



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Genètica i de Microbiologia

TESI DOCTORAL

A large, circular image of a petri dish containing a bacterial culture on a red agar medium. The culture shows a dense, white, fuzzy growth. Overlaid on the left side of the petri dish is a phylogenetic tree diagram with various colored triangles (green, red, black) representing different bacterial strains.

**Estudi epidemiològic d'infeccions invasives
i no invasives produïdes per
*Streptococcus pyogenes***

M. Alba Rivera Martínez

Barcelona, 2008

Sota la direcció de
la Dra. Beatriz Mirelis i el Dr. Ferran Navarro



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Genètica i de Microbiologia

**Estudi epidemiològic d'infeccions invasives i no
invasives produïdes per *Streptococcus pyogenes***

Memòria presentada per

M. Alba Rivera Martínez

Per a optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques

Tesi doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. Beatriz Mirelis i el
Dr. Ferran Navarro a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Tesi doctoral adscrita al Departament de Genètica i de Microbiologia,
Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona.

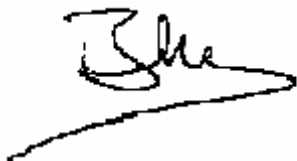
Barcelona, 2008

Beatriz MIRELIS OTERO, Professora Titular del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i **Ferran NAVARRO RISUEÑO**, Professor Associat del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

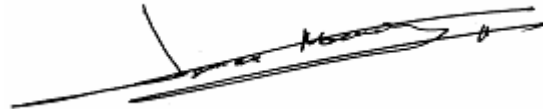
CERTIFIQUEN:

Que, la present tesi doctoral que porta per títol “**Estudi epidemiològic d’infeccions invasives i no invasives produïdes per *Streptococcus pyogenes***” presentada per Na M. Alba Rivera Martínez per a optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques, ha estat elaborada sota la nostra direcció i compleix els requisits necessaris per a la seva tramitació i posterior defensa davant del tribunal corresponent.

Per tant, per tal que així consti, i per als efectes oportuns, signem aquest certificat a Barcelona, 29 de Febrer de 2008.



Beatriz Mirelis Otero



Ferran Navarro Risueño

A mi familia

AGRAÏMENTS

La realització d'aquesta tesi ha estat possible gràcies a l'esforç i recolzament de moltes persones a les que vull mostrar la meva gratitud.

Als meus directors, la Dra. Beatriz Mirelis i el Dr. Ferran Navarro, per la seva dedicació a la supervisió d'aquest treball, els encertats suggeriments i reflexions i també, com no, per la seva infinita paciència. Agraïxo especialment a la Dra. Beatriz Mirelis la confiança i el suport combinats amb la gran dosi d'afecte que sempre m'ha dispensat i per deixar-me aprendre cada dia de la seva experiència, i al Dr. Ferran Navarro, l'estímul constant i la perseverança que sempre m'ha volgut contagiar per reprendre el camí.

Al Dr. Pere Coll, Cap del Servei de Microbiologia, per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, per la seva col·laboració en el projecte i per l'interès que ha mostrat en tot moment amb un tarannà obert i proper.

Al Dr. Guillem Prats, que em va acollir al Servei de Microbiologia, va guiar els meus primers passos professionals i amb el que es van crear els fonaments que han configurat una base sòlida d'hàbits de treball. Agraïxo sincerament que hagi aprofitat qualsevol ocasió per animar-me a seguir endavant amb aquesta tesi.

A la Dra. Montse Rebollo, per participar activament en tot el desenvolupament d'aquest treball i pel el seu excel·lent acompliment científic i tècnic. Agraïment que faig extensiu a la Dra. Elisenda Miró per la seva contribució en aspectes tècnics i metodològics i per les seves valuoses aportacions en la revisió de la tesi. Sense la vostra col·laboració aquest projecte no hauria estat possible.

A la Dra. Gurguí, Cap de la Unitat de Malalties Infeccioses, per les seves enriquidores discussions, i a Míriam Mateo, Anna Lacal i Sergio Herrera, en aquell temps metges residents del Servei de Medicina Interna i avui dia grans professionals, que van dedicar una bona part del seu temps a la revisió de les històries clíniques i a la recollida de dades dels pacients.

Al Federico Grünbaum, de qui és impossible no fer-se amic i al que desitjo molta sort amb la seva tesi, i que va significar un l'ajut inestimable amb el tractament estadístic i el maneig de "l'artilugi" SPSS.

Al Dr. Ferran Sánchez, per la seva participació en la revisió de les històries clíniques, la seva col·laboració en l'obtenció de material bibliogràfic i per ser una persona amb la que sempre es pot comptar.

A tot el personal del Servei de Microbiologia, adjunts, residents, tècnics, administratius i auxiliars que han col·laborat de moltes maneres en la consecució d'aquest projecte. Especialment agraeixo a la M^a Carme Roig els bons petits moments compartits de cada dia, el seu suport incondicional i l'exemple en doctorar-se, fent-me veure que hi ha llum al final del túnel. No vull deixar de mencionar la Lina Aragón, de qui sempre he rebut paraules d'alè i a la que trobo a faltar perquè és una gran persona.

El meu més gran agraïment a la meva família, als meus pares i germans que sempre m'han estat recolzant i als que estimo profundament, i al Hans per arriscar-se a compartir la vida amb mi, per la seva comprensió, i al que espero compensar tot el temps que he estat lluny estant tan a prop.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. <i>Streptococcus pyogenes</i>	3
1.1.1. Perspectiva històrica	3
1.1.2. Taxonomia	5
1.1.3. Característiques morfològiques i estructurals	8
1.1.4. Classificació. Marcadors epidemiològics	9
1.1.5. Ecologia i transmissió	15
1.1.6. Genoma de <i>S. pyogenes</i>	16
1.2. Presentacions clíniques	20
1.2.1. Infeccions supuratives	20
1.2.2. Síndrome del xoc tòxic estreptocòccic (SSTS)	22
1.2.3. Seqüeles no supuratives	24
1.2.4. Situació mundial de les infeccions produïdes per <i>S. pyogenes</i>	25
1.3. Patogènesi	30
1.3.1. Factors de virulència	30
1.3.2. Patogènesi de les seqüeles no supuratives	42
1.4. Diagnòstic microbiològic	44
1.4.1. Diagnòstic directe	44
1.4.2. Diagnòstic indirecte	47
1.5. Tractament de les infeccions produïdes per <i>S. pyogenes</i>	47
1.6. Prevenció	50
1.6.1. Quimioprofilaxi	50
1.6.2. Vacunes	52
1.7. Mecanismes de resistència als antimicrobians	53
1.7.1. Macròlids, lincosamides i estreptogramines	53
1.7.2. Tetraciclins	62
1.7.3. Quinolones	64

2.	OBJECTIUS	69
3.	MATERIAL I MÈTODES	73
3.1.	Característiques i àmbit de l'estudi	75
3.2.	Cultiu i identificació	76
3.3.	Estudi de la sensibilitat als antimicrobians	76
3.4.	Tipificació <i>emm</i>	77
3.5.	Detecció dels gens <i>speA-C</i>, <i>speF-J</i>, <i>speL</i>, <i>speM</i>, <i>ssa</i> i <i>smeZ</i>	82
3.4.1.	PCR	83
3.4.2.	<i>Slot blot</i>	84
3.6.	Estudi dels mecanismes genètics de resistència	87
3.6.1.	Detecció dels determinants genètics de resistència a macròlids i tetraciclins	87
3.6.2.	Detecció dels mecanismes genètics associats a la sensibilitat disminuïda o resistència a fluoroquinolones	87
3.7.	Anàlisi estadística	88
4.	RESULTATS	91
4.1.	Característiques de la mostra	93
4.2.	Característiques demogràfiques i clíniques dels pacients	93
4.2.1.	Infeccions invasives	93
4.2.2.	Infeccions no invasives	96
4.2.3.	Distribució estacional	98
4.3.	Distribució de tipus <i>emm</i>	98
4.3.1.	Distribució de tipus <i>emm</i> per any d'aïllament	100
4.3.2.	Distribució de tipus <i>emm</i> en funció del tipus d'infecció i de variables demogràfiques dels pacients	102
4.4.	Distribució dels gens <i>speA-C</i>, <i>speF-J</i>, <i>speL</i>, <i>speM</i>, <i>ssa</i> i <i>smeZ</i>	107
4.4.1.	Distribució dels al·lels <i>smeZ</i> i <i>speA</i>	108
4.4.2.	Distribució dels SAg's en soques invasives i no invasives	109

4.5. Estudi de sensibilitat als antimicrobians	115
4.5.1. Estudi de sensibilitat a eritromicina	115
4.5.2. Estudi de la sensibilitat a tetraciclina	120
4.5.3. Estudi de la sensibilitat a fluoroquinolones	125
5. DISCUSSIÓ	131
5.1. Presentacions clíniques	134
5.2. Distribució de tipus <i>emm</i> i de SAgs	137
5.3. Resistència antimicrobiana	149
6. CONCLUSIONS	161
7. BIBLIOGRAFIA	167

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Espècies del gènere <i>Streptococcus</i> pertanyents al grup piogènic.	7
Taula 2. Correlació dels tipus <i>M/emm</i> prevalents amb la presència de <i>sof</i> i el patró T.	13
Taula 3. Característiques dels patrons cromosòmics dels gens <i>emm</i> i <i>emm</i> -like.	15
Taula 4. Definició de la síndrome del xoc tòxic estreptocòccic.	23
Taula 5. Estimació global de les infeccions produïdes per <i>S. pyogenes</i> .	25
Taula 6. Factors de virulència de <i>S. pyogenes</i> .	31
Taula 7. Especificitat V β dels superantígens de <i>S. pyogenes</i> .	41
Taula 8. Identificació dels estreptococs β -hemolítics.	45
Taula 9. Classificació dels macròlids en funció del nombre d'àtoms de C de l'anell lactona.	54
Taula 10. Gens <i>erm</i> relacionats amb la resistència a macròlids.	57
Taula 11. Gens relacionats amb sistemes d'expulsió que confereixen resistència a macròlids, lincosamides i estreptogramines.	61
Taula 12. Mecanismes de resistència a tetraciclines i gens <i>tet</i> associats.	63
Taula 13. Classificació de les quinolones.	65
Taula 14. Principals mutacions descrites en les QRDR de <i>parC</i> i <i>gyrA</i> de <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> i estreptococs β -hemolítics els grups C i G.	67
Taula 15. Iniciadors utilitzats per a l'amplificació i seqüenciació del gen <i>emm</i> .	78
Taula 16. Iniciadors utilitzats per a l'amplificació dels gens <i>speA</i> , <i>speB</i> , <i>speC</i> , <i>speF</i> , <i>speG</i> , <i>speH</i> , <i>speI</i> , <i>speJ</i> , <i>speL</i> , <i>speM</i> , <i>ssa</i> i <i>smeZ</i> .	89
Taula 17. Soques control utilitzades en els experiments de detecció d'exotoxines.	83
Taula 18. Iniciadors i condicions utilitzats per a l'amplificació dels gens <i>mef(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(TR)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> i de les QRDR dels gens <i>parC</i> , <i>parE</i> , <i>gyrA</i> i <i>gyrB</i> .	90
Taula 19. Distribució de les soques de <i>S. pyogenes</i> per tipus d'infecció i any d'aïllament.	93

Taula 20. Característiques clíniques i demogràfiques dels 27 casos d'infecció invasiva.	95
Taula 21. Característiques clíniques i demogràfiques dels quatre casos de SSTs.	95
Taula 22. Factors predisposants en pacients amb infecció invasiva.	96
Taula 23. Presentacions clíniques i característiques demogràfiques dels 99 casos no invasius.	97
Taula 24. Tipus i subtipus <i>emm</i> de les 126 soques de <i>S. pyogenes</i> estudiades.	99
Taula 25. Canvis aminoacídics dels nous subtipus <i>emm</i> identificats respecte les seqüències de referència.	100
Taula 26. Distribució de subtipus <i>emm</i> per any d'aïllament.	101
Taula 27. Distribució de tipus <i>emm</i> en les soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives.	102
Taula 28. Distribució de tipus <i>emm</i> en les presentacions clíniques invasives.	103
Taula 29. Distribució de tipus <i>emm</i> en les presentacions clíniques no invasives.	104
Taula 30. Distribució de tipus <i>emm</i> per grup d'edat.	105
Taula 31. Distribució dels gens <i>speA-C</i> , <i>speF-J</i> , <i>speL</i> , <i>speM</i> , <i>ssa</i> i <i>smeZ</i> en les 126 soques de <i>S. pyogenes</i> estudiades.	107
Taula 32. Distribució dels al·lels del gen <i>speA</i> en funció del tipus <i>emm</i> .	108
Taula 33. Distribució dels al·lels del gen <i>smeZ</i> en funció del tipus <i>emm</i> .	109
Taula 34. Distribució dels gens <i>speA</i> , <i>speC</i> , <i>speG-J</i> , <i>speL</i> , <i>speM</i> , <i>ssa</i> i <i>smeZ</i> en les soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives.	110
Taula 35. Patrons de SAgS de les 27 soques aïllades d'infeccions invasives.	111
Taula 36. Patrons de SAgS de les soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives de cada tipus <i>emm</i> .	112
Taula 37. Resistència a eritromicina en funció de l'edat dels pacients.	116
Taula 38. Resistència a eritromicina segons el tipus d'infecció.	116
Taula 39. Distribució anual de les soques resistents a eritromicina i dels fenotips de resistència.	117
Taula 40. Correlació dels fenotips amb els genotips de resistència a macròlids.	118
Taula 41. Valors de CIM d'eritromicina en funció del genotip de resistència.	119

Taula 42. Tipus <i>emm</i> , fenotips i genotips de resistència de les soques resistents a eritromicina.	120
Taula 43. Resistència a tetraciclina en funció de l'edat dels pacients.	121
Taula 44. Resistència a tetraciclina segons el tipus d'infecció.	121
Taula 45. Distribució anual dels genotips de resistència de les soques resistents a tetraciclina.	122
Taula 46. Tipus <i>emm</i> i genotips de resistència de les soques resistents a tetraciclina.	123
Taula 47. Distribució dels gens de resistència a eritromicina i tetraciclina en les soques corresistents.	123
Taula 48. Tipus <i>emm</i> i determinants de resistència de les soques corresistents a eritromicina i tetraciclina.	124
Taula 49. Distribució anual de tipus <i>emm</i> i de gens de resistència de les soques resistents a eritromicina i/o tetraciclina.	125
Taula 50. Característiques dels pacients, tipus <i>emm</i> i valors de CIM de fluoroquinolones de les sis soques de <i>S. pyogenes</i> .	126

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Rebecca C. Lancefield (1895-1981).	4
Figura 2. Representació esquemàtica de la proteïna M6.	10
Figura 3. Característiques estructurals dels patrons cromosòmics A-E.	14
Figura 4. Esquema representant el cromosoma de <i>S. pyogenes</i> .	18
Figura 5. Hipòtesi proposada per Beres <i>et al.</i> per a explicar l'aparició d'un nou subclon del serotip M3.	19
Figura 6. Incidència anual d'infeccions invasives produïdes per <i>S. pyogenes</i> en països europeus, 1990-2002.	27
Figura 7. a) Evolució de la incidència de febre reumàtica aguda a Copenhaguen (1860-1970).	29
Figura 8. Model d'activació de les cèl·lules T pels antígens convencionals o pels superantígens.	41
Figura 9. Distribució dels casos d'infecció invasiva per grups d'edat.	94
Figura 10. Distribució dels casos d'infecció no invasiva per grups d'edat.	97
Figura 11. Distribució mensual acumulada dels casos d'infecció invasiva i no invasiva.	98
Figura 12. Distribució de les soques pertanyents als tipus <i>emm1</i> , <i>emm3</i> , <i>emm4</i> , <i>emm6</i> , <i>emm9</i> , <i>emm11</i> , <i>emm12</i> , <i>emm25</i> , <i>emm28</i> i <i>emm77</i> per grup d'edat i tipus d'infecció.	106
Figura 13. Patrons de SAgS de les soques pertanyents als tipus <i>emm1</i> , <i>emm3</i> , <i>emm4</i> , <i>emm11</i> , <i>emm12</i> , <i>emm28</i> i <i>emm77</i> .	114
Figura 14. Distribució anual dels fenotips de resistència a antibiòtics MLS _B .	117
Figura 15. Nombre de soques sensibles i de soques resistents a eritromicina de cada tipus <i>emm</i> .	119
Figura 16. Canvis aminoacídics i mutacions silents detectats en les QRDR del gen <i>parC</i> de les sis soques amb sensibilitat disminuïda o resistència a fluoroquinolones.	128
Figura 17. Canvis aminoacídics i mutacions silents detectats en les QRDR dels gens <i>parE</i> , <i>gyrA</i> i <i>gyrB</i> de les sis soques amb sensibilitat disminuïda o resistència a fluoroquinolones.	129

LLISTA D'ABREVIACIONS

ARNm	Àcid ribonucleic missatger
ARNr	Àcid ribonucleic ribosomal
ARNt	Àcid ribonucleic de transferència
ADVP	Addicte a drogues per via parenteral
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentració inhibidòria mínima
CMH	Complex major d'histocompatibilitat
FN	Fascitis necrosant
HLA	Antigen leucocitari humà
MLS	Antibiòtics macròlids, lincosamides i estreptogramines
PBPs	Proteïnes d'unió a penicil·lina
SAg	Superantigen
SmeZ	Exotoxina mitogènica estreptocòccica
Spe	Exotoxina pirogènica estreptocòccica
SSA	Superantigen estreptocòccic
SSTS	Síndrome del xoc tòxic estreptocòccic

1. INTRODUCCIÓ

1.1. *Streptococcus pyogenes*

1.1.1. **Perspectiva històrica**

Alguns autors han atribuït a Hipòcrates (segle V a.C.) les primeres descripcions de probables casos d'infeccions estreptocòcciques en la forma d'escarlatina, erisipela i de quadres clínics que avui es referirien com fascitis necrosant^{1,2}. No va ser fins el 1676 que Sydenham adoptà el terme *febris scarlatina* i individualitzà clarament l'escarlatina d'altres manifestacions exantemàtiques com el xarampió³. Cap a finals del 1700, Johnstone aportà una millor apreciació de l'espectre de malalties estreptocòcciques amb la classificació de l'escarlatina en tres entitats clíniques separades, les formes no complicades (*scarlatina simplex*), les associades a faringitis (*scarlatina anginosa*) i els quadres greus (*scarlatina maligna*)⁴. Progressivament, i abans del descobriment del propi microorganisme i de la introducció dels antimicrobians, es van anar comprovant les tendències cícliques en la freqüència i gravetat de la malaltia. En el segle XVIII, l'escarlatina era considerada una malaltia relativament benigna de la infantesa amb epidèmies esporàdiques de formes lleus i fatals de la malaltia àmpliament documentades a Europa¹. Als inicis del segle XIX la situació va canviar dramàticament amb l'aparició epidèmies cícliques de formes greus en diverses àrees d'Europa i dels Estats Units. L'escarlatina va esdevenir la principal malaltia fatal en la infantesa amb taxes de mortalitat que assolien i fins i tot excedien el 30%⁵. Aquesta situació es va mantenir fins a mitjans dels anys 1880, data a partir de la qual els brots epidèmics van anar disminuint gradualment i la mortalitat va davallar fins a taxes inferiors a l'1%. Durant aquesta època els estreptococs van entrar en escena, el que va permetre associar un microorganisme específic a l'escarlatina i a altres infeccions freqüents en aquell temps com l'erisipela i la sèpsia puerperal.

Les primeres descripcions d'estreptococs s'atribueixen al cirurgià alemany Billroth, qui l'any 1874 observà la presència de cocs formant cadenes en mostres de pacients afectats d'erisipela i infeccions de ferides. El 1883, Fehleisen demostrà que estreptococs aïllats en cultius purs a partir de lesions d'erisipela podien induir l'erisipela típica en humans. El nom genèric de *Streptococcus* va ser proposat per Rossenbach el 1884. En els anys següents es va començar a establir la importància dels estreptococs

com agents causals d'infeccions humanes i animals i es van produir els primers avenços en la seva identificació i classificació. El 1903, Schottmüller aportà la tècnica del cultiu en agar sang per a diferenciar els estreptococs hemolítics dels no hemolítics, i Brown el 1919 va categoritzar els estreptococs en tres grups principals (α -, β - i γ -hemolítics) d'acord als patrons d'hemòlisi produïts en cultiu. Aquests treballs inicials van representar la base de subsegüents esquemes bioquímics i serològics de classificació.

Els estudis de Rebecca Lancefield, iniciats en els anys 1920, van delinear la classificació moderna dels estreptococs β -hemolítics amb la introducció del sistema de classificació en grups serològics basat en la composició antigènica del carbohidrat específic de la paret cel·lular⁶. De forma notable, el sistema serològic representà el primer mètode precís per a identificar *Streptococcus pyogenes* (grup A de Lancefield) i per a determinar la seva associació a infeccions humanes. Lancefield contribuï també de manera fonamental al coneixement de l'epidemiologia de les infeccions produïdes per *S. pyogenes* amb el descobriment de la natura antigènica variable de la proteïna M que constitueix la base dels esquemes serològics clàssics utilitzats extensivament per a la tipificació del microorganisme^{7,8}.

Griffith el 1934 aportà una altra aproximació a la classificació serològica de *S. pyogenes* en base a diferències antigèniques de la proteïna T⁹.

Altres línies de recerca conduïdes per Dochez i Dick en els anys 1920 van permetre establir el paper de les toxines eritrogèniques en la patogènesi de l'escarlatina demostrant que l'antisèrum antitoxina permetia disminuir la morbiditat i mortalitat associada a aquesta malaltia. Todd aportà el 1932 el mètode per a la titulació d'antiestreptolisina O (ASO) en sèrum, que continua essent una eina valuosa en l'estudi immunològic i epidemiològic de la malaltia estreptocòccica¹⁰. Aquestes eines van ser



Figura 1. Rebecca C. Lancefield (1895-1981). (<http://www.rockefeller.edu/vaf/rclbio.htm>)

utilitzades per diversos investigadors dels Estats Units i del Regne Unit entre els que es troben Coburn, Collins, Rammelkamp, Wannamaker i Stollerman per a establir la relació de la infecció per *S. pyogenes* amb la febre reumàtica aguda i la glomerulonefritis aguda i per a acumular considerable experiència sobre l'epidemiologia de les infeccions produïdes pel microorganisme^{11,12}.

La introducció de les sulfamides i la penicil·lina en els anys 40 va suposar el desenvolupament d'estratègies per al tractament de les infeccions estreptocòcciques i per a la prevenció primària i secundària de la febre reumàtica. Amb la disponibilitat d'antimicrobians eficaços per a la teràpia i la profilaxi, cap el 1970 la febre reumàtica aguda pràcticament havia desaparegut del món industrialitzat, s'havia abolit la notificació de malalties específiques com l'escarlatina en molts països europeus i existia un optimisme generalitzat en quant a la pràctica eradicació d'infeccions greus produïdes per *S. pyogenes*^{11,12}. No obstant això, en la segona meitat de la dècada del 1980 s'inicia un altre capítol de la canviant epidemiologia de les infeccions produïdes pel microorganisme amb la inesperada reaparició de brots de febre reumàtica en diverses àrees dels Estats Units concomitant a un increment de comunicacions d'infeccions invasives greus en diverses parts del món, descrivint-se una nova entitat clínica anomenada síndrome del xoc tòxic estreptocòccic associada en molts casos a processos invasius tissulars com fascitis necrosant amb una elevada mortalitat¹³⁻²³. L'emergència i persistència d'infeccions invasives greus ha estimulat la implementació de programes de vigilància epidemiològica i ha renovat l'interès per la recerca dels mecanismes moleculars involucrats en la patogènesi i en l'evolució del patogen.

1.1.2. Taxonomia

Streptococcus pyogenes pertany a la família *Streptococcaceae* i constitueix l'espècie tipus del gènere *Streptococcus*. El Bergey's Manual of Systematic Bacteriology²⁴ descriu el gènere *Streptococcus* com organismes grampositius amb morfologia cel·lular esfèrica o ovoide de diàmetre inferior a 2 µm, associats en parelles o cadenes, immòbils i no formadors d'espores. Són anaerobis facultatius i no produeixen catalasa. El metabolisme és exclusivament fermentatiu amb producció d'àcid làctic com a principal producte final de la fermentació de glucosa i altres

carbohidrats. Presenten complexos i variables requeriments nutricionals, i el creixement es veu afavorit en medis suplementats amb sang o sèrum. El contingut de G+C en els membres del gènere varia del 34 al 46 %.

El gènere *Streptococcus* inclou en l'actualitat més de 50 espècies amb un reservori eminentment humà i animal. Alguns organismes formen part de la flora normal i poden comportar-se com oportunistes, altres poden trobar-se com a comensals transitoris, mentre que altres actuen com a virulents patògens²⁵.

La taxonomia del gènere ha sofert modificacions considerables en les últimes dues dècades derivades de l'aplicació de tècniques d'hibridació d'ADN, anàlisi comparatiu de seqüències del gen que codifica l'ARN ribosòmic 16S i altres estudis genètics que han ajudat a delinear millor les diferències entre gèneres i espècies. Les diverses aproximacions genètiques aplicades a la revisió de la taxonomia del gènere han originat successius canvis en la nomenclatura, descripció de noves espècies i de nous gèneres derivats, essent encara la delineació d'algunes espècies un tema de recerca. Així per exemple, poc temps abans de la publicació del Bergey's Manual el 1986, els gèneres *Enterococcus* (considerat estreptococs del grup D) i *Lactococcus* (classificat com estreptococs del grup N) es van establir com gèneres independents del gènere *Streptococcus*. Més recentment, alguns organismes prèviament pertanyents al gènere *Streptococcus* han estat distribuïts en els nous gèneres *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Dolosicoccus*, *Facklamia*, *Globicatella* i *Ignavigranum*²⁶.

