asociada a bacteriemia por *E. faecium* resistente a vancomicina podía llegar a más de un 70% y que en la mitad de esos casos esa mortalidad era directamente atribuible a la bacteriemia<sup>33</sup>. Los nitrofuranos son activos sobre la totalidad de los aislados de *E. faecalis* (CIM 90 ≤ 32 µg/ml) y sobre la mayoría de los de *E. faecium* (CIM 90 = 64 µg/ml)<sup>65, 140</sup>.

Entre el 60% y el 80% de los enterococos son resistentes a rifampicina. Por ello, éste no ha sido un antibiótico muy empleado en el tratamiento de infecciones enterocócicas. No obstante se han ensayado combinaciones con otras drogas para intentar lograr actividad sinérgica.

Las quinolonas solo exhiben una actividad moderada frente a los enterococos. Su resistencia puede estar mediada por mutaciones en la ADN girasa y la topoisomerasa IV, por mecanismos de eflujo (EmeA o EfrAB) o por protección de las enzimas a través de proteínas Qnr<sup>64</sup>.

### Comportamiento frente a nuevos antibióticos

#### *Quinupristina-dalfopristina*

Quinupristina-dalfopristina (Q/D), una combinación de estreptograminas A y B, es una droga bacteriostática, que inhibe la síntesis de proteínas por interacción con la subunidad 50 S ribosomal que, demostró tener una buena actividad in vivo frente a *E. faecium* resistentes a vancomicina. Desafortunadamente no resultó ser activa frente a *E. faecalis*. *E. faecalis* posee un gen cromosómico (*Isa*) que parecería ser el responsable de esta resistencia intrínseca<sup>120</sup>.

Además se detectaron cepas de *E. faecium* con resistencia adquirida a esta combinación por modificación de la droga (acetiltransferasas VatD y VatE), inactivación (lactonasas VgbA y VgbB) y por bombas de eflujo (*msrC* y mutación en el gen *eatA* que codifica el transportador ABC)<sup>53, 63, 97, 135</sup>. La producción de la metilasa a través del mecanismo MLS<sub>B</sub>, que afecta a los macrólidos, lincosamidas y solamente a las estreptograminas B, también afecta en algún grado la actividad de Q/D a pesar de no alterar la acción de la dalfopristina<sup>37</sup>.

Q/D está aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los EE.UU. y por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de la República Argentina (ANMAT), para infecciones graves por *E. faecium*, incluyendo VRE. La *American Heart Association* la recomienda para el tratamiento de endocarditis infecciosa, pero nunca como monoterapia.

Distintos autores sugirieron diferentes combinaciones. La combinación con imipenem y con levofloxacina resultó ser activa en un modelo de ratón infectado con *E. faecium* resistente a vancomicina. La combinación de Q/D con doxiciclina y rifampicina logró negativizar la bacteriemia en un paciente en el que el rescate microbiológico persistía cuando se lo trataba sólo con Q/D. También la asociación de este antibiótico con altas dosis de ampicilina (24g/día) fue exitosa en un paciente con bacteriemia persistente por *E. faecium* resistente a vancomicina (CIM de ampicilina > 32µg/ml) en el cual había fallado la monoterapia con linezolid.

Una importante limitación de esta droga es la frecuencia de efectos secundarios tales como flebitis, artralgias y mialgias<sup>107</sup>.

### *Daptomicina*

Daptomicina, un lipopéptido cíclico de reciente lanzamiento en la Argentina, es un antibiótico indicado para el tratamiento de infecciones graves por VRE, sobre los que presenta actividad bactericida *per se*<sup>48</sup>. La FDA ha aprobado su utilización para infecciones por enterococos sensibles a vancomicina pero, desafortunadamente, aún no ha sido aprobada para su uso en VRE y tampoco en pediatría. La ANMAT autoriza

su uso solamente para infecciones de piel y tejidos blandos producidas por microorganismos gram positivos sensibles y bacteriemia (incluyendo endocarditis derecha) producida por *S. aureus* sensible.

Se ha visto que por su mecanismo de acción complejo, la resistencia experimental es difícil de lograr. No obstante, se han detectado casos de resistencia in vivo tanto en estafilococos como en enterococos<sup>106</sup>. Se ha comprobado no solo su actividad bactericida *per se* en condiciones de ensayo habituales, sino también frente a altos inóculos de enterococos<sup>5</sup>. Además es un antibiótico capaz de penetrar en las vegetaciones. Ambas cosas ubicarían a este antibiótico entre las opciones de elección para el tratamiento de la endocarditis enterocócica. No obstante no ha demostrado ventajas frente a linezolid en la práctica clínica en infecciones bacteriémicas por enterococos<sup>25</sup>. En el tratamiento de endocarditis por enterococo se deberían utilizar altas dosis (8 a 12 mg/kg).

### *Linezolid*

Es un antibiótico bacteriostático, activo frente a gram positivos, que se une al ARNr 23S e inhibe la síntesis de proteínas al interferir la unión del ARNt con el sitio A del ribosoma Su utilización para infecciones por VRE está aprobada por la FDA de los EE.UU. y por la ANMAT. Es activo contra *E. faecium* y *E. faecalis*. Se utiliza en el tratamiento de bacteriemias e infecciones urinarias por VRE.

Si bien los resultados iniciales con linezolid en endocarditis experimentales por *E. faecium* y *E. faecalis* no fueron alentadores, se mejoró su *performance* usando concentraciones más elevadas (6 mg/kg). A pesar de su actividad francamente

bacteriostática, se han podido lograr buenos resultados en casos de endocarditis, incluso posprotésicas<sup>54</sup>. En un estudio comparativo, linezolid ha demostrado una cura de hasta más de un 70%, cifra equivalente a la lograda con tratamientos convencionales<sup>66</sup>.

Linezolid es una oxazolidinona que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en un paso que no es compartido por otros antibióticos. De este modo, la aparición de resistencia sólo va a estar ligada a su uso. De hecho existen muy pocos casos documentados de resistencia a linezolid en enterococos y parece que su número no tiende a aumentar significativamente en el tiempo<sup>58, 99</sup>.

Los enterococos poseen varias copias del gen *rRNA 23S* y es así que su valor de CIM depende del número de alelos mutados<sup>81</sup>. También el aumento de la resistencia a linezolid puede estar dado por mutaciones en las proteínas ribosomales L3 y L4. La modificación enzimática de la subunidad ARNr 23S por metilación de un residuo de adenina también puede producir resistencia a esta droga<sup>126</sup>. El gen responsable de esta metilación (*cmr*) es de naturaleza plasmídica y ha sido encontrado en *E. faecalis* y otras bacterias. Su asociación con el transposón *IS256*, explica su amplia diseminación en el hospital.

Los porcentajes de resistencia a linezolid en *E. faecium*, en algunos países, han llegado al 11-16% en cepas hospitalarias, aunque en la comunidad son menores del 1%<sup>16, 39</sup>. También esta resistencia se detectó en *E. faecalis*<sup>59</sup>.

Los principales inconvenientes del uso de esta droga son los efectos colaterales después de tratamientos prolongados (más de 28 días). Puede producir efectos neurológicos (parestesia periférica, ataxia del sensorio, neuropatía óptica tóxica) y

hematológicos (leucopenia, trombocitopenia, anemia), probablemente por toxicidad mitocondrial<sup>6</sup>.

### *Tigeciclina*

Tigeciclina es una gliciliciclina de muy amplio espectro derivada de la minociclina. Presenta actividad *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, neumococos multirresistentes, muchos bacilos gram negativos y VRE<sup>17</sup>. Actúa uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma e inhibe la síntesis de proteínas. En curvas de muerte con una cepa multirresistente de *E. faecium*, se observó sólo un efecto bacteriostático de la droga, apenas aumentado con el agregado de gentamicina. Sin embargo, con la misma cepa, en un estudio experimental en conejos, tanto la droga sola como combinada con gentamicina, disminuyeron significativamente los recuentos bacterianos en las vegetaciones<sup>96</sup>.

Está aprobado su uso en infecciones complicadas de piel y tejidos blandos por la FDA, pero no para bacteriemias (bajos niveles séricos) ni para infecciones por VRE.

Penetra en las vegetaciones pero no se usa como monoterapia porque es una droga bacteriostática y porque no alcanza dosis séricas necesarias para tratar endocarditis infecciosa, por lo que se sugiere usarla combinada.

Hay dos informes de enterococos resistentes a tigeciclina, ambos relacionados con infecciones intraabdominales y de mecanismo por ahora desconocido.

### *Ceftarolina*

Ceftarolina es una cefalosporina de amplio espectro con actividad bactericida frente a *S. aureus* resistente a meticilina, neumococos multirresistentes y muchos bacilos gram negativos al igual que tigeciclina<sup>43</sup>.

Por curvas de muerte y en estudios experimentales en animales se comprobó también su acción bactericida frente a *E. faecalis*, pero su utilidad se ve limitada por ser inactiva frente a *E. faecium*<sup>19, 43</sup>.

La CIM 90 en *E. faecalis* es elevada (4 µg/ml) por lo que se vio que es útil combinarla con otro antibiótico. Podría ser interesante su combinación con daptomicina<sup>109</sup>.

### *Oritavancina*

Se trata de un derivado semisintético de un glucopéptido natural llamado telavancina. Fue evaluado in vitro y en dos estudios distintos se observó actividad bacteriostática<sup>57</sup> y bactericida<sup>137</sup> frente a VRE.

A pesar de tratarse de un glucopéptido, la adquisición de genes *vanA* o *vanB* por *E. faecalis* afecta sólo modestamente la sensibilidad in vitro a oritavancina, aunque podría generarse un aumento de la CIM durante el tratamiento con esta droga<sup>6</sup>.

En un estudio de endocarditis experimental en conejos resultó ser una droga farmacocinéticamente apta e igualmente efectiva frente a cepas sensibles y resistentes a vancomicina<sup>110</sup>. El agregado de gentamicina disminuye significativamente el inóculo

bacteriano adherido a las válvulas cardíacas e impide la emergencia de mutantes con sensibilidad disminuida a oritavancina<sup>71</sup>.

### Multirresistencia y tratamiento

Se ha detectado la diseminación mundial de una subpoblación de *E. faecium* conocida como complejo clonal 17 (CC17) caracterizada por presentar resistencia a ampicilina y quinolonas. La mayoría de estos enterococos además contienen una posible isla de patogenicidad que incluye los genes *hylEfm* y *esp*. Este clon se ha adaptado al medio hospitalario por pasos. Primero adquirió genes de resistencia que le confirieron ventajas selectivas que le aumentaron las posibilidades de interactuar con otros clones y así pudieron ganar luego otros marcadores que le facilitaron su adaptación. Este proceso, fue llamado “capitalismo genético” por Baquero y col.<sup>11</sup> porque “el rico tiende a volverse más rico”. Así fue que esta subpoblación hospitalaria internacional pudo incorporar más de cien genes específicos que incluyeron elementos móviles tales como secuencias de inserción, secuencias de fagos y plásmidos, genes de resistencia y genes regulatorios<sup>68, 127</sup>.

Resumiendo, los enterococos son patógenos oportunistas, en algunos casos de segunda línea, pero en otros habría que considerarlos como microorganismos de cuidado y de difícil tratamiento. Presentan varios factores de virulencia, una resistencia natural bastante frondosa y adquieren marcadores de resistencia que los convierten en gérmenes multirresistentes. Las alternativas más eficaces parecen ser las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos o glucopéptidos sumados a los aminoglucósidos cuando no lo impiden los mecanismos de resistencia específicos. Cuando las cepas



son multirresistentes es necesario echar mano a los nuevos antibióticos disponibles (linezolid o daptomicina) o a nuevas combinaciones como ampicilina + ceftriaxona para el tratamiento de endocarditis por *Enterococcus faecalis* resistentes a altos niveles de aminoglucósidos<sup>42</sup>. Este esquema se propuso como el tratamiento electivo para las endocarditis por *E. faecalis* por su equivalencia respecto de ampicilina + gentamicina en el tratamiento de endocarditis por cepas sensibles a la ampicilina y a altos niveles de gentamicina y sus menores efectos colaterales. Probablemente por diferencias en sus PBP, esta combinación no resultó efectiva para el tratamiento de endocarditis por *Enterococcus faecium*<sup>78</sup>.

En las guías de la American Heart Association de 2005 y en las de la Sociedad Europea de Cardiología de 2009 se propusieron nuevos esquemas de tratamiento de las endocarditis por enterococos (Tabla 5)<sup>10, 46</sup>.

## **Prevención**

El género *Enterococcus* tiene ciertas características que les facilita la diseminación entre los pacientes hospitalizados:

- Puede colonizar el tracto gastrointestinal de los pacientes y excepcionalmente de los trabajadores de la salud, proveyendo un reservorio continuo para la diseminación intrahospitalaria.
- Es resistente a varios antibacterianos de uso frecuente.
- La resistencia antimicrobiana y la resistencia a algunos antisépticos le permite su supervivencia en un medio ambiente con alto uso de antibacterianos.

**Tabla 5.** Tratamientos propuestos para endocarditis por *Enterococcus* spp.

Antibióticos	Dosis y vías	Duración (semanas)
Penicilina G	18-30 MU/24 h. iv (en 6 dosis/IC)	4-6*
+ gentamicina	+ 1 mg/kg/8 h. iv/im	4-6*
Ampicilina	12 g/24 h. iv (en 6 dosis/IC)	4-6*
+ gentamicina	+ 1 mg/kg/8 h. iv/im	4-6*
Vancomicina**	30 mg/kg/24 h. iv(divididos en 2 dosis)	6
+ gentamicina	+ 1 mg/kg/8 h. iv/im	6
Ampicilina +	12 g/24 h. iv (en 6 dosis/IC.)	≥6
Ceftriaxona***	+ 2 g/12 h. iv	≥6
Daptomicina	6 mg/kg 24 h. iv	≥6
Linezolid	600 mg/12 h. po/iv	≥6

IC: infusión continua; iv: vía endovenosa; im: vía intramuscular; po: vía oral.

\*Se recomienda un tratamiento de 6 semanas para pacientes con síntomas de más de 3 semanas o endocarditis protésica.

\*\*Solo para pacientes que no toleran las penicilinas

\*\*\* Solo para *E. faecalis*

- Puede contaminar el medio ambiente hospitalario y sobrevivir en él por períodos prolongados.
- Puede contaminar las manos de los trabajadores de la salud, permaneciendo por más tiempo si éstos no cumplen con las normas de lavado de manos.

La colonización con VRE precede y predispone generalmente a infecciones como endocarditis o bacteriemia especialmente en pacientes añosos, inmunocomprometidos o posquirúrgicos<sup>91</sup>.

En especial, los VRE colonizan el intestino de estos pacientes y pueden persistir durante largos períodos, lo que genera altos costos, teniendo en cuenta los gastos de aislamiento y cohortización. Hasta el momento no ha podido establecerse un método que permita la descolonización eficaz de VRE en seres humanos. Se han ensayado antibióticos <sup>86, 129, 134</sup> e incluso la descolonización selectiva de VRE del tracto gastrointestinal de ratones mediante bacteriófagos líticos específicos<sup>100</sup>. Estos trabajos no han podido demostrar aún la descolonización completa de estos microorganismos, aunque en algunos casos se obtuvo una importante disminución en la carga de enterococos. Tampoco el uso de probióticos impidió la colonización con VRE de pacientes internados<sup>29, 132</sup>.

No existen por el momento vacunas que permitan prevenir infecciones por enterococos ya que no tendrían un sentido práctico, en virtud del carácter oportunista de estas bacterias.

La vigilancia de la colonización por VRE y el aislamiento y cohortización de pacientes portadores de cepas multirresistentes permite prevenir la transmisión intranosocomial de las infecciones enterocócicas. Las infecciones por VRE presentan

un riesgo de muerte dos veces mayor que las producidas por enterococos sensibles. Además, los pacientes que sobreviven, sufren períodos más prolongados de internación, generan mayores costos hospitalarios y son más frecuentemente derivados a unidades de terapia intensiva<sup>22</sup>. Por otra parte, se demostró que los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina reportados en los EE.UU. se originaron por transferencia de genes de resistencia a partir de los VRE<sup>118</sup>.

La vigilancia se ha realizado de forma activa o pasiva, según la evaluación acerca del costo-beneficio de cada una de las modalidades para cada caso y del riesgo de colonización de cada institución<sup>73, 98</sup>.

Se ha propuesto el uso de caldos de enriquecimiento, pero la siembra directa en placas ha sido el método más empleado a pesar de su menor sensibilidad, dado que los resultados se obtienen 24 horas antes. El uso de PCR directa de materia fecal acelera aún más los tiempos de detección de VRE, pero con una sensibilidad de un 85% respecto del método de enriquecimiento<sup>124</sup>.

Para la realización del *screening* en medio sólido, los medios cromogénicos superaron, especialmente en sensibilidad, al tradicional agar bilis esculina azida adicionado de 6 µg/ml de vancomicina y al agar para *Campylobacter* (10 µg/ml de vancomicina)<sup>14, 55</sup>.

## ***Vagococcus***

Sólo unos pocos casos de infecciones por *Vagococcus* se han relatado en la literatura: bacteriemia, infecciones odontogénicas, peritonitis e infecciones de heridas<sup>3, 122</sup>.

Son microorganismos móviles que dan positivas las pruebas de LAP, PYR y tolerancia a 6,5% de NaCl. Al igual que *Lactococcus*, *Vagococcus* posee el antígeno de grupo N<sup>36</sup>.

En un solo estudio se determinó la sensibilidad a los antibióticos de una colección de aislados de *Vagococcus fluvialis*. Todos ellos eran sensibles a ampicilina, cefotaxima y cotrimoxazol y resistentes a clindamicina y fluoroquinolonas. Con otros antibióticos se obtuvieron resultados variables<sup>122</sup>.

## ***Lactococcus***

Por estudios genéticos el género *Lactococcus* fue separado de *Streptococcus* en 1985<sup>114</sup>. El género consta de 8 especies, de las cuales *Lactococcus lactis* y *actococcus garvieae* han sido las más frecuentemente aisladas a partir de infecciones humanas<sup>94, 105</sup>.

## Habitat y significado clínico

Los lactococos pueden aislarse de vegetales y de algunos alimentos. También son agentes etiológicos de mastitis bovina<sup>36</sup>. En clínica humana se los considera como oportunistas de baja virulencia aunque en muchos casos pudo haber sido subestimada su presencia por haberse confundido con enterococos. Se los ha aislado de sangre, orina, heridas oculares, asociados a endocarditis posprotésica y de válvula nativa, abscesos hepáticos, sepsis en inmunocomprometidos, osteomielitis, peritonitis, etc.

*Lactococcus garvieae* es un reconocido patógeno de peces y a partir de su consumo podría infectar al hombre. *Lactococcus garvieae* (previamente conocido como *Enterococcus seriolicida*) es el agente causal de la lactococosis, una infección sistémica descrita por primera vez en el Japón en la década del 50 en truchas arco iris<sup>131</sup>. Ha producido brotes en peces y ha infectado a otros animales (mastitis bovina) desde donde puede contaminar la leche<sup>30</sup>. Tanto desde los peces como de los mamíferos puede pasar a infectar al hombre<sup>9, 105</sup>.

Los estudios genéticos se realizaron principalmente en peces<sup>102</sup>. Estos datos permitieron diferenciar a estas bacterias según el hospedador y el origen geográfico. Se han realizado estudios preliminares de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) que revelaron la presencia de al menos dos linajes genéticos dentro de la población de *L. garvieae*.

En una revisión de 2012 se describieron 14 casos de endocarditis producidos por *L. garvieae* (8 de válvula protésica y 6 de válvula nativa)<sup>105</sup>. Recientemente se informó el primer caso en América Latina<sup>50</sup>. También se reportaron casos de

septicemia<sup>2</sup>, peritonitis, absceso hepático, osteomielitis, espondilodiscitis<sup>108</sup>, colecistitis<sup>62</sup> y una infección de prótesis de cadera<sup>105</sup>. La mayor parte de estos pacientes tenía factores predisponentes.