Encara que no existeix una classificació actual que sigui completament satisfactòria, en base a l'anàlisi comparatiu de les seqüències del gen que codifica l'ARN ribosòmic 16S la major part de les espècies del gènere *Streptococcus* es poden distribuir en sis grups filogenètics anomenats piogènic, anginosus (anteriorment milleri), mitis, salivarius, mutans i bovis²⁷. *S. pyogenes* s'engloba en el grup piogènic al qual pertanyen altres espècies d'organismes predominantment β -hemolítics associades a infeccions en humans com *S. agalactiae* i *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, així com espècies patògenes d'animals aïllades ocasionalment en infeccions humanes (Taula 1). Els grups anginosus, mitis, salivarius i mutans, també anomenats col·lectivament estreptococs viridans, inclouen organismes principalment α -hemolítics (amb algunes excepcions en el grup anginosus) que es troben formant part de la flora normal de la cavitat oral i del tracte respiratori superior, gastrointestinal i genitourinari. Encara que es

consideren d'escassa virulència, són reconeguts agents causals d'infeccions oportunistes com bacterièmia i endocarditis especialment en pacients neutropènics, i d'infeccions supuratives (principalment abscessos) en el cas dels membres del grup anginosus. Des del punt de vista clínic, en la denominació viridans s'exclou l'espècie *S. pneumoniae*, filogenèticament relacionada amb membres del grup mitis però que difereix notablement en la seva significació clínica²⁶. El grup bovis agrupa organismes α o no hemolítics comensals del tracte digestiu de l'home i altres mamífers, trobant-se algunes espècies també associades a infeccions oportunistes com bacterièmia i endocarditis particularment en pacients amb neoplàsia de colon²⁸.

Taula 1. Espècies del gènere *Streptococcus* pertanyents al grup piogènic

Reservori	Espècie	Serogrup de Lancefield
Humà	<i>S. pyogenes</i>	A
Humà i animal	<i>S. agalactiae</i>	B
	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	C, G, A, L
Animal	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	C
	<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C
	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ^a	C
	<i>S. equi</i> subsp. <i>ruminantium</i>	C
	<i>S. canis</i> ^a	G
	<i>S. porcinus</i> ^a	E, P, U, V, cap
	<i>S. iniae</i> ^a	Cap
	<i>S. phocae</i>	C, F
	<i>S. didelphis</i>	Cap
	<i>S. uberis</i>	E, P, G
<i>S. parauberis</i>	E, P	

^a Associades ocasionalment a infeccions en humans

La caracterització fenotípica en base al tipus de reacció hemolítica, mida de la colònia, serogrup de Lancefield i proves bioquímiques resulta d'utilitat en la identificació de la major part d'estreptococs β -hemolítics aïllats de mostres clíniques però presenta limitacions en la identificació dels estreptococs no β -hemolítics. Els problemes inherents d'aquesta aproximació són deguts a la variabilitat d'algunes característiques fenotípiques en organismes de la mateixa espècie, l'escassa

reproductibilitat d'algunes proves i la manca de suficients dades fenotípiques en algunes espècies descrites més recentment^{25,26}.

L'anàlisi de les seqüències del gen que codifica l'ARN ribosòmic 16S ha estat àmpliament acceptat com a base per a estudis filogenètics i per a la identificació de microorganismes, adoptant-se en molts estudis una similitud inferior al 97% en l'ARN ribosòmic 16S com a criteri per a diferenciar espècies²⁹. No obstant això, el gen que codifica l'ARN ribosòmic 16S no és adequat per a la identificació d'algunes espècies de *Streptococcus* com *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* i *S. oralis* que poden exhibir una homologia superior al 99%. Com a tècniques d'identificació alternatives s'ha utilitzat la seqüenciació d'altres gens *housekeeping* com els que codifiquen la D-alanina:D-alanina ligasa (*ddl*)³⁰, la subunitat β de l'ARN polimerasa (*rpoB*)³¹, la superòxid dismutasa (*sodA*)³², així com la seqüenciació dels gens *groESL*³³ i de la regió espaiadora altament variable situada entre els gens que codifiquen les subunitats 16S i 23S de l'ARN ribosòmic³⁴.

1.1.3. Característiques morfològiques i estructurals

S. pyogenes presenta una morfologia cel·lular esfèrica o ovoide de 0,6 a 1 μm de diàmetre. La divisió cel·lular es produeix en un pla, originant parelles o cadenes de longitud variable degut a la separació incompleta del peptidoglicà.

En cultiu en agar sang forma colònies blanques o grises d'1 a 2 mm de diàmetre típicament envoltades per una zona d'hemòlisi completa (β -hemòlisi). Les colònies poden presentar un aspecte mate o mucós en funció de la quantitat de càpsula d'àcid hialurònic produïda.

La paret cel·lular està constituïda per un esquelet de peptidoglicà format per cadenes de residus alternats de N-acetilglucosamina i N-acetilmuràmic unit a un tetrapèptid (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala). Les cadenes adjacents es troben unides mitjançant ponts transversals intrapeptídics de dialanina. La matriu del peptidoglicà actua com a barrera física protegint al bacteri de la lisi osmòtica i mecànica i serveix d'ancoratge de diverses molècules que s'estenen a la superfície del bacteri entre les que es troben³⁵:

- El carbohidrat específic de grup de Lancefield format per N-acetilglucosamina unit a un polímer de ramnosa, que designa a *S. pyogenes* com estreptococ del grup A segons la classificació de Lancefield.
- L'àcid lipoteicoic constituït per un esquelet de poliglicerol fosfat unit de forma covalent a un àcid gras de longitud variable de tipus diglucosil.
- Una varietat de proteïnes com la proteïna M, les proteïnes M-like i les proteïnes d'unió a fibronectina, entre d'altres, amb importants funcions en la virulència del bacteri que es discutiran amb més detall en les següents seccions.

Adicionalment, moltes soques de *S. pyogenes* sintetitzen una càpsula d'àcid hialurònic compostat per residus alternats d'àcid glucurònic i N-acetilglucosamina que es diposita a l'exterior de la paret cel·lular³⁶.

1.1.4. **Classificació. Marcadors epidemiològics**

L'estudi dels components antigènics variables presents a la superfície cel·lular de *S. pyogenes* constitueix la base dels esquemes serològics clàssics i de les noves aproximacions genètiques utilitzades per a la classificació infraespecífica del microorganisme. Molt del coneixement acumulat sobre l'epidemiologia de les infeccions produïdes per *S. pyogenes* durant la major part del segle XX ha estat aportat pel sistema de serotipat basat en la detecció de diferències antigèniques de la proteïna M, complementat amb la determinació serològica d'altres antígens de superfície variables que inclouen les proteïnes T i SOF (*serum opacity factor*). Els avenços en les tècniques de biologia molecular han permès introduir una alternativa pràctica al sistema de serotipat basada en l'anàlisi de la seqüència del gen que codifica la proteïna M (gen *emm*) que ha esdevingut una eina àmpliament utilitzada per a la caracterització epidemiològica del microorganisme.

1.1.4.1. **Proteïna M**

La proteïna M és una molècula dimèrica que es troba ancorada a la membrana cel·lular per la porció carboxi-terminal, travessa la paret cel·lular i forma estructures fibril·lars en la superfície cel·lular³⁷. Es poden diferenciar quatre regions en la molècula

designades A-D (Figura 2) en cada una de les quals es troben blocs de seqüència repetida. Aquestes regions comprenen una porció amino-terminal hipervariable on es localitzen els epítops que determinen el tipus serològic, una porció central formada per blocs polimòrfics en mida i nombre entre serotips i una regió carboxi-terminal altament conservada^{37,38}. La característica periodicitat repetida de set residus d'aminoàcids no polars confereixen a la proteïna una estructura alfa helicoïdal, similar a la d'algunes proteïnes humanes com la tropomiosina.

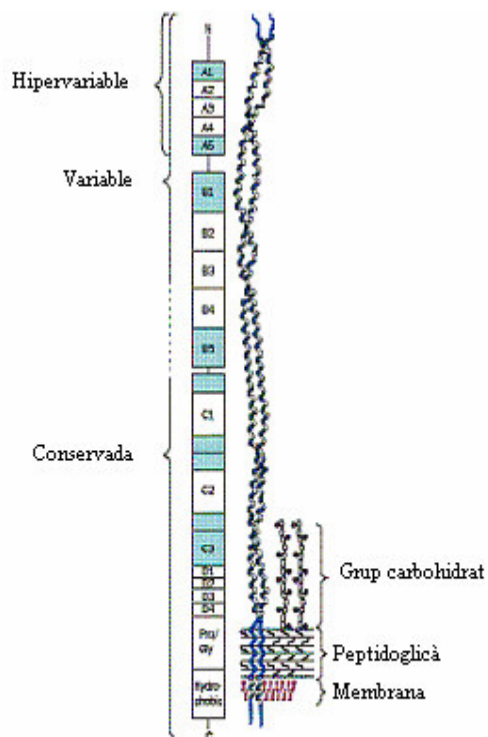


Figura 2. Representació esquemàtica de la proteïna M6. Es poden diferenciar quatre regions designades com A, B, C i D, seguides d'una regió rica en prolina i glicina associada al peptidoglicà i una regió hidrofòbica ancorada a la membrana. Les porcions acolorides corresponen a blocs de seqüència divergent respecte a la dels blocs centrals de la mateixa regió. Adaptat de Bisno *et al*³⁹

El sistema de serotipat M fou originalment descrit per Lancefield i es realitza mitjançant una tècnica de precipitació o immunodifusió^{7,40,41}. Els treballs pioners de Lancefield van permetre establir el paper primordial de la proteïna M en la virulència de *S. pyogenes* i la naturalesa serotip específica de la immunitat protectora contra les infeccions produïdes pel microorganisme⁴². Des del 1928 fins els anys 50, es van identificar els serotips M1 fins M50. El tipus M51 va ser l'últim validat el 1966 per un comitè internacional que va formular els criteris per a la designació de nous serotips M⁴³, existint en l'actualitat 83 serotips validats i internacionalment reconeguts denominats M1 a M93 (alguns serotips es van excloure degut a que corresponien a estreptococs dels grups C o G, o bé eren idèntics a serotips ja descrits)^{44,45}.

El sistema de serotipat M ha estat utilitzat extensivament en estudis epidemiològics però la dificultat que comporta la preparació i manteniment d'una bateria d'antisèrums de tots el serotips coneguts i la impossibilitat de tipificar determinades soques degut a la manca d'expressió de la proteïna M o de reactivitat amb els antisèrums ha fet que en l'actualitat només es realitzi en determinats centres de referència. El sistema serològic ha estat substituït per una tècnica de tipificació genotípica estandarditzada introduïda a mitjans dels anys 1990 basada en l'anàlisi de la seqüència de l'extrem 5' del gen *emm* corresponent a la porció hipervariable amino-terminal de la proteïna M⁴⁶. Aquesta tècnica permet establir una classificació de les soques de *S. pyogenes* en tipus *emm* i en les respectives variants o subtipus i en general presenta bona correlació amb la tipificació serològica⁴⁴. En l'actualitat existeixen més de 110 tipus *emm* validats (*emm1* a *emm124*) i més de 60 tipus provisionals no encara oficialment designats, dividits a la vegada en prop de 800 subtipus, que es troben recollits en una base de seqüències mantinguda pel *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)^{45,47} (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/stre/emmtypes.html>).

El tipus *emm* s'ha mostrat com un bon marcador de relació clonal en comparació amb altres tècniques genètiques de tipificació com MLST (*multilocus sequence typing*), encara que soques del mateix tipus *emm* poden ser divergents genèticament⁴⁸⁻⁵⁰.

Els estreptococs β -hemolítics dels grups C i G poden presentar proteïnes M amb característiques similars a les de *S. pyogenes*. Han estat descrits almenys 40 tipus *emm* específics d'aquests grups, havent-se aportat també evidències de la transferència horitzontal de gens *emm* entre *S. pyogenes* i organismes d'aquestes espècies⁵¹⁻⁵⁴.

1.1.4.2. Proteïna T

A diferència de la proteïna M que ha estat extensivament caracteritzada, els determinants genètics i el possible paper en la virulència de les proteïnes T han estat llargament desconeguts. Estudis recents han evidenciat que les proteïnes T formen estructures fibril·lars en la superfície del bacteri possiblement involucrades en l'adherència, trobant-se els seus determinants genètics en una porció altament variable coneguda com regió FCT (*fibronectin binding, collagen binding, T antigen*) on també es localitzen membres d'una família de gens que codifiquen proteïnes amb funcions en l'adherència^{55,56}.

La classificació serològica de *S. pyogenes* en base a diferències antigèniques de la proteïna T es realitza mitjançant una tècnica d'aglutinació i s'ha utilitzat tradicionalment com a complement o alternativa al sistema de serotipat M. Han estat identificats aproximadament 28 tipus T serològics, i una soca determinada pot expressar simultàniament més d'un antígen T. Les soques d'un mateix serotip M comparteixen amb freqüència un mateix tipus o patró T, constituint les variacions un indicador de diversitat genètica en els membres d'un mateix serotip M⁴⁵.

1.1.4.3. Proteïna SOF (*serum opacity factor*)

La proteïna SOF només es troba en soques de determinats serotips, aproximadament en la meitat de tots els serotips M o tipus *emm* coneguts⁴⁵. Rep el seu nom de la seva capacitat d'originar un increment en l'opacitat del sèrum de diversos mamífers, reacció que es produeix com a conseqüència de la seva interacció amb lipoproteïnes d'alta densitat⁵⁷. La proteïna SOF presenta un domini enzimàtic antigènica variable localitzat en la porció amino-terminal i una porció carboxi-terminal amb capacitat d'unió a fibronectina, raó per la qual també s'anomena proteïna SfbII (*streptococcal fibronectin-binding protein II*)⁵⁸.

Les soques productores de SOF es poden subclassificar en tipus específics mitjançant una tècnica serològica d'inhibició de l'activitat de l'enzim⁵⁹. Degut a que tradicionalment s'ha observat una elevada correlació entre tipus SOF i serotip M, la determinació del tipus SOF s'ha utilitzat com un mètode alternatiu per a extrapolar el serotip M en el cas de manca de disponibilitat d'antisèrum M⁶⁰.

La detecció i caracterització del gen *sof*, que codifica la proteïna SOF, ha afegit una altra eina a la tipificació de *S. pyogenes*⁶¹. D'aquesta manera s'ha evidenciat que encara que existeix una correlació entre tipus *sof* i tipus *emm*, les soques d'un mateix tipus *emm* poden presentar diferents gens *sof* i una única seqüència *sof* pot estar associada amb més d'un tipus *emm*⁶¹.

La correlació del tipus M/*emm* amb la presència del gen *sof* i el patró T ha estat analitzada recentment en una completa revisió realitzada per Johnson *et al.* que inclou la caracterització de més de 42.000 soques clíniques de *S. pyogenes* aïllades als Estats Units i en altres parts del món entre 1953 i 2004⁴⁵. A la taula 2 es presenten els resultats derivats d'aquest estudi corresponents al tipus M/*emm* més prevalents.

Taula 2. Correlació dels tipus M/emm prevalents amb la presència de sof i el patró T^a

Tipus M / emm	sof ^b	No. soques	Patró T ^c
1	-	4.107	1 (3.979); NT (110); 1/3/13/B3264 (18)
2	+	742	2 (528); 2/28 (146); 8/25/Imp19 (56); NT (12)
3	-	2.171	3/13/B3264 (1.959); NT (202); 1 (10)
4	+	1.543	4 (1.478); NT (30); 8/25/Imp19 (16); 4/28 (14); 3/13 (5)
5	-	616	5/27/44 (442); NT (166); 11/12 (8)
6	-	1.412	6 (1.283); NT (129)
9	+	142	9 (97); 14 (20); 5/9 (17); 9/3/B3264 (3); NT (4); 11/12
11	+	339	11 , 11/12 (311); NT (26); 28 (2)
12	+	2.585	12 , 11/12 (2.396); NT (189)
18	-	456	18 (127); NT (192); 8/Imp19/27 (125); 14 (7); 8/25, 5/27/44, 23 (5); 9/18
22	+	681	12 (391); 12/3/13/B3264, 13/B3264 (219); 11/12 (50); NT (17); 22 (4)
28	+	1.412	28 , 4/28 (1.329); NT (35); 11/28, 12/28, 8/28 (37); 3/13/B3264 (9); 4
33	-	72	3/13/B3264 (60); NT (8); 8/25 (4)
41	-	95	3/13/B3264 (78); NT (17); Misc (4)
43	-	88	3/13/B3264 (68); NT (18); Misc (2)
49	+	185	14 (98); NT (56); 8/14/25/Imp19 (18); 3/13/B3264 (9); 12; Misc (3)
58	+	158	8/25/Imp19 (81); NT (45); 2/28 (18); 2/8/25 (11); 12 (2); 14/25
44/61 ^d	+	198	5/27/44 (146); 11/12 (24); NT (21); 8/25/Imp19 (7) 11, 9/11
73	+	165	3/13/B3264 (156); NT (6); Misc (3)
75	+	912	8/25/Imp19 (885); NT (18); 14 (4); 13 (3); 6; 2/8/14
76	+	78	8/25/Imp19 (40); 12 , 11/12, 12/B3264 (30); 22; NT
27L/77 ^d	+	505	3/13/B3264 (209); 28, 13/28 (194); 9, 9/13/28 (45); NT (19); 8/25, 8/28 (10); 5/27/44 (8); 2 (7); 11/12 (3); Misc (10)
78	+	186	11 , 11/12 (158); NT (16); 3/13, 3/13/B3264/5/27/44 (10); 5/11/27; 14/25
81	+	71	3/13/B3264 (37); NT (11); 12, 12/B3264 (5); 8 (5); 4 (4); 6 (3); 14 (2); 23; Misc (3)
82	+	202	5/27/44 (154); NT (32); 3/13/B3264 (11); 11/12 (3); 4 (1); 8/25 (1)
83	-	77	3/13/B3264 (67); NT (10)
87	+	94	28 (80); NT (8); 11/12 (4); Imp19 (1); 6 (1)
89	+	518	11 , 11/12 (314); 3/13/B3264 (115); NT (86); 4; 28; 27
92	+	98	8/25/Imp19, Imp19 (86); 3/13/B3264 (5); NT (5); 28 (2)
94 ^e	+	81	3/13/B3264 , B3264 (77); NT (2); 6; 11
102	+	60	3/13/B3264 (25); NT (18); 11, 12, 11/12 (12); 14 (2); Imp19; 1; 12/B; 12/25
114	+	129	NT (66); 11/12 (47); 14 (10); 12/B3264 ; 5/11; 9; Imp19; 5; 1

^a S'han seleccionat els tipus M/emm més comuns ($n \geq 60$) de la taula original de Johson *et al.*⁴⁵. ^b +, presència; -, absència. ^c Els tipus o patrons T de cada tipus M/emm considerats diferents es troben separats per punt i coma, mentre que els patrons relacionats es troben separats per comes, seguits en ambdós casos pel nombre acumulat de soques de cada patró indicat entre parèntesi. Els patrons no seguits per un número entre parèntesi corresponen a observacions úniques o de molt baix nombre. NT, no tipable; Misc (miscel·lani), patrons incompletament identificats o no confirmats. Els patrons T corresponents a les soques de referència de cada tipus M/emm s'indiquen en negreta. ^d Comparteixen el mateix tipus emm però es poden diferenciar serològicament (també és el cas dels tipus 38/40, 50/62 i 65/69). ^e A partir del tipus 93 no es designen com serotips M sinó únicament com tipus emm.

1.1.4.4. Marcadors relacionats amb l'ecologia i la patogènesi

Dècades d'estudis epidemiològics conduïts fonamentalment en països industrialitzats han aportat l'evidència que determinats serotips M o tipus *emm* es troben associats preferentment a faringitis mentre que altres tipus s'aïllen amb més freqüència de lesions d'impetigen donant lloc al concepte àmpliament acceptat de l'existència de serotips amb tropisme tissular diferenciat^{62,63}. De forma similar, ha estat llargament reconegut que els serotips associats a febre reumàtica aguda difereixen dels associats a glomerulonefritis aguda⁶⁴.

Una distinció inicial entre soques reumatogèniques i no reumatogèniques va ser establerta per Bessen *et al.* amb la classificació de la proteïna M en dos grups antigènics anomenats classe I i classe II en base a la presència o absència, respectivament, d'un domini antigènic conservat localitzat en la regió C de la proteïna^{65,66}. Es va trobar una forta correlació entre els serotips associat a febre reumàtica i la presència de l'epítop de classe I, així com evidències serològiques d'infecció recent amb soques portadores de proteïna M de classe I en pacients afectats de febre reumàtica⁶⁷.

Posteriors investigacions genètiques sobre les relacions filogenètiques, el nombre i disposició dels gens *emm* i *emm-like*, que codifiquen proteïnes relacionades estructuralment i es troben disposats en tàndem en una regió del cromosoma anomenada reguló *mga*, van permetre identificar l'existència de cinc patrons cromosòmics (designats A-E)^{68,69} (Figura 3).

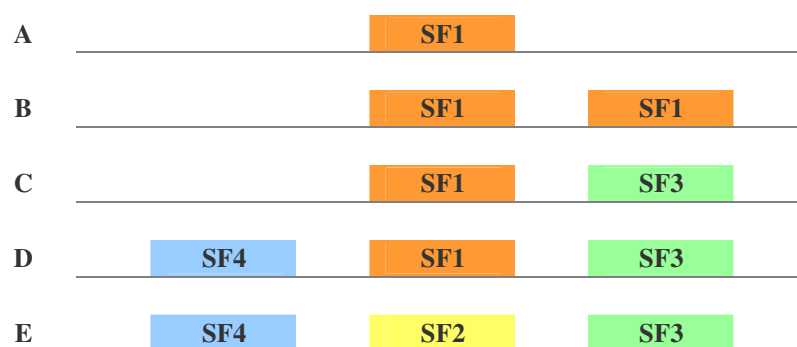


Figura 3. Característiques estructurals dels patrons cromosòmics A-E. Els gens *emm* i *emm-like* es classifiquen en quatre subfamílies designades SF1-SF4 en base a diferències en la seqüència nucleotídica corresponent a la regió que codifica el domini situat en el peptidoglicà proper a l'extrem 3'. Els patrons cromosòmics designats A-E es defineixen en funció del nombre i disposició relativa dels gens de cada subfamília en el locus *mga*. El gen situat en la posició central és el que s'utilitza per a la tipificació *emm*.

L'estudi de la distribució dels patrons cromosòmics en una col·lecció de soques genèticament diverses aïllades de casos de faringitis o impetigen en un període de 50 anys va revelar una correlació entre patró cromosòmic i lloc d'aïllament⁷⁰. Així, les soques amb patrons A-C es van trobar associades amb més freqüència a faringitis, les soques amb patró D a impetigen, mentre que les soques amb patró E no presentaven una predilecció tissular específica i podien ser aïllades d'ambdós territoris. Encara que no es coneix si aquesta regió cromosòmica representa un *locus* directament responsable de les diferències ecològiques, ha estat confirmat en subsegüents estudis l'associació entre soques amb patró A-C i faringe i soques amb patró D i infecció superficial de la pell^{71,72}. En un estudi sobre infecció invasiva als Estats Units menys del 2% de les soques presentaven el patró D, mentre que el 70% presentaven patrons A-C, implicant la faringe com a principal reservori per a la transmissió de clons causants d'infecció invasiva en aquesta població⁷³. Un model experimental d'impetigen estreptocòccic proporciona suport addicional a la forta associació entre soques amb patró D i infecció superficial de la pell⁷⁴. A la taula 3 es mostren les característiques dels diferents patrons cromosòmics i els tipus *emm* típicament associats a cada patró.

Taula 3. Característiques dels patrons cromosòmics dels gens *emm* i *emm*-like

Patró <i>emm</i>	Preferència tissular	Producció de SOF	Tipus <i>emm</i>
A-C	Faringe (faringitis)	Negativa	1, 3, 5, 6, 12, 14, 17, 18, 19, 23, 24, 26, 29, 30, 37, 38/40, 39, 46, 47, 51, <u>54</u> , 55, 57
D	Pell (impetigen)	Negativa	32, 33, 34, 36, 41, 42, 43, 52, 53, <u>54</u> , 56, 59, 64, 65/69, 67, 70, 71, 72, 74, 80, 81, 83, 85, 86, 91, 93, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 105, 108, 111, 115, 116, 119, 120, 121, 122, 123
E	Sense preferència	Positiva	2, 4, 8, 9, 11, 15, 22, 25, 28, 44/61, 48, 49, 50/62, 58, 60, 63, 66, 68, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 84, 87, 88, 89, 90, 92, 94, 96, 102, 103, 104, 106, 107, 109, 110, 112, 113, 114, 117, 118, 124

S'indica subratllat el tipus *emm* associat a més d'un patró cromosòmic. Modificat de McGregor *et al*⁷⁵.

1.1.5. Ecologia i transmissió

El nínxol ecològic de *S. pyogenes* es troba restringit a l'hoste humà. Per tant, l'home és l'únic reservori del microorganisme i la font d'infecció la constitueixen els

malalts i els portadors. El microorganisme es caracteritza per presentar un marcat tropisme per dos teixits principals, l'epiteli mucós nasofaríngi i la pell, que constitueixen els llocs primaris de colonització i infecció i els principals reservoris per a la transmissió.