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* es parte de la microbiota habitual del ganado bovino. También puede formar parte de la microbiota orofaríngea, intestinal y vaginal del hombre. Se lo ha utilizado en la industria láctea, en la preparación de quesos y yogur. A pesar de ser considerado como “no patógeno”, la exposición a estos productos se ha reconocido como factor de riesgo para adquirir infecciones por este microorganismo. Se cuentan recientes ejemplos de un absceso cerebral y una neumonía necrotizante entre los casos más graves<sup>18, 128</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especies**

Son microorganismos inmóviles que dan positivas las pruebas de LAP, PYR y tolerancia a 6,5% de NaCl por lo que se los confunde con enterococos. Se los puede separar de *E. faecalis* por dar negativas las pruebas de telurito, piruvato y sorbitol y de *E. faecium* por dar negativa la prueba de arabinosa<sup>123</sup>. Los métodos automatizados o miniaturizados pueden ser valiosos al sugerir la posibilidad de la presencia de *Lactococcus* spp. No obstante la identificación definitiva debe hacerse a través de la secuenciación del ARN 16S o empleando espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)<sup>92</sup>.

La identificación presuntiva por pruebas bioquímicas puede realizarse siguiendo las pautas de la Tabla 6.

**Tabla 6.** Identificación de las especies de *Lactococcus*

Especie y subespecie	ARG	HIP	PYR	VP	GLU	LAC	MAL	SAC	MAN	SBL	RAF	TRE
<i>L. lactis</i>												
subsp. <i>lactis</i>	+	-	v	+ <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	-	-	+
subsp. <i>cremoris</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
subsp. <i>hordniae</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>L. garvieae</i>	+	-	+	+	+	v	+	v	+	-	-	+
<i>L. plantarum</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>L. raffinolactis</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	v	-	+	-
<i>L. xylosoe</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+

ARG: arginina, HIP: hipurato, PYR: pirrolidonil arilamidasa, VP: Voges-Proskauer, GLU: glucosa, LAC: lactosa, MAL: maltosa, SAC: sacarosa, MAN: manitol, SBL: sorbitol, RAF: rafinosa, TRE: trehalosa.

### Sensibilidad a los antibióticos

*Lactococcus garvieae* es menos sensible a penicilina y cefalotina que *Lactococcus lactis* y es uniformemente resistente a clindamicina. *Lactococcus lactis*, por el contrario, es sensible a este antibiótico<sup>34</sup>.

Un reciente trabajo de autores egipcios determinó la sensibilidad de 27 *Lactococcus* spp. que habían sido aislados de alimentos lácteos y productos farmacéuticos. En este estudio no se encontraron aislados resistentes a vancomicina, cloranfenicol, ni clindamicina. Solo un 7,4% tenían CIM por encima de 4 µg/ml de penicilina, 22,2% eran resistentes a eritromicina, 7,4% a rifampicina, 29,6% a tetraciclina y 11,1% a ciprofloxacina. Se identificaron los genes *tet(M)* y *erm(B)* entre las cepas resistentes a tetraciclina y eritromicina<sup>40</sup>.



El antibiótico de elección para el tratamiento de las infecciones por lactococos es la penicilina sola o combinada con gentamicina<sup>79, 94</sup>.

## Bibliografía

1. Abele-Horn M, Hommers L, Trabold R, Frosch M. Validation of VITEK 2 version 4.01 software for detection, identification, and classification of glycopeptide-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 2006;44:71-6.
2. Aguado-Urda M, López-Campos GH, Blanco MM, Fernández-Garayzábal JF, Cutuli MT, Aspiroz C, López-Alonso V, Gibello A. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 21881, isolated from a case of human septicaemia. *J Bacteriol.* 2011;193:4033-4.
3. Al Ahmad A, Pelz K, Schirrmeister JF, Hellwid E, Pukall R. Characterization of the first oral *Vagococcus* isolate from a root-filled tooth with periradicular lesions. *Curr Microbiol.* 2008;57:235-8.
4. Alatoon AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2868-73.
5. Argemi X, Hansmann Y, Christmann D, Lefebvre S, Jaulhac B, Jehl F. In vitro activity of daptomycin against *Enterococcus faecalis* under various conditions of growth-phases, inoculum and pH. *PLoS ONE.* 2013;8:e64218.
6. Arias CA, Mendes RE, Stilwel MG, Jones RN, Murray BE. Unmet needs and prospects for oritavancin in the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Clin Infect Dis.* 2012; 54(S3):S233-8.
7. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10:266-78.
8. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol.* 1996;4:401-7.

9. Aubin GG, Bémer P, Guillouzouic A, Crémet L, Touchais S, Fraquet N, Boutoille D, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S. First report of a hip prosthetic and joint infection caused by *Lactococcus garvieae* in a woman fishmonger. J Clin Microbiol. 2011;49:2074–6.
10. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Bolger AF, Levison ME, Ferrieri P, Gerber MA, Tani LY, Gewitz MH, Tong DC, Steckelberg JM, Baltimore RS, Shulman ST, Burns JC, Falace DA, Newburger JW, Pallasch TJ, Takahashi M, Taubert KA; Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease; Council on Cardiovascular Disease in the Young; Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia; American Heart Association; Infectious Diseases Society of America. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. Circulation. 2005;111:e394-434.
11. Baquero F, Coque TM, Canton R. Antibiotics, complexity, and evolution. ASM News. 2003;69:547–52
12. Bayer AS, Seidel JS, Yoshikawa TT, Anthony BF, Guze LB. Group D enterococcal meningitis: clinical and therapeutic considerations with report of three cases and review of the literature. Arch Intern Med. 1976;136:883-6.
13. Berk SL, Verghese A, Holtsclaw SA, Smith JK. Enterococcal pneumonia: occurrence in patients receiving broad-spectrum antibiotic regimens and enteral feeding. Am J Med. 1983;74:153-4.
14. Blanco MA, Lopardo H. Evaluación de un medio cromogénico (CHROMagar) para la detección de enterococos resistentes a vancomicina a partir de hisopados rectales. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología, Rosario, 9-11 de octubre de 2008.
15. Blanco MA, Mónaco MB, Lopardo H. Evaluación de un sistema automatizado para la identificación de especies de enterococos. Acta Bioq Clin Latnoam. 2010;44:239-42.
16. Bonora MG, Solbiati M, Stepan E, Zorzi A, Luzzani A, Catania MR, Fontana R. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. J Clin Microbiol. 2006;44:1153-5

17. Brandon M, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among gram-positive organisms collected from pediatric patients globally between 2004 and 2011: results from the tigecycline evaluation and surveillance trial. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2371-8.
18. Buchelli-Ramírez HL, Álvarez-Álvarez C, Rojo-Alba S, García-Clemente M, Cimadevilla-Suárez R, Pando-Sandoval A, Casan-Clará P. Necrotising pneumonia caused by *Lactococcus lactis cremoris*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17:565-7.
19. Cédric J, Caillon J, Le Mabecque V, Miègeville AF, Ge Y, Biek D, Batard E, Potel G. In vivo activity of a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, ceftaroline, against vancomycin-susceptible and –resistant *Enterococcus faecalis* strains in a rabbit endocarditis model: a comparative study with linezolid and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5300-2.
20. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, Zervos MJ. Plasmid associated hemolysin and aggregation substance production contributes to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:2474-7.
21. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis.* 2000;31:586-9.
22. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health costs. *Clin Infect Dis.* 2006;42:S82-9.
23. Costerton JW. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.* 2001;9:50-2.
24. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin infect Dis.* 2006;42(Suppl. 1): S25-34.
25. Crank CW, Scheetz MH, Brielmaier B, Rose WE, Patel GP, Ritchie DJ, Segreti J. Comparison of outcomes from daptomycin or linezolid treatment for vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection: a retrospective, multicenter cohort study. *Clin Therap.* 2010;32:1713-9.
26. Dalal A, Urban C, Rubin D, Ahluwalia M. Vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* endocarditis. A case report and review of literature. *Infect Dis Clin Pract.* 2008;16:144-6.
27. de Garnica ML, Valdezate S, Gonzalo C, Sáez-Nieto JA. Presence of the *vanC1* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from ewe bulk tank milk. *J Med Microbiol.* 2013;62:494-5.

28. de Moura TM, Cassenego APV, Campos FS, Ribeiro AML, Franco AC, d'Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon APG. Detection of *vanC1* gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:453-6.
29. de Regt MJA, Willems RJL, Hené RJ, Siersema PD, Verhaar HJJ, Hopmans TEM, Bonten MJ. Effects of probiotics on acquisition and spread of multiresistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:2801-5
30. Devriese LA, Hommez J, Laevens H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. Vet Microbiol. 1999;70:87-94.
31. Doyle PW, Woodham JD. Evaluation of the microbiology of chronic ethmoid sinusitis. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2396-400.
32. Dunny GM. Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. Plasmid. 1990;4:689-96.
33. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, Pfaller MA, Hwang T, Sanford MD, Wenzel RP. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. Clin Infect Dis. 1995;20:1126-33.
34. Elliott JA, Facklam RR. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garviae* and a proposed method to discriminate between them. J Clin Microbiol. 1996;34:1296-8.
35. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 Surveillance Data and 2011 Epidemic Intelligence Data. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>.
36. Facklam RR, Elliott JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clin Microbiol Rev. 1995;8:479-95.
37. Fantin B, Leclercq R, Garry L, Carbon C. Influence of inducible cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B-type antibiotics in *Enterococcus faecium* on activity of quinupristin-dalfopristin in vitro and in rabbits with experimental endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:931-5.
38. Felmingham D, Wilson APR, Quintana AI, Grüneberg RN. *Enterococcus* species in urinary tract

infection. Clin Infect Dis. 1992;15:295-301.

39. Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS Program results for 2011. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;76:206-13.

40. Gad GFM, Ahmed M, Abdel-Hamid AM, Farag ZSH. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. Braz J Microbiol. 2014;45:25–33.

41. Galimand M, Schmitt E, Panvert M, Desmolaize B, Douthwaite S, Mechulam Y, Courvalin P. Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. RNA. 2011;17:251-62.

42. Gavalda J, Len O, Miró JM, Muñoz P, Montejo M, Alarcón A, de la Torre Cisneros J, Peña C, Martínez Lacasa X, Sarria C, Bou G, Aguado JM, Navas E, Romeu J, Marco F, Torres C, Tornos P, Planes A, Falcó V, Almirante B, Pahissa A. Brief communication: Treatment of *Enterococcus faecalis* endocarditis with ampicillin plus ceftriaxone. Ann Intern Med. 2007;146:574-9.

43. Ge Y, Biek G, Talbot GH, Sahm DF. In vitro profiling of ceftaroline against a collection of recent bacterial isolates from across the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:3398-407.

44. Graninger W, Ragette R. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. Clin Infect Dis. 1992;15:49-57.

45. Guiton PS, Hung CS, Kline KA, Roth R, Kau AL, Hayes E, Heuser J, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. Infect Immun. 2009;77:3626-38.

46. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, de Jesus Antunes M, Thilen U, Lekakis J, Lengyel M, Müller L, Naber CK, Nihoyannopoulos P, Moritz A, Zamorano JL; ESC Committee for Practice Guidelines. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. Eur Heart J. 2009;30:2369-413.

47. Hendrickx AP, van Wamel W, Posthuma G, Bonten MJ, Willems RJ. Five genes encoding surface-exposed LPXTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex

17 isolates. J Bacteriol. 2007; 189:8321-32.

48. Hernández Martí V, Romá Sánchez E., Salavert Lletí M, Bosó Ribelles V, Poveda Andrés JL. Daptomicina: revitalizando un antiguo fármaco ante la necesidad de nuevos agentes activos frente a bacterias gram positivas multirresistentes. Rev Esp Quimioterap. 2007;20:261-76.

49. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. National Healthcare Safety Network Team, Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008;29:996-1011.

50. Hirakawa TF, Costa FA, Vilela MC, Rigon M, Abensur H, Araújo MR. *Lactococcus garvieae* endocarditis: first case report in Latin America. Arq Bras Cardiol. 2011;97:e108-10.

51. Horvitz RA, von Graevenitz A. A clinical study of the role of enterococci as sole agents of wound and tissue infection. Yale J Biol Med. 1977;50:391-5.

52. Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. Infect Immun. 1984;45:528-30.

53. Isnard C, Malbruny B, Leclercq R, Cattoir V. Genetic basis for in vitro and in vivo resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins (LSAP phenotype) in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:4463-9.

54. Jasovich A, Ganaha MC, Ebi C, García RD, Blanco MA, Lopardo H. Endocarditis due to vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* successfully treated with linezolid: case report and review of literature. Rev Argent Microbiol. 2008;40:204-7.

55. Jenkins SG, Raskoshina L, Schuetz AN. Comparison of performance of the novel chromogenic spectra VRE agar to that of bile esculin azide and *Campylobacter* agars for detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples. J Clin Microbiol. 2011;49:3947-9.

56. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev. 1994;7:462-78.

57. Jones NR, Barrett MS, Erwin ME. In vitro activity and spectrum of LY333328, a novel glycopeptide derivative. Antimicrob Agents Chemother. 1996;41:488-93.

58. Jones RN, Kohno S, Ono Y, Ross JE, Yanagihara K. ZAAPS international surveillance program (2007) for linezolid resistance: results from 5591 gram-positive clinical isolates in 23 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64:191-201.
59. Kainer MA, Devasia RA, Jones TF, Simmons BP, Melton K, Chow S, Broyles J, Moore KL, Craig AS, Schaffner W. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1024-30.
60. Kernodle DS. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. p.609-20 *En: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI (ed.) Gram-positive pathogens.* ASM Press, 2000.
61. Khardori N, Wong E, Carrasco CH, Wallace S, Patt Y, Bodey GP. Infections associated with biliary drainage procedures in patients with cancer. *Rev Infect Dis.* 1991;13:587-91.
62. Kim JH, Go J, Cho CG, Kim JI, Lee MS, Park SC. First report of human acute acalculous cholecystitis caused by the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *J Clin Microbiol.* 2013;51:712-4.
63. Korczynska M, Mukhtar T, Wright G, Berghuis AM. Structural basis for streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* by virginiamycin B lyase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:10388–93.
64. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal infection — Treatment and antibiotic resistance. *En: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, (ed.). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet].* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.
65. Lai KK. Treatment of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* infections. *Arch Intern Med.* 1996;156:2579-84.
66. Lauridsen TK, Bruun LE, Rasmussen RV, Arpi M, Risum N, Moser C, Johansen HK, Bundgaard H, Hassager C, Bruun NE. Linezolid as rescue treatment for left-sided infective endocarditis: an observational, retrospective, multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:2567-74.
67. Laverde Gómez JA, Hendrickx APA, Willems RJ, Top J, Sava I, Huebner J, Witte W, Werner G. Intra- and interspecies genomic transfer of the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *PLoS ONE.* 2011; 6: e16720.
68. Leavis HL, Willems RJ, Van Wamel WJ, Schuren FH, Caspers MP, Bonten MJ. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog.* 2007;3:e7.

69. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berqer P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. D-Ala-d-Ser *vanN*-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:4606-12.
70. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*. 1988; 319: 157-61.
71. Lefort A, Saleh-Mghir A, Garry L, Carbon C, Fantin B. Activity of LY333328 combined with gentamicin in vitro and in rabbit experimental endocarditis due to vancomycin-susceptible or -resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:3017-21.
72. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:999-1007.
- 72a. Lopardo H, Bantar C, Venuta ME, Fernández Canigia L, Barbero S, Kaufman S, Bianchini H, Ruboglio E. Detection of high and moderately high-level resistance to gentamicin and streptomycin in *Enterococcus faecium* by a disk diffusion method. *J Antimicrob Chemother*. 1995;36:237-40.
73. Lopardo H, Blanco MA, Carbonaro M, Ruvinsky S, Andi6n E, Venuta ME, Corso A, Gagetti P, Bologna R. Impacto de 10 a6os de vigilancia de colonizaci6n con enterococos resistentes a vancomicina en un hospital pedi6trico de alta complejidad. *Medicina Infantil*. 2008;15:114-20.
74. Lopardo H, Casimir L, Hern6ndez C, Ruboglio E. Isolation of three strains of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;9:402-5.
75. Lopardo H, Venuta ME, Ruboglio EA. Penicillin-resistance and aminoglycoside-penicillin synergy in enterococci. *Chemotherapy* 1995;41:165-71.
76. Lopardo HA, Kaufman S, Lauro L, Vidal P and Buenos Aires Microbiology Network. One-day prevalence study on colonization with vancomycin-resistant enterococci in intensive care units of Buenos Aires City. En: Martin DR, Tagg JR (ed) *Streptococci and streptococcal diseases: entering the new millenium*. (Proceedings of the XIV Lancefield Symposium of Streptococcus and Streptococcal Diseases, Auckland, New Zealand, 1999). p. 259-61, Securacopy Book, New Zealand, 2000.
77. Lund B, Agvald-6hman C, Hultberg A, Edlund C. Frequent transmission of enterococcal strains between mechanically ventilated patients treated at an intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2084-8.



78. Mainardi JL, Gutmann L, Acar JF, Goldstein FW. Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1984-7.
79. Mannion PT, Rothburn MM. Diagnosis of bacterial endocarditis caused by *Streptococcus lactis*. *J Infect Dis*. 1990;21:317-8.
80. Marín ME, Mera JR, Arduino RC, Correa AP, Coque TM, Stambouliau D, Murray BE. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clin Infect Dis*. 1998;26:235-6.
81. Marshall S, Donskey C, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3334– 6.
82. Mc Bride SM, Coburn PS, Baghdayan AS, Willems RJ, Grande MJ, Shankar N, Gilmore MS. Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2009;191:3392-402.
83. Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J Infect Dis*. 1983;147:751-7.
84. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12:1221–36.
85. Mohr JF, Friedrich LV, Yankelev S, Lamp K. Daptomycin for the treatment of enterococcal bacteraemia: results from the Cubicin Outcomes Registry and Experience (CORE). *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:543-8.
86. Montecalvo MA, Horowitz H, Wormser GP, Seiter K, Carbonaro CA. Effect of novobiocin-containing antimicrobial regimens on infection and colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:794.
87. Murray BE, Singh KV, Markowitz SM, Lopardo HA, Patterson JE, Zervos MJ; Rubeglio EA, Eliopoulos GM, Rice LB, Goldstein FW, Jenkins SG, Caputo GM, Nasnas R, Moore LS, Wong ES, Weinstock G. Evidence for clonal spread of a single strain of  $\beta$ -lactamase-producing *Enterococcus faecalis* to six hospitals in five states. *J Infect Dis*. 1991;163:780-5.
88. Murray BE, Lopardo HA, Rubeglio EA, Frosolono M, Singh KV. Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant,  $\beta$ -lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Antimicrob*

Agents Chemother. 1992;36:230-2.

89. Murray BE, Mederski-Samoraj B. Transferable beta-lactamase: a new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. J Clin Invest. 1983;72:1168-71.
90. Murray BE. The life and the times of *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev. 1990;3:45-65.
91. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Engl J Med. 2000;342:710-2
92. Navas ME, Hall G, El Beijani D. A case of endocarditis caused by *Lactococcus garvieae* and suggested methods of identification. J Clin Microbiol. 2013;51:1990-2.
93. Nomura T, Tanimoto K, Shibayama K, Arakawa Y, Fujimoto S, Ike Y, Tomita H Identification of *vanN*-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from chicken meat in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:6389-92.
94. Pellizzer G, Benedetti P, Biavasco F, Manfrin V, Franzetti M, Scagnelli M, Scarparo C, de Lalla F. Bacterial endocarditis due to *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: case report. Clin Microbiol Infect. 1996;2:230-2.
95. Pillai SK, Sakoulas G, Gold HS, Wennersten C, Eliopoulos GM, Moellering RC, Inouye RT. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. J Clin Microbiol. 2002;40:2651-2.
96. Pontikis K, Pefanis A, Tsaganos T, Tzepe IM, Carrer DP, Giamarellou H. Efficacy of tigecycline alone and in combination with gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to linezolid-resistant *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:3392-4.
97. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:967–71.
- 97a. Predari S, Gutiérrez MA, Ribas C, Molinari GS, Santopianni JE. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* to twelve antibiotics, time-kill assays, and high-level aminoglycoside resistance in a university hospital in Argentina. Rev Argent Microbiol. 1991;23:67-78.
98. Price CS, Paule S, Noskin GA, Peterson LR. Active surveillance reduces the incidence of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia. Clin Infect Dis. 2003;37:921-8.
99. Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, Shinabarger DL, Millichap J, Peterson LR, Noskin GA. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2154-6

100. Ramírez B, Centrón D, Ramírez MS, Lopardo H. Isolation and characterization of lytic bacteriophages of *Enterococcus* spp. Proceedings of the XVI Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Palm Cove, Australia, September 5-30, 2005. International Congress Series 2006; 1289: 162-164.
101. Ramotar K, Woods W, Larocque L, Toye B. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (vanC VRE). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;36:119-24.
102. Ravelo C, Magariños B, López-Romalde S, Toranzo AE, Romalde JL. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 2003;41:751-6.
103. Rice LB, Bellais S, Carias LL, Hutton-Thomas R, Bonomo RA, Caspers P, Page MGP, Gutmann L. Impact of specific *pbp5* mutations on expression of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 3028-32.
104. Rice LB, Carias LL, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, Klare I, Nallapareddy SR, Huang W, Murray BE. A potential virulence gene, *hyl<sub>Em</sub>*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis*. 2003;187;508-12.
105. Russo G, Iannetta M, D'Abramo A, Mascellino MT, Pantosti A, Erario L, Tebano G, Oliva A, D'Agostino C, Trinchieri V, Vullo V. *Lactococcus garvieae* endocarditis in a patient with colonic diverticulosis: first case report in Italy and review of the literature. *New Microbiologica*. 2012;35:495-501.
106. Sabol K, Patterson J, Lewis JS, Owens A, Cadena J, Jorgensen JH. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1664-5.
107. Sahgal VS, Urban C, Mariano N, Weinbaum F, Turner J, Rahal JJ. Quinupristin/dalfopristin (RP59500) therapy for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* aortic graft infection: case report. *Microb Drug Resist*. 1995;1:245-7.
108. Saidane O, Mahmoud I, Saadi F, Souayah A, Zouari R. Spondylodiscitis and *Lactococcus cremoris* endocarditis. *Med Mal Infect*. 2013;43:489-90.