S. pyogenes pot colonitzar la faringe de persones sanes sense produir cap signe d'infecció, és el que es coneix com estat de portador faríngi asimptomàtic. En aquest estat no es produeix resposta immune aparent, el microorganisme pot persistir durant llargs períodes de temps i es pot transmetre a nous hostes però amb eficiència reduïda⁷⁶. L'estat de portador faríngi asimptomàtic és especialment prevalent en nens en edat escolar on pot assolir taxes del 15 al 20% i és menys freqüent en població adulta⁷⁷⁻⁷⁹. No està clar si existeix un veritable estat de portador cutani, ja que la colonització de la pell intacta en absència de signes d'infecció pot ser només transitòria⁸⁰. De manera infreqüent, el microorganisme també pot colonitzar la mucosa vaginal i rectal de persones sanes⁷⁷.

La transmissió de *S. pyogenes* es produeix de manera habitual per via aèria a través de la dispersió d'aerosols de saliva i secrecions respiratòries, i per contacte directe^{77,81,82}. La transmissió indirecta a través d'aliments contaminats per manipuladors colonitzats o infectats està ben documentada, i ha estat l'origen de brots explosius de faringitis⁸³⁻⁸⁵. Altres modes de transmissió indirecta a través d'objectes o fomites han estat descrits de manera ocasional a la literatura⁸⁶. També s'ha suggerit el paper del mosquit *Hippelates* en la transmissió del microorganisme en poblacions amb elevada incidència d'impetigen, encara que no sembla representar un vector específic de *S. pyogenes*⁸⁷.

1.1.6. Genoma de *S. pyogenes*

Un tema comú en microbiologia mèdica és que la majoria d'espècies bacterianes es caracteritzen per presentar una substancial variació genètica, molt superior a la d'organismes eucariotes^{88,89}. Aquestes variacions genètiques entre soques d'una mateixa espècie poden comportar importants diferències en característiques biomèdiques rellevants com són la virulència i la resistència antimicrobiana.

En *S. pyogenes* ha estat reconegut durant dècades la repetida associació entre determinats serotips i síndromes clínics particulars, així com remarcables variacions temporals i geogràfiques en la freqüència i gravetat d'infeccions produïdes pel bacteri. Per exemple, soques dels serotips M1 i M3 són la principal causa d'infeccions invasives en la major part de països desenvolupats, i soques del serotip M18 s'han trobat particularment associades a brots contemporanis de febre reumàtica als Estats Units^{15,17,90,91}. Aquestes observacions epidemiològiques han donat lloc a la idea que diferències genètiques entre les soques de *S. pyogenes* poden ser responsables d'aquestes associacions, assumptió que ha estimulat l'interès per la seqüenciació del genoma de soques de diferents serotips.

L'any 2001 es va publicar la primera seqüència completa del genoma d'una soca de *S. pyogenes* del serotip M1 (SF370 aïllada d'una ferida infectada)⁹², i d'aleshores ençà es disposa de la seqüència genòmica completa d'11 soques addicionals pertanyents als serotips M1 (MGAS5005)⁹³, M2 (MGAS10270)⁹⁴, M3 (MGAS315 i SSI-1)^{95,96}, M4 (MGAS10750)⁹⁴, M5 (Manfredo)⁹⁷, M6 (MGAS10394)⁹⁸, M12 (MGAS2096 i MGAS9429)⁹⁴, M18 (MGAS8232)⁹⁹ i M28 (MGAS6180)¹⁰⁰. Els projectes de seqüenciació genòmica han contribuït considerablement a la identificació de nous factors de virulència i han proporcionat noves claus sobre la patogènesi, regulació, diversitat genètica intra i entre serotips i evolució del patogen.

Els genomes analitzats presenten una mida d'1,84 a 1,94 Mb, sis operons d'ARNr i més del 85% de regions codificadores comuns⁹⁴. Una característica important de tots els genomes estudiats és la presència de profags en un nombre que oscil·la entre dos (MGAS2096) i vuit (MGAS10394) per genoma. Encara que les regions codificadores associades a profags representen del 7 al 14% dels genomes, constitueixen la principal font de variació en el contingut genètic entre els genomes seqüenciats, essent responsables de fins el 75% de la variació¹⁰¹. Transposons i seqüències d'inserció proporcionen diversitat genètica addicional. La major part dels profags contenen gens que codifiquen factors de virulència incloent superantígens (*speA*, *speC*, *speH*, *speI*, *speK*, *speL*, *speM* i *ssa*), DNAses (*sda*, *sdn* i *spd*), hialuronidases (*hyl*, *hylP*), una fosfolipasa (*slaA*), i també una bomba d'expulsió responsable de la resistència a macròlids (*mefA*)(Figura 4).

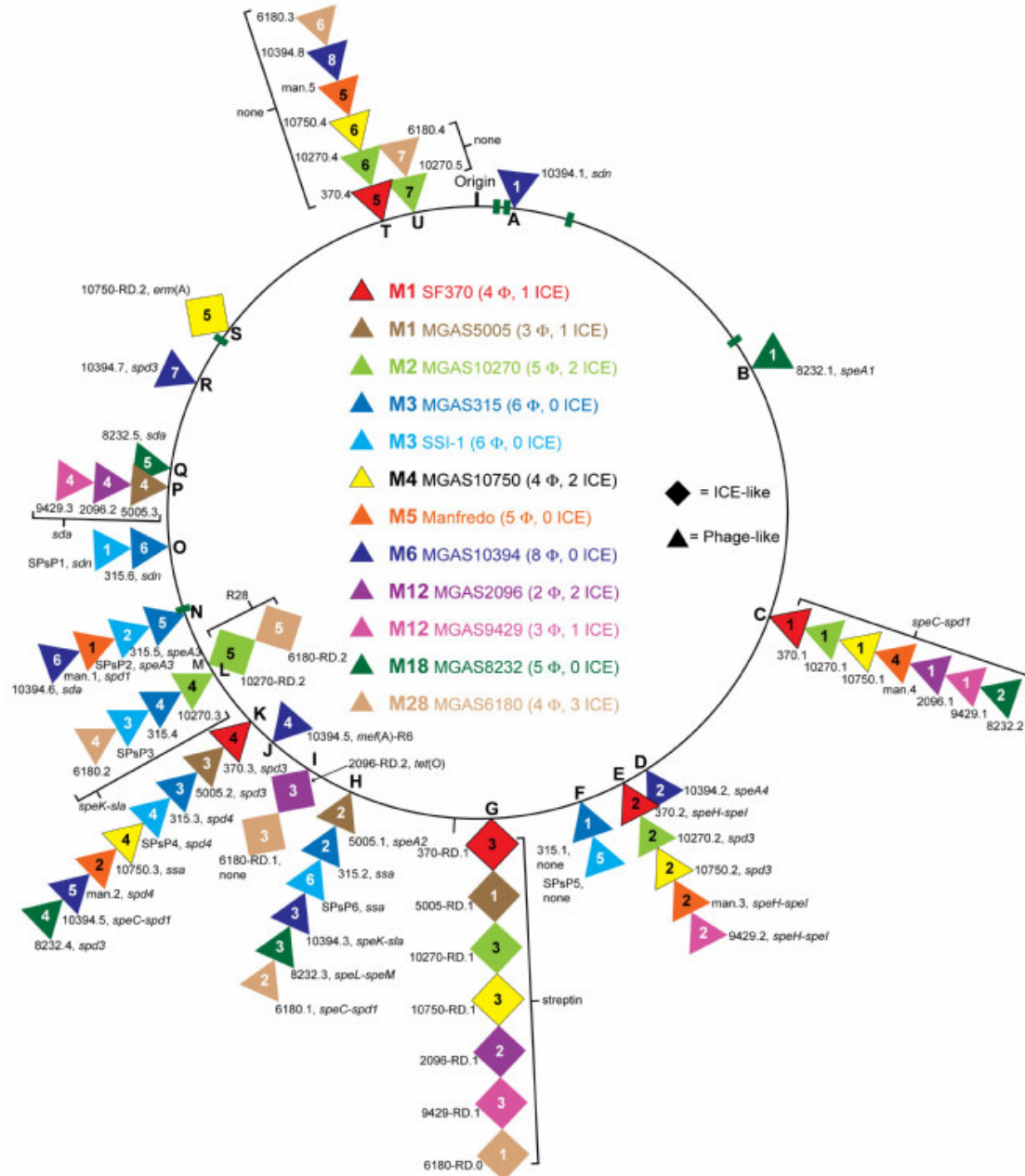


Figura 4. Esquema del cromosoma de *S. pyogenes*. S'il·lustren els llocs d'inserció dels profags i dels elements conjugatius identificats (ICE, *integrated conjugative elements*) i els factors de virulència codificats per profags de les 12 soques de les que es disposa informació del genoma complet. Els profags s'indiquen amb triangles i els elements conjugatius amb quadrats, en els que els colors indiquen les soques origen i els números indiquen l'ordre de localització des de l'origen de replicació. Els triangles i quadrats apilats indiquen una mateixa posició d'integració. Els *loci* d'integració s'indiquen alfabèticament. Les línies curtes de color verd indiquen els sis operons d'ARNr. Es mostra el nom assignat a cadascun dels profags i elements conjugatius, i els corresponents gens de virulència o de resistència antimicrobiana associats. *speA*, *speC*, *speH*, *speI*, *speK*, *speL*, *speM*, exotoxines pirogèniques estreptocòcciques; *ssa*, superantigen estreptocòccic; *sda*, *sdn*, *spd1*, *spd3* i *spd4*, estreptodornases o DNases; *sla*, fosfolipasa; *erm(A)*, *mef(A)* i *tet(O)*, gens de resistència; R6 i R28, adhesines de superfície. Obtingut de Beres *et al*⁹⁴.

Els bacteriòfags constitueixen un vehicle per a la transferència gènica horitzontal i proporcionen un mecanisme per a l'adquisició de nou material genètic en un únic esdeveniment genètic, contribuint de manera substancial a la diversificació del genoma i a l'evolució del patogen¹⁰¹. L'adquisició additiva de nous factors de virulència codificats per profags s'ha postulat com el principal mecanisme per a l'aparició de subclons potencialment més virulents. En suport d'aquesta idea Beres *et al.* han proposat una hipòtesi segons la qual les soques contemporànies del serotip M3 són el resultat de l'adquisició seqüencial de tres profags (Φ 315.5, Φ 315.2, Φ 315.4), originant soques amb un patró particular de factors de virulència (SpeA3, SSA, SpeK i Sla) que no es trobava present en soques del serotip M3 recuperades abans del ressorgiment d'infeccions invasives en els anys 1980⁹⁵ (Figura 5).

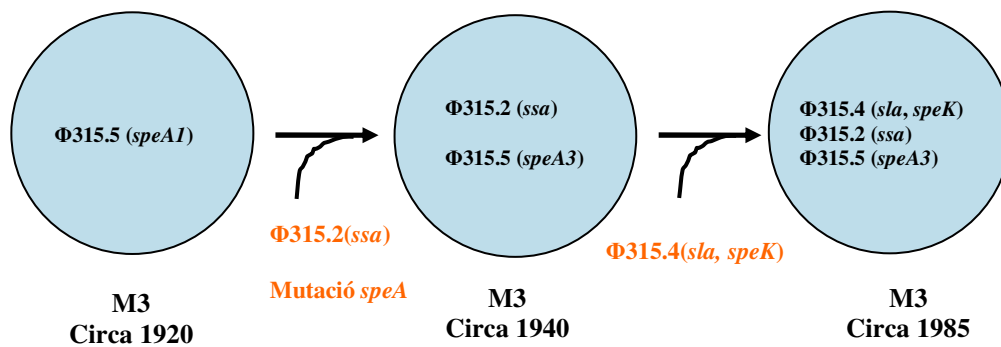


Figura 5. Hipòtesi proposada per Beres *et al.* per a explicar l'aparició d'un nou subclon del serotip M3. Sota aquesta hipòtesi totes les soques mostrades són clonals (MEE tipus 2). En els anys 1920 una soca ancestral del serotip M3 contenia el profag Φ 315.5 que codifica la toxina pirogènica estreptocòccica SpeA1. En els anys 1940 es va produir l'adquisició de profag Φ 315.2 que codifica el superantigen estreptocòccic SSA així com una mutació puntual en SpeA1 (Val106Ile) que va originar la variant SpeA3. La soca portadora de SSA i SpeA3 va adquirir el profag Φ 315.4 que codifica Sla i SpeK i es va disseminar àmpliament a partir de finals dels anys 1980. Adaptat de Beres *et al.*⁹⁵.

Estudis derivats de l'anàlisi genòmic han permès evidenciar que els profags no només constitueixen una font de variació genètica significativa entre soques de diferents serotips, sinó que juntament amb variacions al·lèliques en gens compartits, representen també la principal font de variació genètica entre soques del mateix serotip^{95,99,101}.

Una altra troballa rellevant és la identificació d'aproximadament 125 gens involucrats en la regulació que inclouen factors reguladors transcripcionals i sistemes reguladors de dos components. L'estudi d'alguns d'aquests sistemes reguladors com CovR-CovS, FasBCAX, Ihk-Irr i SptR-SptS està aportant important informació sobre

els mecanismes moleculars implicats en la regulació coordinada de l'expressió de factors de virulència en resposta a estímuls ambientals durant els diferents estadis de la infecció i com poden afectar mutacions en aquest gens reguladors l'expressió fenotípica global i el potencial virulent¹⁰²⁻¹⁰⁴.

La integració de la informació obtinguda a partir dels projectes de seqüenciació genòmica amb eines moleculars com *microarrays*, proteoma i immunoma, juntament amb estudis en models animals i assaigs *ex vivo/in vitro* està essent utilitzat per a millorar el coneixement de la interacció hoste-patogen i per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques¹⁰⁵.

1.2. Presentacions clíniques

S. pyogenes origina un ampli ventall de formes clíniques que abasten des d'infeccions supuratives superficials com faringitis i impetigen a quadres sistèmics associats a una elevada morbiditat i mortalitat com síndrome del xoc tòxic estreptocòccic (SSTS) i fascitis necrosant (FN). El microorganisme presenta també la particularitat d'originar seqüeles tardanes no supuratives, la febre reumàtica aguda i la glomerulonefritis aguda postestreptocòccica.

1.2.1. Infeccions supuratives

Les formes clíniques més comuns causades per *S. pyogenes* són la faringitis i la infecció cutània superficial coneguda com impetigen o pioderma. *S. pyogenes* és el principal agent causal de faringitis d'etiologia bacteriana amb un pic d'incidència en infants entre els 5 i 15 anys¹⁰⁶. En regions temperades la malaltia presenta un patró estacional, essent especialment prevalent durant els mesos d'hivern i primavera. Sol cursar amb febre, exsudat faringoamigdalari i limfadenopaties cervicals i és en general autolimitada però es poden produir complicacions supuratives en les àrees adjacents com abscessos periamigdalars, otitis mitja i sinusitis, i més rarament la disseminació hematògena i quadres metastàsics. L'escarlatina, caracteritzada per un exantema cutani i descamació, es pot presentar com una complicació associada a la infecció faríngica encara que pot aparèixer associada a la infecció en altres ubicacions. Secundàriament a

la faringitis estreptocòccica es poden desenvolupar també seqüeles no supuratives com la febre reumàtica aguda i la glomerulonefritis aguda.

L'impetigen estreptocòccic és una infecció cutània superficial consistent en lesions purulentes discretes que afecta principalment a àrees exposades del cos¹⁰⁷. Encara que tots els grups d'edat són susceptibles, la infecció presenta un pic d'incidència en infants entre els 2 i 5 anys i és molt freqüent en regions tropicals i subtropicals, mentre que en regions temperades es presenta predominantment durant els mesos càlids. Les complicacions supuratives de l'impetigen són excepcionals, però la infecció amb determinades soques considerades nefritogèniques constitueix el principal antecedent de glomerulonefritis aguda postestreptocòccica.

S. pyogenes pot produir formes clíniques que comporten una afectació més profunda del teixit cutani i normalment són secundàries a la pèrdua d'integritat de la barrera cutània per traumatismes, ferides quirúrgiques, varicel·la, úlceres o dermatitis¹⁰⁷. L'erisipela compromet les capes superficials de la pell i els vasos limfàtics cutanis i es caracteritza per la presència d'una línia clara de demarcació entre el teixit afectat i el no afectat. La cel·lulitis s'estén més profundament fins al teixit subcutani i no presenta la línia de demarcació característica de l'erisipela. Ambdues condicions es manifesten clínicament amb àrees d'edema que avancen ràpidament, signes locals d'inflamació i en molts casos amb febre, leucocitosi, linfoangitis i linfoadenitis. Els pacients amb alteracions en el drenatge limfàtic de les extremitats superiors o inferiors són propensos a episodis recurrents de cel·lulitis estreptocòccica. Un altre factor predisposant és la injecció de drogues per via parenteral. En aquests casos, la cel·lulitis sovint es troba associada a bacterièmia i a altres complicacions supuratives com artritis sèptica, osteomielitis, i en ocasions endocarditis infecciosa.

La fascitis necrosant és una infecció profunda del teixit subcutani que evoluciona ràpidament originant una extensiva destrucció de fàscia i teixit adipós. El quadre es pot complicar amb mionecrosi com a conseqüència de l'extensió al múscul del procés destructiu. En la major part dels casos la porta d'entrada dels estreptococs es produeix a través de lesions cutànies, en ocasions trivials o inaparents, o bé, quan no hi ha porta d'entrada evident, la infecció comença amb freqüència en una zona d'hematoma, distensió muscular o lesió articular traumàtica¹⁰⁸. En el 40 al 60 % del casos la FN es presenta amb bacterièmia i aproximadament la meitat dels casos

desenvolupen SSTS¹⁰⁹⁻¹¹². La mortalitat associada oscil·la entre el 20 i el 50%, essent més comú en pacients amb malalties preexistents, bacterièmia, SSTS i mionecrosi¹⁰⁹⁻¹¹².

La miositis estreptocòccica és una entitat rara que es pot presentar en pacients amb FN. La major part dels casos es produeixen després de traumatismes contusos no penetrants, però pot aparèixer també de manera espontània^{108,113}. És freqüent l'aparició de toxicitat sistèmica i la mortalitat associada és del 80 al 100%¹¹³.

Altres formes sistèmiques inclouen bacterièmia, pneumònia, meningitis, endocarditis, peritonitis, artritis sèptica i sèpsia puerperal⁷⁷. La bacterièmia per *S. pyogenes* es produeix amb més freqüència en infants i en pacients d'edat avançada, encara que també s'ha descrit en adults joves especialment en associació a la injecció parenteral de drogues. La bacterièmia en l'infant pot tenir el seu origen en una infecció de les vies respiratòries altes, però s'associa també amb freqüència a focus cutanis com cremades o varicel·la. En pacients adults és freqüent una malaltia subjacent com diabetis, malaltia vascular perifèrica, i neoplàsia i el focus de la infecció és principalment cutani. La pneumònia per *S. pyogenes* es troba associada amb freqüència a infeccions víriques com grip o varicel·la o a malalties pulmonars cròniques, es complica sovint amb empiema (30-40%) i s'acompanya de bacterièmia en el 10-15% dels casos. La meningitis produïda per *S. pyogenes* és generalment secundària a infeccions de les vies respiratòries altes com sinusitis o otitis, i també s'ha associat a procediments neuroquirúrgics^{114,115}. La sèpsia puerperal, una malaltia amb elevada mortalitat en l'era preantibiòtica, es produeix després d'un avortament o part en el que els estreptococs ja colonitzaven la pacient o han estat transmesos des del personal mèdic a l'endometri i estructures circumdants¹¹⁶. L'endometritis resultant pot complicar-se amb una cel·lulitis pelviana, tromboflebitis pelviana sèptica, peritonitis o abscess pelvià.

1.2.2. Síndrome del xoc tòxic estreptocòccic (SSTS)

La SSTS és una complicació greu que segueix un curs clínic caracteritzat per un inici sobtat de xoc i insuficiència multiorgànica. Els primers casos es van descriure a finals dels anys 1980 i els pacients afectats presentaven un quadre clínic similar al de la síndrome del xoc tòxic estafilocòccic¹⁴. Després de la revisió de casos subsegüents, el *Working Group on Severe Streptococcal Infections* va establir el 1993 una definició

consensuada per tal de reconèixer el quadre clínic i facilitar-ne el diagnòstic¹¹⁷ (Taula 4).

Taula 4. Definició de la síndrome del xoc tòxic estreptocòccic¹¹⁷. Per a ser considerat com a cas definitiu s'han de complir els criteris IA i II (A i B). Si es compleixen els criteris IB i II (A i B) es considera un cas probable si no s'identifiquen altres etiologies.

<p>I. Aïllament de <i>S. pyogenes</i>:</p> <p>A. D'un lloc normalment estèril (sang, líquid cefaloraquidi, pleural o peritoneal, biòpsia tissular, ferida quirúrgica, etc.).</p> <p>B. D'un lloc no estèril (faringe, lesió cutània superficial, vagina, etc.).</p>
<p>II. Signes clínics de gravetat:</p> <p>A. Hipotensió: pressió arterial sistòlica ≤ 90mmHg en adults o $<$ al percentil 5 per edat en nens.</p> <p>B. Dos o més dels signes següents:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Afectació renal: creatinina ≥ 177 $\mu\text{mol/l}$ (≥ 2 md/dl) en adults, o major o igual al doble del límit superior normal per l'edat. En pacients amb una malaltia renal preexistent, una elevació igual o superior a dues vegades el valor basal. - Coagulopatia: plaquetes $\leq 100 \times 10^9/\text{l}$ ($\leq 100.000/\text{mm}^3$) o coagulació intravascular disseminada definida per una prolongació del temps de coagulació, baix nivell de fibrinogen i presència de productes de degradació de fibrina. - Afectació hepàtica: nivells d'alanina-aminotransferasa (ALT), aspartat-aminotransferasa (AST), o de bilirrubina total superior o igual al doble del valor límit superior normal per l'edat. En pacients amb una malaltia hepàtica preexistent, una elevació igual o superior a dues vegades el valor basal. - Síndrome de distrés respiratori de l'adult, definit per l'aparició aguda d'infiltrats pulmonars difusos i hipoxèmia en absència d'insuficiència cardíaca, o evidència d'extravasació capil·lar difusa manifestada per l'aparició aguda d'edema generalitzat, o vessament pleural o peritoneal amb hipoalbuminèmia. - Exantema macular eritematós generalitzat que pot descamar. - Necrosi de teixits tous, incloent fascitis necrosant o miositis o gangrena.

La SSTS es presenta amb freqüència com una complicació d'infeccions cutànies i de teixits tous com FN, però pot estar associada a qualsevol altra infecció estreptocòccica. Encara que rar, la SSTS pot ser secundària a una faringitis simptomàtica^{118,119}. Algunes infeccions víriques com la varicel·la o la grip, traumatismes cutanis, i diversos procediments quirúrgics han proporcionat portes d'entrada del microorganisme, mentre que en el 50% dels casos la porta d'entrada no és evident¹²⁰. La major part dels pacients presenten bacterièmia i la mortalitat assoleix

taxes del 30 al 80%. La SSTS es pot desenvolupar en tots els grups d'edat, encara que és més freqüent en pacients d'edat avançada i en els que presenten comorbiditats com diabetis, neoplasies, alcoholisme, i varicel·la^{15,17,90,120-124}.

1.2.3. Seqüeles no supuratives

Com a conseqüència de la infecció estreptocòccica es poden produir seqüeles tardanes no supuratives considerades de natura autoimmune que inclouen la febre reumàtica aguda i la glomerulonefritis aguda¹²⁵.

La febre reumàtica aguda es produeix d'una a cinc setmanes després d'un episodi de faringitis per *S. pyogenes* i es caracteritza per lesions inflamatòries no supuratives que afecten principalment el cor, les articulacions, el teixit subcutani i el sistema nerviós central^{125,126}. Es manifesta amb una varietat de signes i símptomes clínics que poden presentar-se en diferents graus de severitat i en diverses combinacions. Els principals inclouen carditis, poliartritis, corea, nòduls subcutanis i eritema marginatum i s'utilitzen en el diagnòstic amb altres més inespecífics en base als criteris establerts per Jones el 1944, que han estat posteriorment revisats i actualitzats^{127,128}. Els episodis en general són autolimitats, però són freqüents les recurrències després d'episodis subsegüents d'infecció faríngia. El dany a les vàlvules cardíques pot ser crònic i progressiu originant una disfunció cardíaca significativa que es coneix com malaltia reumàtica cardíaca. En pacients joves la regurgitació de la vàlvula mitral és la lesió cardíaca predominant, mentre que l'estenosi mitral esdevé progressivament més comú amb l'edat. Els episodis inicials de febre reumàtica són més freqüents entre els 5-14 anys i són rars en nens de menys de 2 anys o en adults de més de 35 anys. S'estima que aproximadament el 60% dels casos de febre reumàtica originen el desenvolupament de malaltia reumàtica cardíaca, que presenta un pic de prevalença en l'edat adulta¹²⁶.

La glomerulonefritis postestreptocòccica es presenta en pacients amb una història recent de faringitis o impetigen, aproximadament deu dies després d'un episodi de faringitis o tres setmanes després d'un episodi d'impetigen. La malaltia presenta un pic d'incidència en infants, reflectint també l'epidemiologia de la infecció estreptocòccica prèvia. És un trastorn inflamatori agut dels glomèruls renals que es caracteritza, des del punt de vista anatomopatològic per lesions glomerulars

proliferatives difuses i des del punt de vista clínic per edema, hipertensió, hematúria i proteinúria¹²⁵.