109. Sakoulas G, Nonejuie P, Nizet V, Pogliano J, Crum-Cianflone N, Haddad F. Treatment of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* endocarditis with daptomycin plus ceftaroline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:4042-5.
110. Saleh-Mghir A, Lefort A, Petegnief Y, Dautrey S, Vallois JM, Le Guludec D, Carbon C, Fantin B. Activity and diffusion of LY333328 in experimental endocarditis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:115-20.
111. Sandoe JA, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol.* 2003;52:547-50.
112. Sava IG, Helkens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:533-40.
113. Schleifer KH, Kilpper-Baltz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34:31-4.
114. Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Baltz R, Collins MD, Fisher W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Bacteriol.* 1985;6:183-95.
115. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature.* 2002;417:746-50.
116. Sherman JM. The streptococci. *Bacteriol Rev.* 1937;1:3-97.
117. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34:1-14.
118. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002 - 2006. *Clin Infect Dis.* 2008;46: 668-74.
119. Sifaoui F, Arthur M, Rice L, Gutmann L. Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2594-7.

120. Singh KV, Weinstock G, Murray B. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1845–50.
121. Sun M, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Tian L, Sun Z. The first report of the *vanC1* gene in *Enterococcus faecium* isolated from a human clinical specimen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:712-5.
122. Teixeira LM, Carvalho MG, Merquior VL, Steigerwalt G, Brenner DJ, Facklam RR. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis* including strains isolated from human sources. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2778-81.
123. Teixeira LM, Siqueira Carvalho MG, Shewmaker PL, Facklam RR. *Enterococcus*. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW.(ed). *Manual of Clinical Microbiology.* p. 350-64, ASM Press, Washington D.C.10<sup>th</sup> ed., 2011.
124. Tenover FC. Laboratory methods for surveillance of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Newsl.* 1998; 20: 1-5.
125. Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2010; 78:4936-43.
126. Toh S, Xiong L, Arias C, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, Mankin AS. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol.* 2007;64:1506–14.
127. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;52:297-308.
128. Topçu Y, Akıncı G, Bayram E, Hız S, Türkmen M. Brain abscess caused by *Lactococcus lactis cremoris* in a child. *Eur J Pediatr.* 2011;170:1603-5.
129. Tran TT, Palmer HR, Weimar MR, Arias CA, Cook GM, Murray BE. Oral bacitracin: a consideration for suppression of intestinal vancomycin-resistant enterococci (VRE) and for VRE bacteremia from an apparent gastrointestinal tract source. *Clin Infect Dis.* 2015;60:1726-8.

130. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1988; i: 57-8.
131. Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2006;29:177–98.
132. Vidal M, Forestier C, Charbonnel N, Henard S, Rabaud C, Lesens O. Probiotics and intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in mice and humans. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2595-8.
133. Waters CM, Hirt H, McCormick JK, Schlievert PM, Wells CL, Dunny GM. An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance requires for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Mol Microbiol*. 2004;52:1159-71.
134. Weinstein MR, Dedier H, Brunton J, Campbell I, Conly JM. Lack of efficacy of oral bacitracin plus doxycycline for the eradication of stool colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis*. 1999;29:361-6.
135. Werner G, Klare I, Witte W. Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. *Int J Med Microbiol*. 2002;292:81–94.
136. Willey BM, Kreiswirth BN, Simor AE, Faur Y, Patel M, Williams G, Low DE. Identification and characterization of multiple species of vancomycin-resistant enterococci, including an evaluation of Vitek Software Version 7.1. *J Clin Microbiol*. 1993;31:2777-9.
137. Zelenitsky SA, Karlowsky JA, Zhanel GG, Hoban DJ, Nicas T. Time-kill curves for a semisynthetic glycopeptide LY333328, against vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:1407-8.
138. Zervos MJ, Kauffman CA, Therasse PM, Bergman AG, Mikesell TS, Schaberg DR. Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Streptococcus faecalis*. *Ann Intern Med*. 1987;106:687-91.
139. Zervos MJ, Schaberg DR. Reversal of in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28:446-8.
140. Zhanel GG, Hoban DJ, Karlowsky JA. Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:324-6.
141. Zimmermann RA, Moellering RC Jr, Weinberg AN. Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. *J Bacteriol*. 1971; 105: 873-9.

## **Capítulo Ila.2.5**

### ***Abiotrophia, Granulicatella, Gemella, Aerococcus y bacterias relacionadas***

**HORACIO A. LOPARDO**

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría  
"Prof Dr Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas.  
Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Correspondencia. E-mail: [hlopar25@gmail.com](mailto:hlopar25@gmail.com)

### **II.a.2.5.1. Cocos gram positivos, catalasa negativos, distintos de estreptococos y enterococos, que se disponen en cadenas**

En esta sección describiremos las características principales de *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Leuconostoc*, *Globicatella*, *Facklamia*, *Ignavigranum* y *Dolosicoccus*. Solo una especie de *Facklamia* (*Facklamia languida* se dispone en tétradas y racimos). No se incluyeron los géneros *Vagococcus* y *Lactococcus*, porque ya se describieron en el capítulo anterior junto con los enterococos, con quienes comparten resultados similares respecto de las pruebas bioquímicas que se utilizan inicialmente para definir géneros.

#### ***Abiotrophia* y *Granulicatella***

##### **Características generales, estructura y taxonomía**

Desde su primera descripción concreta a principios de los años 60 las mal llamadas variantes nutricionales de estreptococos (VNS) recibieron distintas denominaciones y despertaron la atención de clínicos, infectólogos y microbiólogos por los frecuentes fracasos de tratamiento, por las dificultades en su recuperación a partir de materiales clínicos y por las complicaciones para definir su sensibilidad a los antibióticos. Algunas revisiones sobre este tema fueron publicadas en diversos medios



y a ellas se puede recurrir para ampliar algunos aspectos que en este capítulo puedan estar acotados<sup>109, 134, 135</sup>.

Por razones prácticas se utilizará la sigla VNS para referirse en conjunto a los microorganismos incluidos en estos dos géneros. Primariamente se los describió como formas L de estreptococos que desarrollaban auxiliados por otras bacterias (satelitismo)<sup>61</sup>. Sus requerimientos nutricionales [dependencia de clorhidrato de piridoxal (CIHP) y/o clorhidrato de cisteína (CIHCys)], su variabilidad en la coloración de Gram, su pleomorfismo y su microaerofilia fueron destacados *a posteriori* por varios autores<sup>23, 25, 115</sup>.

Al principio se los consideró mutantes deficientes de especies previamente conocidas dentro de los estreptococos del grupo viridans<sup>23, 47</sup>, basándose en resultados de pruebas de fermentación de azúcares, en los porcentajes de contenido de ramnosa de su pared celular<sup>131</sup> y en la producción de un cromóforo rosado-rojo que se encuentra localizado en la pared celular<sup>153</sup>. Bouvet et al., concluyeron que se trataba de un grupo diferente de bacterias<sup>17</sup>. Se observó que daban positiva la prueba de pirrolidonilarilamidasa (PYR) y que bioquímicamente se comportaban en forma heterogénea como para conformar tres biotipos distintos que fueron incluidos en dos especies: *Streptococcus defectivus* y *Streptococcus adjacens* (dos subespecies)<sup>16</sup>.

El estudio de las secuencias del ARNr 16S de las cepas "tipo" o de referencia de estas especies permitió establecer un nuevo género, *Abiotrophia* en el que ambas especies quedaban incluidas. Las especies fueron denominadas *Abiotrophia defectiva* y *Abiotrophia adiacens*<sup>81</sup>. Luego fueron agregadas nuevas especies: *Abiotrophia elegans*<sup>133</sup>, *Abiotrophia balaenopterae*, aislada de ballenas<sup>97</sup> y *Abiotrophia para-*

*adiacens*<sup>80</sup>.

Collins y Lawson propusieron la creación del género *Granulicatella* para abarcar las especies *Granulicatella adiacens*, *Granulicatella balaenopterae* y *Granulicatella elegans* que se diferenciaban de *A. defectiva*, que aparecía como filogenéticamente distinta<sup>43</sup>.

La morfología microscópica de estas bacterias fue excelentemente documentada por Zierdt en 1992<sup>176</sup>. Formas gram-negativas aberrantes, cadenas de cocos normales o deformados coexistían en los extendidos, aunque en condiciones más permisivas para su desarrollo predominaban las formas regulares de cocos gram-positivos. Coincidentemente Clark et al. señalaron que en los extendidos de bacterias desarrolladas en las proximidades de la bacteria "*helper*" en una prueba de satelitismo, se veían cocos gram positivos dispuestos en pares y cadenas cortas. Por el contrario, en aquellos correspondientes a colonias obtenidas de la parte más externa del desarrollo, se podían apreciar formas filamentosas y globulares que se coloreaban de rojo o de violeta con la tinción de Gram<sup>29</sup>.

Estas bacterias desarrollan formando colonias pequeñas, brillantes, frecuentemente  $\alpha$ -hemolíticas, en medios suplementados con CIHP o alrededor de colonias de estafilococos u otras bacterias en agar sangre. Aproximadamente un 10 % de las cepas son dimórficas y ese dimorfismo (colonias pequeñas y colonias más grandes) se perpetúa aún después de varios subcultivos<sup>29</sup>.

El agregado de sangre humana favorece el desarrollo de las VNS en medio líquido porque contiene entre 20 y 45  $\mu\text{g/ml}$  de CIHP<sup>133</sup>. Actualmente se sabe que los dos factores más importantes para el desarrollo de las VNS son el CIHP y el clorhidrato

de cisteína (CIHCys). La respuesta a su aporte es dependiente de la especie y aún dependiente de la cepa. Nótese que *G. elegans* desarrolla mejor con el agregado de CIHCys que con la adición de CIHP<sup>133</sup>.

Los caldos habitualmente utilizados para la realización de los hemocultivos contienen este tipo de nutrientes que se suman a los que puede aportar la sangre del paciente y de este modo las VNS desarrollan normalmente.

En medio sólido, Peterson et al. ensayaron varias alternativas, de las cuales las más aceptables fueron agar sangre de oveja y agar chocolate con base de agar Columbia y agar sangre con base de agar Brucella en los que las VNS crecen en forma de pátina. Estos investigadores no obtuvieron desarrollo en agar sangre con base de tripteína de soja, agar BHI o agar Mueller Hinton si no se les efectuaba el agregado de CIHP y/o CIHCys<sup>126</sup>.

Resumiendo, las VNS desarrollan en medios líquidos con el agregado de sangre humana (p.ej. caldos de hemocultivos adicionados de la sangre del paciente) y pueden desarrollar también en algunos caldos anaeróbicos sin agregado de sangre o nutrientes especiales. Pueden desarrollar en forma de pátina en agar sangre o agar chocolate con base de agar Columbia, sin agregados. De este modo el microbiólogo puede confundirse al iniciar su marcha de identificación ya que parece no tener requerimientos nutricionales por no observarse el típico satelitismo. Dada la variabilidad de requerimientos de las distintas cepas se recomienda el agregado de 0,001% de CIHP y 0,1% de CIHCys a los medios de cultivo.

## Identificación de género y especie

La recomendación de efectuar la coloración de Gram en forma ciega de los frascos de hemocultivos procesados por el método clásico, contribuyó sin duda a poner en evidencia la existencia de estos microorganismos de crecimiento dificultoso. En bacteriemias por VNS es frecuente que se observen cocos gram positivos en los extendidos realizados con gotas de caldos de hemocultivo y que luego no se obtenga desarrollo en los subcultivos en medio sólido. Por ello, en estos casos se recomienda efectuar la prueba de satelitismo, además de realizar un cultivo en anaerobiosis para búsqueda de cocos anaerobios.

El satelitismo es una prueba clave en la identificación a nivel de grupo de especies (VNS). Este consiste en la provisión de nutrientes por parte de otra bacteria que crece en forma concomitante, de modo que aparecen colonias "satélites" de las VNS alrededor de las de la otra bacteria (*helper*) (Fig 1). Diversas especies bacterianas e incluso de levaduras resultaron ser aptas para aportar al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de las VNS, pero se prefiere utilizar una cepa de *Staphylococcus aureus*<sup>61, 110</sup>.



**Figura 1.** Observación del fenómeno de satelitismo. Prueba realizada en agar Mueller Hinton con 5% de sangre ovina. La bacteria auxiliar empleada fue la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Nótese las pequeñas colonias que crecen alrededor de la estría del estafilococo (Fotografía obtenida por M. Litterio Bürki, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan").

El satelitismo debe ser realizado en medios no permisivos para el desarrollo *per se* de estas bacterias: agar tripteína de soja o agar Mueller Hinton, en ambos casos con el agregado de 5% de sangre ovina. Esta prueba resulta de gran utilidad en la separación de los géneros *Abiotrophia* y *Granulicatella* respecto de *Gemella*, un género poco emparentado genéticamente pero con gran similitud en su perfil de pruebas bioquímicas (Tabla 1). Esta prueba no debe realizarse con medios preparados con

base de agar Columbia puesto que, como se dijo previamente, muchas cepas de *Abiotrophia* y *Granulicatella* pueden desarrollar en ellos en forma de una fina pátina sin necesidad de contar con una bacteria auxiliar. Esto podría valorarse erróneamente como "satelitismo negativo"<sup>106</sup>. Sin embargo, no son las únicas bacterias que exhiben satelitismo. Dentro de los cocos gram positivos catalasa negativos se han descrito cepas de *Streptococcus pyogenes* nutricionalmente deficientes que mostraban un satelitismo similar al de las VNS<sup>85, 129</sup>. También, cepas de *Ignavigranum* pueden requerir de bacterias *helper* para desarrollar en medios sólidos<sup>42</sup>. Las pruebas de PYR y LAP pueden dar resultados débilmente positivos, aunque son inconfundiblemente positivas en la batería de pruebas del API 20 Strep<sup>18</sup>.

*G. adiacens* da positiva la prueba de  $\beta$ -glucuronidasa y negativa la de  $\alpha$ -galactosidasa y produce ácido de tagatosa pero no de lactosa, trehalosa y pululano, reacciones que la diferencian de *A. defectiva*. *G. para-adiacens*, tampoco produciría ácido de tagatosa. *G. elegans* da positiva las pruebas de arginina dihidrolasa e hipurato, a diferencia de las otras especies, y no produce ácido de trehalosa, tagatosa ni pululano (Tabla 2)<sup>28</sup>.

Se han desarrollado métodos moleculares para su identificación a nivel de especie<sup>122, 133</sup>. Los métodos que emplean la secuenciación de porciones de ADN parecen ser los más adecuados para la identificación tanto de género como de especies<sup>77, 159</sup>.

**Tabla 1.** Características fenotípicas diferenciales de cocos gram-positivos catalasa negativos que se disponen en cadenas. Adaptada de Ruoff <sup>137</sup>

Microorganismo	PYR	LAP	NaCl	BE	Mov	SAT	VAN
					(1)		
<i>Abiotrophia / Granulicatella</i>	+	+	-	-	-	+	S
<i>Dolobicoccus</i>	+	-	-	ND	-	-	S
<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	-/+	-	S/R
<i>Facklamia</i> spp.	+	+	+	-	-	-	S
<i>Gemella</i> spp.	+	+	-	-	-	-	S
<i>Globicatella</i>	+/-	-	+	+/-	-	-	S
<i>Ignavigranum</i>	+	+	+	-	-	+/-	S
<i>Lactococcus</i>	+/-	+	+/-	+	-	-	S
<i>Leuconostoc</i>	-	-	+	+/-	-	-	R
<i>Streptococcus</i> (excepto <i>S. pyogenes</i> y algunas cepas de <i>S. pneumoniae</i> )	-	+	-	-/+	-	-	S
<i>Vagococcus</i>	+	+	+/-	+	+	-	S

(1) Movilidad

### Habitat, patogenia y significado clínico

Las VNS se describieron como microorganismos comensales de la zona orofaríngea y de las mucosas urogenital y digestiva del hombre<sup>132</sup>. Entre las 141 especies más frecuentes de las más de 700 comensales existentes en la cavidad oral humana se encuentran las del género *Granulicatella*<sup>1</sup>. También se encontró a este tipo de bacterias entre las más predominantes en la placa dental precoz<sup>116</sup>, aunque no en los niños<sup>48</sup>. Parece razonable pensar que la cavidad oral es una puerta de entrada

frecuente de las VNS en los casos de endocarditis infecciosa humana. También estos microorganismos fueron aislados de la cavidad oral de los perros<sup>54</sup>.

**Tabla 2.** Características fenotípicas utilizadas en la identificación de las VNS a nivel de especie [adaptada de Christensen y Facklam<sup>28</sup> y Kanamoto et al.<sup>81</sup>]

Característica fenotípica	<i>A. defectiva</i>	<i>G. adiacens</i>	<i>G. para-adiacens</i>	<i>G. elegans</i>
$\alpha$ -galactosidasa	+	-	-	-
$\beta$ -galactosidasa	+	+	-	-
$\beta$ -glucuronidasa	-	+	ND	-
Fosfatasa alcalina	-	-	ND	-
$\alpha$ -fucosidasa	+	+	ND	-
Acetoína	-	-	ND	-
Arginina	-	-	-	+
Hipurato	-	-	ND	+
Inulina	-	-	ND	-
Lactosa	+	-	ND	-
Maltosa	+	+	ND	-
Rafinosa	-	-	ND	-
Sacarosa	+	+	+	+
Trehalosa	+	-	-	-
Amigdalina	-	-	ND	-
Salicina	-	-	ND	-
Pululano	+	-	-	-
Tagatosa	-	+	-	-

+, >90% de los aislamientos son positivos; -, <10% de los aislamientos son positivos; ND: no determinado.

Las VNS fueron predominantemente aisladas a partir de muestras de sangre en los laboratorios de microbiología clínica<sup>28</sup>. Varios casos aislados de bacteriemias sin endocarditis también se publicaron a lo largo de los años, incluso se reconoció a *G. adiacens* como agente de sepsis neonatal precoz<sup>11, 100, 102, 107</sup>. Son raros los casos de



endocarditis infecciosa en los que el agente causal no pueda ser recuperado de las muestras de hemocultivo (entre un 3 y un 28%). Es posible que la presencia de microorganismos de crecimiento dificultoso como las VNS sea una de las causas de las endocarditis con cultivo negativo<sup>19</sup>. Estos microorganismos causan entre un 3 y un 5% de las endocarditis "estreptocócicas"<sup>132</sup>. Un 90% de los pacientes son portadores de alguna enfermedad cardíaca de base. Su evolución es más tórpida que la de las endocarditis producidas por estreptococos del grupo viridans. Se observa falla clínica y bacteriológica hasta en un 25 a 40% de los casos de endocarditis, tanto en niños como en adultos, a pesar de efectuarse un tratamiento adecuado según los ensayos *in vitro*<sup>15</sup>.

Hasta el año 2001, en la literatura se habían descrito más de 100 casos de endocarditis por VNS<sup>19</sup>. En una serie de casos reportados por Jeng et al. solo un 10% fueron endocarditis de válvula protésica<sup>79</sup>.

Según la literatura disponible, solamente 39 casos de infecciones extravasculares por VNS fueron publicados a lo largo de 44 años (1961-2005): otitis media, infecciones de heridas, absceso pancreático, infecciones oculares, senos paranasales, médula ósea, absceso escrotal y úlcera ocular, hematoma infectado, un absceso pulmonar, cuatro abscesos cerebrales, un absceso epidural posterior a una meningitis, una meningitis iatrogénica, dos infecciones postquirúrgicas de rodilla (artritis posprotésicas), una artritis séptica primaria, tres posibles osteomielitis vertebrales, una sacroileítis acompañada de discitis, diez infecciones oculares (una conjuntivitis neonatal, tres endoftalmitis, y seis queratitis), una infección urinaria asintomática en un paciente pediátrico con uropatía compleja y una sinusitis en una niña inmunocomprometida<sup>106, 109</sup>. La evolución de las infecciones extravasculares parece ser

más favorable que la de los casos de endocarditis utilizando los esquemas habituales de tratamiento.

La patogénesis de la endocarditis infecciosa comienza con la adherencia del microorganismo infectante a una válvula cardíaca dañada. Las estructuras que intervienen en esa adherencia son la matriz de fibronectina y la matriz extracelular del tejido dañado. *S. defectivus*, actualmente *A. defectiva*, parece tener afección por esta última a través de un gen (*emb*), que codifica para una proteína fibrilar<sup>110</sup>. Las cepas de *A. adiacens* (*G. adiacens*) y *A. defectiva* demostraron poseer capacidad de unirse a la fibronectina, a diferencia de las otras dos especies. Dada la diferente frecuencia relativa de las distintas especies en infecciones humanas graves, se puede suponer que existe una posible relación entre la afección de unión a fibronectina y la infectividad de las VNS<sup>123</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

En 1982, Gephart y Washington, en un estudio de 17 aislamientos de VNS, encontraron que tres de ellos presentaban una CIM de penicilina  $\geq 0,12 \mu\text{g/ml}$ , pero en ningún caso, una CIM mayor de  $1 \mu\text{g/ml}$ <sup>62</sup>. Coincidentemente con Bosley y Facklam<sup>13</sup>, en un estudio más reciente de Tuohy et al. se verificó una mayor tendencia a la resistencia a penicilina que en años anteriores, con cepas que presentaban CIM de penicilina superiores a  $4 \mu\text{g/ml}$ <sup>160</sup>. Zheng et al., por su parte, observaron un 20% de resistencia a penicilina y un 60% a ceftriaxona<sup>174</sup>. Es decir que la resistencia *in vitro* a la penicilina es similar a la observada en estreptococos del grupo viridans tanto en

porcentaje como en valores de CIM, mientras que el porcentaje de resistencia a ceftriaxona es muy superior<sup>108</sup>.

La resistencia a macrólidos y clindamicina fue variable entre los diferentes estudios y llegó en algunos casos al 50%. Se reconocieron los genes *mefA* y *ermB* expresado en forma constitutiva, solos y combinados<sup>174</sup>. Aún no se han observado cepas con resistencia a altos niveles de aminoglucósidos, aunque en algunos estudios no se ensayaron concentraciones adecuadas para detectarla<sup>62, 118, 160</sup>. La resistencia a quinolonas fue observada en una sola cepa resistente a levofloxacina con una CIM = 16 µg/ml en un paciente que había recibido profilaxis previa con dicho antibiótico<sup>118</sup>. La resistencia a tetraciclina mediada por el gen *tet(M)* fue de alrededor de un 10% en dos estudios<sup>118, 160</sup>.

Todas las cepas ensayadas hasta el momento fueron sensibles a rifampicina y quinupristina/dalfopristina<sup>62, 118, 160</sup>. La primera fue exitosamente ensayada *in vitro*<sup>154</sup> e *in vivo*<sup>15</sup> en combinación con vancomicina. No se observó resistencia a vancomicina (CIM < 2 µg/ml) y sólo en un estudio se encontraron cepas con resistencia a cloranfenicol<sup>62</sup>.

### **Pruebas de sensibilidad *in vitro***

Algunos investigadores encontraron una importante disociación entre los resultados obtenidos *in vitro* con los resultados experimentales en modelos animales<sup>15</sup> e incluso con la respuesta clínica obtenida en los pacientes tratados<sup>103</sup>. Tal vez su

condición de microorganismos defectivos impida una buena actividad *in vivo* de los antibióticos que actúan alterando la biosíntesis de la pared celular, como son los glucopéptidos y los  $\beta$ -lactámicos.

El método de elección parecería ser la macrodilución en caldo Mueller Hinton con el agregado de 0,001% de CIHP y 2,5 a 5% de sangre lacada equina, con incubación al aire y lectura a las 20-24 h<sup>30</sup>. La macrodilución en caldo Todd & Hewitt + 0,001% de CIHP también fue utilizada por algunos autores que además la emplearon para efectuar curvas de muerte<sup>154</sup>. El agregado de cisteína puede interferir con la actividad de la penicilina, aunque en concentraciones menores de 0,01% su actividad parecería ser despreciable<sup>119</sup>. No obstante, el CLSI recomienda el método de microdilución en caldo Mueller Hinton con 2,5 a 5% de sangre equina lisada y solo 1  $\mu\text{g/ml}$  de CIHP. En esa guía se propone efectuar la incubación a 35°C al aire por 20 a 24 horas. Los puntos de corte para sensibilidad y resistencia son equivalentes a los que se recomiendan para estreptococos del grupo viridans, a excepción de imipenem y ciprofloxacina que no están contemplados para estos últimos<sup>30</sup>.

El método de Etest parece ser de utilidad para efectuar pruebas de sensibilidad con estos microorganismos exigentes pues desarrollan mejor en medio sólido. Douglas et al. compararon las pruebas de Etest en varios medios de cultivo con los métodos convencionales de dilución en medio líquido y en medio sólido. El agar Isosensitest + 5% de LHB+ 0,001% CIHP fue el que tuvo menos porcentaje de errores al compararse con los métodos de referencia<sup>51</sup>. La incubación debe realizarse en 5% de CO<sub>2</sub> a 35°C para los métodos de microdilución en medio líquido, Etest y dilución en medio sólido y en atmósfera normal para macrodilución en medio líquido<sup>51, 62</sup>. Varios autores

comprobaron en VNS el fenómeno de tolerancia para penicilina<sup>15, 59, 62, 72</sup> y vancomicina<sup>59</sup> según la definición de Sabath (CBM/CIM  $\geq$  32)<sup>138</sup>. La importancia de este fenómeno, en este caso como en otros, es incierta, por cuanto estaría influenciado por las condiciones de trabajo<sup>72</sup>.

## **Pautas de tratamiento**

Es importante volver a remarcar que en el caso de las VNS las pruebas de sensibilidad a los antibióticos *in vitro* no tienen el mismo valor predictivo que para otros microorganismos.

En 1989 el *American Heart Association's Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease* recomendaron el tratamiento de las endocarditis por VNS con penicilina endovenosa durante cuatro semanas y un aminoglucósido por la misma vía durante dos semanas<sup>9</sup>. A la vista de la mala respuesta con la utilización de este régimen, Stein y Libertin propusieron en el mismo año el uso de cuatro a seis semanas de terapia combinada (penicilina + gentamicina)<sup>152</sup>. Aún con este regimen se han observado fracasos terapéuticos microbiológicamente comprobados. Es por ello que cada paciente debe ser monitoreado en forma constante con hemocultivos y en caso de persistencia de la bacteriemia, apelar a tratamientos alternativos como los ensayados en animales por Bouvet et al. (p. ej. vancomicina, vancomicina + gentamicina o vancomicina + rifampicina)<sup>15</sup>. Estos tratamientos también han resultado efectivos en algunos casos de endocarditis por VNS en humanos<sup>157</sup>. Se recomienda entonces la utilización de penicilina + gentamicina durante 4 a 6 semanas para el

tratamiento de endocarditis por VNS y en caso de fracaso terapéutico o alergia a  $\beta$ -lactámicos, el uso de vancomicina sola o con agregado de gentamicina y/o rifampicina.

## ***Leuconostoc***

### **Hábitat e importancia clínica**

Son microorganismos que habitualmente pueden encontrarse en alimentos y desde allí llegar al hombre.

Las infecciones por *Leuconostoc* se caracterizan por ser secundarias a procedimientos invasores del tracto gastrointestinal, por ocurrir en pacientes inmunocomprometidos y en aquellos sometidos a tratamiento con antibióticos<sup>68</sup>. En neonatos se han registrado casos de bacteriemia que se supone estaban asociados a la colonización intraparto con microorganismos del tracto genital materno. Se los ha aislado de sangre, líquido cefalorraquídeo (ventriculitis)<sup>52</sup>, líquido de diálisis peritoneal, pus de absceso cerebral<sup>3</sup> y secreciones de heridas. También se relataron casos de osteomielitis y endoftalmitis<sup>88, 173</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especie**

Su resistencia natural a altos niveles de vancomicina, su disposición en pares y cadenas, las pruebas negativas de LAP y de PYR y la producción de gas de glucosa

en caldo de Man Rogosa y Sharpe (MRS), hacen que este género sea de muy fácil identificación (Tabla 1)<sup>136</sup>. Desarrollan a 10°C pero no a 45°C.

Las colonias, al igual de las de *Weissella* y *Pediococcus* (otros microorganismos naturalmente resistentes a vancomicina), son pequeñas y producen hemólisis alfa o gamma en agar sangre. Las pruebas que permiten diferenciar las diferentes especies pueden verse en la tabla 3.

**Tabla 3.** Características para la diferenciación de especies de *Leuconostoc*

Especie	PIG	ESC	ARA	GAL	LAC	MAL	RAF	SAC	MNL
<i>L. mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	-	+ <sup>-</sup>	+ <sup>-</sup>	+ <sup>-</sup>	V	+	+ <sup>-</sup>	+	+ <sup>1</sup>
<i>L. pseudomesenteroides</i>	- <sup>+</sup>	+	+ <sup>-</sup>	+ <sup>-</sup>	V	+	+ <sup>-</sup>	+ <sup>-</sup>	- <sup>+</sup>
<i>L. citreum</i>	+	+	+	- <sup>+</sup>	-	+	-	+	V
<i>L. lactis</i>	-	- <sup>+</sup>	- <sup>+</sup>	+	+	+	+ <sup>-</sup>	+	-
<i>L. oenos</i>	-	+	V	V	-	-	-	-	-
<i>L. gelidum</i>	-	+	+	-	-	V	+	+	-
<i>L. carnosum</i>	-	- <sup>+</sup>	-	-	-	V	-	+	-
<i>L. fallax</i>	-	ND	-	-	-	+	-	+	+ <sup>1</sup>
<i>L. argentinum</i>	-	-	V	+	+	+	+ <sup>-</sup>	+	V

+ positivo ; - negativo ; +<sup>1</sup> reacción positiva lenta; ND : no se dispone de datos; v, variable; -<sup>+</sup> la mayoría de las cepas negativas, algunas positivas. PIG: pigmento amarillo, ESC: esculina, ARA: arabinosa, GAL: galactosa, LAC: lactosa, MAL: maltosa, RAF: rafinosa, SAC: sacarosa, MNL: manitol

## Sensibilidad a los antibióticos

Los microorganismos del género *Leuconostoc* son naturalmente resistentes a glucopéptidos, con CIM de vancomicina superiores a 256 µg/ml, por un mecanismo cromosómico, constitutivo y no transferible, al igual que *Pediococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus* y *Erysipelothrix*<sup>86</sup>. Este consiste en la alteración de la síntesis de la pared celular.

Son sensibles a penicilina (CIM ≤8 mg/L) teniendo en cuenta los puntos de corte establecidos por el CLSI<sup>30, 165</sup>. Generalmente también son sensibles a tetraciclinas, cloranfenicol y aminoglucósidos. En algunas cepas se detectó resistencia a cefalosporinas y carbapenemes<sup>165</sup>. Se observaron valores bajos de CIM de linezolid y daptomicina en 68 cepas de *Leuconostoc*<sup>75</sup>.

Las pruebas de sensibilidad deben realizarse por dilución en caldo Mueller Hinton con ajuste en la concentración de cationes bivalentes y con el agregado de 2,5 a 5% de sangre lisada de caballo. La incubación se debe realizar a 35°C al aire durante 20 a 24 horas. El CLSI estableció puntos de corte para penicilina, ampicilina, minociclina, gentamicina y cloranfenicol. Las pruebas de sensibilidad para otros antibióticos pueden interpretarse en forma provisoria según las tablas establecidas para enterococos, excepto cotrimoxazol que requiere la utilización de la tabla para estafilococos<sup>30</sup>.



## ***Globicatella***

### **Hábitat e importancia clínica**

*Globicatella sanguinis* es la única especie aislada de muestras clínicas humanas. Otra especie (*Globicatella sulfidifaciens*) fue aislada de infecciones en animales domésticos<sup>164</sup>. Ambas fueron encontradas como colonizantes del intestino y en la ingle de una paciente<sup>70</sup>. *G. sanguinis* ha sido aislada de infecciones urinarias, meningitis secundaria y principalmente de bacteriemia<sup>34, 70, 144, 147</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especie**

Los microorganismos de la especie *G. sanguinis* son cocos gram positivos catalasa negativos que se disponen en pares y cadenas. Forman colonias puntiformes,  $\alpha$ -hemolíticas a las 18 horas de incubación en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Dan la prueba del PYR en forma variable (75%), positiva la de tolerancia a 6,5% de NaCl y negativa la prueba de LAP<sup>147</sup>. El uso de la secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal es de utilidad para la identificación a nivel de género, pero para separar ambas especies es necesario secuenciar el gen *sodA*<sup>70</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

En un estudio de 27 aislados clínicos se vio que *G. sanguinis* era sensible a vancomicina y a las penicilinas, pero no a las cefalosporinas (48% de resistencia a

cefotaxima)<sup>147</sup>. Se encontraron cepas resistentes a la eritromicina (CIM  $\geq 16$  mg/L) con o sin resistencia a la clindamicina (cepas resistentes con CIM  $\geq 1$  mg/L), con mecanismos diversos (genes *mefA* y *ermA*). También se ha registrado la resistencia a levofloxacin (CIM  $\geq 8$  mg/L)<sup>70, 147</sup>.

## ***Facklamia***

### **Hábitat e importancia clínica**

Los microorganismos del género *Facklamia* han sido aislados de diferentes materiales clínicos humanos: sangre, secreciones de heridas, del tracto genitourinario y de un caso de corioamnionitis<sup>37, 40, 41, 69, 93</sup>.

Se enviaron 18 aislamientos clínicos al CDC de Atlanta, EE. UU. Doce de ellos provenían de hemocultivos, uno de un exudado vaginal, uno de un absceso, uno de hueso, uno de líquido cefalorraquídeo, uno de vesícula biliar y otro de algún sitio desconocido<sup>90</sup>. Tres de las 6 cepas descritas originalmente en 1997 como *Facklamia hominis* provenían de hisopados vaginales<sup>37</sup> y 13 sobre 14 de las 18 en que se conoció el género de los pacientes, eran del sexo femenino<sup>90</sup>. Por ello se especula que el hábitat de *F. hominis* al menos, sería el tracto genital femenino.

### **Identificación a nivel de género y especie**

Hay cuatro especies de *Facklamia* aisladas de materiales clínicos humanos: *F. hominis*, *Facklamia ignava*, *Facklamia sourekii* y *Facklamia languida*. Excepto esta

última que se dispone en pares, tétradas y racimos, las especies de *Facklamia* son cocos gram positivos que forman cadenas en caldo tioglicolato. Dan positivas las pruebas de LAP y PYR, desarrollan en NaCl al 6,5% y no desdoblan la esculina<sup>136</sup>. *F. languida*, además de por su morfología, se distingue por dar negativas la prueba de hipurato y la de arginina dihidrolasa<sup>91, 93</sup>.

Cuando se utilizan métodos miniaturizados, automatizados o de espectrometría de masas es importante conocer si estas especies están incluidas o no en sus respectivas bases de datos<sup>91</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

Los 18 aislamientos estudiados por LaClaire y Facklam eran sensibles o tenían sensibilidad intermedia a la penicilina (CIM  $\leq$  0,5 mg/l) con puntos de corte extrapolados de los estreptococos del grupo viridans<sup>31</sup>. Presentaban valores de CIM mayores de 1 mg/l para cefuroxima ( $\leq$  8 mg/l), cefotaxima ( $\leq$  4 mg/l) y meropenem ( $\leq$  2 mg/l). Algunas cepas tenían valores de CIM de 16 mg/l para eritromicina, de 2 mg/l para clindamicina, de 8 mg/l para cotrimoxazol y cloranfenicol y de 4 mg/l para levofloxacina, tetraciclina y rifampicina. Todas eran sensibles a vancomicina (CIM  $\leq$  1mg/l)<sup>90</sup>.

### ***Ignavigranum***

#### **Hábitat e importancia clínica**

Muy pocas cepas de la única especie de este género, *Ignavigranum ruoffiae* han sido descritas en la literatura. Se identificaron microorganismos de esta especie en una

infección de herida y en un absceso de oído en la primera descripción de este género<sup>42</sup>. En la Argentina se describió un absceso de tejidos blandos en un varón de 83 años<sup>50a</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especie y sensibilidad a los antibióticos**

Los microorganismos de la especie *I. ruoffiae* son cocos gram positivos catalasa negativos que se disponen en pares y cadenas. Dan positiva las pruebas del PYR, LAP y tolerancia a NaCl 6,5% y negativas las de bilis esculina, esculina, hipurato y arginina (Tabla 1). Son sensibles a la vancomicina y en algunos casos pueden exacerbar su desarrollo por medio del satelitismo<sup>136</sup>. Al no figurar en la base de datos de sistemas automatizados y equipos de espectrometría de masas, por el momento no se puede lograr la identificación por estos medios<sup>50a</sup>.

La bacteria aislada en la Argentina resultó ser sensible a penicilina, vancomicina, cefalotina, ceftriaxona, carbapenemes, ciprofloxacina y cotrimoxazol. Cabe destacar que la CIM de penicilina era muy inferior (0,016 µg/ml) que la de ceftriaxona (1 µg/ml)<sup>50a</sup>.

### ***Dolosicoccus***

*Dolosicoccus paucivorans* es la única especie de este género y fue aislada de muestras de sangre<sup>44</sup>. Se caracteriza por tratarse de cocos gram positivos, catalasa negativos, que se disponen en pares y cadenas. Dan positiva la prueba de PYR pero no las de LAP, bilis esculina y NaCl al 6,5%. Son inmóviles, sensibles a la vancomicina, no hidrolizan el hipurato y dan negativa la prueba de satelitismo (Tabla 1)<sup>44, 136</sup>.

## **II.b.5.2. Cocobacilos gram positivos, catalasa negativos, que se disponen en pares y cadenas**

En esta sección describiremos las características principales solamente de *Weissella* spp.

### ***Weissella***

La filogenia de este género quedó clarificada a partir de 1990 cuando primero se definió la especie *Weissella confusa*, luego *Weissella minor*, *Weissella paramesenteroides* y, más recientemente, *Weissella viridescens*, *Weissella thailandensis* y *Weissella cibaria*<sup>112, 113</sup>.

### **Hábitat e importancia clínica**

Estas bacterias parecen habitar la mucosa colónica de individuos sanos, donde se las ha encontrado en grandes cantidades<sup>73</sup>. *W. confusa* había sido previamente clasificada como *Lactobacillus confusus* y fue descrita como agente etiológico de bacteriemia y endocarditis, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos<sup>87, 139, 148</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especie**

Las colonias de *Weissella* son pequeñas y presentan hemólisis alfa o gamma en

agar sangre, al igual que *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Su resistencia natural a vancomicina y su producción de gas de glucosa, que comparte con *Leuconostoc*, la diferencian de otras bacterias relacionadas. La prueba de arginina que da positiva para *Weissella* y negativa para *Leuconostoc* las separa de esta última.