Darrerament també s'ha suggerit el paper del patogen en l'aparició o recrudescència de desordres neuropsiquiàtrics en infants (tics i desordres obsessius compulsius) coneguts com PANDAS (*pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection*), manifestacions també considerades de caràcter autoimmune^{129,130}.

1.2.4. Situació mundial de les infeccions produïdes per *S. pyogenes*

Una recent revisió de dades de base poblacional indica que a escala global *S. pyogenes* constitueix una important causa de morbiditat i mortalitat, especialment en països menys desenvolupats on les condicions de vida promouen la transmissió del microorganisme i en els que els programes de tractament i prevenció són inexistents o ineficaços¹³¹ (Taula 5). La mortalitat ocasionada per *S. pyogenes*, estimada en aproximadament 500.000 morts a l'any, situa a *S. pyogenes* entre els principals causants de mortalitat atribuïda a un únic patogen després d'HIV, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *S. pneumoniae*, i hepatitis B, i probablement comparable a *Haemophilus influenzae* serotip b, xarampió, i rotavirus¹³¹ (<http://who.int>).

Taula 5. Estimació global de les infeccions produïdes per *S. pyogenes*

Malaltia	No. de casos existents	No. de nous casos per any	No. de morts per any
Infeccions greus			
Malaltia reumàtica cardíaca	15,6 milions	282.000	233.000
Història de febre reumàtica aguda sense carditis, requerint profilaxi secundària	1,88 milions	188.000	-
Glomerulonefritis aguda	-	472.000	5.000
Infeccions invasives	-	663.000	163.000
Total de casos greus	18,1 milions	1,78 milions	517.000
Infeccions superficials			
Faringitis	-	616 milions	-
Impetigen	111 milions	-	-

Obtingut de Carapetis *et al*¹³¹

Si bé tal com reflexa la taula 5, les infeccions superficials com faringitis i impetigen són molt més comuns que les infeccions greus, i encara que poden ser relativament benignes, representen una càrrega important als sistemes de salut i una utilització considerable d'antimicrobians.

Encara que no es disposa d'estudis recents que examinin l'evolució en la taxes d'incidència de faringitis estreptocòccica, les dades disponibles suggereixen que s'han mantingut més o menys estables en la major part de països. Els estudis més detallats realitzats als Estats Units durant els anys 1950 i 1960 documenten taxes de faringitis simptomàtica demostrada serològicament de 0,15 a 0,22 per persona i any en nens i de 0,06 en adults¹³²⁻¹³⁴. Aquestes dades són similars a les obtingudes en un estudi realitzat a Melbourne (0,14 casos per persona i any en nens i 0,04 en adults) durant el període 2001-2002¹³⁵ i es consideren representatives de la incidència de faringitis en països industrialitzats. En països menys desenvolupats, els escassos estudis poblacionals realitzats en població pediàtrica reflecteixen taxes d'incidència de faringitis amb cultiu positiu per *S. pyogenes* molt superiors. Així per exemple, s'han documentat taxes per persona i any de 0,5 a Nova Zelanda i de 0,95 a l'Índia¹³⁶. S'estima que a nivell global la incidència de faringitis atribuïda a *S. pyogenes* en casos per persona i any en població pediàtrica és 0,15 en països desenvolupats, 0,4 en països menys desenvolupats i 0,04 en adults. Així doncs, anualment es produeixen aproximadament 600 milions de nous casos de faringitis per *S. pyogenes*, dels quals 550 milions s'originen en països menys desenvolupats¹³¹.

L'impetigen estreptocòccic és altament prevalent en regions tropicals i subtropicals, trobant-se en moltes poblacions associat a elevades prevalences d'escabiosi. Les taxes de prevalença varien de l'1 al 20% en països africans i asiàtics, i poden assolir el 40-90% en poblacions aborígens australianes i en illes del Pacífic. S'estima que 111 milions d'infants amb edat inferior a 15 anys es troben afectats d'impetigen estreptocòccic en països menys desenvolupats¹³¹.

Les infeccions invasives causades per *S. pyogenes* han atret considerable atenció des de mitjans dels anys 1980 quan diversos estudis realitzats a Amèrica del Nord i Europa van advertir una possible reemergència de manifestacions clíniques greus. Aquests fets van actuar com important catalitzador per a la implementació de programes de vigilància epidemiològica en diversos països, el que ha millorat el coneixement de la

incidència, els factors de risc i les taxes de mortalitat associada a les infeccions invasives. En aquest sentit, el 2002 es va implementar a Europa el programa Strep-EURO (<http://www.strep-euro.lu.se>) constituït per 11 països, entre els que no es troba Espanya, per tal de portar a terme una vigilància epidemiològica activa de les infeccions invasives utilitzant criteris harmonitzats. Els estudis de vigilància epidemiològica realitzats a Europa han revelat un increment en la incidència d'infeccions invasives durant la dècada dels anys 1990 i inici del 2000, amb patrons que varien des de un increment lineal a marcades oscil·lacions anuals (Figura 6). Les taxes d'incidència en els últims anys es situen al voltant de 2,9 a 3,8 casos per 100.000 habitants en països com el Regne Unit, Noruega, Dinamarca, Holanda i Suècia, mentre que en altres països com Bèlgica, França i Hongria les taxes són inferiors i es situen al voltant d'1 a 1,7 casos per 100.000 habitants¹³⁷.

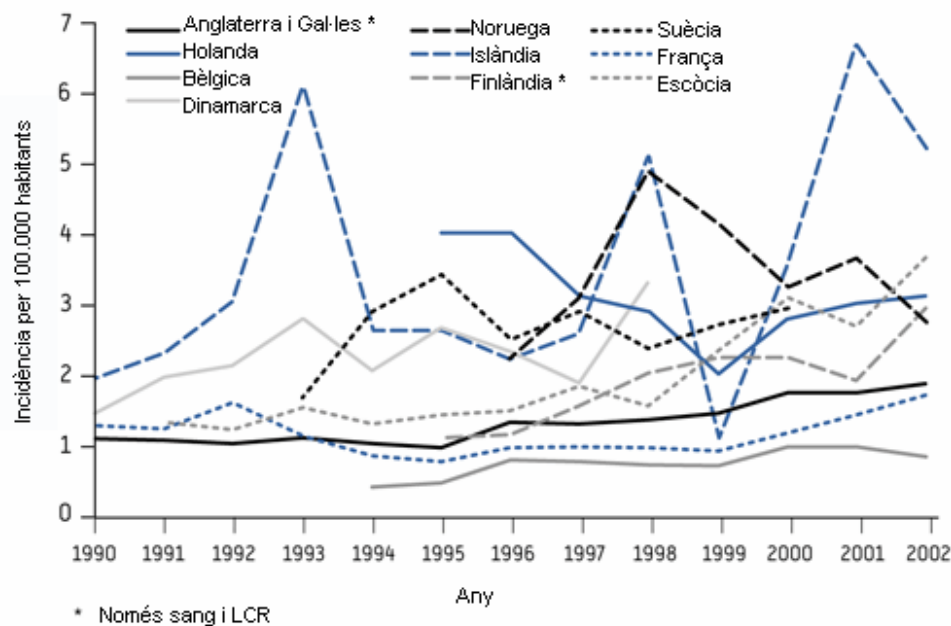


Figura 6. Incidència anual d'infeccions invasives produïdes per *S. pyogenes* en països europeus, 1990-2002. Adaptat de Lamagni *et al*¹³⁷

Als Estats Units i Canadà els estudis poblacionals publicats durant les últimes dues dècades revelen taxes d'incidència que oscil·len entre 1,5 a 5,2 casos per 100.000 habitants^{15,90,121,138}. L'informe del CDC *Active Bacterial Core Surveillance Report* corresponent a l'any 2005 situa una taxa d'infecció invasiva als Estats Units de 3,6 casos per 100.000 habitants (<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/abcs/survreports.htm>).

Les dades disponibles de països menys desenvolupats i de comunitats indígenes de països desenvolupats reflecteixen taxes d'incidència molt superiors. Així, als Estats Units s'han descrit taxes de 46 casos per 100.000 habitants en poblacions d'indis americans²¹ i d'entre 32,2 i 85,5 en poblacions d'aborígens australians^{139,140}. A Kenya, s'ha documentat una incidència de bacterièmia per *S. pyogenes* en població infantil d'edat inferior a 15 anys de 13 casos per 100.000 amb una elevada incidència d'infecció en els primers anys de vida (0,55 per 1.000 nounats; i 96, 63 i 29 per 100.000 en infants amb edats inferiors a 1 any, 2 anys i 5 anys, respectivament)¹⁴¹. Aquesta situació és similar a la descrita en un estudi realitzat pel *Young Infants Study Group* (WHO) a Papua Guinea, Etiòpia, Gàmbia i Filipines on aproximadament el 20% de les bacterièmies en infants de menys de 90 dies eren causades per *S. pyogenes*¹⁴². L'impacte mundial de les infeccions invasives causades per *S. pyogenes* s'estima en 660.000 casos per any (97% en països menys desenvolupats) que originen aproximadament 160.000 morts¹³¹.

La febre reumàtica aguda ha esdevingut una entitat extremadament infreqüent en països desenvolupats, però constitueix un important problema de salut pública en molts països menys desenvolupats en els que la malaltia és endèmica i roman com una de les principals causes de malaltia cardiovascular adquirida¹³¹. En països desenvolupats la incidència de febre reumàtica ha sofert una considerable disminució al llarg del segle XX¹⁴³. Els registres de Dinamarca i dels Estats Units il·lustren aquest declivi en la incidència i mortalitat de la febre reumàtica, iniciat fins i tot abans de la introducció dels antimicrobians, que ha estat també observat en altres països industrialitzats (Figura 7). Aquesta sorprenent evolució s'ha atribuït a diversos factors com la millora en les condicions de vida, un millor accés als serveis sanitaris, la introducció dels antimicrobians i la implementació de programes de prevenció, així com a canvis en la distribució dels serotips i en les propietats biològiques de les soques de *S. pyogenes*^{126,144}.

La incidència de febre reumàtica en els últims anys en la major part de països desenvolupats és inferior a 1 cas per 100.000 habitants, encara que cap el 1985 es van descriure brots epidèmics aparentment restringits a algunes àrees dels Estats Units¹⁴⁵. En països menys desenvolupats la incidència de la malaltia oscil·la entre 10 casos per 100.000 habitants a Europa de l'Est, 13 a l'Àfrica subsahariana, 19 a Amèrica Llatina,

54 a Àsia Central i del Sud, i 374 en poblacions indígenes d'Austràlia i Nova Zelanda¹³¹.

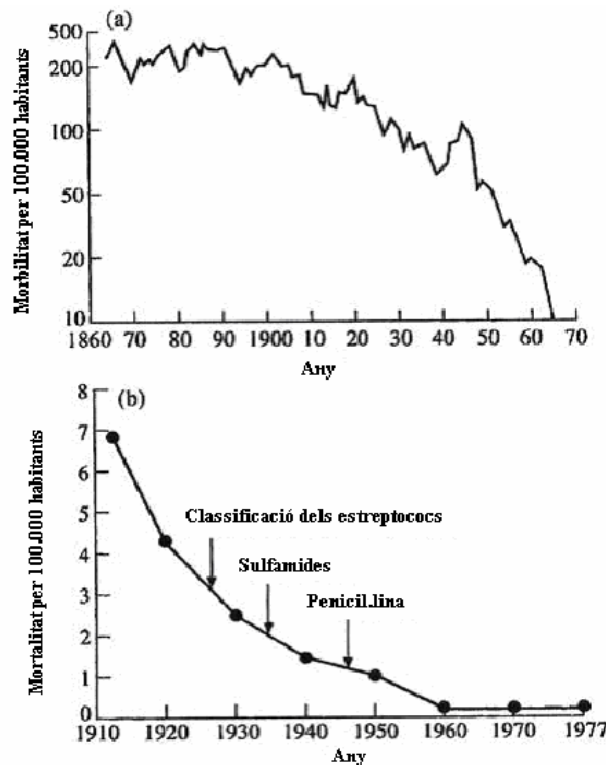


Figura 7. a) Evolució de la incidència de febre reumàtica aguda a Copenhaguen (1860-1970). b) Taxa de mortalitat atribuïda a febre reumàtica als Estats Units (1910-1977). Adaptat d'Olivier¹⁴³.

La prevalença de malaltia reumàtica cardíaca és elevada a l'Àfrica subsahariana (5,7 casos per 1.000), en comunitats indígenes d'Austràlia i nova Zelanda (3,5 casos per 1.000), i a Àsia Central i del Sud (2,2 casos per 1.000), mentre que en països desenvolupats es calcula en 0,3 casos per 1.000. S'estima que almenys 15,6 milions d'individus sofreixen malaltia reumàtica cardíaca al món i 233.000 morts a l'any són atribuïbles directament a aquesta malaltia¹³¹.

A l'igual que la febre reumàtica aguda, la incidència de glomerulonefritis aguda és més elevada en països menys desenvolupats, estimant-se en 24,3 casos per 100.000 habitants en població pediàtrica i en 2 casos en població adulta. En països desenvolupats es calcula que la incidència és de 6 casos en població pediàtrica i de 0,3 en adults. S'estima que anualment es produeixen al voltant de 470.000 casos de glomerulonefritis que originen aproximadament 5.000 morts (1% del total de casos)¹³¹.

1.3. Patogènesi

Els mecanismes involucrats en la patogènesi de *S. pyogenes* són complexos i no completament coneguts i representen el resultat de la intrigant interacció entre els factors de virulència del microorganisme, els mecanismes de defensa de l'hoste, factors immunogenètics i altres condicions subjacents de l'hoste.

El cicle infectiu s'inicia amb l'adherència del bacteri a teixits de l'hoste. Aquesta primera etapa és essencial per tal que el bacteri pugui superar barreres mecàniques fisiològiques com el flux mucociliar i salival o la descamació de l'epidermis i competir amb la flora normal resident al teixit. Després de la interacció inicial amb l'hoste, el patògen pot romandre al lloc de colonització en un estat relativament quiescent o pot proliferar i causar una infecció local com faringitis o impetigen. En alguns individus, el patògen evita la seva eliminació o control pels mecanismes de defensa de l'hoste i inicia una infecció sistèmica que en les formes més greus pot arribar a desencadenar una ràpida i extensiva destrucció tissular, xoc i la mort. Des del costat de l'equació del patògen, aquest ampli espectre de manifestacions clíniques reflecteix la gran varietat de factors de virulència de que disposa el microorganisme per sobreviure i establir-se en diferents llocs anatòmics i implica també la necessitat de regular coordinadament l'expressió de factors de virulència i de canviar els fenotips a mesura que respon a diferents estímuls ambientals.

1.3.1. Factors de virulència

S. pyogenes disposa d'una plèthora de factors de virulència incloent components estructurals localitzats en la superfície cel·lular i productes secretats al medi extracel·lular implicats en la capacitat del microorganisme de colonitzar, evadir i manipular el sistema immune, disseminar-se, i causar destrucció tissular i toxicitat sistèmica^{39,146,147}. A la taula 6 es recullen els principals factors de virulència que han estat identificats en *S. pyogenes*.

Taula 6. Factors de virulència de *S. pyogenes*

Factor de virulència	Activitat biològica
Constituents somàtics	
Proteïnes d'unió a fibronectina (Prf1/SfbI, SOF/SfbII, PrtF2, SfbX, FBP54, PFBP, FbaA, FbaB)	Adherència Invasió cel·lular
Àcid lipoteicoic	Primera etapa en l'adherència per unió a fibronectina Confereix adherència dèbil i no específica
Proteïna M	Adherència per unió a CD46, fibronectina, laminina, glicosaminoglicans i fibrinogen Invasió cel·lular Inhibició de la fagocitosi per interferència amb l'opsonització
Proteïnes M-like (Enn, Arp, Mrp)	Inhibició de la fagocitosi Unió a immunoglobulines
Proteïnes d'unió a plasminogen/plasmina (PrI/GAPDH, SEN, PAM)	Invasió tissular Adherència per unió a fibronectina, actina, miosina i plasmina
Càpsula	Inhibició de la fagocitosi Adherència per unió a CD44 Invasió tissular per translocació paracel·lular
C5a peptidasa (ScpA)	Inhibició de la quimiotaxi per hidròlisis del factor de complement C5a
GRAB	Unió a l'inhibidor de proteases del sèrum α 2-macroglobulina i regulació de l'activitat proteolítica a la superfície del bacteri
Productes extracel·lulars	
SIC (<i>streptococcal inhibitor of complement</i>) DRS (<i>distant related SIC</i>)	Inhibició del complement i inactivació de pèptids antibacterians de superfícies mucoses
Ides/Mac, EndoS	Hidròlisi d'immunoglobulines IgG
Estreptoquinasa	Invasió tissular Activador de plasminogen a plasmina
Hialuronidases (HylA, HylP)	Invasió tissular Hidròlisi d'àcid hialurònic
DNases (A, B, C, D) (Sda, Sdn, Spd)	Hidròlisi de DNA Degradació de NETs
Estreptolisines O i S	Citolisines
SpeA, SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, speM, SmeZ, SSA	Efectes de superantigen en el sistema immune
SpeB	Degradació de fibronectina, vitronectina, immunoglobulines i proteïnes del propi microorganisme Activació de metaloproteases de la matriu extracel·lular Activació de mediadors inflamatoris (interleucina 1 β i bradiquinina) Unió a integrines i laminina

1.3.1.1. Constituents somàtics

Un pas previ essencial per a la colonització i subsegüent infecció és l'adherència del bacteri a receptors específics de les cèl·lules de l'hoste. El procés d'adherència i colonització es troba influenciat de manera substancial per diversos factors de l'hoste com la composició de la saliva, el tipus de flora normal i la quantitat d'immunoglobulines presents en superfícies mucoses, així com per la pèrdua d'integritat de la barrera cutània.

Els estudis sobre l'adherència de *S. pyogenes* a cèl·lules epitelials han evidenciat que el microorganisme utilitza múltiples molècules de superfície en el procés d'adhesió essent les més ben caracteritzades l'àcid lipoteicoic, la proteïna M, la càpsula i una sèrie de proteïnes anomenades en conjunt proteïnes d'unió a fibronectina entre les que es troben PrtF1/SfbI, SOF/SfbII, PrtF2, SfbX, FBP54, PFBP, FbaA i FbaB¹⁴⁸. Les molècules que han estat identificades com a receptors inclouen components de la matriu extracel·lular com fibronectina, laminina, colagen, vitronectina i les glicoproteïnes integrals de membrana CD44 i CD46.

La dotació genètica de factors d'adherència específics difereix entre soques i la seva expressió, que pot tenir implicacions en el tropisme tissular, es troba controlada per sistemes reguladors sensibles a factors ambientals locals¹⁴⁹.

Malgrat *S. pyogenes* no ha estat considerat un patògen intracel·lular, diversos estudis han demostrat que el microorganisme pot envair cèl·lules epitelials humanes i romandre viable intracel·lularment¹⁵⁰⁻¹⁵². En el procés de penetració intracel·lular han estat involucrades almenys tres tipus d'adhesines que inclouen la proteïna M^{151,153} i les proteïnes d'unió a fibronectina PrtF1^{154,155} i PrtF2¹⁵⁶. El mecanisme de penetració intracel·lular comporta reordenacions del citoesquelet de cèl·lules de l'hoste en resposta a la interacció entre les adhesines estreptocòcciques i integrines a través de molècules pont de la matriu extracel·lular com fibronectina o laminina^{151,157}. El significat biològic de la internalització és controvertit¹⁵⁸. Alguns estudis han suggerit que la internalització pot donar lloc a la invasió de teixits profunds¹⁵⁰, mentre que altres han demostrat freqüències d'internalització molt superiors en soques recuperades de portadors i de casos de faringitis no complicada que en soques aïllades de mostres sistèmiques¹⁵⁹. S'ha suggerit que la penetració intracel·lular pot permetre al microorganisme evadir els mecanismes de defensa de l'hoste i l'acció d'alguns antibiòtics com la penicil·lina que

no travessa les membranes cel·lulars eucariotes i contribuir així a la persistència de l'estat de portador i a l'increment del reservori humà^{152,159,160}. Addicionalment, en un estudi recent s'ha trobat una major proporció de soques portadores del gen que codifica la proteïna d'unió a fibronectina PrtF1 (*prtF1*) i freqüències d'internalització superiors en soques resistents a eritromicina que en soques sensibles¹⁶¹. S'ha suggerit que aquesta associació entre resistència a eritromicina i internalització pot representar un problema terapèutic degut a la possible selecció de soques capaces de resistir l'acció de la penicil·lina i altres β -lactàmics a causa de la localització intracel·lular i l'acció dels macròlids per la resistència¹⁶¹.

El principal mecanisme de defensa contra la infecció per *S. pyogenes* és l'opsonització i la fagocitosi per macròfags residents als teixits i per neutròfils polimorfonuclears (PMN) que migren del torrent circulatori al lloc de la infecció¹⁶². *S. pyogenes* disposa de múltiples components que interfereixen amb pràcticament totes les etapes de la funció dels efectors de la resposta immune innata; bloquejant la fagocitosi i la deposició d'opsonines, inhibint la quimiotaxi de PMN al lloc de la infecció i degradant immunoglobulines.

La proteïna M es considera un dels principals factors de virulència de *S. pyogenes* degut al seu paper central en la resistència del bacteri contra la fagocitosi. La capacitat antifagocítica de la proteïna M en l'hoste no immune s'atribueix a la interferència amb l'opsonització que es produeix com a conseqüència de la seva unió específica a les proteïnes reguladores del complement C4BP (*C4 binding protein*)¹⁶³, factor H¹⁶⁴, factor H-like (FHL-1)¹⁶⁵, o a fibrinogen¹⁶⁶, mecanismes que originen una inhibició o disminució de la deposició de C3b en la superfície bacteriana i el subsegüent reconeixement per PMN.

Lancefield aportà la important observació que l'efecte antifagocític de la proteïna M queda anul·lat en presència d'anticossos serotip M específics, els quals es produeixen en resposta a la infecció natural en humans i confereixen immunitat protectora però només contra soques del mateix serotip, de manera que l'individu roman susceptible a la infecció per soques d'altres serotips^{8,42}. Posteriorment es va determinar que els epítops que evoquen la immunitat protectora es troben localitzats en la porció amino-terminal de la proteïna (aproximadament en els 30-50 primers aminoàcids), el que ha estat utilitzat en el desenvolupament de vacunes¹⁶⁷. Alguns estudis han suggerit,

però, que en alguns casos la immunitat protectora podria ser soca específica més que serotip específica degut a l'aparició de subpoblacions amb lleugeres variacions en la porció amino-terminal (mutacions puntuals, delecions o duplicacions) que no siguin reconegudes per la resposta immune^{168,169}.

Un altre aspecte central en la resposta immunològica contra la proteïna M, que històricament ha representat un handicap per al desenvolupament d'una vacuna segura, és la producció d'anticossos que reaccionen de forma creuada amb teixits humans degut a la similitud entre determinants antigènics localitzats en les porcions central i carboxi-terminal de la proteïna i el teixit humà cardíac, cerebral, renal i articular¹⁴⁷. Aquesta potencial inducció d'autoimmunitat degut al mimetisme molecular amb teixits de l'hoste ha estat implicat en la patogènesi de les seqüeles postestreptocòcciques¹⁴⁷.

Adicionalment, Herwal *et al.* han mostrat en un estudi recent una nova propietat de la proteïna M que pot contribuir al procés fisiopatològic de la SSTS¹⁷⁰. Els autors han observat que la proteïna M pot ser alliberada de la superfície bacteriana i formar complexos amb fibrinogen que a la vegada s'uneixen a neutròfils PMN a través de β_2 -integrines donant lloc a la secreció per part d'aquests d'HBP (*heparin-binding protein*), un potent inductor de la permeabilitat vascular.

S. pyogenes presenta altres proteïnes de superfície estructuralment similars a la proteïna M, conegudes en conjunt com proteïnes M-like (Mrp, Enn i Arp), amb capacitat d'interaccionar amb diferents proteïnes humanes com albúmina, fibrinogen, plasminogen, reguladors del complement i immunoglobulines IgG i IgA i s'ha suggerit que cooperen amb la proteïna M en l'efecte antifagocític¹⁴⁷.

La producció de càpsula és una altra de les estratègies emprades per *S. pyogenes* per a resistir la fagocitosi. La càpsula de *S. pyogenes* està composta exclusivament per àcid hialurònic que és poc immunogen degut a la seva similitud química amb el que es troba en el teixit connectiu humà. La quantitat d'àcid hialurònic capsular pot variar àmpliament entre soques i també en una mateixa soca sota diferents condicions. La seva expressió es troba relacionada amb el promotor de l'operó *has*, on es localitzen els gens que codifiquen el polisacàrid capsular (*hasA*, *hasB* i *hasC*)¹⁷¹ i està controlada pel sistema regulador transcripcional CovR-CovS¹⁴⁹. La contribució de la càpsula a la virulència i a la protecció del bacteri contra la fagocitosi està recolzada per diverses línies d'evidència. Tant *in vitro* com en models experimentals animals s'ha observat que

les soques de *S. pyogenes* deficientes en càpsula són més sensibles a la fagocitosi i menys virulentes¹⁷²⁻¹⁷⁴. Tanmateix, diversos estudis clínics i epidemiològics han evidenciat una associació entre soques altament encapsulades (mucoses) i infecció invasiva o brots de febre reumàtica^{175,176}. Altres observacions indiquen que la unió específica de la càpsula a la glicoproteïna transmembrana CD44, que és el receptor de l'àcid hialurònic humà present en el teixit connectiu i en la matriu extracel·lular, indueix reordenacions del citoesquelet que donen lloc a la pèrdua d'integritat de les unions intercel·lulars i permeten al microorganisme penetrar a través de l'epiteli¹⁷⁷. Addicionalment, en un estudi recent s'ha demostrat el paper de la càpsula en la unió del bacteri al virus de la grip, el que podria explicar l'associació entre infeccions per *S. pyogenes* i determinades infeccions víriques¹⁷⁸.