Son dos las especies de *Weissella* aisladas a partir de materiales clínicos humanos: *Weissella confusa* y *Weissella cibaria*. Esta última también fue aislada de alimentos y de animales<sup>12</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

Al igual que *Pediococcus* y *Leuconostoc*, *Weissella* presenta resistencia natural a la vancomicina. No se cuenta con estudios suficientes de ensayo de otros antibióticos como para establecer alguna tendencia. No obstante, parecería tener un comportamiento similar a *Leuconostoc* y *Pediococcus* respecto de los  $\beta$ -lactámicos.

### **II.b.5.3. Cocos gram positivos, catalasa negativos, distintos de estreptococos y enterococos, que se disponen en tétradas o racimos**

En esta sección se describirán las características principales de *Gemella*, *Aerococcus*, *Dolosigranulum*, *Helcococcus*, *Tetragenococcus* y *Pediococcus*.

## **Gemella**

### **Características generales, estructura y taxonomía**

Son cocos gram positivos, catalasa negativos que se disponen en pares, tétradas, racimos y a veces en cadenas cortas. Algunas cepas pueden aparecer como gram negativas y otras pueden requerir de anaerobiosis estricta para su aislamiento primario a partir de muestras clínicas. Berger en 1961 propuso la creación del género *Gemella*, pensando que se trataba de cocos gram negativos<sup>8</sup>. La única especie descrita en esos años era *Gemella haemolysans*, la que luego pasó a denominarse *Neisseria haemolysans*. La segunda especie, *Gemella morbillorum*, fue transferida desde el género *Streptococcus* en 1988<sup>83</sup>. *G. morbillorum* en algún momento se clasificó también como *Peptostreptococcus morbillorum* por su preferencia por la atmósfera anaeróbica y su tendencia a formar cadenas. Su inclusión final en el género *Gemella* se debió a estudios de secuenciación de la subunidad 16S del ARN ribosomal y de hibridación del ADN<sup>58, 135</sup>. Collins et al. posteriormente describieron dos nuevas especies: *Gemella bergeri* (antes *Gemella bergeriae*) y *Gemella sanguinis*<sup>38, 39</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especie**

Estas bacterias desarrollan pobremente en agar sangre a las 48-72 horas de incubación. Las colonias son grises o incoloras, similares a las de los estreptococos del grupo viridans, no son hemolíticas o bien presentan hemólisis alfa. Su identificación es dificultosa por su lentitud en el desarrollo y sobre todo es difícil diferenciarlas de

bacterias de los géneros *Granulicatella* y *Abiotrophia*. Al igual que estas últimas, la mayoría de las cepas del género *Gemella* dan negativas las pruebas de bilis esculina y desarrollo en 6,5% de NaCl y positivas las de LAP y PYR cuando se utilizan inóculos densos (Tabla 1). La disposición en la coloración de Gram de una gota de un cultivo en caldo tioglicolato (presencia de racimos y tétradas en alrededor de un 75% de las cepas) y la no dependencia de piridoxal (70-75%) pueden servir para separar *Gemella* de las antiguamente denominadas “variantes nutricionales”<sup>58</sup>. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que *G. morbillorum* suele disponerse en pares y cadenas cortas.

*G. haemolysans*, como se mencionó previamente, puede aparecer como gram negativa en la coloración de Gram y confundirse con microorganismos del género *Neisseria*. Es una bacteria que desarrolla preferentemente en aerobiosis y da negativas las pruebas de esculina, arginina, hipurato, urea e hidrólisis de almidón. *G. haemolysans* (cocos en tétradas y racimos) se diferencia de *G. morbillorum* (cocos que también forman cadenas) porque además da positivas las pruebas de fosfatasa alcalina y reducción de nitritos y no fermenta el manitol ni el sorbitol en ensayos convencionales.

### **Habitat, patogenia e importancia clínica**

Tanto *G. haemolysans* como *G. morbillorum* son parte de la microbiota habitual del tracto digestivo (cavidad oral y mucosa gastrointestinal) y del tracto genitourinario de los seres humanos.

La más notable de las infecciones por *Gemella* spp. es la endocarditis, la que



ocurre especialmente en individuos con problemas odontológicos y/o con válvulas cardíacas dañadas<sup>19, 82, 92</sup>.

Tanto *G. haemolysans* como *G. morbilloorum* también se han aislado de hemocultivos de pacientes con abscesos cerebrales<sup>98</sup>, sometidos a terapia antitumoral<sup>171</sup>, abscesos hepáticos<sup>74</sup>, artritis séptica<sup>170</sup>, empiema pleural<sup>163</sup>, peritonitis posterior a diálisis peritoneal<sup>65</sup> y ocasionalmente de LCR de pacientes con meningitis<sup>4, 50</sup>. También *G. morbilloorum* se aisló de materiales del tracto respiratorio, del tracto urinario, de secreciones de heridas, de abscesos cutáneos, empiema, absceso pulmonar, peritonitis y osteomielitis<sup>169</sup>. Por su parte *G. bergeri* y *G. sanguinis* se aislaron de hemocultivos y podrían ser también agentes productores de endocarditis<sup>38, 39, 105</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

Buu Hoi et al. en 1982 informaron que todos los aislados probados de *G. haemolysans* eran sensibles a penicilina, ampicilina, vancomicina, rifampicina y cloranfenicol. No encontraron resistencia a altos niveles de aminoglucósidos, pero sí, al igual que Zolezzi et al. observaron altos porcentajes de resistencia a trimetoprima y algunos aislados resistentes a eritromicina y tetraciclina<sup>20, 177</sup>.

### ***Aerococcus* spp.**

Los aerococos suelen considerarse contaminantes en las muestras clínicas

humanas. No obstante se han descrito en casos de infecciones urinarias bacteriemia y endocarditis.

Son cocos gram positivos que se disponen en tétradas y racimos, desarrollan en presencia de 6,5% de NaCl, y en su mayoría dan positiva las pruebas de hipurato y  $\beta$ -glucuronidasa. El género *Aerococcus* actualmente comprende siete especies: *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinae*, *Aerococcus christensenii*, *Aerococcus urinaehominis* y *Aerococcus sanguinicola*, *Aerococcus suis*<sup>166</sup> y *Aerococcus urinaequi*<sup>60</sup>. Sólo las primeras cinco fueron aisladas de muestras pertenecientes a seres humanos.

### **Habitat, patogenia e importancia clínica**

*A. viridans* se encuentra principalmente en el suelo. También se lo ha descrito produciendo infecciones en crustáceos y como parte de la microbiota habitual de las vías aéreas superiores y de la piel de los seres humanos<sup>161</sup>. Se lo ha aislado de bacteriemia en pacientes con enfermedad de base<sup>161, 165</sup>, endocarditis<sup>127, 128</sup>, infecciones osteoarticulares<sup>120, 162</sup>, infecciones urinarias tanto en adultos como en niños<sup>33, 99</sup> y meningitis aguda<sup>121</sup>.

*Aerococcus urinae* es un microorganismo raramente aislado a partir de muestras clínicas humanas. Ha sido reconocido como un patógeno que principalmente afecta el tracto urinario de pacientes añosos, desde donde puede producir infecciones graves si no se efectúa un tratamiento adecuado<sup>155</sup>. Se calcula que su prevalencia en infecciones urinarias es de un 0,3 a un 0,8% y aparece especialmente en pacientes añosos y con condiciones urológicas predisponentes<sup>142, 143, 145, 149</sup>. También puede producir

endocarditis<sup>53</sup>, linfadenitis<sup>141</sup>, peritonitis<sup>32</sup> y espondilodiscitis<sup>5, 158</sup>.

*Aerococcus sanguinicola* fue descrito por primera vez en el año 2001<sup>95</sup>. Se lo aisló de hemocultivos, orina y se lo describió como productor de endocarditis y urosepsis. *A. christensenii* fue aislado de muestras vaginales<sup>45</sup> y *A. urinaehominis* del tracto urinario<sup>94</sup>, pero su importancia clínica es incierta.

### **Identificación a nivel de género y especie**

Las bacterias del género *Aerococcus* se disponen en pares, tétradas y racimos cuando se efectúa la coloración de los materiales clínicos o a partir de su desarrollo en caldo tioglicolato. Al utilizar las pruebas básicas para la identificación de género se puede ver que con las pruebas de PYR, LAP y desarrollo en NaCl al 6,5% ya se pueden separar las tres especies principales. *Aerococcus viridans* da positiva la prueba de PYR y negativa la de LAP. A veces también puede dar positiva la prueba de bilis esculina.

*Aerococcus urinae* produce colonias  $\alpha$ -hemolíticas en agar sangre ovina, es PYR negativo y LAP positivo a diferencia de *A. viridans*. En la tabla 4 se pueden ver las características que sirven para realizar una identificación presuntiva con solo tres pruebas básicas. *A. urinae* y *A. christensenii* se pueden diferenciar porque la primera de las especies da positiva la prueba de  $\beta$ -glucuronidasa mientras que la segunda no. *Aerococcus viridans* es  $\alpha$ -hemolítico y prefiere condiciones aeróbicas para su desarrollo. De esta manera se diferencia de *Helcococcus kunzii*, una especie con la que comparte muchas características fenotípicas, pero que frecuentemente no

presenta hemólisis y es facultativa<sup>136</sup>.

La secuenciación del gen *16S rRNA* parece ser una técnica de identificación más apropiada para todo este grupo de bacterias que los métodos fenotípicos tanto convencionales como miniaturizados y automatizados<sup>14</sup>. Además en estos sistemas comerciales no están incorporadas algunas especies como *A. sanguinicola* a su base de datos<sup>78</sup>.

**Tabla 4.** Identificación presuntiva de los cocos gram positivos, catalasa negativos que se disponen en pares, tétradas y racimos (modificada de Ruoff<sup>137</sup>).

PYR	LAP	NaCl 6,5%	Géneros y especies
+	+	+	<i>Facklamia languida</i> , <i>Dolosigranulum pigrum</i> , <i>Aerococcus sanguinicola</i>
+	+	-	<i>Gemella haemolysans</i> ,
+	-	+	<i>Aerococcus viridans</i> , <i>Helcococcus kunzii</i> *
-	+	+	<i>Aerococcus urinae</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Tetragenococcus Aerococcus christensenii</i>
-	-	+	<i>Aerococcus urinaehominis</i> , <i>Helcococcus sueciensis</i> *
-	+	+/-	<i>Pediococcus</i> spp.**

\* Las bacterias del género *Helcococcus* pueden dar positiva la prueba de satelitismo (27a).

\*\*Los aislados de *Pediococcus* spp. son naturalmente resistentes a vancomicina

## Sensibilidad a los antibióticos

*Aerococcus viridans* suele ser sensible a la penicilina y a altos niveles de aminoglucósidos<sup>21</sup>. No obstante se han descrito casos de infecciones por cepas con sensibilidad intermedia a la penicilina (CIM = 0,5 mg/l)<sup>156</sup>. Se observó también la

presencia de cepas con resistencia a macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol<sup>21</sup>.

Recientemente se publicó un caso clínico de una mujer con una infección abdominal asociada a diálisis peritoneal, con el aislamiento de *Aerococcus viridans* resistente a vancomicina, portador del gen *vanA* (CIM de vancomicina y de teicoplanina > 32 mg/l). Este aislado también era resistente a ceftriaxona, cefepima, eritromicina, levofloxacina, ofloxacina y clindamicina<sup>175</sup>.

*A. urinae* clásicamente ha sido considerado como resistente a trimetoprima-sulfametoxazol<sup>64, 151</sup>, pero estos resultados podrían estar viciados por la utilización de medios inapropiados. Humphries y col. propusieron el uso de caldo Mueller Hinton con ajuste en la concentración de cationes, suplementado con sangre lisada de caballo para pruebas de dilución en medio líquido<sup>76</sup>. En estas condiciones entre el 98,8 y el 100% aparecían como sensibles (CIM  $\leq$  0,25/4,75 mg/l). Recientemente también se han detectado aislamientos de *A. urinae* resistentes a fluoroquinolonas<sup>24, 145</sup>. En un estudio de 56 cepas de *A. urinae* se observaron rangos de sensibilidades menores para penicilinas que para cefalosporinas (ceftriaxona y cefepima). Se vieron también aislamientos de *A. urinae* con resistencia a gentamicina y ampicacina moderadamente alta. Aquí también se observaron cepas con resistencia a eritromicina, rifampicina y sensibilidad intermedia a ciprofloxacina y tetraciclinas por puntos de corte sugeridos para estreptococos del grupo viridans o *Streptococcus pneumoniae*<sup>31</sup>. Las CIM de vancomicina fueron de 0,5 y 1 mg/l y en algún caso se observó actividad bactericida por parte de este antibiótico a través de curvas de muerte<sup>151</sup>.

El comportamiento frente a los antibióticos de *A. sanguinicola* ha demostrado tener características similares a las de *A. urinae*. Se observaron CIM más elevadas

para cefalosporinas que para penicilinas, cepas resistentes a eritromicina, otras con sensibilidad intermedia y hasta con resistencia a fluoroquinolonas<sup>56, 146</sup>. En uno de los estudios se detectaron además cepas resistentes a meropenem con CIM de 1 y 2 mg/l<sup>56</sup> y en otro, cepas con CIM de vancomicina de hasta 4 mg/l<sup>146</sup>.

### ***Dolosigranulum pigrum***

Son cocos gram positivos, catalasa negativos que se disponen en pares, tétradas y racimos, descritos por primera vez en 1993 por Aguirre et al. en muestras de tejido de médula espinal y de hisopado ocular<sup>2</sup>.

### **Habitat e importancia clínica**

Desde su primera descripción en muestras clínicas esta especie ha sido aislada principalmente a partir de hemocultivos. En uno de los casos se trataba de un paciente con probable artritis séptica tratado con inmunosupresores y en otro, de un paciente con colecistitis y pancreatitis<sup>67, 104</sup>. Una serie de 14 cepas sobre 27 enviadas al CDC de Atlanta EE.UU. correspondían a aislamientos de hemocultivos. Las otras 13 pertenecían a muestras oculares, de la nasofaringe, de senos paranasales, esputo y estómago<sup>89</sup>. Todo esto sugiere que el habitat natural de estas bacterias podría ser el tracto respiratorio superior.

Adicionalmente se describieron casos de neumonías intrahospitalarias asociadas o no a ventilación mecánica<sup>71, 97</sup>. Más aún, últimamente se lo ha valorado como uno de

los patógenos potenciales en pacientes con fibrosis quística<sup>10</sup>. También, recientemente se describieron tres casos de queratitis unilateral por *D. pigrum* en pacientes añosos, en dos de los cuales hubo perforación de la córnea<sup>140</sup>.

### **Identificación anivel de género y especie**

*D. pigrum*, como ya se mencionó, es un coco gram positivo que se dispone en pares tétradas y racimos. Es la única especie del género descrita hasta la fecha. Da positivas las reacciones de PYR y LAP y se distingue de las especies de *Gemella* por crecer en presencia de NaCl al 6,5% y de las de *Facklamia* spp. que se disponen en racimos por dar positiva la prueba de esculina<sup>136</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

En un estudio de LaClaire y Facklam se observó que estos microorganismos eran sensibles a penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, rifampicina, tetraciclina, clindamicina y levofloxacin. La sensibilidad a eritromicina era variable y encontraron una cepa con resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol<sup>89</sup>.

### ***Helcococcus***

Este género fue descrito por primera vez en 1993 como integrado por bacterias

similares a *Aerococcus*<sup>35</sup>. Actualmente se reconocen dos especies aisladas de seres humanos: *Helcococcus kunzii* (la original) y *Helcococcus sueciensis* (descrita en 2004)<sup>36</sup>. *Helcococcus pyogenes* todavía no ha sido reconocida como tal en forma oficial<sup>136</sup> y otra especie, *Helcococcus seattlensis*, ha sido propuesta recientemente a partir de su aislamiento en muestras de hemocultivo<sup>27a</sup>. *Helcococcus ovis* ha sido aislada de animales.

### **Hábitat e importancia clínica**

*H. kunzii* es un colonizante habitual de la piel de las extremidades inferiores<sup>66</sup>. Su presencia en úlceras de pie podría ser un punto de partida para infecciones más profundas<sup>117</sup>. Se lo ha encontrado como oportunista produciendo infecciones de piel y abscesos en tejidos blandos (mamario y posquirúrgico de pie), en algunos casos como parte de una microbiota mixta<sup>22, 26, 101, 124, 131</sup> y en una infección de una prótesis colocada como reemplazo total de rodilla en un paciente inmunocompetente<sup>125</sup>. *H. kunzii* también fue aislada de bacteriemia y líquido pleural como copatógena en dos casos de *shock* séptico (uno de ellos con un empiema) en sendos pacientes drogadictos<sup>171</sup>. El 85% de 39 cepas de *H. kunzii* aisladas entre 2008 y 2013 de muestras clínicas humanas correspondían a verdaderas infecciones (79% procedentes de úlceras de pie)<sup>168</sup>. Recientemente se informó un caso de endocarditis de válvula nativa por *H. kunzii* en un paciente añoso con enfermedad polivascular<sup>109a</sup>.



## Identificación a nivel de género y especie

Son cocos gram positivos catalasa negativos que se disponen en pares, racimos y tetradas. *H. kunzii* da positivas las pruebas de PYR y NaCl al 6,5% y negativa la de LAP, por lo que puede confundirse con *Aerococcus viridans* (Tabla 3). Se diferencia principalmente porque *H. kunzii* es anaerobio facultativo y frecuentemente no hemolítico, mientras que *Aerococcus viridans* es favorecido por las condiciones aeróbicas y es alfa hemolítico<sup>136</sup>. *H. kunzii* da negativas las pruebas de bilis esculina, movilidad, hipurato, satelitismo, arginina y  $\beta$ -glucuronidasa y positiva la de esculina<sup>35</sup>. Las colonias de *H. sueciensis* son puntuales, grisáceas y no hemolíticas a las 48 h de incubación en anaerobiosis. *H. sueciensis* se distingue de *H. kunzii* en que, a diferencia de ésta, da positiva las pruebas de fosfatasa alcalina y negativas las de  $\beta$ -glucosidasa y PYR. Son microorganismos anaerobios facultativos pero crecen mejor en condiciones anaeróbicas. .

*H. kunzii* ha podido ser identificado por el sistema automatizado VITEK 2 GP<sup>101</sup>. El método de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y los métodos moleculares identifican a estas bacterias en forma precisa<sup>167</sup>.

## Sensibilidad a los antibióticos

*H. kunzii* mostró sensibilidad a penicilina y vancomicina en varios estudios. Los  $\beta$ -lactámicos parecen ser los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones producidas por estas bacterias. La mayoría también son sensibles a clindamicina pero

hay un 28,2% de aislados resistentes a eritromicina con CIM > 256 µg/ml<sup>168</sup>. En una cepa resistente a clindamicina y eritromicina se detectó el gen *ermA*<sup>26, 124, 171</sup>. En un estudio de 39 aislados se describió un 95% de sensibilidad a levofloxacin y tetraciclina<sup>168</sup>. Recientemente se comunicó el hallazgo de una cepa multirresistente que presentaba una homología genética del 99% con *H. sueciensis*. Esta bacteria demostró por Etest ser resistente a vancomicina (CIM = 4 mg/l), a penicilina, a ceftriaxona, a ciprofloxacina, y a trimetoprima-sulfametoxazol<sup>111</sup>. Los autores reportaron al menos dos casos previamente publicados en la literatura de bacterias similares a *Helcococcus* con resistencia a vancomicina.

## ***Tetragenococcus***

El género *Tetragenococcus* fue descrito por Collins en 1990 por reclasificación de una especie halófila y láctica previamente conocida como *Pediococcus halophilus* y *Enterococcus solitarius*<sup>46, 55</sup>. Las especies fueron denominadas *Tetragenococcus halophilus* y *Tetragenococcus solitarius*. Estas bacterias se aislaron de alimentos ricos en sales y proteínas como anchoas en salmuera, salsa de soja, etc. Por el momento, el género comprende cuatro especies: *T. halophilus*, *Tetragenococcus muriaticus*, *T. solitarius* y *Tetragenococcus koreensis*. Estas dos últimas están representadas por una sola cepa.

*T. muriaticus* y *T. koreensis* también se aislaron de alimentos, mientras *T. solitarius* se aisló de una muestra clínica.

Todas las cepas de este género desarrollan bien a pH 9, pero no a pH 5 y

toleran altas concentraciones de NaCl. Más aún, *T. muriaticus* no puede crecer en ausencia de NaCl.

*T. koreensis* y *T. solitarius* desarrollan en el medio de Man Rogosa y Sharpe (MRS) mientras que *T. muriaticus* no lo hace. Solo *T. solitarius* es capaz de desarrollar a 45°C.

Fenotípicamente se los puede describir como *Pediococcus* sensibles a vancomicina (Tabla 5).

## ***Pediococcus***

### **Hábitat e importancia clínica**

Si bien se trata de microorganismos de importancia como probióticos, a los pediococos se los ha aislado de abscesos hepáticos, bacteriemia y sepsis en pacientes debilitados<sup>63, 114, 150</sup>. En clínica humana se los aisló principalmente de casos de bacteriemia en niños con malformaciones gastrointestinales intervenidos quirúrgicamente<sup>7</sup>. Según Barros y col. *P. acidilactici* es más frecuente que *P. pentosaceus* en materiales clínicos humanos<sup>6</sup>.

### **Identificación a nivel de género y especie**

Los pediococos no son difíciles de identificar. Se trata de cocos que se disponen en pares, racimos o tétradas, son resistentes naturales a la vancomicina y dan positiva

la prueba de LAP, pero no la de PYR (Tabla 4)<sup>136</sup>.

Solamente dos especies: *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* han sido aisladas de materiales clínicos humanos (Tabla 5)<sup>57</sup>.

### **Sensibilidad a los antibióticos**

Estas bacterias son naturalmente resistentes a glucopéptidos, con CIM superiores a 256 µg/ml. El mecanismo es cromosómico, constitutivo y no transferible, al igual que el de *Leuconostoc*<sup>86</sup>. Han mostrado sensibilidad a penicilinas, a altos niveles de aminoglucósidos, a macrólidos, lincosamidas y cloranfenicol<sup>165</sup>. Se observaron algunas cepas no clínicas con sensibilidad intermedia a estreptograminas y linezolid y también resistentes a tetraciclinas. Se registró también resistencia al cotrimoxazol y a cefalosporinas de tercera generación, pero no a carbapenemes<sup>49, 75, 84, 165</sup>.

Las pruebas de sensibilidad deben realizarse por dilución en caldo Mueller Hinton con ajuste en la concentración de cationes bivalentes y con el agregado de 2,5 a 5% de sangre lisada de caballo. La incubación se debe realizar a 35°C al aire durante 20 a 24 horas. El CLSI estableció puntos de corte para penicilina, ampicilina, imipenem, gentamicina y cloranfenicol. Las pruebas de sensibilidad para otros antibióticos podrán interpretarse en forma provisoria según las tablas establecidas para enterococos, excepto cotrimoxazol que requerirá de la tabla para estafilococos<sup>30</sup>.

**Tabla 5.** Características para la identificación de especies de *Pediococcus* y de *Tetragenococcus halophilus*

Especie	Desarrollo	GLU	GLI	ALM	MAL	ARA	DEX	XIL	MEL
	a 45°C								
<i>P. acidilactici</i>	+	+	-	-	-	V	-	+	-
<i>P. pentosaceus</i>	V	+	-	-	+	+	-	V	-
<i>P. dexnitricus</i>	-	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>P. damnosus</i>	-	+	-	-	V	-	-	-	V
<i>P. parvulus</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. inopinatus</i>	-	+	-	-	+	-	V	-	-
<i>T. halophilus</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	+

Glu: glucosa, GLI: glicerol, ALM: almidón, MAL: maltosa, ARA: arabinosa, DEX: dextrina, XIL: xilosa, MEL: melitosa.

## Bibliografía

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721-32.
2. Aguirre M, Morrison D, Cookson BD, Gay FW, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Gemella*-like organisms from human infections: description of *Dolosigranulum pigrum* gen. nov., sp. nov. *J Appl Bacteriol.* 1993; 75: 608-12.
3. Albanese A, Spanu T, Sali M, Novegno F, D'Inzeo T, Santangelo R, Mangiola A, Anile C, Fadda G. Molecular identification of *Leuconostoc mesenteroides* as a cause of brain abscess in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3044-5.
4. Anil M, Ozkalay N, Helvaci M, Agus N, Guler O, Dikerler A, Kanar B. Meningitis due to *Gemella haemolysans* in a pediatric case. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2337-9.
5. Astudillo L, Sailer L, Porte L, Lefevre JC, Massip P, Arlet-Suau E. Spondylodiscitis due to *Aerococcus urinae*: a first report. *Scand J Infect Dis.* 2003; 35: 890-1.
6. Barros RR, Carvalho MD, Peralta JM, Facklam RR, Teixeira LM. Phenotypic and genotypic characterization of *Pediococcus* strains isolated from human clinical sources. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1241-6.
7. Barton LL, Rider ED, Coen RW. Bacteremic infection with *Pediococcus*: vancomycin-resistant opportunist. *Pediatrics.* 2001; 107: 775-6.
8. Berger U. A proposed new genus of gram-negative cocci: *Gemella*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon.* 1961; 11: 17-9.
9. Bisno AL, Dismukes WE, Durack DT, Kaplan EL, Karchmer AW, Kaye D, Rahimtoola SH, Sande MA, Sanford JP, Watanakunakorn C, Wilson WR. Antimicrobial treatment of infective endocarditis due to viridans streptococci, enterococci and staphylococci. *JAMA.* 1989; 261: 1471-7.
10. Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremmer N, Sarles J, Raoult D, Rolain JM. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE.* 2008; 3: e2908.
11. Bizarro MJ, Callan DA, Farrel PA, Dembry LM, Gallagher PG. *Graulicatella adiacens* and

early-onset sepsis in neonate. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 1971-3.

12. Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov. detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52(Pt 1): 141-8.

13. Bosley GS, Facklam RR. Biochemical and antimicrobial testing of nutritionally variant streptococci. 90<sup>th</sup> Annual Meeting American Society for Microbiology, 1990, Abstract C-307, p.395, Anaheim, California, Estados Unidos.

14. Bosshard PP, Abels S, Altwegg M, Bottger EC, Zbinden R. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2065-73.

15. Bouvet A, Cremieux AC, Contrepolis A, Vallois J-M, Lamesch C, Carbon C. Comparison of penicillin and vancomycin, individually and in combination with gentamicin and amikacin, in the treatment of experimental endocarditis induced by nutritionally variant streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 28: 607-11.

16. Bouvet A, Grimont F, Grimont PA. Intraspecies variations in nutritionally variant streptococci: rRNA gene restriction patterns of *Streptococcus defectivus* and *Streptococcus adjacens*. *Int J Syst Bacteriol.* 1991; 41: 483-6.

17. Bouvet A, Grimont F, Grimont PAD. *Streptococcus defectivus* sp. nov. and *Streptococcus adjacens* sp. nov. nutritionally variant streptococci from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 1989; 39: 290-4.

18. Bouvet A, Villeroy F, Cheng F, Lamesch C, Williamson R, Gutmann L. Characterization of nutritionally variant streptococci by biochemical tests and penicillin-binding proteins. *J Clin Microbiol.* 1985; 22: 1030-4.

19. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 177-207.

20. Buu Hoi A, Sapoeira A, Branger C, Acar JF. Antimicrobial susceptibility of *Gemella haemolysans* isolated from patients with subacute endocarditis. *Eur J Clin Microbiol.* 1982; 1: 102-6.

21. Buu-Hoi A, Le Bouguenec CL, Horaud T. Genetic basis of antibiotic resistance in *Aerococcus*

*viridans*. Antimicrob Agents Chemother. 1989; 33: 529-34.

22. Caliendo AM, Jordan CD, Ruoff KL. *Helcococcus*, a new genus of catalase-negative, gram-positive cocci isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1638-9.

23. Carey RB, Gross KC, Roberts RB. Vitamin B6-dependent *Streptococcus mitior* (*S.mitis*) isolated from patients with systemic infections. J Infect Dis. 1975; 131: 722-6.

24. Cattoir V, Kobal A, Legrand P. First molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Aerococcus* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55: 451-2.

25. Cayeux P, Acar JF, Chabbert YA. Bacterial persistence in streptococcal endocarditis due to thiol-requiring mutants. J Infect Dis. 1971; 124: 247-54.

26. Chagla AH, Borczyk AA, Facklam RR, Lovgren M. Breast abscess associated with *Helcococcus kunzii*. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2377-9.

27. Christensen JJ, Facklam RR. *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3520-3523.

27a. Chow SK, Clarridge III JE. Identification and clinical significance of *Helcococcus* species, with description of *Helcococcus seattlensis* sp. nov. from a patient with urosepsis. J Clin Microbiol. 2014; 52: 854-8.

28. Christensen JJ, Facklam RR. *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3520-3.

29. Clark RB, Gordon RE, Bottone EJ, Reitano M. Morphological aberrations of nutritionally deficient streptococci: association with pyridoxal (vitamin B<sub>6</sub>) concentration, and potential role in antibiotic resistance. Infect Immun. 1983; 42: 414-7.

30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline, 2<sup>nd</sup>. ed. Document M45-2 Vol 30 No.18, CLSI, Wayne, PA, EE.UU., 2010.

31. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22<sup>nd</sup>. Vol 32 No.3, informational supplement. M100-S22, CLSI, Wayne, PA, 2011.



32. Colakoglu S, Turunc T, Taskoparan M, Aliskan H, Kizilkilic E, Demiroglu YZ, Arslan H. Three cases of serious infection caused by *Aerococcus urinae*: a patient with spontaneous bacterial peritonitis and two patients with bacteremia. *Infection* 2008; 36: 288-90.
33. Collins LE, Clarke RW, Maskell R. Streptococci as urinary pathogens. *Lancet* 1986; ii: 479-81.
34. Collins MD, Aguirre M, Facklam RR, Shallcross J, Williams AM. *Globicatella sanguis* gen. nov., sp. nov, a new gram-positive catalase-negative bacterium from human sources. *J Appl Bacteriol.* 1992; 73: 433-7.
35. Collins MD, Facklam RR, Rodrigues UM, Ruoff KL. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1993; 43: 425-9.
36. Collins MD, Falsen E, Brownlee K, Lawson PA. *Helcococcus sueciensis* sp. nov., isolated from a human wound. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54: 1557-60.
37. Collins MD, Falsen E, Lemozy J, Åkervall E, Sjöden B, Lawson PA. Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Globicatella*-like organisms from human sources: description of *Facklamia hominis* gen. nov., sp. nov. *Int Syst Bacteriol.* 1997; 47: 880-2.
38. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, Sjöden B, Facklam RR. *Gemella bergeriae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1290-3.
39. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, Sjoden B, Facklam RR. Description of *Gemella sanguinis* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3090-3
40. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, Sjöden B. *Facklamia sourekii* sp. nov., isolated from human sources. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49: 635-8.
41. Collins MD, Lawson PA, Monasterio R, Falsen E, Sjoden B, Facklam RR. *Facklamia ignava* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2146-8.
42. Collins MD, Lawson PA, Monasterio R, Falsen E, Sjöden B, Facklam RR. *Ignavigranum ruoffiae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999; 49: 97-101.
43. Collins MD, Lawson PA. The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al.) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov., and *Granulicatella balaenopterae* comb.nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50: 365-9.

44. Collins MD, Rodríguez Jovita M, Hutson RA, Falsen E, Sjöden B, Facklam RR. *Dolosicoccus paucivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human blood. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49: 1439-42.
45. Collins MD, Rodríguez Jovita M, Hutson RA, Ohlen M, Falsen E. *Aerococcus christensenii* sp. nov., from the human vagina. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49: 1125-8.
46. Collins MD, Williams AM, Wallbanks S. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol Lett.* 1990; 70: 255-62.
47. Cooksey RC, Thompson FS, Facklam RR. Physiological characterization of nutritionally variant streptococci. *J Clin Microbiol.* 1979; 10: 326-30.
48. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, Goss AL, Corby AL, Junior HM, Weyant RJ, Paster BJ. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5753-9.
49. de la Maza L, Ruoff KL, Ferraro MJ. In vitro activities of daptomycin and other antimicrobial agents against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33: 1383-4.
50. Debast SB, Koot R, Meis JFGM. Infections caused by *Gemella morbillorum*. *Lancet.* 1993; 342: 560.
- 50a. De Paulis AN, Bertona E, Gutiérrez MA, Ramírez MS, Vay CA, Predari SC. *Ignavigranum ruoffiae* isolated from a human skin abscess. Abstract 0223. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Buenos Aires, November 9-12, 2014.
51. Douglas CP, Siarakas S, Gottlieb T. Evaluation of Etest as a rapid method for determining MICs for nutritionally variant streptococci. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2318-20.
52. Dye G, Lewis J, Patterson J, Jorgensen J. A case of *Leuconostoc* ventriculitis with resistance to carbapenem antibiotics. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 869-70.
53. Ebnöther C, Altwegg M, Gottschalk J, Seebach JD, Kronenberg A. *Aerococcus urinae* endocarditis: case report and review of the literature. *Infection.* 2002; 30: 310-3.
54. Elliott DR, Wilson M, Buckley CM, Spratt DA. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. *J Clin*

Microbiol. 2005; 43: 5470-6.

55. Ennahar S, Cai Y. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 589-92.

56. Facklam R, Lovgren M, Shewmaker P, Tyrrell G. Phenotypic description and antimicrobial susceptibilities of *Aerococcus sanguinicola* isolates from human clinical samples. J Clin Microbiol. 2003; 41: 2587-92.

57. Facklam RR. Newly described, difficult-to-identify, catalase-negative, gram-positive cocci. Clin Microbiol Newsl. 2001; 23: 1-7.

58. Facklam RR, Elliott JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clin Microbiol Rev. 1995; 8: 479-95.

59. Feder HM, Olsen N, McLaughlin JC, Barlett RC, Chameides L. Bacterial endocarditis caused by vitamin B<sub>6</sub>-dependent viridans group streptococcus. Pediatrics. 1980; 66: 309-12.

60. Felis GE, Torriani S, Dellaglio F. Reclassification of *Pediococcus urinaequi* (ex Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaequi* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 1325-7.

61. Frenkel A, Hirsch W. Spontaneous development of L forms of streptococci requiring secretions of other bacteria or sulphhydryl compounds for normal growth. Nature. 1961; 191: 728-30.

62. Gephart JF, Washington JA II. Antimicrobial susceptibilities of nutritionally variant streptococci. J Infect Dis. 1982; 146: 536-9.

63. Golledge CL, Stingemore N, Aravena M, Joske K. Septicemia caused by vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1678-9.

64. Grude N, Jenkins A, Tveten Y, Kristiansen BE. Identification of *Aerococcus urinae* in urine samples. Clin Microbiol Infect. 2003; 9: 976-9.

65. Guney I, Isik A, Altintepe L, Er C, Kurdoglu MG. *Gemella morbillorum* peritonitis in a CAPD patient. Perit Dial Int. 2009; 29: 674-5

66. Haas J, Jernick SL, Scardina RJ, Teruya J, Caliendo AM, Ruoff KL. Colonization of skin by *Helcococcus kunzii*. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2759-61.

67. Hall GS, Gordon S, Schroeder S, Smith K, Anthony K, Procop GW. Case of synovitis potentially

caused by *Dolosigranulum pigrum*. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1202-3.

68. Handwerger S, Horowitz H, Coburn K, Kolokathis A, Wormser GP. Infection due to *Leuconostoc* species: six cases and review. Rev Infect Dis. 1990; 12: 602-10.

69. Healy B, Beukenholt RW, Tuthill D, Ribeiro CD. *Facklamia hominis* causing chorioamnionitis and puerperal bacteraemia. J Infect. 2005; 50: 353-5.

70. Héry-Arnaud G, Doloy A, Ansart S, Le Lay G, Le Flèche-Matéos A, Seizeur R, Garré M, Payan C, Bouvet A. *Globicatella sanguinis* meningitis associated with human carriage. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1491-3.

71. Hoedemaekers A, Schülin T, Tonk B, Melchers WJ, Sturm PD. Ventilator-associated pneumonia caused by *Dolosigranulum pigrum*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 3641-2.

72. Holloway Y, Dankert J. Penicillin tolerance in nutritionally variant streptococci. Antimicrob Agents Chemother. 1982; 22: 1073-5.

73. Hong PY, Croix JA, Greenberg E, Gaskins HR, Mackie RI. Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and microheterogeneity. PLoS One. 2011; 6(9):e25042.Epub.2011.sep22.

74. Hsu CY, Su YC, Wang TL, Chong CF, Chen CCI. *Gemella morbillorum* liver abscess. Scand J Infect Dis. 2007; 39: 637-8.

75. Huang YT, Liao CH, Teng LJ, Hsueh PR. Daptomycin susceptibility of unusual gram-positive bacteria: comparison of results obtained by the Etest and the broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 1570-2.

76. Humphries RM, Lee C, Hindler JA. *Aerococcus urinae* and trimethoprim-sulfamethoxazole. J Clin Microbiol. 2011; 49: 3934-5.

77. Hung WC, Tseng SP, Chen HJ, Tsai JC, Chang CH, Lee TF, Hsueh PR, Teng LJ. Use of *gro ESL* as a target for identification of *Abiotrophia*, *Granulicatella* and *Gemella* species. J Clin Microbiol. 2010; 48: 3532-8.

78. Ibler K, Jensen KT, Østergaard C, Sönksen UW, Bruun B, Schønheyder HC, Kemp M, Dargis R, Andersen K, Christensen JJ. Six cases of *Aerococcus sanguinicola* infection: clinical relevance and bacterial identification. Scand J Infect Dis. 2008; 40: 761-5.

79. Jeng A, Chen J, Katsivas T. Prosthetic valve endocarditis from *Granulicatella adiacens* (nutritionally variant streptococci). *J Hosp Infect.* 2005; 51: e125-9.
80. Kanamoto T, Sato S, Inoue M. Genetic heterogeneities and phenotypic characteristics of strains of the genus *Abiotrophia* and proposal of *Abiotrophia para-adiacens* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 492-8.
81. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Liu S, Yamamoto H, Ezaki T. Transfer of *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov. respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45: 798- 803.
82. Khan R, Urbin C, Rubin D, Segal Maurer S. Subacute endocarditis caused by *Gemella haemolysans* and a review of the literature. *Scand J Infect Dis.* 2004; 36: 885-8.
83. Kilpper-Bälz R, Schleifer KH. Transfer of *Streptococcus morbillorum* to the genus *Gemella* as *Gemella morbillorum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1988; 38: 442-3.
84. Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W, Goossens H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 900-12.
85. Kocka FE, Chittom AL, Sanders L, Hernández L, Soriano E, Jacobs N, Carey RB. Nutritionally variant *Streptococcus pyogenes* from a periorbital abscess. *J Clin Microbiol.* 1987; 25: 736-7.
86. Krčmery V, Sefton A. Vancomycin resistance in gram-positive bacteria other than *Enterococcus* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 14: 99-105.
87. Kumar A, Augustrine D, Sudhindran S, Kurian AM, Dinesh KR, Karim S, Philip R. *Weissella confusa*: a rare cause of vancomycin-resistant gram-positive bacteremia. *J Med Microbiol.* 2011; 60: 1539-41
88. Kumudhan D, Mars S. *Leuconostoc mesenteroids* as a cause of post-operative endophthalmitis – a case report. *Eye* 2004; 18: 1023-4.
89. LaClaire L, Facklam RR. Antimicrobial susceptibility and clinical sources of *Dolosigranulum pigrum* cultures. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 2001-3.
90. LaClaire L, Facklam RR. Antimicrobial susceptibilities and clinical sources of *Facklamia* species.

Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 2130-2.