S. pyogenes ha desenvolupat mecanismes per interferir amb l'activitat de molècules del complement involucrades en el reclutament de neutròfils al lloc de la infecció. La C5a peptidasa (ScpA) és un enzim proteolític altament immunogen i molt conservat expressat virtualment per tots els serotips de *S. pyogenes*, així com per estreptococs dels grups B, C i G, que hidrolitza específicament el factor quimiotàctic del complement C5a en el seu lloc d'unió a PMN, inhibint així la quimiotaxi de les cèl·lules fagocítiques al lloc de la infecció^{179,180}.

Recentment s'ha identificat en *S. pyogenes* una altra proteïna de superfície anomenada GRAB (*G-related α_2 -macroglobulin-binding protein*) que presenta una elevada afinitat per l' α_2 -macroglobulina humana, l'inhibidor de proteases més abundant del sèrum¹⁸¹. Els autors han proposat que la captació de l' α_2 -macroglobulina pot conferir una protecció local a proteïnes superficials del bacteri enfront a la degradació proteolítica per part de cèl·lules fagocítiques o per proteases produïdes pel propi microorganisme.

La captura de plasminogen de l'hoste és un mecanisme comú en molts microorganismes invasius per a travessar barreres tissulars¹⁸². El plasminogen és el precursor inactiu de la plasmina, un enzim proteolític que intervé en la fibrinolisi de coalls intravasculars i en la degradació de components de la matriu extracel·lular facilitant la migració de cèl·lules epitelials durant els processos de regeneració tissular. *S. pyogenes* presenta la capacitat de segrestar plasminogen i plasmina de l'hoste a través dels receptors localitzats a la superfície cel·lular Plr (*plasmin receptor*)/GAPDH

(*glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase*)¹⁸³, SEN (*streptococcal surface enolase*)¹⁸⁴ i PAM (*plasminogen binding group A streptococcal M protein*)¹⁸⁵. La plasmina unida a la superfície bacteriana pot activar metaloproteases i colagenases de la matriu extracel·lular i facilitar la disseminació del bacteri. Alternativament, també s'ha suggerit que la unió a plasminogen pot disminuir els nivells disponibles d'aquest durant la resposta immune¹⁸⁶.

1.3.1.2. Productes extracel·lulars secretats

En addició als components estructurals presents en la superfície bacteriana, *S. pyogenes* secreta una varietat de productes al medi extracel·lular implicats en la virulència. Aquests productes secretats inclouen enzims degradatius (proteases, DNases, hialuronidases), toxines (estreptolisines i superantígens) i diverses proteïnes amb altres funcions com la inhibició del complement i la interferència amb la fagocitosi.

La proteïna Sic (*streptococcal inhibitor of complement*) és produïda majoritàriament per soques del serotip M1 i va ser inicialment identificada com un inhibidor del complex d'atac de membrana¹⁸⁷. En addició al seu efecte sobre el complement, Sic bloqueja els processos cel·lulars crítics de la fagocitosi alterant la funció normal del citoesquelet de PMN¹⁸⁸ i inhibeix l'activitat de diversos pèptids antibacterians del sistema immune innat que es troben en superfícies mucoses¹⁸⁹. Altres estudis en models animals han posat de manifest la importància d'aquesta proteïna en la persistència del microorganisme en superfícies mucoses en demostrar que la inactivació del gen *sic* disminueix l'habilitat de *S. pyogenes* de colonitzar i persistir en el tracte respiratori superior¹⁹⁰. La proteïna Sic és altament immunògena i extremadament variable amb més de 300 variants al·lèliques identificades¹⁹¹⁻¹⁹⁴. Les variants Sic són seleccionades ràpidament en superfícies mucoses aparentment per la pressió exercida pel sistema immune¹⁹¹⁻¹⁹³, havent-se detectat subpoblacions amb diferents al·lells *sic* simultàniament en un mateix individu¹⁹⁴. Encara que no s'ha trobat associació entre al·lells *sic* específics i gravetat de la infecció, s'ha suggerit que la selecció d'aquestes variants pot contribuir a l'abundància de soques del serotip M1 en infeccions humanes^{192,193}.

S. pyogenes produeix diverses proteases com Mac (*group A streptococcal Mac-1 like protein*), també anomenada IdeS (*immunoglobulin G degrading enzyme of S.*

pyogenes), i l'endoglicosidasa EndoS que degraden específicament immunoglobulines G i contribueixen a la inhibició de l'opsonització i la fagocitosi¹⁹⁵.

La producció d'estreptoquinasa és un altre factor que s'ha considerat implicat en la disseminació del microorganisme a través dels teixits. L'estreptoquinasa és una proteïna que forma complexos 1:1 amb plasminogen i l'activa a plasmina, la seva forma proteolítica activa. El complex plasmina-estreptoquinasa presenta el potencial de dissoldre coalls de fibrina i de digerir les unions intercel·lulars, el que facilita la migració del microorganisme a través de les capes tissulars¹⁸⁶. L'estreptoquinasa és altament específica pel plasminogen humà i exhibeix una activitat escassa o nul·la sobre el plasminogen d'altres mamífers, fet que ha representat una important limitació en l'estudi del seu paper en la virulència en models experimentals animals. El paper central de l'estreptoquinasa en la invasió i disseminació del microorganisme ha estat definitivament demostrat *in vivo* en un model murí transgènic "humanitzat" amb un transgen que codifica el plasminogen humà¹⁹⁶. Els autors d'aquest estudi han suggerit la possibilitat que polimorfismes genètics responsables de variacions en les concentracions plasmàtiques de plasminogen podrien representar un factor de sensibilitat a la infecció. El gen que codifica l'estreptoquinasa (*ska*) es troba en la major part de soques de *S. pyogenes* així com en estreptococs dels grups C i G. En *S. pyogenes* s'han descrit aproximadament 80 variants al·lèliques amb variacions localitzades en dues regions de la molècula generades principalment per processos de recombinació^{197,198}.

A banda de la seva funció fagocítica, s'ha conegut recentment que els neutròfils poden també lisar microorganismes eficientment en el medi extracel·lular mitjançant un procés que involucra l'extrusió d'una matriu d'ADN i histones coneguda com NETs (*neutrophil extracellular traps*)¹⁹⁹. En aquest context, la contribució de les diferents DNases produïdes per *S. pyogenes* en la patogènesi ha cobrat una nova significació. Les DNases A, B, C i D es troben entre les primeres proteïnes secretades de *S. pyogenes* en ser identificades, encara que no existien evidències directes de la seva contribució a la virulència però sí de la seva producció *in vivo*, essent la detecció d'anticossos anti DNasa B una eina utilitzada en el diagnòstic per a demostrar infecció recent^{200,201}. Arrel dels estudis de seqüenciació genòmica s'ha postulat que les DNases poden correspondre als factors mitogènics (MF1, MF2, MF3 i MF4) i estreptodornases (Sda, Sdn i Spd) identificats en base a la seva similitud amb proteïnes amb activitat

nucleasa, la major part dels quals es troben codificats per bacteriòfags. Buchanan *et al.* aplicant una aproximació genètica de mutagènesi dirigida i expressió heteròloga de la DNAsa Sda1 han revelat que l'enzim és necessari i suficient per a promoure la degradació de NETs i la resistència del bacteri a la lisi per neutròfils *in vitro* i en un model murí de FN²⁰². Addicionalment, els autors han mostrat que la inhibició farmacològica de l'activitat DNAsa de Sda1 preserva la funció dels NETs de l'hoste i redueix la virulència.

Un altre factor de virulència que s'ha considerat tradicionalment implicat tant en la disseminació del bacteri com de les seves toxines i enzims extracel·lulars és la hialuronidasa que podria actuar degradant l'àcid hialurònic present al teixit connectiu, encara que no s'han realitzat gaires estudis que suportin aquesta assumpció²⁰³. *S. pyogenes* produeix diverses hialuronidases, incloent una de codificació cromosòmica (HylA), i diverses codificades per bacteriòfags (HylP, HylP1, HylP2, HylP3). El paper de la hialuronidasa cromosòmica ha estat caracteritzat recentment en un model murí d'infecció cutània, presentant-se evidències de que actua facilitant la disseminació de molècules grans, però no del bacteri²⁰⁴. Els autors suggereixen que la hialuronidasa podria tenir també un paper nutricional a través de la utilització de l'àcid hialurònic de l'hoste o el de la seva pròpia càpsula com a font d'energia, podent ser aquesta última possibilitat important en la transmissió i viabilitat del microorganisme fora de l'hoste humà.

L'elaboració de toxines capaces de formar porus en membranes eucariotes és un altre tema comú en diversos microorganismes patògens. *S. pyogenes* produeix dos tipus d'hemolisines, l'estreptolisina O (SLO) i l'estreptolisina S (SLS), que presenten activitat citolítica sobre una varietat de cèl·lules i fraccions cel·lulars, incloent eritròcits, macròfags, leucòcits, plaquetes i diversos tipus cel·lulars en cultiu²⁰⁵. SLO és una toxina inhibida de manera reversible per l'oxigen que interacciona amb el colesterol de membranes cel·lulars on forma agregats i indueix la formació de porus transmembrana. Els efectes tòxics de SLO han estat demostrats *in vivo* en models experimentals animals d'infecció invasiva²⁰⁶. Una important observació és que SLO actua com a vehicle per a la translocació a l'interior de cèl·lules epitelials d'una segona proteïna, la NAD glicohidrolasa (NADasa), el que origina un increment de la citotoxicitat i la inducció

d'apoptosi²⁰⁷. SLO és altament immunògena i la titulació d'antiestreptolisina O és de gran utilitat en el diagnòstic per a evidenciar infecció recent²⁰¹.

SLS és estable a l'oxigen i a diferència de SLO no és immunògena. És la principal responsable de la característica zona de β -hemòlisi que envolta les colònies de *S. pyogenes* quan creixen en agar sang. La seva activitat hemolítica és inhibida per lipoproteïnes del sèrum i altres fosfolípids. A l'igual que SLO, origina la formació de porus transmembrana però en aquest cas mitjançant un mecanisme lític similar al del complement sobre les cèl·lules bacterianes²⁰⁸. Estudis experimentals en animals han evidenciat que SLS constitueix un factor de virulència rellevant en la infecció necrosant de teixits tous i que actua activament en la destrucció de neutròfils al lloc de la infecció²⁰⁹. Degut a que la mida molecular i la composició aminoacídica de SLS són similars a les de bacteriocines produïdes per altres espècies bacterianes, s'ha suggerit que els seu efecte tòxic sobre cèl·lules de mamífer pot representar un dany col·lateral en un sistema que ha evolucionat per a controlar la competició amb la flora bacteriana per un nínxol ecològic²⁰⁸. La major part de les soques de *S. pyogenes* produeixen ambdues hemolisines, encara que ocasionalment es poden trobar soques que produeixen només una o més rarament cap hemolisina²¹⁰.

S. pyogenes produeix una família d'exotoxines que actuen immunològicament com superantígens i han estat considerades mediadores cabdals d'infeccions invasives greus en virtut de la seva potent activitat immunoestimuladora²¹¹⁻²¹⁴. Aquesta família compren les exotoxines pirogèniques estreptocòcciques clàssiques SpeA i SpeC, històricament anomenades toxines de l'escarlatina degut a la seva associació amb aquesta patologia, així com les exotoxines pirogèniques SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, el superantigen estreptocòccic SSA i l'exotoxina mitogènica estreptocòccica SmeZ²¹¹.

Alguns autors inclouen les proteïnes de codificació cromosòmica SpeB i SpeF a la llista de superantígens estreptocòccics^{215,216}, encara que la seva activitat superantigènica és controvertida. Cap de les dues proteïnes no es troba genètica ni estructuralment relacionada amb altres superantígens estreptocòccics i a diferència d'aquests, presenten activitat enzimàtica. SpeB és una potent proteasa amb activitat hidrolítica sobre proteïnes tant del propi microorganisme com sobre proteïnes humanes. La seva activitat biològica inclou la hidròlisi de fibronectina, vitronectina,

immunoglobulines i la generació de mediadors inflamatoris actius com interleucina-1 β (IL-1 β) i l'hormona vasoactiva bradiquinina a partir dels seus precursors¹⁹⁵. SpeF, també anomenat factor mitogènic (MF), és idèntic a la DNAsa B²¹⁷, i l'activitat mitogènica atribuïda a aquesta proteïna s'ha considerat causada probablement per la contaminació d'altres superantígens com SmeZ o SpeC²¹⁸.

Tots els superantígens estreptocòccics coneguts amb l'excepció de SpeG, SpeJ i SmeZ són codificats per bacteriòfags, el que contribueix a la seva diversificació en les soques de *S. pyogenes*. Algunes d'aquestes exotoxines presenten variants al·lèliques que exhibeixen diferent capacitat mitogènica. SpeA presenta sis variants al·lèliques^{219,220}, de les quals SpeA2 i SpeA3 s'han trobat associades a les soques contemporànies dels serotips M1 i M3. També han estat descrites variants al·lèliques de SpeC^{221,222}, SpeB²²³, SSA²²⁴ i SmeZ²²⁵, essent aquesta darrera la més diversa amb més de 40 variants al·lèliques identificades.

La “super” activitat d'aquestes exotoxines es deu a la seva capacitat de sobrepassar la presentació i processament normal dels antígens convencionals i de provocar una activació i alliberament massiu de mediadors inflamatoris. A diferència dels antígens convencionals, els superantígens no requereixen ser processats per les cèl·lules presentadores d'antígens i s'uneixen directament a la molècula del CMH de classe II i al receptor del limfòcit T, no en el lloc antigen específic sinó en la regió variable de la cadena β (regió V β) (Figura 8)²¹¹⁻²¹³. Cada superantigen mostra especificitat per determinades famílies de cadenes V β , d'entre les aproximadament 30 diferents que conformen el repertori de cèl·lules T en humans, de manera que pot reaccionar amb tots els limfòcits T que expressin aquestes cadenes (Taula 7). Per tant, en comparació amb els antígens convencionals que reaccionen amb una fracció de cèl·lules T inferior al 0,01%, els superantígens són capaços d'activar del 5 al 25% del total de cèl·lules T. El resultat és una potent estimulació del sistema immune i el subsegüent alliberament massiu de citocines per part de les cèl·lules presentadores d'antígens (factor de necrosi tumoral α , interleucina 1) i per les cèl·lules T activades (interleucina 2, interferó γ).

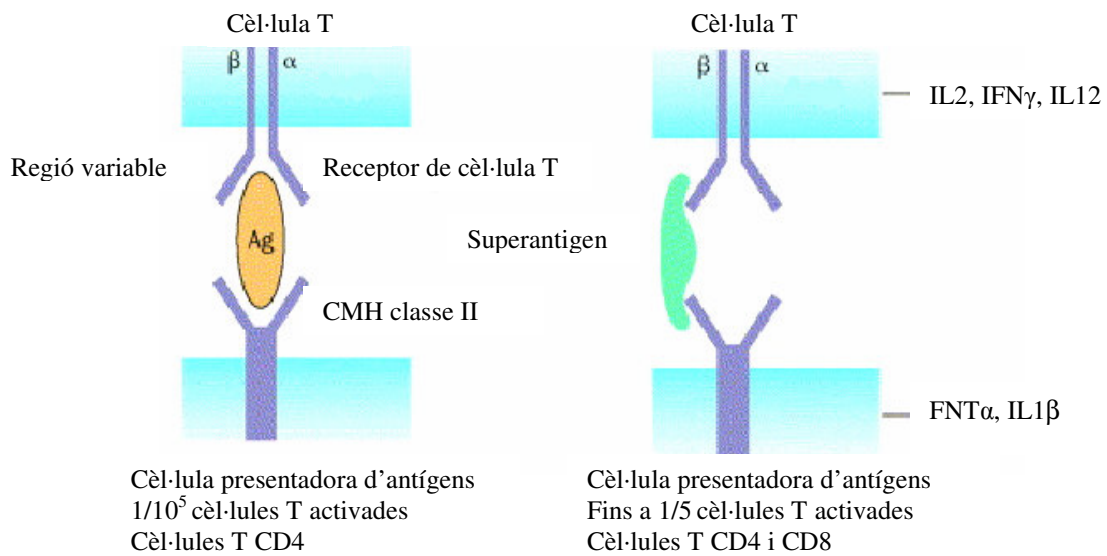


Figura 8. Model d'activació de les cèl·lules T pels antígens convencionals o pels superantígens. Els antígens convencionals son processats per les cèl·lules presentadores d'antígens en fragments peptídics que formen complexos amb molècules del CMH classe II i són dirigits a la superfície cel·lular per ser reconeguts per cèl·lules T que expressen un únic receptor $\alpha\beta$ específic d'un determinat CMH-antigen. Els superantígens no requereixen ser processats per les cèl·lules presentadores d'antígens i s'uneixen directament a la molècula del CMH classe II i al receptor del limfòcit T en la regió variable de la cadena β (regió V β). Adaptat de Llewelyn *et al*²¹².

Taula 7. Especificitat V β dels superantígens de *S. pyogenes*

Superantigen	Especificitat V β de TCR humà
SpeA	2.1, 12.2, 14.1, 15.1
SpeC	2.1, 3.2, 12.5, 15.1
SpeG	2.1, 4.1, 6.9, 9.1, 12.3
SpeH	2.1, 7.3, 9.1, 23.1
SpeI	6.9, 9.1, 18.1, 22
SpeJ	2.1
SpeL	1.1, 5.1, 23.1
SpeM	1.1, 5.1, 23.1
SSA	1.1, 3, 15
SmeZ	2.1, 4.1, 7.3, 8.1
SmeZ-2	4.1, 8.1

TCR, receptor de cèl·lules T. Obtingut de Proft *et al*²¹¹.

La magnitud de la resposta inflamatòria evocada pel mateix superantigen pot variar considerablement en diferents individus i s'ha trobat una correlació directa entre la intensitat en la producció de citocines i la gravetat de la infecció sistèmica²²⁶. En base a aquestes observacions s'ha suggerit que variacions individuals en factors immunogenètics encarregats de la regulació de les respostes als superantígens poden ser importants determinants en l'evolució de la infecció. En aquest sentit, en un estudi clínic realitzat per Kobt *et al.* s'ha observat que determinat haplotips/al·lels HLA de Classe II es relacionen amb un risc incrementat de SSTS i/o FN, mentre que altres resulten protectors²²⁷. Aquest mateix estudi també ha revelat que en individus amb haplotips protectius la producció de citocines en resposta als superantígens estreptocòccics és significativament més baixa que en individus amb haplotips neutrals o de risc, fet que ha estat també recentment recolzat *in vivo* en un model d'infecció en ratolí HLA-transgènic²²⁸.

1.3.2. Patogènesi de les seqüeles no supuratives

La relació entre la infecció per *S. pyogenes* específicament localitzada en les vies respiratòries altes i la subsegüent aparició de febre reumàtica aguda es troba àmpliament avalada per evidències clíniques i epidemiològiques⁶⁴. No obstant això, darrerament s'han mostrat evidències de que les infeccions cutànies poden tenir un paper en el desenvolupament de la malaltia en determinades poblacions com les comunitats aborígens d' Austràlia on la febre reumàtica aguda i l'impetigen són hiperendèmics, i la incidència de faringitis és molt baixa^{229,230}.

Encara que els mecanismes involucrats en la patogènesi de la febre reumàtica aguda i de la malaltia reumàtica cardíaca són desconeguts, existeixen evidències de que es produeixen com a resultat d'una resposta immune humoral i cel·lular anormal en un hoste susceptible. El model que es troba més àmpliament acceptat és el d'autoimmunitat originada pel mimetisme molecular entre antígens microbians i antígens de l'hoste, però les evidències són encara indirectes¹⁴⁷.

La proteïna M es considera un dels principals components involucrats en el mimetisme molecular degut a la seva similitud estructural i antigènica amb diverses proteïnes humanes com miosina, tropomiosina, vimentina, queratina i laminina, i a la

demostració de reactivitat immunològica creuada amb diversos teixits humans¹⁴⁷. La presència d'anticossos reactius contra el teixit cardíac i miosina, i la deposició d'aquests anticossos al miocardi i a teixits valvulars ha estat demostrada en pacients amb febre reumàtica¹⁴⁷. També hi ha evidències de que anticossos contra el teixit valvular cardíac reaccionen de forma creuada amb la N-acetilglucosamina del carbohidrat del grup A. Una resposta exagerada va ser demostrada en pacients amb febre reumàtica, i els títols es mantenen alts en pacients amb malaltia valvular mitral residual, proporcionant evidència addicional de que aquests anticossos causen dany valvular. Es incert si el dany inicial al teixit valvular es troba mediat per immunitat humoral o cel·lular, però el dany subsegüent sembla ser causat per la infiltració de cèl·lules T i macròfags²³¹.

El fet que només una limitada proporció d'individus exposats a *S. pyogenes* desenvolupin febre reumàtica aguda suggereix que la sensibilitat a la malaltia pot estar condicionada per factors immunogenètics. S'han trobat associacions amb determinats haplotips HLA de classe II, i amb l'expressió de l'antigen D8/17 de cèl·lules B però de forma variable en diferents poblacions¹⁴⁷.

El mecanisme precís pel qual s'origina la glomerulonefritis aguda postestreptocòccica tampoc ha estat clarament establert. El període de latència, la disminució sèrica del complement, i els efectes sobre el glomèrul renal suggereixen que en el desenvolupament de la malaltia intervenen processos immunològics. Han estat proposats diversos mecanismes que inclouen la deposició d'immunocomplexes al glomèrul renal, el mimetisme molecular entre antígens estreptocòccics i antígens glomerulars, l'alteració del teixit glomerular per productes estreptocòccics com proteases o estreptoquinasa, i l'activació directa del complement per components estreptocòccics dipositats als glomèruls¹⁴⁷.

La proteïna M s'ha considerat com a candidat en la patogènesi de la glomerulonefritis aguda degut a l'associació de la malaltia amb determinats serotips M i a la demostració en models animals de nefritis de la presència d'anticossos antiglomerulars que reaccionen de forma creuada amb la proteïna M²³². La producció d'estreptoquinasa s'ha mostrat essencial en el desenvolupament de la malaltia en un model animal, en el que s'ha evidenciat la deposició d'estreptoquinasa i complexos del complement en el glomèrul renal²³³. S'ha suggerit que la divergència en la seqüència de l'estreptoquinasa podria condicionar l'afinitat pel teixit glomerular, el que podria

explicar el fet de que només determinades soques puguin causar nefritis²³⁴. També s'ha postulat que SpeB pot intervenir en la patogènesi de la malaltia degut a la seva detecció en biòpsies renals en casos de glomerulonefritis i a l'observació de títols elevats d'anticossos contra SpeB en pacients afectats²³⁵.

1.4. Diagnòstic microbiològic

El diagnòstic microbiològic de les infeccions produïdes per *S. pyogenes* es centra en dos àmbits principals, el diagnòstic directe que permet la detecció del microorganisme en mostres clíniques mitjançant la utilització de tècniques de cultiu, detecció d'antigen i detecció d'àcids nucleics, i el diagnòstic indirecte basat en la detecció serològica d'anticossos produïts contra antigens estreptocòccics en resposta a la infecció.

1.4.1. Diagnòstic directe

1.4.1.1. Cultiu i identificació

S. pyogenes requereix medis enriquits per al seu creixement òptim, essent el medi d'agar sang el més utilitzat pel cultiu²⁵. Aquest medi permet detectar la reacció de β -hemòlisi al voltant de la colònia, de molta utilitat en la identificació presumptiva del microorganisme. Per tal de millorar la recuperació de *S. pyogenes* a partir de mostres faríngees, on la flora normal pot interferir amb el creixement del bacteri i amb la producció d'hemòlisi, s'ha proposat la utilització de medis selectius com agar sang suplementat amb antibiòtics (cotrimoxazole, àcid nalidíxic) i la incubació en anaerobiosi per tal d'afavorir la producció d'hemòlisi.

La identificació de *S. pyogenes* es basa en un conjunt de característiques morfològiques i bioquímiques que inclouen una mida de la colònia superior a 0,5 mm, la producció de l'enzim pirrolidonil arilamidasa (PYR), la sensibilitat a la bacitracina (0,04 U) i la presència de l'antigen del grup A de Lancefield²⁵. Ocasionalment s'han descrit soques de *S. pyogenes* no hemolítiques²¹⁰, i soques resistents a la bacitracina²³⁶⁻²³⁹. Encara que rarament, l'antigen del grup A també pot estar present en altres estreptococs β -hemolítics com *S. dysgalactiae* o estreptococs del grup anginosus.

Algunes espècies d'estreptococs β -hemolítics patògens d'animals que rarament s'aïllen d'infeccions en humans com *S. porcinus* i *S. iniae* també presenten un resultat positiu en la prova del PYR. *S. iniae* mostra a més una sensibilitat variable a la bacitracina, el que fa que alguns aïllats siguin fisiològicament similars a *S. pyogenes*. Cap de les dues espècies però, exhibeix reactivitat amb l'antisèrum del grup A de Lancefield. A la taula 8 s'assenyalen les principals característiques bioquímiques diferencials de *S. pyogenes* respecte altres estreptococs β -hemolítics.