91. LaClaire L, Facklam RR. Comparison of three commercial rapid identification systems for the unusual gram-positive cocci *Dolosigranulum pigrum*, *Ignavigranum ruoffiae* and *Facklamia* species. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2037-42.
92. La Scola B, Raoult D. Molecular identification of *Gemella* species from three patients with endocarditis. J Clin Microbiol. 1998; 36: 866-71.
93. Lawson PA, Collins MD, Falsen E, Sjöden B, Facklam RR. *Facklamia languida* sp. nov., isolated from human clinical specimens. J Clin Microbiol. 1999; 37: 1161-4.
94. Lawson PA, Falsen E, Ohlen M, Collins MD. *Aerococcus urinaehominis* sp. nov. isolated from human urine. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51: 683-6.
95. Lawson PA, Falsen E, Truber-Jensen K, Collins MD. *Aerococcus sanguicola* sp. nov. isolated from a human clinical source. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51: 475-9.
96. Lawson PA, Foster G, Falsen E, Sjöden B, Collins MD. *Abiotrophia balaenopterae* sp. nov. isolated from the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Int J Syst Bacteriol. 1999; 49: 503-6.
97. Lécuyer H, Audibert J, Bobigny A, Eckert C, Jannièrre-Nartey C, Buu-Hoï A, Mainardi JL, Podglajen I. *Dolosigranulum pigrum* causing nosocomial pneumonia and septicemia. J Clin Microbiol. 2007; 45: 3474-5.
98. Lee MR, Lee SO, Kim SY, Yang SM, Seo YH, Cho YK. Brain abscess due to *Gemella haemolysans*. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2338-40.
99. Leite A, Vinhas da Silva A, Felício L, Vilarinho AC, Ferreira G. *Aerococcus viridans* urinary tract infection in a pediatric patient with secondary pseudohypoaldosteronism. Rev Argent Microbiol. 2010; 42: 269-70.
100. Lejtkowicz F, Kassis I. *Granulicatella* and *Abiotrophia* species: cause or consequence? Clin Microbiol Newsl. 2002; 24: 125-7.
101. Lemaître N, Huvent D, Loïez C, Wallet F, Courcol R. Isolation of *Helcococcus kunzii* from plantar phlegmon in a vascular patient. J Med Microbiol. 2008; 57: 907-8.
102. Leonard MK, Pox CP, Stephens DS. *Abiotrophia* species bacteremia and a mycotic aneurysm in an intravenous drug abuser. N Engl J Med. 2001; 344: 233-4.

103. Levine JF, Hanna BA, Pollock AA, Simberkoff MS, Rahal JJ Jr. Penicillin sensitive nutritionally variant streptococcal endocarditis: relapse after penicillin therapy. *Am J Med Sci.* 1983; 286:31-6.
104. Lin JC, Hou SJ, Huang LU, Sun JR, Chang WK, Lu JJ. Acute cholecystitis accompanied by acute pancreatitis potentially caused by *Dolosigranulum pigrum*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2298-9.
105. Logan LK, Zheng X, Shulman ST. *Gemella bergeriae* endocarditis in a boy. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27: 184-6.
106. Lopardo H, Hernández C. Extravascular infections due to *Granulicatella adiacens*: two case-reports and review. *Clin Microbiol Newsl.* 2004; 26: 78-80.
107. Lopardo H, Mastroianni A, Casimir L. Bacteriemia por *Abiotrophia defectiva* en un paciente pediátrico neutropénico febril. *Rev Argent Microbiol.* 2007;39:93-4.
108. Lopardo H, Vidal P, Bottero D, Moviglia AM, Gobet LM. Is the diffusion method appropriate to determine the susceptibility to penicillin of viridans group streptococci? Resumen T-287. *Rev Esp Quimioter.* 2000; 13 (Supl. 2): 104. Third European Congress of Chemotherapy, Madrid, España.
109. Lopardo H. *Abiotrophia y Granulicatella*. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38: 164-82.
- 109a. Lotte R, Lotte L, Degand N, Gaudart A, Gabriel S, Ben H'dech M, Blois M, Rinaldi JP, Ruimy R. Infectious endocarditis caused by *Helcococcus kunzii* in a vascular patient: a case report and literature review. *BMC Infect Dis.* 2015; 15: 238.
110. Manganelli R, van de Rijn I. Characterization of *emb*, a gene encoding the major adhesin of *Streptococcus defectivus*. *Infect Immun.* 1999; 67: 50-6.
111. Martin I, Schwartzman J, Ruoff K. Multi-drug resistant *Helcococcus*-like organism isolated from a chest abscess. *Infect Dis Rep.* 2015; 7: 5754.
112. Martinez-Murcia AJ, Collins MD. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* 1990; 70:73-84.
113. Martinez-Murcia A J, Harland NM, Collins MD. Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large-subunit rRNA derived trees. *J Appl Bacteriol.* 1993; 74: 532-41.
114. Mastro TD, Spika JS, Lozano P, Appel J, Facklam RR. Vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*: nine cases of bacteremia. *J Infect Dis.* 1990; 161: 956-60.

115. Mc Carthy LR, Bottone EJ. Bacteremia and endocarditis caused by satelliting streptococci. *Am J Clin Pathol.* 1974; 61: 585-91.
116. Mikkelsen L, Teilade E, Poulsen K. *Abiotrophia* species in early dental plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15: 263-8.
117. Moore , Hall V, Paull A, Morris T, Brown S, McCulloch D, Richardson MC, Harding KG. Surface bacteriology of venous leg ulcers and healing outcome. *J Clin Microbiol.* 2010; 63: 830-4
118. Murray CK, Walter EA, Crawford S, MC Elmeel ML, Jorgensen JH. *Abiotrophia* bacteremia in a patient with neutropenic fever and antimicrobial susceptibility testing of *Abiotrophia* isolates. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: e140-2.
119. Murray PR, Niles AC. Inactivation of penicillin by thiol broth. *J Clin Microbiol.* 1982; 16: 982-4.
120. Nasoodi A, Ali AG, Gray WJ, Hedderwick SA. Spondylodiscitis due to *Aerococcus viridans*. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 532-3.
121. Nathavitharana KA, Arseculeratne SN, Aponso HA, Vijeratnam R, Jayasena L, Navaratnam C. Acute meningitis in early childhood caused by *Aerococcus viridans*. *Br Med J.* 1983; 286: 1248.
122. Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Sasaki M, Kaneko M. Identification of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva* by 16S rRNA gene PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2458-63.
123. Okada Y, Kitada K, Takagaki M, Ito HO, Inoue M. Endocardiac infectivity and binding to extracellular matrix proteins of oral *Abiotrophia* species. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 27: 257-61.
124. Peel MM, Davis JM, Griffin KJ, Freedman DL. *Helcococcus kunzii* as sole isolate from an infected sebaceous cyst. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 328-9.
125. Pérez JC, Cordero J, Marín M, Esteban J. Prosthetic joint infection caused by *Helcococcus kunzii* . *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 528-30.
126. Peterson CE, Cook JL, Burke JP. Media-dependent subculture of nutritionally variant streptococci. *Am J Clin Pathol.* 1981; 75: 634-6.
127. Pien FD, Wilson WR, Kunz K, Washington JA 2nd. *Aerococcus viridans* endocarditis. *Mayo Clinic Proc.* 1984; 59: 47-8.
128. Popescu GA, Benea E, Mitache E, Piper C, Horstkotte D. An unusual bacterium, *Aerococcus*



- viridans*, and four cases of infective endocarditis. *J Heart Valve Dis.* 2005; 14: 317-9.
129. Poyart C, Quesne G, Acar P, Berche P, Trieu-Cuot P. Characterization of the Tn916-like transposon Tn3872 in a strain of *Abiotrophia defectiva* (*Streptococcus defectivus*) causing sequential episodes of endocarditis in a child. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 790-3.
130. Riede U, Graber P, Ochsner PE. *Granulicatella* (*Abiotrophia*) *adiacens* infection associated with a total knee arthroplasty. *Scand J Infect Dis.* 2004; 36: 761-4.
131. Riegel P, Lepargneur JP. Isolation of *Helcococcus kunzii* from a post-surgical foot abscess. *Int J Med Microbiol.* 2003; 293: 437-9
132. Roberts RB, Kriege AG, Schiller NL, Gross KC. Viridans streptococcal endocarditis: the role of various species including pyridoxal-dependent streptococci. *Rev Infect Dis.* 1979; 1: 955-66.
133. Roggenkamp A, Abele-Horn M, Trebesius K, Tretter U, Autenrieth IB, Heesemann J. *Abiotrophia elegans* sp. nov., a possible pathogen in patients with culture-negative endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 100-4,
134. Ruoff K. Nutritionally variant streptococci. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 184-90.
135. Ruoff K. Update on nutritionally variant streptococci (*Streptococcus defectivus* and *Streptococcus adiacens*). *Clin Microbiol Newsl.* 1990; 12:97-9
136. Ruoff KL. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other aerobic catalase-negative, gram-positive cocci. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology.* 10<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington D.C., 2011, p.365-75.
137. Ruoff KL. *Gemella*: a tale of two species (and five genera). *Clin Microbiol Newsl.* 1990;12:1-4.
138. Sabath LD. Staphylococcal tolerance to penicillins and cephalosporins. En: Schlessinger D, editor. *Microbiology.* ASM Press, Washington DC, 1979, p. 299-303..
139. Salimnia H, Alangaden GJ, Bharadwaj R, Painter TM, Chandrasekar PH, Fairfax MR. *Weissella confusa*: an unexpected case of vancomycin-resistant gram-positive bacteremia in immunocompromised hosts. *Transpl Infect Dis.* 2011; 13: 294-8.
140. Sampo M, Ghazouani O, Cadiou D, Trichet E, Hoffart L, Drancourt M. *Dolosigranulum pigrum* keratitis: a three-case series. *BMC Ophthalmology.* 2013; 13: 31.
141. Santos R, Santos E, Goncalves S, Marques A, Sequeira J, Abecasis P, Cadete M. Lymphadenitis

caused by *Aerococcus urinae* infection. Scand J Infect Dis. 2003; 35: 353-4.

142. Schuur PM, Sabbe L, Van der Wouw AJ, Montagne GJ, Buiting AG. Three cases of serious infection caused by *Aerococcus urinae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999;18:368-71.

143. Schuur PM, Kasteren ME, Sabbe L, Vos MC, Janssens MM, Buiting AG. Urinary tract infections with *Aerococcus urinae* in the south of the Netherlands. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997; 16: 871-5.

144. Seegmuller I, van der Linden M, Heeg C, Reinert RR. *Globicatella sanguis* is an etiological agent of ventriculoperitoneal shunt-associated meningitis. J Clin Microbiol. 2007; 45: 666-7.

145. Senneby E, Petersson AC, Rasmussen M. Clinical and microbiological features of bacteraemia with *Aerococcus urinae*. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 546-50.

146. Shelton-Dodge K, Vetter EA, Kohner PC, Nyre LM, Patel R. Clinical significance and antimicrobial susceptibilities of *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus urinae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 70: 448-51.

147. Shewmaker PL, Steigerwalt AG, Shealey L, Weyant R, Facklam RR. DNA relatedness, phenotypic characteristics, and antimicrobial susceptibilities of *Globicatella sanguinis* strains. J Clin Microbiol. 2001; 39: 4052-7

148. Shin JH, Kim DI, Kim HR, Kim DS, Kook JK, Lee JN. Severe infective endocarditis of native valves caused by *Weissella confusa* detected incidentally on echocardiography. J. Infect. 2007; 54: e149-51.

149. Sierra Hoffman M, Watkins K, Jinadatha C, Fader R, Carpenter JL. Clinical significance of *Aerococcus urinae*: a retrospective review. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 53: 289-92.

150. Sire JM, Donnio PY, Mensard R, Pouedras P, Avril JL. Septicemia and hepatic abscess caused by *Pediococcus acidilactici*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1992; 11: 623-5.

151. Skov R, Christensen JJ, Korner B, Frimodt-Møller N, Espersen F. In vitro antimicrobial susceptibility of *Aerococcus urinae* to 14 antibiotics, and time-kill curves for penicillin, gentamicin and vancomycin. J Antimicrob Chemother. 2001; 48: 653-8.

152. Stein DS, Libertin CR. Antibiotics in endocarditis due to nutritionally deficient streptococci. JAMA. 1989; 262: 618.

153. Stein DS, Libertin CR. Enzymatic extraction and spectral analysis of the chromophore from cell

walls of nutritionally deficient streptococci. J Clin Microbiol. 1989; 27: 207-9.

154. Stein DS, Libertin CR. Time kill curve analysis of vancomycin and rifampin alone and in combination against nine strains of nutritionally deficient streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis. 1988; 10: 139-44.

155. Sturm PD, Van Eijk J, Veltman S, Meuleman E, Schülin T. Urosepsis with *Actinobaculum schaalii* and *Aerococcus urinae*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 652-4.

156. Swanson H, Cutts E, Lepow M. Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia in a child receiving prophylaxis for sickle-cell disease. Clin Infect Dis. 1996; 22: 387-8.

157. Tantimavanich S, Nilakul C, Sukroongreung S. Modified antimicrobial disc susceptibility testing for nutritionally-variant streptococci. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002; 33:151-4.

158. Tekin A, Tekin G, Turunç T, Demiroğlu Z, Kizilkiliç O. Infective endocarditis and spondylodiscitis in a patient due to *Aerococcus urinae*: first report. Int J Cardiol. 2007; 115: 402-3.

159. Tung SK, Teng LJ, Vaneechoutte M, Chen HM, Chang TC. Identification of species of *Abiotrophia*, *Enterococcus*, *Granulicatella* and *Streptococcus* by sequence analysis of the ribosomal 16S-23S intergenic spacer region. J Med Microbiol. 2007; 56: 504-13

160. Tuohy M, Procop GW, Washington JA. Antimicrobial susceptibility of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000; 38: 189-91.

161. Uh Y, Son JS, Jang IH, Yoon KJ, Hong SK. Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia associated with granulocytopenia. J Korean Med Sci. 2002; 17: 113-5.

162. Untereker WJ, Hanna BA. Endocarditis and osteomyelitis caused by *Aerococcus viridans*. Mt Sinai J Med. 1976; 43: 248-52.

163. Valipour A, Koller H, Setinek U, Burghuber OC. Pleural empyema with *Gemella morbillorum*: report of a case and review of the literature. Scand J Infect Dis. 2005; 37: 378-81.

164. Vandamme P, Homme J, Snauwaert C, Hoste B, Cleenwerck I, Lefebvre K, Vancanneyt M, Swings J, Devriese LA, Haesebrouck F. *Globicatella sulfidifaciens* sp. nov. isolated from purulent infections in domestic animals. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51: 1745-9.

165. Vay C, Cittadini R, Barberis C, Rodríguez CH, Pérez Martínez H, Genero F, Famiglietti A. Antimicrobial susceptibility of non-enterococcal intrinsic glycopeptide-resistant gram-positive organisms

Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 52: 183-8.

166. Vela AI, García N, Latre MV et al. *Aerococcus suis* sp. nov. isolated from clinical specimens from swine. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57: 1291-4.
167. Vergne A, Guérin F, Lienhard R, Le Coustumier A, Daurel C, Isnard C, Marty N, Poyart C, Cattoir V. Identification and clinical significance of *Helcococcus kunzii* in human samples. J Clin Microbiol. 2015; 53:2703-5.
168. Vergne A, Guérin F, Lienhard R, Le Coustumier A, Daurel C, Isnard C, Marty N, Poyart C, Cattoir V. In vitro antimicrobial susceptibility of *Helcococcus kunzii* and molecular analysis of macrolide and tetracycline resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34:2057-61.
169. Villamil I, Villar A, Masa LA. Absceso cutáneo por *Gemella morbillorum*. Rev Chil Infect. 2009; 26: 464-5.
170. von Essen R, Ikävalko M, Forsblom B. Isolation of *Gemella morbillorum* from joint fluid. Lancet. 1993; 342: 177-8.
171. Vossen MG, Gattringer KB, Khalifeh N, Koreny M, Spertini V, Mallouhi A, Willeit M, Volc-Platzer B, Asboth F, Graninger W, Thalhammer F, Lagler H. *Gemella morbillorum* bacteremia after anti-tumor necrosis factor alpha as acne inversa therapy. J Clin Microbiol. 2012; 50: 1109-12.
172. Woo PCY, Tse H, Wong SY, Tse CWS, Fung AMY, Tam DMW, Lau SKP; Yuen K. Life-threatening invasive *Helcococcus kunzii* infections in intravenous-drug users and *ermA*-mediated erythromycin resistance. J Clin Microbiol. 2005; 43: 6205-8.
173. Zaoui A, Brousse C, Bletry O, Augouard LW, Boisaubert B. *Leuconostoc* osteomyelitis. Joint Bone Spine. 2005; 72: 79-81.
174. Zheng X, Freeman AF, Villafranca J, Shortridge D, Beyer J, Kabat W, Dembkowski K, Shulman ST. Antimicrobial susceptibilities of invasive pediatric *Abiotrophia* and *Granulicatella* isolates. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4323-6.
175. Zhou WQ, Niu DM, Zhang ZZ, Ning MZ, Shen H, Zhang K. Vancomycin resistance due to VanA in an *Aerococcus viridans* isolate. Indian J Med Microbiol. 2014; 32: 462-5.
176. Zierdt CH. Light-microscopic morphology, ultrastructure, culture and relationship to disease of the nutritional and cell-wall-deficient  $\alpha$ -hemolytic streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis. 1992; 15: 185-94.

177. Zolezzi PC, Cepero PG, Ruiz J Laplana LM, Calvo CR, Gómez-Lus R. Molecular epidemiology of macrolide and tetracycline resistances in commensal *Gemella* sp. Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 1487-90.

## Apéndice II

### Pruebas bioquímicas para la identificación de cocos gram positivos catalasa negativos

#### Prueba de la catalasa

##### Prueba rutinaria en portaobjetos a temperatura ambiente

Con un palillo de madera o plástico tomar material del centro de una colonia del microorganismo a ensayar y colocarlo sobre un portaobjetos limpio.

- a. Colocar una gota de  $H_2O_2$  sobre estos microorganismos depositados en el portaobjetos.
- b. Observar el burbujeo (prueba positiva) producido por la liberación de gas o no (prueba negativa)

*Precauciones: No invertir la secuencia. No emplear colonias desarrolladas en agar sangre o hacerlo comparando con las burbujas que se desprenden al colocar trocitos del medio en la gota de  $H_2O_2$ .*

##### Prueba en tubo

Se utiliza un cultivo en agar en pico de flauta con 10 a 24 h. de incubación (los cultivos viejos dan reacciones incorrectas). Se vuelca 1 ml de una solución al 3% de agua oxigenada sobre las colonias y se deja el tubo en posición inclinada. La reacción es positiva cuando aparece un rápido burbujeo gaseoso.

*Control de calidad para ambos métodos*

Se realiza la prueba con la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (negativa) y con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (positiva)

### **Prueba de la bencidina**

Sirve como confirmatoria de la prueba de la catalasa.

Reactivos: A) Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% (fresca, de preparación semanal).

B) Solución de bencidina: se disuelve parcialmente 1,0 g de diclorhidrato de bencidina en 20 ml de ácido acético glacial. Se agregan 30 ml de agua destilada y se calienta suavemente. Se enfría y se adicionan 50 ml de etanol al 95%. El reactivo permanece estable por lo menos un mes a 4°C (una débil coloración amarilla no lo afecta).

*Medio:* Agar tripteína de soja con un aislamiento o estrías de las cepas en estudio de 24 - 48 h. de incubación.

### Procedimiento

Se inundan las placas con el reactivo B. Una vez que los cultivos se contactaron perfectamente con la solución de bencidina, se agrega igual volumen del reactivo A.

*Resultado positivo:* el cultivo se colorea de un azul-verdoso intenso o verde oscuro. La prueba de la bencidina detecta la presencia de los citocromos a, b, c y d en las cepas en estudio.

*Control positivo:* *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Control negativo:* *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

## **Prueba de Voges Proskauer (VP)**

### Método de Coblenz (indicado para estreptococos)

Medio: caldo MRVP distribuido a razón de 2,5 ml en tubos de ensayo.

Reactivos: A: 5% de  $\alpha$ -naftol en alcohol etílico al 95 %.

B: 0,3 % de creatina en KOH al 40 %.

### Procedimiento

Se siembra el caldo MRVP con gotas del inóculo (de un caldo tripteína de soja (TSB) o infusión cerebro corazón (BHI) incubado a 35°C durante 18-24 h).

Se agrega 0,6 ml del reactivo A y luego 0,2 ml del B.

Se agita vigorosamente durante 5 segundos y se deja en reposo, colocando el tubo en posición inclinada y sobre un papel blanco (para lograr una máxima exposición al aire, también puede aflojarse y hasta sacarse el tapón). No tocar hasta el momento de la lectura. Esto es definitivamente importante para la detección de las reacciones débiles.

La mayoría de las reacciones positivas (producción de acetoína), aparecen dentro de los primeros 15 minutos, pero la lectura final debe hacerse al cabo de una hora.

*Resultado positivo:* color rosa o rojo en la superficie o en todo el caldo.

*Resultado positivo débil:* color rosa pálido en los bordes del caldo.

*Control positivo y/o positivo débil:* *S. aureus* ATCC 25923

*Control negativo:* *Escherichia coli* ATCC 25922



## **Prueba de la bacitracina (estreptococos)**

Esta prueba se realiza si en la placa de agar sangre se aislaron colonias de cocos gram positivos, catalasa negativos y  $\beta$ -hemolíticos.