Taula 8. Identificació dels estreptococs β -hemolítics

Espècie	Grup de Lancefield	BAC	PYR	CAMP	VP	HIP	ARG	ESC	STR	SBL	TRE	RIB
<i>S. pyogenes</i>	A	+	+	-	-	-	+	v	-	-	NA	-
<i>S. agalactiae</i>	B	-	-	+	-	+	+	-	-	-	NA	NA
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> ^a	C	-	-	-	-	-	+	v	-	v	+	+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	C, G, L, A	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	-	-	-	-	-	+	v	+	-	-	NA
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	-	-	-	-	-	+	v	+	+	v	NA
<i>S. canis</i>	G	-	-	+	-	-	+	+	-	-	v	NA
Grup anginosus	F, C, G, A, cap	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	NA
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V, cap	-	+	+	+	v	+	+	-	+	+	NA
<i>S. iniae</i>	Cap	v	+	+	-	-	-	+	+	-	NA	NA
<i>S. phocae</i>	C, F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
<i>S. didelphis</i>	Cap	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	NA

Abreviacions i símbols: BAC, sensibilitat a la bacitracina; PYR, pirrolidonil arilamidasa; CAMP, reacció de CAMP; VP, reacció de Voges-Proskauer; HIP, hidròlisi d'hipurat; ARG, desaminació d'arginina; ESC, hidròlisi d'esculina; STR, hidròlisi de midó, SBL, TRE, i RIB, fermentació de sorbitol, trealosa i ribosa, respectivament. +, Reacció positiva >95%; -, reacció negativa >95%; v, reacció variable (positiva del 6 al 94%); NA, no aplicable.

^a *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* no mostra β -hemólisis, però s'inclou en la taula per motius taxonòmics. Obtingut de Facklam²⁶.

1.4.1.2. Tests ràpids de detecció d'antigen

El diagnòstic clínic de la faringitis estreptocòccica és difícil degut a l'encavalcament de signes i símptomes amb la faringitis d'etiologia vírica, que per altra banda és l'etiologia més freqüent i no requereix tractament antimicrobià. Per aquest motiu i per tal de minimitzar l'ús inadequat d'antibiòtics, diversos comitès han publicat directrius que advoquen per la confirmació microbiològica del diagnòstic clínic mitjançant cultiu o amb la utilització de tècniques ràpides de detecció d'antigen²⁴⁰

El 1978 El Kholy *et al.* van publicar els resultats d'un estudi descrivint la identificació de *S. pyogenes* directament a partir del frotis faringoamigdal·lar en 30 minuts usant un procediment d'extracció de l'antigen del grup A i la subsegüent detecció amb una reacció immunològica de precipitació²⁴¹. Aquest estudi va tenir un profund impacte en el diagnòstic de la faringitis estreptocòccica i va significar l'inici de la introducció de kits comercials de detecció ràpida.

Al llarg del temps les metodologies emprades per a la detecció ràpida d'antigen s'han anat expandint i inclouen tècniques d'aglutinació amb partícules de làtex, ELISA i immunocromatografia, totes elles basades en la detecció de l'antigen del grup A^{242,243}. El rendiment d'aquestes tècniques depèn no només del mètode utilitzat sinó també del nombre d'estreptococs presents a la mostra. La sensibilitat de les proves ràpides de detecció d'antigen comercials varia entre el 62% i el 96% i l'especificitat és superior al 97% en comparació amb el cultiu que continua essent la tècnica de referència per a la detecció de *S. pyogenes* en mostres faríngees^{242,243}.

1.4.1.3. Detecció d'àcids nucleics

Recentment han estat descrites diverses tècniques genètiques per a la detecció de *S. pyogenes* directament a partir de mostres clíniques, en especial de mostres faríngees. Existeixen dos kits comercials disponibles que utilitzen tècniques d'hibridació sense amplificació (*Gen-Probe Group A Strep Direct Test*) o de PCR a temps real (*LightCycler Strep-A assay*). La sensibilitat de la tècnica d'hibridació varia del 88,6% al 94,8% i l'especificitat és superior al 97% en comparació amb el cultiu. En el cas de la PCR a temps real, la sensibilitat és del 93% i l'especificitat del 98%²⁴³. Una altra aproximació prometedora avaluada recentment, de la qual cal optimitzar el cost-

benefici, és la utilització de *microarrays* que permeten tant la identificació de *S. pyogenes* com la de marcadors genètics de resistència a macròlids²⁴⁴.

1.4.2. Diagnòstic indirecte

El diagnòstic serològic de la infecció estreptocòccica no presenta utilitat clínica en el maneig de la infecció aguda degut a que els títols sèrics d'anticossos no s'elevan fins a la convalescència, però resulta imperatiu en el diagnòstic de la febre reumàtica aguda i la glomerulonefritis aguda per tal de demostrar infecció recent.

El diagnòstic serològic es basa en la detecció de la resposta immune contra productes extracel·lulars incloent estreptolisina O, DNAsa B, hialuronidasa i estreptoquinasa, que indueixen fortes respostes immunes en l'hoste infectat^{147,201}. Els anticossos produïts contra aquests productes extracel·lulars assoleixen un pic a les 3 o 4 setmanes després de la infecció aguda i normalment es mantenen durant 2 o 3 mesos²⁰¹. El rang de valors normals de cada test és variable i depèn de l'edat del pacient, la localització geogràfica i l'estació de l'any.

La determinació del títol d'antiestreptolisina O (ASO) és la tècnica més estandarditzada i la més utilitzada per a la confirmació d'infecció estreptocòccica recent, encara que en alguns pacients amb febre reumàtica i especialment en casos de glomerulonefritis subsegüents a infeccions cutànies no sempre es produeixen fortes respostes ASO. En aquests casos la determinació del títol d'anticossos contra altres productes extracel·lulars com la DNAsa B incrementa el diagnòstic¹⁴⁷.

1.5. Tractament de les infeccions produïdes per *S. pyogenes*

La introducció de les sulfamides en els anys 1930 obrí l'era de la terapèutica antimicrobiana i va suposar el primer tractament efectiu de les infeccions estreptocòcciques. La demostració de l'efectivitat d'aquest agents en la prevenció de recurrències en pacients afectats de febre reumàtica va propiciar la seva utilització profilàctica massiva en personal militar durant la Segona Guerra Mundial on representaren un important benefici en el control de les infeccions estreptocòcciques. Poc temps després emergí la resistència a aquests agents en *S. pyogenes*²⁴⁵, situació que es va veure compensada amb l'adveniment de la penicil·lina, a la qual el

microorganisme continua mantenint-se uniformement sensible, no havent-se descrit fins a l'actualitat cap aïllat clínic resistent al món^{246,247}. Per aquest motiu i degut a la seva eficàcia en la prevenció de la febre reumàtica, seguretat, curt espectre i baix cost, la penicil·lina continua essent el tractament d'elecció de la major part d'infeccions produïdes pel microorganisme^{77,128}.

Els pacients al·lèrgics a penicil·lina requereixen una teràpia antimicrobiana alternativa i en aquests casos els macròlids constitueixen el tractament d'elecció⁷⁷. Inicialment, les tetraciclines van ser àmpliament utilitzades en el tractament d'infeccions estreptocòcciques, però la resistència en *S. pyogenes* emergí poc temps després de la seva introducció en la pràctica clínica²⁴⁸ i en l'actualitat no es consideren un tractament d'elecció degut a les elevades prevalences de resistència i a la disponibilitat d'altres alternatives terapèutiques. Per altra banda, el desenvolupament de resistència a macròlids en *S. pyogenes*, que pot comportar també resistència a lincosamides, ha sofert una evolució considerable fins a constituir un fenomen preocupant en molts països. El 1959 Lowbury i Hurst van descriure les primeres soques de *S. pyogenes* resistents a eritromicina aïllades en una unitat de cremats d'un hospital de Birmingham al Regne Unit²⁴⁹, i el 1968 es van publicar les següents comunicacions de l'aïllament esporàdic de soques resistents a eritromicina i lincomicina als Estats Units²⁵⁰ i Canadà²⁵¹. Un dels primers països en els que es descriu un ràpid i alarmant increment en la resistència a eritromicina en *S. pyogenes* va ser el Japó durant la dècada de 1970 on la resistència es va incrementar del 2% observat el 1971 fins al 62% el 1975²⁵². En altres països d'Europa i Amèrica del Nord la resistència en *S. pyogenes* era en aquell moment inusual²⁵³ i no va ser fins a la dècada del 1990 quan s'observa una important escalada en la freqüència de resistència en alguns països europeus com Finlàndia²⁵⁴, Itàlia^{255,256} i Espanya^{257,258}. Subsegüentment, la resistència a macròlids en *S. pyogenes* s'ha descrit en tot el món encara que amb notables variacions en diferents àrees geogràfiques tant en la freqüència com en els mecanismes de resistència implicats. Alguns autors han considerat la possible utilitat de fluoroquinolones com a teràpia de segona línia en el tractament d'infeccions en adults en casos d'al·lèrgia a β -lactàmics, especialment en zones on la resistència a macròlids i lincosamides és elevada²⁵⁹. La resistència a fluoroquinolones en *S. pyogenes* és en l'actualitat inusual i es limita a casos esporàdics descrits en àrees geogràfiques diverses²⁶⁰⁻²⁶⁴. No obstant, estudis recents

indiquen que la prevalença de soques de *S. pyogenes* amb sensibilitat disminuïda a fluoroquinolones pot ser més elevada del que s'havia contemplat prèviament, havent-se descrit freqüències del 3,5% a Espanya²⁶⁵ i del 5,4% a Bèlgica²⁶⁶.

Malgrat la universal sensibilitat *in vitro* de *S. pyogenes* a la penicil·lina, s'han aportat evidències de la seva baixa eficàcia en l'eradicació del microorganisme del tracte respiratori superior tant de portadors²⁶⁷ com de pacients amb faringoamigdalitis on els fracassos en l'eradicació poden arribar al 35%²⁶⁸. S'han ofert diverses possibles explicacions d'aquest fet que inclouen la producció de β -lactamases per microorganismes presents en la flora faríngia, poca adherència del pacient a la medicació, la internalització del bacteri a cèl·lules epitelials on els antibiòtics β -lactàmics no assoleixen concentracions terapèutiques, i la tolerància fenotípica, encara que la significació d'aquest últim fenomen és controvertida²⁶⁹. Altres règims avaluats que s'han mostrat eficaços en el tractament de la faringitis estreptocòccica inclouen l'amoxicil·lina i els tractaments curts (5 dies o menys) amb macròlids (claritromicina, azitromicina) o amb cefalosporines orals (cefuroxima, cefixima, ceftibutè, cefnidir, cefpodoxima)²⁷⁰. No obstant això, aquests agents presenten un major espectre antimicrobià respecte a la penicil·lina amb els potencials efectes ecològics en la flora normal i en el desenvolupament de resistències.

Si bé les formes més lleus d'infecció cutània poden ser controlades adequadament amb teràpia antimicrobiana, en infeccions greus com FN, miositis i STTS resulta imperatiu un reconeixement temprà del quadre clínic i sovint és necessari el desbridament quirúrgic i mesures de suport complementaries¹⁰⁷. En aquests casos el tractament únicament amb penicil·lina no es considera efectiu i es recomana la inclusió de clindamicina en el règim terapèutic¹²⁰. La ineficàcia de la penicil·lina en aquests tipus d'infeccions s'ha atribuït a l'efecte índex produït per una elevada concentració de microorganismes que assoleixen ràpidament la fase estacionària durant la qual disminueix l'expressió de proteïnes d'unió a penicil·lina (PBPs)²⁷¹. La utilitat de la clindamicina ha estat demostrada en models animals de miositis estreptocòccica²⁷² i, encara que no s'han realitzat assaigs clínics randomitzats, la combinació de clindamicina amb un β -lactàmic s'ha mostrat superior a la monoteràpia amb un β -lactàmic en un estudi retrospectiu d'infecció invasiva en humans²⁷³. La clindamicina és un inhibidor de la síntesi proteica i la seva eficàcia s'atribueix a la seva capacitat de

suprimir tant la producció de toxines bacterianes i de proteïna M com de citocines per monòcits humans¹²⁰. Addicionalment, degut a la implicació dels superantígens en les manifestacions de la SSTS i la FN, s'ha proposat l'ús d'immunoglobulines intravenoses (IGIV) com a teràpia adjuntiva en infeccions greus degut a la seva capacitat de neutralitzar una àmplia varietat de superantígens i de facilitar l'opsonització del microorganisme^{274,275}. L'eficàcia de les IGIV ha estat descrita en diversos casos clínics així com en un estudi observacional on es va trobar una reducció significativa en la mortalitat dels pacients tractats amb IGIV respecte dels controls²⁷⁶. Un assaig clínic multicèntric europeu a doble cec ha proporcionat evidència addicional de l'eficàcia de la teràpia adjuntiva amb IGIV en pacients amb SSTS²⁷⁷. Encara que l'estudi es va acabar prematurament degut al baix nombre de pacients i no es van obtenir diferències significatives, els resultats van mostrar una tendència cap a la reducció de la mortalitat en pacients tractats amb IGIV respecte dels controls (10% *versus* 36%).

1.6. Prevenció

1.6.1. Quimioprofilaxi

En l'actualitat només existeixen guies consensuades per a la prevenció primària i secundària de la febre reumàtica¹²⁸. L'anomenada prevenció primària consisteix en el tractament antibiòtic de la faringitis simptomàtica. La prevenció secundària consisteix en l'administració de profilaxi antibiòtica continuada als pacients amb un episodi previ de febre reumàtica o de malaltia reumàtica cardíaca per tal d'evitar la infecció del tracte respiratori superior i el desenvolupament d'atacs subsegüents de febre reumàtica. El regim antibiòtic més acceptat per a la prevenció secundària de la febre reumàtica consisteix en l'administració cada 3 o 4 setmanes de penicil·lina G benzatina o bé de penicil·lina oral en zones amb baixa incidència de febre reumàtica. L'eritromicina es considera un tractament alternatiu en els pacients al·lèrgics a la penicil·lina. La duració òptima de la profilaxi secundària varia en funció del risc de recurrències de febre reumàtica (disminueix amb l'edat i amb els anys transcorreguts des de l'atac més recent) i es correlaciona de manera directa amb la quantitat d'atacs previs i amb la presència i gravetat de la malaltia cardíaca preexistent¹²⁸.

En el cas de la prevenció de la infecció invasiva, l'administració de quimioprofilaxi als contactes d'un cas amb infecció invasiva és un tema controvertit²⁷⁸. La controvèrsia deriva de les limitades evidències de l'eficàcia de la quimioprofilaxi i del regim antibiòtic més adequat. A més, si bé s'han descrit brots d'infecció invasiva en comunitats tancades com famílies, centres sociosanitaris i hospitals, la gran majoria de casos d'infecció invasiva són esporàdics i adquirits en la comunitat, i del 4 al 13% són nosocomials²⁷⁸⁻²⁸⁴.

El CDC ha formulat recomanacions per a la prevenció d'infeccions invasives entre contactes familiars de pacients amb infecció invasiva i per al control d'infeccions d'adquisició nosocomial²⁸⁵. Les recomanacions per a la prevenció de la infecció invasiva adquirida en la comunitat es basen en dos únics estudis poblacionals publicats en els que s'ha avaluat el risc d'infecció invasiva entre contactes propers. En un estudi realitzat a Ontàrio (Canadà) es van identificar 4 casos d'infecció invasiva entre 1.362 contactes, el que representa una taxa de 294 casos per 100.000 contactes (IC 95% 80-750/100.000)¹⁵. En l'altre estudi portat a terme en diverses àrees dels Estats Units es va identificar un cas confirmat i un cas probable (quadre clínic compatible amb infecció invasiva per *S. pyogenes* amb cultiu negatiu) entre 1.540 contactes, situant una taxa de 66,1 casos per 100.000 contactes (IC 95% 2-367/100.000) o de 132 casos per 100.000 contactes (IC 95% 16-476/100.000) si s'inclou el cas probable²⁸⁶. D'aquests estudis es deriva que la infecció invasiva secundària entre contactes propers és poc freqüent, malgrat representar un risc relatiu entre 19 i 200 vegades superior al risc basal en la comunitat. En base a aquests resultats, el CDC recomana oferir quimioprofilaxi únicament als contactes que presentin factors de risc associats amb el desenvolupament d'infecció invasiva (edat avançada, immunosupressió, diabetis, etc.). En el cas de que s'hagi d'administrar profilaxi, el règim antimicrobià proposat pel CDC es basa en els resultats d'estudis sobre l'eradicació dels portadors faringis de *S. pyogenes* i inclou l'administració de penicil·lina G benzatina més rifampicina, o clindamicina o azitromicina.

Per a la prevenció d'infecció invasiva d'adquisició nosocomial les recomanacions formulades pel CDC inclouen la recerca del personal sanitari colonitzat i el tractament antibiòtic, en especial si es produeixen dos o més casos d'infecció invasiva causats per la mateixa soca en un període inferior a 6 mesos²⁸⁵.

1.6.2. Vacunes

En els últims anys s'ha progressat considerablement en la identificació de candidats per a ser utilitzats en la formulació de vacunes, que es troben en diferents estadis de desenvolupament i avaluació²⁸⁷. Els principals avenços s'han produït amb la utilització de porcions peptídiques de la proteïna M, excloent sistemàticament els epítops que evocuen reaccions immunològiques creuades contra teixits humans. Una aproximació que té l'avantatge de cobrir múltiples serotips es basa en la utilització de porcions peptídiques conservades de la porció carboxi-terminal, que en models animals s'ha demostrat que indueixen la producció d'anticossos en superfícies mucoses i prevenen la colonització de soques de múltiples serotips. Atès que la porció amino-terminal serotip específica origina la producció d'anticossos opsonics que confereixen protecció, una altra aproximació és la construcció de vacunes multivalents que continguin seqüències amino-terminals corresponents als serotips més prevalents. S'han construït versions inicials amb un baix nombre de serotips representats com és el cas d'una vacuna hexavalent avaluada en adults²⁸⁸, i recentment s'han publicat els resultats de l'avaluació en adults d'una vacuna 26-valent (StreptAvax, ID Biomedical) formulada en base als serotips més comuns als Estats Units en casos de faringitis, infeccions invasives i als considerats actual o històricament "reumatogènics"^{167,289}. Aquests estudis han demostrat que les vacunes són ben tolerades, altament immunògenes i no indueixen anticossos reactius contra teixits humans. Un potencial obstacle a l'ús de vacunes multivalents és l'elevat nombre de tipus *emm* descrits i la variada prevalença temporal i geogràfica. A diferència d'Amèrica del Nord i altres països industrialitzats, la cobertura de la vacuna pot ser menys efectiva en països menys desenvolupats on predominen serotips M diferents²⁹⁰⁻²⁹². A més, a l'igual que amb altres vacunes serotip específiques, la implementació d'un programa de vacunació pot comportar el reemplaçament dels serotips vacunals per altres no inclosos a la vacuna o l'emergència de nous tipus *emm*.

1.7. Mecanismes de resistència als antimicrobians

1.7.1. Macròlids, lincosamides i estreptogramines

Els macròlids van ser introduïts en clínica en la dècada de 1950 amb l'eritromicina A, obtinguda el 1952 a partir de *Streptomyces erythreus*, com a primer representant d'aquesta família. Posteriorment es van anar introduint altres compostos naturals i diversos derivats semisintètics amb millor activitat i perfil farmacocinètic, malgrat no representar una millora substancial en l'activitat antibacteriana respecte a l'eritromicina^{293,294}. El coneixement dels mecanismes moleculars de resistència a macròlids ha permès el desenvolupament d'una nova família de derivats, els cetòlids, representats per la telitromicina com a primer membre del grup d'ús clínic amb activitat contra organismes amb determinats tipus de resistència a macròlids^{293,294}.

Estructuralment, els macròlids d'ús clínic estan constituïts per un anell lactònic (macrolactona) unit a dos o més sucres neutres o bàsics. Es diferencien en funció del nombre d'àtoms de carboni (14, 15 o 16) i dels radicals de l'anell lactona (Taula 9). L'eritromicina pertany al grup de macròlids de 14 àtoms i es caracteritza per ser inestable al medi àcid de l'estómac el que provoca que la seva biodisponibilitat sigui escassa i imprevisible. Modificacions específiques en els grups químics que participen en la seva degradació (grup hidroxil en posició C6, oxigen en posició C9 i hidrogen en posició C8) han donat lloc a diversos derivats semisintètics més estables en medi àcid, amb millor absorció per via oral i vida mitja més perllongada. Així, entre els derivats semisintètics de 14 àtoms, la roxitromicina presenta un radical etiloxima en posició C9 mentre que la claritromicina conté un grup metoxi en posició C6. L'azitromicina és el representat tipus dels macròlids de 15 àtoms, també anomenats azalides, i es caracteritza per presentar una substitució en posició C9 formada per un grup metil amb un àtom de nitrogen. Els macròlids de 16 àtoms, que inclouen l'espíramicina, la josamicina i la midecamicina com a productes naturals, i la rokitamicina i la miocamicina com a derivats semisintètics, són intrínsecament estables en medi àcid.

Els cetòlids són derivats semisintètics de macròlids de 14 àtoms en els que el sucre neutre cladinósina en posició 3 es troba reemplaçat per un grup cetònic. La telitromicina presenta a més un grup metoxi en posició C6 que incrementa la seva

biodisponibilitat i un grup carbamat en les posicions C11-C12 responsable de la seva major afinitat pel ribosoma i millor activitat respecte als macròlids.

Taula 9. Classificació dels macròlids en funció del nombre d'àtoms de C de l'anell lactona

14 àtoms		15 àtoms	16 àtoms	
Naturals	Semisintètics	Semisintètics	Naturals	Semisintètics
Eritromicina	Claritromicina	Azitromicina	Espiramicina	Rokitamicina
Oleandomicina	Roxitromicina		Josamicina	Miocamicina
Esporeamicina	Diritromicina		Midecamicina	
	Fluritromicina		Tilosina	

Les lincosamides són un grup d'antimicrobians derivats de *Streptomyces lincolnensis*, amb propietats biològiques semblants a les dels macròlids, però amb diferent estructura química²⁹⁵. L'any 1962, es va obtenir el primer compost de la família, la lincomicina. Modificacions posteriors de la seva estructura van donar lloc a nous derivats, entre els quals la clindamicina és el més utilitzat actualment en clínica. L'estructura bàsica de les lincosamides consisteix en un aminoàcid unit a un aminosucre.

Les estreptogramines inclouen compostos naturals i derivats semisintètics i es classifiquen en els grups A i B en funció de la seva estructura²⁹⁶. Les estreptogramines del grup A són macrolactones i les del grup B són polipèptids cíclics. Els compostos naturals, entre els que es troben, en el grup A, la pristinamicina II_A i la pristinamicina II_B, i en el grup B, la pristinamicina I_A i la virginiamicina S₁, procedeixen de diverses espècies de *Streptomyces*. Entre els compostos semisintètics es troba l'associació quinupristina-dalfopristina que deriva de la pristinamicina I_A i de la pristinamicina II_B, respectivament. Una de les principals característiques d'aquests compostos és la seva capacitat d'actuar sinèrgicament.

Els macròlids, les lincosamides i les estreptogramines (MLS) presenten estructura química diferent però comparteixen el mateix mecanisme d'acció que consisteix en la inhibició de la síntesi proteica. S'uneixen reversiblement a la subunitat 50S del ribosoma bacterià on actuen bloquejant directament la funció del centre de la peptidiltransferasa, o en el cas de l'eritromicina i els seus derivats el canal de sortida de

la cadena peptídica naixent^{294,297}. Addicionalment, els macròlids interfereixen en la formació de subunitats ribosòmiques 50S. Els llocs d'unió dels macròlids es localitzen en el domini V de l'ARNr 23S (especialment en els nucleòtids A2058 i A2059) i probablement es superposen als de les lincosamides i estreptogramines de tipus B. La telitromicina presenta un lloc d'unió addicional en el domini II (residu A752) de l'ARNr 23S a través del radical carbamat de la posició C11-C12 el que incrementa la seva afinitat pel ribosoma.

Han estat descrits quatre mecanismes principals pels quals els microorganismes adquireixen resistència a antibiòtics del grup MLS que inclouen la modificació de la diana per l'acció de metilases, l'expulsió activa de l'antibiòtic (bombes d'expulsió), la modificació de la diana per mutacions en l'ARNr 23S o en proteïnes ribosòmiques, i la inactivació enzimàtica de l'antibiòtic^{297,298}. Amb l'excepció de la inactivació enzimàtica, tots aquests mecanismes han estat descrits en *S. pyogenes*, essent la modificació de la diana per l'acció de metilases i l'expulsió activa els de major impacte clínic.

1.7.1.1. Modificació de la diana per l'acció de metilases

La modificació ribosòmica per metilació va ser el primer mecanisme de resistència a eritromicina en ser elucidat i va romandre com l'únic mecanisme conegut durant dècades. Està originat per l'acció de metilases que monometilen o dimetilen un residu d'adenina (A2058) del domini V de l'ARNr 23S²⁹⁹. La metilació provoca un canvi conformacional al ribosoma que redueix la unió de l'antibiòtic a la subunitat 50S. Aquest mecanisme confereix resistència creuada a macròlids de 14, 15 i 16 àtoms, lincosamides i estreptogramines del grup B, donant lloc a l'anomenat fenotip de resistència MLS_B. No afecta les estreptogramines del tipus A, i es manté la sinèrgia entre estreptogramines del tipus A i B.

Aquestes metilases estan codificades per gens *erm* (*erythromycin resistance methylase*) que han estat identificats en una àmplia varietat de gèneres bacterians filogenèticament diversos i la major part es troben associats a transposons conjugatius o no conjugatius i a plasmidis³⁰⁰ (<http://faculty.washington.edu/marylinr>) (Taula 10). L'homologia en les seqüències aminoacídiques de les metilases suggereix que els gens *erm* deriven d'un ancestre comú, probablement d'un microorganisme productor

d'antibiòtics. Davant el gran nombre de gens *erm* descrits, Roberts *et al.* van proposar un nou sistema de nomenclatura per tal d'evitar la complexitat en la designació³⁰⁰. Segons aquesta nova classificació, els gens *erm* amb una homologia en la seqüència aminoacídica deduïda superior o igual al 80% es designen amb la mateixa lletra i s'inclouen en la mateixa classe, mentre que els que presenten una homologia inferior al 80% es designen amb lletres diferents.

Inicialment tant en *S. pyogenes* com en altres estreptococs la resistència a antibiòtics MLS_B va ser atribuïda a l'adquisició de determinants *erm*(AM), actualment denominats *erm*(B). En estreptococs el gen *erm*(B) es troba associat amb freqüència a transposons conjugatius de la família Tn916-Tn1545 que transporten gens de resistència a tetraciclina (*tet*(M)) i/o aminoglucòsids (*aph*(3')-III)³⁰¹. Aquests elements contribueixen a la disseminació de multiresistència amb la integració en altres transposons conjugatius com Tn5252 i Tn3872 que codifiquen gens de resistència addicionals com el gen *cat*_{pC194} de resistència a cloramfenicol. En *S. pyogenes* el gen *erm*(B) s'ha identificat en una àmplia diversitat de transposons incloent Tn917, Tn1116 (un element compost format per la integració d'un fragment de DNA que conté el gen *erm*(B) en el del transposó defectiu Tn5397), Tn3872 (un element compost format per la inserció del transposó Tn917 en Tn916) i el nou element Tn6002³⁰².

El 1998 es va identificar un nou gen *erm* en soques de *S. pyogenes* amb fenotip de resistència MLS_B induïble anomenat *erm*(TR)³⁰³. Aquest gen presenta una homologia del 82,5% amb el gen *erm*(A) de *Staphylococcus aureus* i es va incloure subsegüentment en la classe de gens *erm*(A)³⁰⁰, encara que alguns autors mantenen la designació original. El gen *erm*(TR) s'ha descrit principalment en estreptococs β-hemolítics, és infreqüent en *S. pneumoniae*, havent-se identificat també en espècies del gènere *Peptostreptococcus*³⁰⁴. Arrel dels projectes de seqüenciació genòmica, l'element genètic que transporta el gen *erm*(TR) ha estat caracteritzat en la soca de *S. pyogenes* MGAS10750 i s'ha observat que presenta característiques de transposó i profag remanent⁹⁴. Un element genètic similar portador del gen *erm*(TR) ha estat descrit recentment en una soca de *S. pneumoniae*³⁰⁵.

Taula 10. Gens *erm* relacionats amb la resistència a macròlids ^a

Nomenclatura actual del gen	Gens inclosos	Gèneres bacterians
<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (A), <i>erm</i> (TR)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (AM), <i>erm</i> (AMR), <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (BC), <i>erm</i> (BP), <i>erm</i> (BZ1), <i>erm</i> (BZ2), <i>erm</i> (IP), <i>erm</i> (P), <i>erm</i> (Z), <i>erm</i> , <i>erm</i> (2)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rothia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Treponema</i> , <i>Wolinella</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C), <i>erm</i> (IM), <i>erm</i> (M)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Wolinella</i>
<i>erm</i> (D)	<i>erm</i> (D), <i>erm</i> (J), <i>erm</i> (K)	<i>Bacillus</i> , <i>Salmonella</i>
<i>erm</i> (E)	<i>erm</i> (E), <i>erm</i> (E2)	<i>Bacteriodes</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (F)	<i>erm</i> (F), <i>erm</i> (FS), <i>erm</i> (FU)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Shigella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Treponema</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Wolinella</i>
<i>erm</i> (G)	<i>erm</i> (G)	<i>Bacillus</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Catenibacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Staphylococcus</i>
<i>erm</i> (H)	<i>car</i> (B)	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (I)	<i>mdm</i> (A)	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (N)	<i>tlr</i> (D)	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (O)	<i>lm</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (Q)	<i>erm</i> (Q)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Wolinella</i>
<i>erm</i> (R)	<i>erm</i> (R)	<i>Arthrobacter</i>
<i>erm</i> (S)	<i>erm</i> (SF), <i>tlr</i> (A)	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (T)	<i>erm</i> (GT)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>
<i>erm</i> (U)	<i>lmr</i> (B)	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (V)	<i>erm</i> (SV)	<i>Eubacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (W)	<i>myr</i> (B)	<i>Micromonospora</i>
<i>erm</i> (X)	<i>erm</i> (CD), <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (CX)	<i>Arcanobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Propionibacterium</i>
<i>erm</i> (Y)	<i>erm</i> (GM)	<i>Staphylococcus</i>
<i>erm</i> (Z)	<i>srm</i> (D)	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (30)	<i>pikR1</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (31)	<i>pikR2</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (32)	<i>tlr</i> (B)	<i>Streptomyces</i>
<i>erm</i> (33) ^b		<i>Staphylococcus</i>
<i>erm</i> (34)		<i>Bacillus</i>
<i>erm</i> (35)		<i>Bacteriodes</i>
<i>erm</i> (36)	<i>erm</i> (MT)	<i>Micrococcus</i>
<i>erm</i> (37) ^c		<i>Mycobacterium</i>
<i>erm</i> (38) ^d		<i>Mycobacterium</i>
<i>erm</i> (39) ^d		<i>Mycobacterium</i>
<i>erm</i> (40) ^d		<i>Mycobacterium</i>

^aClassificació d'acord a la nomenclatura de Roberts *et al.*³⁰⁰ i a l'actualització publicada a <http://faculty.washington.edu/marylinr>. ^bHíbrid entre *erm*(A) i *erm*(C). ^cMetilasa cromosòmica natural de *Mycobacterium tuberculosis*. ^dMetilasa cromosòmica natural de *Mycobacterium* sp.

L'expressió dels gens *erm* pot ser de caràcter constitutiu o induïble, i ambdós tipus d'expressió es poden detectar fenotípicament mitjançant un test de doble difusió utilitzant un disc d'eritromicina situat proper a un disc de clindamicina³⁰⁶. La producció constitutiva de la metilasa confereix un fenotip de resistència creuada a tots els macròlids, lincosamides i estreptogramines del tipus B. En el cas de l'expressió induïble, les soques mostren resistència a macròlids de 14 i 15 àtoms, mentre que els macròlids de 16 àtoms, les lincosamides i les estreptogramines B romanen actives. Si bé aquest comportament és evident en estafilococs, l'expressió induïble dels gens *erm* en estreptococs pot donar lloc a una major diversitat de fenotips³⁰⁷. S'ha observat que molts membres del grup MLS_B, incloent clindamicina i macròlids de 16 àtoms són inductors a diferents graus de l'expressió de la metilasa codificada per *erm(B)*³⁰⁸ i que en *S. pneumoniae* el fenotip caracteritzat per resistència creuada i d'alt nivell a antibiòtics MLS_B és freqüentment induïble³⁰⁹.

L'especificitat de la inducció depèn de forma crítica de la seqüència del domini regulador o seqüència líder que precedeix al gen estructural *erm* i també es troba influenciada per l'estructura química de l'antibiòtic. El mecanisme molecular de la inducció ha estat estudiat extensivament en el determinant *erm(C)* d'estafilococs i s'explica d'acord a un model d'atenuació de la traducció, que probablement també tingui lloc en el cas dels determinants de les classes *erm(B)* i *erm(A)*³¹⁰. Segons aquest model, es sintetitza l'ARNm però en una conformació inactiva que esdevé activa només en presència de macròlids inductors. La inactivitat de l'ARNm es deu a l'estructura del seu extrem 5', que conté una sèrie de seqüències invertides repetides que s'associen en virtut de la seva complementarietat donant lloc a bucles on queden segregades les seqüències d'iniciació de la metilasa (lloc d'unió al ribosoma i codó d'iniciació), quedant per tant inaccessible al ribosoma. En presència d'eritromicina o d'un altre antibiòtic inductor, la unió de l'antibiòtic al ribosoma fa que aquest s'aturi durant la traducció del pèptid líder el que indueix reordenacions conformacionals en l'ARNm que deixen accessibles les seqüències d'iniciació de la metilasa i permeten la seva síntesi.

La regió reguladora de gens de les classes *erm(A)*, *erm(B)* i *erm(C)* ha estat estudiada en diversos grups bacterians, havent-se observat tant en soques clíniques com en mutants de laboratori seleccionats amb antibiòtics no inductors que deleccions, insercions i mutacions puntuals en aquesta regió donen lloc a l'expressió constitutiva de

les metilases³⁰⁹⁻³¹⁴. Així per exemple, Fines *et al.* a partir d'una soca clínica de *S. pyogenes* portadora del gen *erm*(TR) que expressava inicialment resistència induïble van obtenir mutants resistents constitutius a freqüències de 10^{-7} mitjançant la selecció *in vitro* amb clindamicina. La resistència a clindamicina es va associar a deleccions de 163 i 6 pb i a una duplicació en tàndem de 101 pb en la seqüència reguladora del gen *erm*(TR)³¹¹. En *S. aureus* s'han aportat evidències clíniques de fracassos terapèutics amb la utilització de clindamicina en el tractament d'infeccions produïdes per soques amb resistència MLS_B induïble, fet que ha plantejat dubtes sobre la seguretat de l'ús de clindamicina o altres antibiòtics MLS no inductors en el maneig d'infeccions produïdes per soques amb aquest tipus de resistència³¹⁵. En estreptococs, encara que no s'ha documentat fracassos terapèutics, existeix una controvèrsia similar respecte a l'activitat de clindamicina contra soques sensibles a aquest antibiòtic però amb un fenotip de resistència MLS_B induïble.

1.7.1.2. Expulsió activa

Un altre dels principals mecanismes de resistència adquirida a macròlids en organismes grampositius és l'expulsió activa de l'antibiòtic que està originada per la producció de dos tipus de bombes, les formades per membres de la família de transportadors d'unió a ATP (ABC) i les de la superfamília de facilitació major (MFS). En *Staphylococcus* la resistència a macròlids per expulsió activa va ser inicialment identificada en *Staphylococcus epidermidis* i ve determinada pel gen *msr*(A) (*macrolide streptogramin resistance*) que codifica una proteïna característica dels transportadors ABC amb activitat específica sobre macròlids de 14 i 15 àtoms i estreptogramines B (fenotip MS_B)³¹⁶.

En *Streptococcus* la resistència a macròlids per expulsió activa està determinada principalment per l'expressió de gens *mef* (*macrolide efflux*) que codifiquen proteïnes pertanyents a la família de transportadors MFS. Confereixen resistència a macròlids de 14 i 15 àtoms, patró de resistència designat com fenotip M³¹⁷. Han estat descrites dues variants principals de gens *mef*, el gen *mef*(A) originalment identificat en *S. pyogenes*³¹⁸ i el gen *mef*(E) identificat posteriorment en *S. pneumoniae*³¹⁹. Darrerament s'han identificat les variants al·lèliques *mef*(O) en *S. pyogenes*³²⁰, *mef*(I) en *S. pneumoniae*³²¹ i altres variants en *S. agalactiae*³²² i en estreptococs β -hemolítics del grup G³²³. Els gens

mef s'han assignat a una única classe de gens *mef*(A) en base a una homologia en la seqüència aminoacídica superior o igual al 80%³⁰⁰, encara que alguns autors recomanen mantenir la distinció inicial entre *mef*(A) i *mef*(E) degut a importants diferències en els elements mòbils als que es troben associats i en la seva distribució³²⁴. El gen *mef*(A) és el predominant en *S. pyogenes*, mentre que en *S. pneumoniae* i estreptococs del grup viridans el gen *mef*(E) es troba amb major freqüència. En *S. pneumoniae* el gen *mef*(E) forma part d'un element d'inserció genètica anomenat mega (*macrolide efflux genetic assembly*)³²⁵, mentre que el gen *mef*(A) s'ha descrit en el transposó Tn1207.1³²⁶. En *S. pyogenes* el gen *mef*(A) s'ha identificat en elements quimèrics amb característiques de transposó i profag que inclouen dos elements relacionats formats per la inserció de Tn1207.1 en un profag en el cromosoma^{327,328}, i un tercer element en el que el gen *mef*(A) es troba associat al determinant de resistència a tetraciclina *tet*(O) que conté diverses variants defectives del transposó Tn1207.1 i sembla estar inserit en un profag diferent³²⁹. Els elements genètics que transporten els gens *mef*(A/E) contenen a més el gen *msr*(D), homòleg al *msr*(A) d'estafilococs, que contribueix a la resistència independentment dels gens *mef* i afecta també lleugerament l'activitat de telitromicina³³⁰. Addicionalment, en soques de *S. pyogenes* amb mecanisme de resistència MLS_B induïble s'ha detectat la presència d'un sistema d'expulsió no caracteritzat diferent de *mef*(A/E) i *msr*(A/D) que afecta a macròlids de 14, 15 i 16 àtoms i en menor proporció a cetòlids³³¹.

La resistència a lincosamides per mecanisme d'expulsió s'ha descrit principalment en *Enterococcus faecalis* i està determinada per l'expressió del gen cromosòmic *lsa*, responsable de la característica resistència intrínseca d'aquest microorganisme a lincosamides i estreptogramines A^{332,333}. Un determinant anàleg anomenat *lsa*(B) que confereix baix nivell de resistència a clindamicina ha estat identificat en un plasmidi en *Staphylococcus sciuri*³³⁴.

Addicionalment, s'han descrit determinants de resistència a estreptogramines A per mecanisme d'expulsió associats a elements genètics mòbils en *Staphylococcus* que inclouen els gens *vga*(A), *vga*(A)V i *vga*(B). Un estudi recent ha confirmat que *vga*(A) i *vga*(A)V també confereixen baix nivell de resistència a lincosamides en *S. aureus* i *S. epidermididis* i s'ha suggerit que els fenotip LS_A trobat ocasionalment en estafilococs pot ser degut aquests elements³³⁵.

A la taula 11 es mostren els principals determinants de resistència a antibiòtics del grup MLS relacionats amb sistemes d'expulsió activa i la seva distribució.

Taula 11. Gens relacionats amb sistemes d'expulsió que confereixen resistència a macròlids, lincosamides i estreptogramines ^a

Nomenclatura actual del gen	Fenotip	Microorganismes
Transportadors ABC		
<i>msr(A)</i>	MS _B	<i>Corynebacterium, Enterobacter, Enterococcus, Gemella, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus</i>
<i>msr(C)</i>	MS _B	<i>Enterococcus</i>
<i>msr(D)</i>	M(K)	<i>Acinetobacter, Bacteroides, Corynebacterium, Enterococcus, Neisseria, Pseudomonas, Ralstonia, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Streptococcus, Enterobacteriaceae</i>
<i>lsa(A)</i>	LS _A	<i>Enterococcus</i>
<i>lsa(B)</i>	L	<i>Staphylococcus</i>
<i>ole(B), ole(C)</i>	M	<i>Streptomyces</i>
<i>srn(B)</i>	M	<i>Streptomyces</i>
<i>tlr(C)</i>	M	<i>Streptomyces</i>
<i>vga(A), vga(B)</i>	S _A (L)	<i>Staphylococcus</i>
Transportadors MFS		
<i>mef(A)</i>	M	<i>Acinetobacter, Bacteroides, Corynebacterium, Enterococcus, Fusobacterium, Gemella, Lactobacillus, Micrococcus, Neisseria, Pseudomonas, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Streptococcus, Enterobacteriaceae</i>
<i>lmr(A)</i>		<i>Streptomyces</i>

^aClassificació d'acord a la nomenclatura de Roberts *et al.*³⁰⁰ i a l'actualització publicada a <http://faculty.washington.edu/marylinr/>.

1.7.1.3. Modificacions en la diana per mutacions en l'ARNr 23S o en proteïnes ribosòmiques

La resistència a macròlids es pot produir també com a conseqüència de mutacions que afecten la conformació de la regió crítica d'unió d'aquests antibiòtics. Aquestes mutacions es localitzen en els dominis V i II de l'ARNr 23S i en les proteïnes ribosòmiques L4 i L22³³⁶. La importància clínica de les mutacions en l'ARNr 23S en la resistència a macròlids ha estat llargament reconeguda en patògens que presenten un o dos operons d'ARNr (*rrn*) com *Helicobacter*, *Mycoplasma* i *Mycobacterium*. En microorganismes amb múltiples operons *rrn* com *S. pyogenes* i *S. pneumoniae* aquest mecanisme de resistència és infreqüent ja que es requereixen mutacions en varies còpies del *rrn* per evidenciar resistència. Les mutacions identificades en aquestes espècies són similars a les prèviament descrites en altres microorganismes i afecten principalment als residus A2058 i A2059 del domini V de l'ARNr, si bé en *S. pneumoniae* s'han descrit

mutacions en altres posicions que inclouen A2166, A2610, A2611 i A752, aquesta darrera localitzada en el domini II^{307,337-340}. El fenotip de resistència conferit per mutacions en l'ARNr 23S varia no només en funció del nombre de còpies de *rrn* mutades sinó també amb la natura de la substitució. Les mutacions A2058G i A2058U confereixen els nivells més alts de resistència a macròlids, lincosamides i estreptogramines B, i poden afectar també a telitromicina.

Mutacions en les proteïnes ribosòmiques L4 i L22 han estat també recentment associades amb la resistència a macròlids en *S. pyogenes*³⁴¹, *S. pneumoniae*^{307,339}, i *S. aureus*³⁴², demostrant-se en alguns casos la selecció d'aquests mutants després de la teràpia amb macròlids.

1.7.2. Tetraciclines

Els primers membres de la família de les tetraciclines (clortetraciclina i oxitetraciclina) es van obtenir a finals de la dècada del 1940 a partir de *Streptomyces aureofaciens* i *Streptomyces rimosus*. Posteriorment es van identificar altres molècules naturals com tetraciclina i dimetilclortetraciclina i es van desenvolupar productes semisintètics com metaciclina, doxiciclina i minociclina, essent les glicilciclines representades per la tigeiclina el grup de tetraciclines semisintètiques més recentment desenvolupat^{343,344}.

L'estructura de les tetraciclines consta d'un nucli tetracíclic format per quatre anells benzènics on s'uneixen diferents grups funcionals que donen lloc a les diferents molècules de tetraciclines.

Les tetraciclines actuen inhibint la síntesi proteica mitjançant la seva unió de forma reversible a la subunitat ribosòmica 30S, on interfereixen amb l'associació de l'aminoacil-ARNt amb el ribosoma bacterià^{343,344}.

Els mecanismes pels quals els microorganismes adquireixen resistència a tetraciclines inclouen l'expulsió activa de l'antibiòtic, la protecció del ribosoma i amb menor importància clínica la inactivació enzimàtica^{343,344}. Aquests mecanismes estan determinats per l'adquisició de gens *tet* que es troben associats a elements genètics mòbils, el que explica la seva àmplia distribució en bacteris gramnegatius, grampositius, aerobis i anaerobis^{343,344} (<http://faculty.washington.edu/marylinr/>). A la taula 12 es

mostren els gens *tet* de resistència a tetraciclins descrits, i els gens *otr* de resistència a oxitetraciclina identificats en espècies de *Streptomyces* productores d'antibiòtics. Altres mecanismes de resistència a tetraciclins no codificats per gens *tet* inclouen la disminució de l'acumulació de les tetraciclins al citoplasma bacterià per alteracions en la membrana externa o per sistemes d'expulsió activa no específics de tetraciclins.

Taula 12. Mecanismes de resistència a tetraciclins i gens *tet* associats

Bombes d'expulsió	Protecció del ribosoma	Inactivació enzimàtica	Desconegut
<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>tet(E)</i> , <i>tet(G)</i> , <i>tet(H)</i> , <i>tet(J)</i> , <i>tet(V)</i> , <i>tet(Y)</i> , <i>tet(Z)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(30)</i> , <i>tet(31)</i> , <i>tet(33)</i> , <i>tet(35)</i> ^a , <i>tet(38)</i> , <i>tet(39)</i> , <i>tet(40)</i> , <i>tet(41)</i> , <i>tetA(P)</i> , <i>otr(B)</i> , <i>otr(C)</i> , <i>tcr3</i>	<i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>tet(Q)</i> , <i>tet(T)</i> , <i>tet(32)</i> , <i>tet(36)</i> , <i>otr(A)</i> , <i>tetB(P)</i> ^b , <i>tet</i>	<i>tet(X)</i> ^c , <i>tet(34)</i> , <i>tet(37)</i> ^c	<i>tet(U)</i> ^d

^a *tet(35)* no es troba relacionat amb altres gens que codifiquen bombes d'expulsió. ^b *tetB(P)* sempre s'ha trobat en el mateix operó que *tetA(P)*. ^c *tet(X)* i *tet(37)* no estan relacionats però ambdós codifiquen oxidoreductases. ^d *tet(U)* ha estat seqüenciat però no sembla estar relacionat amb bombes d'expulsió ni amb proteïnes de protecció del ribosoma. Obtingut de Chopra *et al.*³⁴³, Roberts³⁴⁴ i de l'actualització publicada a <http://faculty.washington.edu/marylinr/>.

1.7.2.1. Bombes d'expulsió activa específiques de tetraciclins

Les bombes d'expulsió activa codificades per gens *tet* pertanyen a la superfamília de facilitació major (MFS) i són proteïnes associades a la membrana que actuen intercanviant un protó per un complex tetraciclina-catió, el que origina una disminució intracel·lular de l'antibiòtic. La majoria confereixen resistència a tetraciclina i doxiciclina però no a minociclina ni a les glicilciclins, amb l'excepció de *Tet(B)* que també confereix resistència a minociclina.

La major part dels gens *tet* que codifiquen bombes d'expulsió de tetraciclins han estat identificats en organismes gramnegatius amb l'excepció de *tet(K)* i *tet(L)* descrits principalment en grampositius, *tet(Z)* i *tet(33)* descrits en *Corynebacterium*, *tet(V)* en *Mycobacterium*, i *otr(B)*, *otr(C)* i *tcr3* en *Streptomyces* (<http://faculty.washington.edu/marylinr/>). Encara que en *S. pyogenes* no s'han trobat

gens *tet* relacionat amb bombes d'expulsió, els gens *tet(K)* i *tet(L)* han esta identificats en altres estreptococs^{343,344}.

1.7.2.2. Protecció del ribosoma

El mecanisme de protecció ribosòmica es troba associat a la producció de proteïnes citoplasmàtiques Tet que s'uneixen al ribosoma el que provoca un canvi conformacional i la inhibició de la unió de tetraciclina. Aquestes proteïnes mostren certa homologia amb els factors d'elongació EF-Tu i EF-G i presenten activitat GTPasa essencial per al seu funcionament. El patró de resistència inclou tetraciclina, minociclina i doxiciclina, i per tant un major espectre de resistència que les bombes d'expulsió.

Els gens *tet* que codifiquen proteïnes de protecció ribosòmica han estat descrits principalment en organismes grampositius, en anaerobis i en alguns gramnegatius com *Neisseria*, *Haemophilus* i *Campylobacter*. Aquests gens es troben associats generalment a transposons conjugatius o no conjugatius integrats en el cromosoma i amb menys freqüència en plasmidis. El gen *tet(M)* és el que es troba més àmpliament distribuït, degut en part a la seva associació a la família de transposons conjugatius Tn916 que codifiquen la seva pròpia transferència. Aquests transposons es poden integrar en altres transposons donant lloc a elements compostos que contenen gens de resistència a altres antimicrobians com macròlids, kanamicina i cloramfenicol³⁰¹. En *S. pyogenes* el determinant més freqüentment implicat en la resistència a tetraciclina és *tet(M)* i en menor proporció *tet(O)*³⁴⁵, havent-se descrit ocasionalment *tet(S)*³⁴⁶ i *tet(T)*³⁴⁷.

1.7.3. Quinolones

Les quinolones són antibacterians d'origen sintètic, essent el primer representant de la família introduït en clínica l'àcid nalidíxic, agent descobert l'any 1962 de manera fortuïta durant el procés de síntesi i purificació de la cloroquina. Originalment l'ús clínic de l'àcid nalidíxic i dels seus primes anàlegs com l'àcid oxolínic i l'àcid pipemídic estava limitat al tractament d'infeccions urinàries. El desenvolupament del norfloxacinó el 1978 obrí l'era de les quinolones fluorades o fluoroquinolones, compostos amb

millors paràmetres farmacocinètics i espectre d'acció ampliat a organismes grampositius, mantenint l'activitat sobre gramnegatius^{348,349}.

Les fluoroquinolones deriven de la modificació del nucli central 4-oxo-1,4-dihidroquinoleïna amb l'addició d'un àtom de fluor en posició 6 i de diverses cadenes radicals^{348,349}. Recentment, gràcies al major coneixement de l'estructura-activitat de les quinolones s'ha desenvolupat un nou grup de compostos anomenats desfluoroquinolones o quinolones no fluorades que es caracteritzen per l'absència de l'àtom de fluor en posició 6, encara que poden contenir àtoms de fluor en altres posicions³⁵⁰. El primer representant d'aquest grup és el garenoxacino, molècula amb activitat incrementada enfront bacteris grampositius respecte a altres fluoroquinolones.