Los estreptococos del grupo A son sensibles. El resto son resistentes aunque hay excepciones dentro de los grupos C, F, y G.

Recordar que los enterococos pueden presentar hemólisis en agar sangre humana pero no en agar sangre ovina. Igualmente, son resistentes a la bacitracina.

### Método

- Efectuar estrías en cuatro sentidos en una placa de agar sangre con un ansa con la que previamente se tocaron colonias aisladas de un estreptococo  $\beta$ -hemolítico.
- Aplicar un disco de bacitracina (0,04 U).
- Dejar incubar durante toda la noche a 37°C.
- Lectura: la prueba es positiva cuando se produce una inhibición en el desarrollo del germen alrededor del disco, independientemente del tamaño del halo.

## **Sensibilidad a la optoquina**

Esta prueba está basada en la capacidad de la optoquina (clorhidrato de etilhidrocupreína) de inhibir el desarrollo de *S. pneumoniae* en bajas concentraciones ( $\leq 5 \mu\text{g}$ ). Se realiza cuando se aíslan colonias  $\alpha$ -hemolíticas.

### Procedimiento

Se prepara una suspensión de una turbiedad similar a la del tubo N°0,5 de la escala de McFarland. Se hisopa una placa de agar Mueller Hinton + 5% de sangre ovina en tres direcciones con la misma. Se coloca un disco de optoquina y se deja incubar 18 - 24 h en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

*Reacción positiva:* presencia de un halo de inhibición mayor o igual a 14 mm (discos de 6 mm).

*Reacción negativa:* halos menores o habitualmente ausencia de halo.

Diámetros de 6 a 14 mm deben ser considerados dudosos.

En todos los casos se debe confirmar mediante la prueba de solubilidad de bilis, que se realizará en paralelo.

*Control de calidad:*

*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (reacción positiva)

*Streptococcus mitis* ATCC 49456 (reacción negativa).

### **Solubilidad en bilis o sales biliares**

Esta prueba está basada en la autólisis de *S. pneumoniae* en presencia de desoxicolato de sodio. Puede realizarse en tubo o en placa.

### Prueba en placa

Para el método en placa se inocula la cepa en estudio en una placa de agar sangre de carnero al 5% e incuba a 35-37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 18-24

h. Al día siguiente se colocan unas gotas de desoxicolato de sodio al 10% sobre una porción del crecimiento (colonia aislada) y se incuba a 35-37 °C al aire por 30 minutos con la tapa hacia arriba y ligeramente abierta. La prueba es positiva cuando se observa la disolución de la colonia dejando un área parcialmente hemolizada en el medio

Los resultados dudosos deben ser repetidos o confirmados por el método en tubo.

### Prueba en tubos

Para la prueba en tubos se prepara una suspensión muy densa con la bacteria a ensayar (>1 de la escala de Mc Farland) en 1 ml de solución fisiológica. Se vierte 0,5 ml de esta suspensión en cada uno de dos tubos. A uno de ellos se le agrega 0,5 ml de solución fisiológica (tubo control) y al otro 0,5 ml de una solución de desoxicolato de sodio al 10% (tubo de prueba). Se ponen a incubar ambos tubos a 35°C.

*Prueba positiva:* se observa que el tubo de prueba se torna transparente antes de las 2 horas de incubación, mientras que el control permanece turbio.

*Prueba negativa:* se observa turbiedad equivalente en ambos tubos.

*Prueba no válida:* se observa que ambos tubos se tornan transparentes (probable contaminación de los tubos con detergente, EDTA u otros productos activadores de autolisinas).

*Control de calidad:*

*Streptococcus pneumoniae* ATCC 33400 (reacción positiva)

*Streptococcus mitis*\_ATCC 49456 (reacción negativa).

## **Crecimiento en caldo hipersalado (NaCl 6.5%)**

### Procedimiento

Se prepara una suspensión del microorganismo a ensayar en un caldo o solución fisiológica. Se inocula una gota de esta suspensión a cada uno de los tubos (tubo con NaCl al 6,5% y tubo control con caldo nutritivo normal). A las 18-24 h se observa la turbiedad.

*Prueba positiva:* ambos tubos turbios.

*Prueba negativa:* turbio sólo el tubo control.

*Prueba inválida:* Ninguno de los tubos presenta turbiedad.

*Control de calidad:*

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (positiva)

*Streptococcus pyogenes* (negativa)

## **Hidrólisis del hipurato**

### Fundamento

La enzima (hipuricasa) desdobra al hipurato (benzoilglicina) en ácido benzoico y glicina. Con el método clásico se detecta el ácido benzoico y con el rápido, la glicina.

La prueba se puede realizar de dos maneras:

### 1) Método clásico

Se utiliza un caldo infusión de corazón de pH 7,4 o mejor un caldo Todd & Hewitt con hipurato de sodio al 1%. Se inocular con el microorganismo a ensayar y se incuba durante 48 horas a 37°C. Se revela con  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  al 12% \*. Se observa la presencia de un precipitado marrón persistente por formación de un complejo coloreado del hierro con el ácido benzoico que no se disuelve por agitación durante 10 minutos.

### 2) Método rápido

Preparar una solución con 0,25 g de hipurato de sodio en 25 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración. Se agrega un inóculo denso del microorganismo a 0,5 ml de la solución. Se incuba a 35 - 37°C durante una hora, se le agregan dos gotas del revelador (ninhidrina al 3,5% en butanol-acetona 1:1), se vuelve a poner en estufa durante quince minutos exactos y se efectúa la lectura final:

*Prueba negativa:* solución incolora

*Prueba positiva:* solución color púrpura, por ser la glicina un aminoácido que reacciona con el reactivo de ninhidrina.

*Control de calidad: Streptococcus pyogenes* (negativa)

*Streptococcus agalactiae* (positiva)

-----

\*  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  12g en HCl al 37% 5,4ml +  $\text{H}_2\text{O}$  94,6ml.

## Prueba de bilis esculina

El medio, preparado en tubos, en pico de flauta, se inocula en forma de estría superficial con 3 o 4 colonias del microorganismo y se lo deja incubar 24 – 48 h en estufa de 35 ±1°C al aire. No conviene efectuar la punción hacia el fondo del tubo porque algunas bacterias que dan positiva la prueba de esculina, pero que no toleran la alta concentración de bilis, podrían dar resultados falsamente positivos.

### Composición del medio:

---

Extracto de carne	3,00 g
Peptona	5,00 g
Esculina	1,00 g
Bilis de buey	40,00 g
Citrato férrico	0,50 g
Agar	15,00 g
Agua dest.	csp. 1.000 ml

---

pH: 6,6 a 25°C

---

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. El medio se debe preparar en pico de flauta en tubos. Inocular con ansa (efectuando una estría en superficie) o con pipeta (depositando gotas de un caldo desarrollado).

---

Luego de la incubación a 35°C durante 24-48 h realizar la lectura según las siguientes pautas:

- Dejar incubando los tubos que permanezcan inalterados a las 48 h. Si continúan de este modo a las 72 h, descartarlos como negativos.
- Si se produce un color negro o castaño oscuro en la mitad o más de la superficie, la prueba se considera positiva.
- Si se produce el ennegrecimiento de menos de la mitad del tubo, la prueba es dudosa y deberá repetirse. Si no se produce ennegrecimiento, independientemente de si hubo desarrollo o no, la prueba es negativa.

*Control de calidad:*

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (positiva)

*Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 (negativa)

### **Prueba de esculina**

Es exactamente igual que la anterior solo que el medio de cultivo no lleva bilis de buey.

### **Pruebas de PYR (pirrolidonil- $\beta$ -naftilamidasa) y LAP (leucinaminopeptidasa)**

El fundamento y el procedimiento de ambas pruebas son exactamente iguales

## Fundamento

Estas pruebas permiten observar la propiedad de las bacterias capaces de hidrolizar estas sustancias de la siguiente manera:

(1) PYR: L-pirrolidonil- $\alpha$ -naftilamida = L-pirrolidona (incolora) +  $\alpha$ -naftilamina (incolora)

$\alpha$ -naftilamina + N,N-dimetilamino cinamaldehído = Base de Shiff (roja)

(2) LAP: leucina- $\beta$ -naftilamida = leucina (incolora) +  $\beta$ -naftilamina (incolora)

$\beta$ -naftilamina + N,N-dimetilamino cinamaldehído = Base de Shiff (roja)

## Procedimiento (Prueba con discos)

Rehidratar el disco con agua destilada. Aplicar sobre el un inóculo denso del microorganismo, con ansa y tomado de colonias crecidas en medio sólido durante no más de 24 horas. Incubar a temperatura ambiente de 5 a 15 minutos.

Agregar una gota del reactivo revelador (p-dimetilaminocinamaldehído). Dejar actuar un minuto.

*Prueba positiva:* color rojo.

*Prueba negativa:* color amarillo pálido o incoloro.

PYR Control de calidad: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (positiva)

*Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 (negativa)



LAP Control de calidad: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (positiva)

*Aerococcus viridans* (negativa)

### ***Observación microscópica de la morfología de cocos en medio líquido***

#### Procedimiento

Se inocula un tubo de caldo tioglicolato con la bacteria problema. Se lo deja 18-24 horas a 35°C. Se toma una gota y con ella se efectúa un extendido en portaobjetos que se colorea con Gram.

Resultado 1: observación de cadenas.

Resultado 2: observación de diplococos y tétradas.

Resultado 3: Sólo se observan diplococos. En este caso el resultado es incierto y se deberá repetir en otras condiciones.

Resultado 4: observación de bacilos (se interpreta como un error en la observación inicial, una contaminación al realizar la prueba o un alargamiento de cocobacilos en esta nueva condición de crecimiento)

### **Sensibilidad a altos niveles de vancomicina**

#### Procedimiento

Se toma una colonia con ansa, se hacen tres estrías superpuestas sobre una placa de agar sangre y se coloca por encima de ellas un disco de vancomicina de 30

µg. A las 18 - 24 horas se observa la formación o no de un halo de inhibición sobre el desarrollo de la bacteria:

#### *Resultados*

Presencia de algún halo de inhibición: *Streptococcus*, *Enterococcus*, etc.

Ausencia de halo: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* o enterococos con alto nivel de resistencia a vancomicina.

### **Prueba de CAMP**

Efectuar una estría con una cepa de *Staphylococcus aureus* productor de β-lisina, por ej. ATCC 25923 en una placa de agar sangre ovina.

Realizar otra estría en forma perpendicular a la anterior con el estreptococo que se va a probar. No tocar la estría del estafilococo: llegar a 1 mm de la misma.

*Lectura:* a las 24- 48 h se produce un refuerzo de la hemólisis del estafilococo quedando una zona francamente hemolisada en forma de punta de flecha (prueba positiva ).

Esta prueba puede también realizarse utilizando discos de β-lisina, pero no están disponibles comercialmente en nuestro medio.

#### *Control de calidad:*

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (negativa)

*Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 (positiva)

*Advertencias:* No utilizar placas de agar sangre preparadas con sangre que no sea de oveja.

No utilizar otra cepa de *S. aureus* que no sea la recomendada

## Almidón

### *Composición por litro*

Agar	8g
Peptona	2g
Extracto de carne o peptona de carne Nº 1	1,2g
Cloruro de sodio	2g
Almidón soluble	8g
Agua destilada	400ml
pH : 7,2 +/- 0,1	

### ***Preparación:***

1. Disolver el agar en 200ml de agua por calentamiento. **A**
2. Disolver el extracto de carne y la peptona en 150ml de agua. **B**
3. Mezclar **A** y **B** y completar los 400ml con el almidón disuelto en lo que resta de agua
4. Fraccionar en tubos por 20ml
5. Esterilizar
6. Plaquear en el momento de su uso

No refrigerar las placas

Reactivo revelador: Alcohol yodado

Yodo	20g
Yoduro de potasio	24g
Alcohol al 50%	1000ml

Alcohol al 50%: 600ml de alcohol de 96° + 450ml de agua destilada

### **Arginina dihidrolasa (ADH) y ornitina descarboxilasa (ODC)**

#### Fundamento

Se prepara un caldo comercial que contiene púrpura de bromocresol como indicador de pH y al que se agrega ornitina o arginina como sustancias reaccionantes. En primer lugar, la glucosa es degradada a ácido láctico. Como consecuencia de esto, al igual que sucede con el medio LIA, el color del indicador de pH vira al amarillo (pH inferior a 5,6). Después, las bacterias que descarboxilan la ornitina o que producen la doble hidrólisis de la arginina, producen un nuevo ascenso del pH debido a la degradación de los respectivos aminoácidos. De este modo, el medio de cultivo retoma su color violeta original. Este ensayo solamente debe realizarse con microorganismos que puedan utilizar glucosa, con producción de ácido. Sin embargo hay formulaciones que permiten verificar la descarboxilación de aminoácidos por bacterias no fermentadoras de glucosa (medio de Moeller). El medio base con el agregado de lisina también puede utilizarse para corroborar la descarboxilación de este aminoácido.

### *Composición del medio*

---

Peptona de carne	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
D (+) Glucosa	1,0 g
Púrpura de Bromocresol	0,016 g
Agua	csp. 1.000 ml

---

Esterilizar. Agregar la solución del aminoácido esterilizada por filtración en una concentración del 1 % excepto a la porción de medio que se empleará para la preparación de los tubos de control. Distribuir en tubos.

---

### *Incubación e interpretación*

Tanto los tubos con el medio de cultivo como los tubos de control se siembran con el cultivo puro en cuestión. A continuación, los tubos se deben recubrir con vaselina estéril. Incubar hasta 4 días a 35°C.

Durante las primeras 6 a 8 h el medio es de color amarillo intenso. Si el microorganismo degrada la ornitina (o la arginina, según el caso), su color se tornará violeta. Los tubos de control deberán permanecer amarillos.

Este método también puede usarse para ensayar la descarboxilación de la lisina.

### **Movilidad en medio SIM**

SIM es un medio diferencial (multiprueba), que posee tiosulfato de sodio como fuente de azufre y sulfato ferroso como indicador de la producción de H<sub>2</sub>S (ennegrecimiento del medio). Además el medio contiene peptonas para estudiar la

producción de indol, el cual se revela por agregado de gotas de reactivo de Ehrlich o de Kovacs, luego de su incubación. También, por tratarse de un agar blando, se puede poner en evidencia la movilidad del microorganismo en estudio, observando por luz transmitida la migración bacteriana por fuera de la línea de punción.

*Composición:*

---

Triptona.	20,0g
Peptona	6,1g
Sulfato ferroso	0,2g
Tiosulfato de sodio	0,2g
Agar	3,5g
Agua	csp. 1000ml

---

*Siembra:* se realiza por punción con ansa recta, y se incuba 24-48 hs a 35- 37° C. Se observa el desarrollo lateral a partir de la línea de punción.

**Prueba de la ureasa**

Fundamento

Determina la capacidad de un microorganismo de hidrolizar urea, por acción de la enzima ureasa, dando como producto final amoníaco. Este último alcaliniza el medio con el consiguiente viraje del indicador de pH, (rojo de fenol) del amarillo al rojo.



### Composición del medio

Tripteína	1,0 g
Glucosa	1,0 g
NaCl	5,0 g
Fosfato monopotásico	2,0 g
Rojo de fenol	0,012 g
Agar	15,0 g
Solución de urea al 40% estéril	50 ml
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml
pH final: 6,8 ± 0,2	

### Procedimiento

Con colonias del microorganismo problema se estría la superficie del medio en el pico de flauta. Se recomienda no punzar la capa profunda para controlar el color.

Incubación. Se incuba en aerobiosis, a 35-37°C, durante 18-24 horas. Los microorganismos que hidrolizan la urea lentamente pueden requerir hasta 72 horas de incubación.

### Interpretación de los resultados

*Reacción positiva:* viraje del amarillo al rojo

*Reacción negativa:* no se produce cambio de color en el medio.

### Control de calidad

Control positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

Control negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922

### ***Pruebas de fermentación de azúcares***

Se utiliza el medio Azúcares Medio Basal (Streptococos) de Britania, con el agregado de los hidratos de carbono al 1% final. En el medio de cultivo, la tripteína y el extracto de levadura, aportan los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano, el cloruro de sodio, mantiene el balance osmótico y la cisteína y el tioglicolato de sodio son agentes reductores.

El indicador de pH es púrpura de bromocresol y el agar elimina la necesidad de sellar los tubos debido a que enlentece la dispersión del CO<sub>2</sub> y la difusión del O<sub>2</sub>.

La utilización de hidratos de carbono genera acidez y el consiguiente viraje del indicador de pH del color púrpura al amarillo.



### Composición del medio

Tripteína	15,0 g
Extracto de levadura	7,0 g
NaCl	2,5 g
L-cisteína	0,5 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar	0,75 g
pH final: 7,3 ± 0,2	

Luego de esterilizado y enfriado a 50°C, agregar de manera aséptica el hidrato de carbono elegido en concentración final al 1%.

### Procedimiento

#### *Siembra*

Directa, a partir de un inóculo denso del microorganismo en estudio.

#### *Incubación*

En aerobiosis, a 35-37 °C hasta 7 días.

#### *Interpretación de los resultados*

Positivo: microorganismos fermentadores del hidrato de carbono en estudio: medio de color amarillo.

Negativo: microorganismos no fermentadores del hidrato de carbono en estudio: el medio permanece de color púrpura, sin cambios.

#### *Control de calidad*

Se elegirán bacterias que produzcan reacciones positivas y negativas para cada hidrato de carbono

### ***Pigmento amarillo***

Con ansa en anillo se levantarán colonias del microorganismo desarrollado en agar sangre y se observará la presencia de un pigmento de color amarillo huevo.

Precaución: no arrastrar porciones del medio de cultivo porque pueden enmascarar el color.

### ***β-glucuronidasa***

Se utilizan discos impregnados con el sustrato p-nitrofenil-glucurónido.

#### Procedimiento

##### *Siembra*

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, hacer una suspensión densa (aproximadamente N° 2 de la escala de McFarland) en 0,2 ml de agua destilada estéril, pH:7,0 y agregar un disco de p-nitrofenil-glucurónido (puede utilizarse un disco comercial de Britania denominado Colibritania®).

En aerobiosis, a 35-37 °C durante al menos 4 horas.

##### *Interpretación de los resultados*

Observación del color de la suspensión.

Positiva: observación de color amarillo en el disco y/o en la suspensión.

Negativa: el disco y la suspensión permanecen sin cambio de color.

##### Control de Calidad

*Escherichia coli* ATCC 25922 control positivo

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 control negativo

### ***Prueba del telurito***

#### Preparación de las placas

Preparar 1 litro de agar infusión cerebro-corazón (agar BHI) llevado a pH 6 con HCl 1N.

Esterilizar en autoclave (121°C, 15 min). Agregar 50 ml de sangre de carnero a 90°C.

Dejar enfriar a 50°C y agregar 150 ml de la solución de telurito de potasio.

*Solución de telurito de potasio:* Pesar 0,5 g de telurito de potasio. Disolver en 150 ml de agua destilada estéril. Esterilizar por filtración.

Cantidades relativas:

<b>Agar BHI</b>	<b>Sangre</b>	<b>Solución de telurito de K</b>
1000 ml	50 ml	150 ml
500 ml	25 ml	75 ml
250 ml	12,5 ml	37,5 ml
125 ml	6,25 ml	18,75 ml

#### Procedimiento

Realizar una estría en el agar telurito con una colonia aislada del microorganismo problema. Dejar incubar 24-48 horas.

*Prueba positiva:* observación de colonias negras (por reducción del telurito)

*Prueba negativa:* ausencia de desarrollo o desarrollo de colonias grisáceas.

Control de calidad

Prueba positiva: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Prueba negativa: *Enterococcus faecium*

### Prueba de utilización del piruvato

El medio para la utilización del piruvato tiene la siguiente composición:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
NaCl	5 g
Piruvato de sodio	10 g
Azul de bromotimol	0,04 g
Agua destilada	csp. 1.000 ml

---

pH 7,2 a 7,4.

---

El caldo se dispensa en tubos y se autoclava a 118°C durante 5 minutos. Puede mantenerse en heladera así preparado por 2 o 3 meses.

### Fundamento

Si un microorganismo es capaz de utilizar el piruvato como fuente de energía, el caldo se vuelve amarillo (ácido) después de 16-18 horas de incubación. Si por el contrario no puede utilizarlo, permanece del color azul verdoso inicial.