Atenent a l'espectre d'acció i als paràmetres farmacocinètics les quinolones es poden classificar en quatre generacions, encara que hi ha molècules que s'agrupen en una generació o en una altra depenent de l'autor^{348,349,351} (Taula 13).

Taula 13. Classificació de les quinolones

1 ^{era} generació	2 ^{ona} generació	3 ^{era} generació	4 ^{ta} generació
Àcid nalidíxic	Lomefloxacino	Levofloxacino	Trovafoxacino
Àcid oxolínic	Enoxacino	Esparfloxacino	Moxifloxacino
Àcid pipemídic	Norfloxacino	Gatifloxacino	Gemifloxacino
Cinoxacino	Ofloxacino	Grepafloxacino	Clinafloxacino
Flumequino	Ciprofloxacino		Sitafloxacino

Les quinolones actuen inhibint l'acció dels enzims DNA girasa i topoisomerasa IV, que són topoisomerases de tipus II relacionades amb els processos de replicació i segregació del cromòfor bacterià^{352,353}. La funció principal de la DNA girasa és la de catalitzar el superenrotllament negatiu del DNA, mentre que la topoisomerasa sembla intervenir en la segregació dels cromosomes després de la duplicació. Ambdós són enzims tetramèrics semblants estructuralment constituïts per dues subunitats, GyrA i GyrB en la DNA girasa, i ParC i ParE (anomenades GrlA i GrlB en *S. aureus*) en la topoisomerasa IV.

La resistència a quinolones es produeix principalment per l'alteració de les dianes i per la disminució de l'acumulació intracel·lular de l'antibiòtic degut a la impermeabilitat de la membrana o a l'expulsió activa de l'antibiòtic^{349,354,355}. A

diferència d'aquests mecanismes que es produeixen per mutacions en gens cromosòmics, s'han descrit altres mecanismes de resistència transmissibles que inclouen la protecció de les dianes mitjançada pels gens *qnr*³⁵⁶⁻³⁵⁸ i la inactivació enzimàtica produïda per una variant de l'acetiltransferasa modificadora d'aminoglucòsids ACC(6')-Ib anomenada ACC(6')-Ib-cr³⁵⁹, ambdós identificats en enterobacteris.

1.7.3.1. Alteració de les dianes

L'alteració de les dianes és el mecanisme de resistència a quinolones amb més importància clínica i es produeix com a conseqüència de mutacions puntuals en el gens que codifiquen la DNA girasa i la topoisomerasa IV^{349,354,355}. Aquestes mutacions es localitzen en regions concretes de les subunitats conegudes com QRDR (*quinolone resistance determining region*).

L'especificitat de les diferents quinolones per cadascuna de les dianes és variable i depèn del microorganisme i de la quinolona específica. De manera general, en bacteris gramnegatius la diana primària és GyrA, mentre que en grampositius és ParC^{349,354,355}, encara que algunes quinolones més recents com clinafloxacino i garenoxacino presenten una afinitat similar per tots dos enzims i són referides com quinolones duals^{350,360}

La resistència a quinolones es produeix de manera esglaonada com a conseqüència de l'acumulació de mutacions successives, de manera que el nivell de resistència conferit per una primera mutació en la diana primària s'incrementa amb mutacions addicionals en la mateixa diana o en la diana secundària. Així, en *E.coli* una primera mutació en *gyrA* normalment confereix resistència d'alt nivell a àcid nalidíxic, però per a evidenciar resistència a fluoroquinolones es requereixen mutacions addicionals en *gyrA* i/o *parC*³⁶¹. De forma anàloga, en *S. pneumoniae* una mutació en *parC* confereix resistència a ciprofloxacino de baix nivell, mentre que mutacions addicionals en *parC* i/o *gyrA* originen un nivell de resistència moderat o alt a diverses fluoroquinolones³⁶². Les mutacions en *gyrB* i *parE* són menys freqüents i sovint són secundàries a mutacions en les altres subunitats.

En *S. pneumoniae* les mutacions detectades amb més freqüència afecten les posicions Ser79 i Asp83 de ParC, i Ser81 i Glu85 de GyrA³⁵⁵. En *S. pyogenes* i altres

estreptococs β -hemolítics la resistència a quinolones s'ha començat a descriure i caracteritzar en els últims anys, trobant-se mutacions similars a les descrites en *S. pneumoniae*²⁶⁰⁻²⁶⁴ (Taula 14).

Un mecanisme de resistència transmissible descrit en *S. pneumoniae* i en estreptococs viridans que sembla ser poc habitual és la transferència de resistència a quinolones mitjançada per la incorporació de fragments dels gens *gyrA* i *parC* per transformació³⁶³. En *S. pyogenes*, un organisme que no es considera naturalment transformable, s'ha descrit fins ara una única soca amb evidències de l'adquisició d'un fragment del gen *parC* amb la mutació Ser79Phe probablement a partir de *S. dysgalactiae*³⁶⁴.

Taula 14. Principals mutacions descrites en les QRDR de *parC* i *gyrA* en *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* i estreptococs β -hemolítics els grups C i G

Espècie	<i>parC</i>		<i>gyrA</i>	
	Posició AA salvatge	AA substituït	Posició AA salvatge	AA substituït
<i>S. pneumoniae</i>	Ser79	Phe, Tyr	Ser81	Phe, Tyr
	Asp83	Asn, Tyr, Thr, Gly	Glu85	Lys, Gly
	Ala84	Thr		
	Arg95	Cys		
	Ile81 ^a	Thr		
	Lys137 ^a	Asn		
<i>S. pyogenes</i>	Ser79	Phe	Ser81	Phe
	Asp91 ^a	Asn		
	Ala121 ^a	Val		
<i>S. agalactiae</i>	Ser79	Phe, Arg, Tyr	Ser81	Leu, Tyr
	Asp83	Asn, Tyr, Gly	Glu85	Lys, Ala
Estreptococs grups C, G	Ser79	Phe	Ser81	Phe, Tyr, Cys
	Asp83	Tyr	Glu85	Lys
	Thr56 ^a	Met		

^a No es coneix el seu significat en la resistència

1.7.3.2. Disminució de la concentració intracel·lular de l'antibiòtic

Les quinolones penetren a l'interior cel·lular per un sistema de difusió passiva, principalment travessant la membrana i a través de porines. En gramnegatius la disminució en l'expressió de porines com OmpF i OmpC s'ha associat a una disminució de la sensibilitat de determinades quinolones^{349,354}. Aquest és un mecanisme de resistència múltiple que afecta a altres antibiòtics no emparentats com tetraciclins, cloramfenicol i β -lactàmics.

Adicionalment, tant organismes gramnegatius com grampositius disposen de sistemes d'expulsió activa amb una funció fisiològica relacionada amb processos d'excreció de metabolits secundaris, productes tòxics i fins i tot proteïnes de captació de nutrients. L'increment en l'expressió d'alguns d'aquests sistemes d'expulsió per inducció, mutacions en els promotors o alteracions en sistemes reguladors pot originar resistència a quinolones i a altres antibiòtics no relacionats estructuralment^{349,354,365}.

En organismes grampositius els sistemes d'expulsió més ben caracteritzats que actuen sobre quinolones són NorA de *S. aureus*, Pmra de *S. pneumoniae*, Bmr de *Bacillus* i Lde de *Listeria*³⁶⁵. Aquests sistemes confereixen una resistència moderada a quinolones hidrofíliques com norfloxacino i ciprofloxacino però no afecten a altres fluoroquinolones. En *S. aureus* s'han descrit recentment els sistemes d'expulsió NorB i NorC, anàlegs a NorA però que confereixen resistència a diverses fluoroquinolones incloent esparfloxacino i moxifloxacino^{366,367}. Estudis amb mutants seleccionats *in vitro* han descrit la possible existència de sistemes d'expulsió amb activitat sobre norfloxacino i ciprofloxacino en *S. pyogenes*^{368,369}, si bé aquests sistemes no han estat encara caracteritzats.

2. OBJECTIUS

S. pyogenes és l'agent causal d'una varietat d'infeccions en humans que varien àmpliament en termes de severitat. La vigilància epidemiològica i l'estudi de les característiques del microorganisme que puguin conformar un major potencial virulent, així com la identificació de grups de risc, constitueixen eines essencials en el desenvolupament d'estratègies per al maneig i control d'aquestes infeccions.

Els objectius d'aquesta tesi han estat els següents:

- Determinar l'espectre de presentacions clíniques invasives causades per *S. pyogenes* en la nostra sèrie i les característiques dels pacients afectats.
- Analitzar la freqüència dels tipus i subtipus *emm* i la seva distribució en les soques aïllades dels casos invasius i no invasius.
- Determinar la prevalença dels gens que codifiquen les exotoxines pirogèniques estreptocòcciques *speA-C*, *speF-J*, *speL*, *speM*, superantigen estreptocòccic *ssa* i exotoxina mitogènica estreptocòccica *smeZ*, les variants al·lèliques de *speA* i *smeZ*, i analitzar la seva distribució en les soques aïllades dels casos invasius i no invasius.
- Determinar la prevalença i evolució de la resistència a eritromicina, tetraciclina i fluoroquinolones i els mecanismes de resistència implicats.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Característiques i àmbit de l'estudi

S'ha realitzat un estudi retrospectiu, descriptiu i observacional en el que s'han analitzat 126 soques clíniques de *S. pyogenes* aïllades entre gener de 1999 i juny de 2003 a l'hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Aquest és un centre hospitalari de tercer nivell que disposa de 645 llits i cobreix una població d'aproximadament 300.000 habitants.

Les soques incloses en l'estudi representen una part del total de soques de *S. pyogenes* aïllades en el laboratori durant el mateix període que va ser de 229. La major part de les soques no incloses van correspondre a soques aïllades d'infeccions faríngees degut a que no es trobava entre els procediments del laboratori el seu estudi de sensibilitat als antimicrobians ni la seva conservació.

Les dades clíniques i demogràfiques dels pacients van ser recollides de la història clínica per metges residents del Servei de Medicina Interna amb un qüestionari confeccionat a partir de l'utilitzat pel *Working Group on Severe Invasive Disease* europeu (<http://www.strep-euro.lu.se>). Aquestes dades inclouen edat, sexe, diagnòstic, lloc i evolució de la infecció així com factors que puguin haver predisposat al desenvolupament d'infecció invasiva incloent traumatismes cutanis, ús de drogues per via parenteral, alcoholisme, càncer, infecció per HIV, diabetis, immunosupressió i varicel·la.

La infecció invasiva es va definir com l'aïllament de *S. pyogenes* a partir d'un lloc normalment estèril incloent sang, líquids orgànics (cefaloraquidi, peritoneal, pleural i articular), abscessos tissulars profunds i de llocs no estèrils en associació clínica amb FN o SSTs. La SSTs es va definir d'acord als criteris establerts pel *Working Group on Severe Invasive Disease*¹¹⁷ (veure Taula 4, pàgina 23). La infecció no invasiva es va definir com l'aïllament de *S. pyogenes* de llocs normalment no estèrils incloent pell, conducte auditiu extern, tracte genital, faringe i altres llocs diversos. Es va considerar infecció d'adquisició nosocomial quan l'aïllament del microorganisme es produí després de les 48 hores de l'ingrés hospitalari sempre i quan no existís evidència d'infecció en el moment de l'ingrés. La taxa de mortalitat es va avaluar en els 30 dies posteriors a la data de recollida de la mostra.

Únicament en el cas de l'estudi de la sensibilitat a fluoroquinolones el període es va ampliar fins a juny de 2004, avaluant-se un total de 189 soques.

3.2. Cultiu i identificació

El cultiu de les mostres clíniques es va efectuar seguint procediments estandarditzats en funció de la localització de la infecció²⁵. Els hemocultius es van realitzar amb el sistema BacTAlert (Organon Teknika Corp., Durham North Carolina).

La identificació de les soques es va realitzar en base a un conjunt de característiques fenotípiques que inclouen la morfologia colonial, hemòlisi en agar sang, tinció de Gram, catalasa, sensibilitat a la bacitracina (0,04 U), activitat pirrolidonil arilamidasa (PYR), reacció de Voges-Proskauer, hidròlisi d'hipurat i detecció de l'antigen del grup A de Lancefield (Streptex, Wellcome, Regne Unit)²⁵. Les soques es van conservar a -80°C en brou tripticasa soja suplementat amb glicerol al 10%.

3.3. Estudi de la sensibilitat als antimicrobians

L'estudi de la sensibilitat als antimicrobians es va realitzar mitjançant la tècnica de disc difusió en agar Mueller-Hinton suplementat amb 5% de sang (bioMèrieux, França) amb discs impregnats de concentracions estandarditzades d'antibiòtics (Oxoid, Regne Unit o Bio-Rad, França) seguint la normativa del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), anteriorment NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)³⁷⁰. Després de 18-24 hores d'incubació a 37°C en atmosfera suplementada amb 5% de CO₂ es van llegir i interpretar els halos d'inhibició en funció dels criteris establerts pel CLSI³⁷¹. Es van avaluar els següents antibiòtics: penicil·lina, cefotaxima, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, levofloxacino, rifampicina i vancomicina.

Els fenotips de resistència a macròlids es van determinar per la tècnica de difusió amb doble disc en agar Mueller-Hinton suplementat amb 5% de sang utilitzant discs d'eritromicina (15µg) i clindamicina (2µg) situats a una distància d'1,5 a 2,5 cm³⁰⁶. La resistència a eritromicina i clindamicina es va interpretar com fenotip MLS_B constitutiu. La resistència a eritromicina i la presència d'un halo d'inhibició tallat de clindamicina en la zona propera al disc d'eritromicina (forma de D) es va considerar fenotip MLS_B induïble, mentre que la resistència a eritromicina i la sensibilitat a clindamicina en absència d'un halo d'inhibició tallat es va interpretar com fenotip M.

Es va determinar la concentració inhibidòria mínima (CIM) mitjançant la tècnica d'Etest (ABiodisk, Suècia) de penicil·lina, cefotaxima i levofloxacino en totes les

soques, i la CIM d'eritromicina en les soques que van mostrar resistència a aquest antimicrobià per disc difusió. Addicionalment, en les soques que van mostrar una CIM de levofloxacino ≥ 2 µg/ml es va determinar la CIM de norfloxacino, ciprofloxacino, esparfloxacino, moxifloxacino i clinafloxacino amb la tècnica d'Etest.

La soca *S. pneumoniae* ATCC 49619 es va utilitzar com a control de qualitat en els estudis de sensibilitat.

3.4. Tipificació *emm*

La determinació dels tipus i subtipus *emm* es va realitzar mitjançant l'amplificació del gen *emm* per la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i l'anàlisi de la seqüència que codifica la porció amino-terminal hipervariable de la proteïna M seguint el protocol descrit pel CDC amb lleugeres modificacions (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm>). El procés consta de sis etapes que es detallen a continuació.

3.4.1. Extracció del DNA

Per a l'extracció del DNA es va partir d'un cultiu pur en agar sang incubat durant 24 hores a 37°C en atmosfera suplementada amb 5% de CO₂.

Procediment

1. Resuspendre una nansa del cultiu en 100 µl d'aigua ultrapura.
2. Congelar i descongelar dues vegades a -80°C durant 10 minuts.
3. Incubar a 95°C durant 30 minuts i efectuar una centrifugació breu a alta velocitat.

3.4.2. Amplificació del gen *emm*

La PCR permet una amplificació *in vitro* de fragments específics de DNA localitzats entre dues regions de seqüència coneguda. La reacció requereix la preparació d'una barreja amb el DNA de doble cadena del qual se'n vol amplificar un fragment, dos iniciadors (oligonucleòtids) que s'uneixen específicament a les regions que delimiten la seqüència a amplificar, la DNA polimerasa, una barreja dels quatre deoxinucleòtids (dNTPs) i un tampó de reacció adequat. La repetició de cicles successius de desnaturalització, hibridació amb els iniciadors i extensió o síntesi del

DNA a partir dels iniciadors permet una amplificació exponencial del fragment de DNA. A la taula 15 es mostren els iniciadors utilitzats per a l'amplificació del gen *emm*.

Taula 15. Iniciadors utilitzats per a l'amplificació i seqüenciació del gen *emm*.

Iniciador	Seqüència	Referència
<i>emm</i> primer1	5'-TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA-3'	CDC
<i>emm</i> primer2	5'-GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT-3'	CDC
<i>emm</i> seq2 ^a	5'-TATTCGCTTAGAAAATTAAAAACAGG-3'	CDC
<i>emm</i> 1REV.seq ^b	5'-TTACGCTGGTCTTCTAAGGC-3'	Aquest treball
<i>emm</i> 12REV.seq ^c	5'-CCGCTAAGCTCATTATACGC-3'	Aquest treball
<i>emm</i> 83REV.seq ^d	5'-TTAAGTCGTTCCAACGCAAC-3'	Aquest treball

^a Iniciador utilitzat per a la seqüenciació del gen *emm* marcat amb Cy5 a l'extrem 5'. ^{b, c, d} Iniciadors utilitzats per a la seqüenciació (reversa complementària) dels gens ^b *emm1*, ^c *emm12* i ^d *emm83* marcats amb Cy5 a l'extrem 5'.

Procediment

- Preparar la barreja d'amplificació per a un volum final de 20 µl:

Reactiu	Volum
Tampó 10X (15 mM MgCl ₂)	2 µl
dNTPs [Roche] (2 mM cada un)	2 µl
Iniciador 1 [Isogen-Life Science] (10 pmol/µl)	2,8 µl
Iniciador 2 [Isogen-Life Science] (10 pmol/µl)	2,8 µl
Taq Expand [Roche] (3,5 U/ µl)	0,1 µl
Aigua	9,8 µl
DNA	0,5 µl

- Programar el termociclador (Perkin Elmer 2400 o Bio-Rad i-cycler) amb les següents condicions :

Etapa	Temperatura/Temps	Nº cicles
Desnaturalització inicial	94°C/1'	
Desnaturalització	94°C/15"	10
Hibridació	46,5°C/30"	
Extensió	72°C/ 1' 15"	
Desnaturalització	94°C/15"	20
Hibridació	46,5°C/30"	
Extensió	72°C/ 1' 15" (amb 10" d'increment per cicle)	
Extensió final	72°C/10'	
Conservació	4°C	

3.4.3. Electroforesi en gel d'agarosa i visualització del producte amplificat

La tècnica d'electroforesi s'utilitza per a separar i identificar fragments de DNA i també permet l'aïllament d'un determinat fragment a partir d'una barreja heterogènia. Aquesta tècnica es basa en la migració del DNA (carregat negativament a pH neutre) cap el pol positiu a través d'una matriu porosa (l'agarosa) en ser sotmès a un camp elèctric. La mobilitat electroforètica depèn de diversos paràmetres entre els que es troben la longitud del DNA, la seva conformació estructural, la porositat del gel d'agarosa (percentatge d'agarosa) i el corrent elèctric aplicat.

Procediment

1. Preparar una solució d'agarosa (Biorad) al 0,8% en tampó TBE 0,5X (50mM Tris, 50mM àcid bòric i 0,2 mM EDTA). Dissoldre l'agarosa al microones evitant que quedin partícules en suspensió.
2. Deixar refredar fins a uns 50-55°C i addicionar 7.5 µl de bromur d'etidi d'una solució stock de 10 mg/ml (concentració final de 0,5 µg/ml).
3. Abocar la solució sobre un suport, en el que els frontals s'hauran segellat transitòriament amb cinta adhesiva. Col·locar una peça dentada (pinta) per a la formació dels pouets a 0,5-1 cm de l'extrem, verificant que estigui separada de la base del suport de 0,5 a 1 mm per tal de mantenir la integritat dels pouets. Deixar a temperatura ambient fins que estigui solidificat.
4. Retirar la pinta i la cinta adhesiva i col·locar el gel en una cubeta d'electroforesi plena de tampó TBE 0,5X que ha de cobrir el gel.
5. Mesclar 2 µl de tampó de càrrega 10X (0,25% blau de bromofenol, 0,25% xilen cianol i 60% glicerol) amb 10 µl de cada mostra. Carregar els pous amb aquesta mescla. Generalment en un o més pous s'afegeix un marcador de pes molecular que conté fragments lineals de mida coneguda (Marker VIII, Roche) i permet, un cop acabada l'electroforesi, establir relacions amb les bandes de la mostra del DNA i deduir la seva mida aproximada.
6. Tancar la cubeta i connectar els electrodes aplicant un voltatge constant d'entre 70 i 80 volts, 25-30 mA (Power Pac 300, Biorad).
7. Per a la visualització del DNA es situa el gel en un transil·luminador de radiació ultraviolat (UVP).

3.4.4. Purificació dels fragments de DNA

El producte amplificat s'ha de purificar per tal d'eliminar nucleòtids i oligonucleòtids no incorporats a la cadena que poden intervenir en la reacció de seqüenciació. Per a la purificació del DNA es va utilitzar el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguint les instruccions del fabricant.

3.4.5. Seqüenciació

La seqüenciació del DNA es va realitzar en base al mètode enzimàtic de Sanger (1977) que es fonamenta en la síntesi i terminació amb dideoxinucleòtids (ddNTPs) mitjançant cicles de PCR. Es van utilitzar iniciadors marcats amb Cy5 emprant el kit fmol[®] DNA Cycle Sequencing System (Promega) en el seqüenciador ALFexpress[™] DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech).

Per a la determinació d'una seqüència es realitzen quatre reaccions d'amplificació independents que contenen el DNA a seqüenciar, un iniciador complementari a un fragment de la cadena motlle, una barreja dels quatre dNTPs, la DNA polimerasa (Sequenase[®]) i el tampó adequat (DNA Sequencing 5X Buffer). A cada reacció s'afegeix una quantitat limitant d'un ddNTP diferent (A, C, G o T) de manera que en totes les reaccions es generen una sèrie de fragments finalitzats per la incorporació del ddNTP corresponent. Els fragments finals es separen per mida en un gel d'electroforesi de poliacrilamida d'alta resolució. La lectura del gel es realitza automàticament amb el sistema ALFexpress[™] (Amersham Pharmacia Biotech) que es basa en la lectura de l'excitació que produeix un llum làser al marcador fluorescent Cy5, que en aquest cas es troba en els iniciadors utilitzats. L'anàlisi de les seqüències es realitza per mitjà del software Sequence Analyser 2.10 (Amersham Pharmacia Biotech).

A la taula 15 es mostren els iniciadors utilitzats per a la seqüenciació del gen *emm*. En tres casos la seqüenciació es va efectuar en ambdues cadenes per tal de confirmar nous subtipus *emm* utilitzant els iniciadors *emm1REV.seq*, *emm12REV.seq* i *emm83REV.seq* dissenyats en aquest estudi.

3.4.5.1. Reacció de seqüenciació

Procediment

1. Preparar la barreja de reacció per un volum final de 16 µl:

Reactiu	Volum
Tampó	5 µl
Iniciador marcat (10 pmol/µl)	1,5 µl
Taq	1 µl
Aigua	6,5 µl
DNA	2 µl

2. Addicionar 2 µl de cada ddNTP en el seu respectiu eppendorf (dipositar-los al fons del tub).
3. Afegir 4 µl de la barreja de reacció a cada eppendorf
4. Programar el termociclador (Perkin Elmer 2400 o Bio-Rad iCycler) amb les següents condicions:

Etapa	Temperatura/Temps	Nº cicles
Desnaturalització	95°C/30''	30
Hibridació	58°C/30''	
Extensió	70°C/2'	
Conservació	4°C	

5. Addicionar 3 µl de solució stop de seqüenciació i conservar els tubs a 4°C fins el moment de l'electroforesi de seqüenciació.

3.4.5.2. Preparació del gel de seqüenciació

Procediment

1. Rentar els vidres del seqüenciador amb sabó Mistol (que és el que menys interacció dóna amb el llum làser) i esbandir abundantment amb aigua destil·lada. Un cop secs, passar alcohol de 70° i tornar a rentar amb aigua destil·lada. Fer el mateix amb els separadors i la pinta per a fer els pouets.
2. Preparar una solució fixadora amb 1 ml d'etanol absolut, 250 µl d'àcid acètic al 10% i 3 µl de Bind-Silane.
3. Aplicar la solució fixadora amb un paper de cel·lulosa en 5 cm de la part superior del vidre exterior i en 3 cm de la part superior del vidre interior. Aquesta solució facilita la formació d'uns pouets ben alineats.
4. Muntar els vidres i netejar amb alcohol de 70° les superfícies exteriors.
5. Preparar la barreja d'acrilamida/bisacrilamida segons les indicacions del kit ReproGel High Resolution i introduir-la lentament evitant la formació de bombolles.
6. Col·locar la pinta per a formar els pouets i deixar solidificar el gel aplicant llum ultraviolat durant 10 min.

3.4.5.3. Electroforesi

Procediment

1. Iniciar el programa ALFwin i el seqüenciador ALFexpress.
2. Introduir les condicions de l'electroforesi per High Resolution: de 1500V, 60mA, 25 W, 55°C durant 450 minuts.
3. Col·locar la cubeta del tampó i el gel poliacrilamida en l'ALFexpress i connectar els tubs de refrigeració.
4. Addicionar 1 litre de tampó d' electroforesi TBE 0.5X a cada cubeta i deixar que el llum làser s'alineï.
5. Comprovar que el llum làser estigui ben alineat (90% o >600 de transmitància) i pressionar "preset" per tal que el tampó arribi a la temperatura de 55°C. Durant aquest procés el valor del làser disminueix però mai ha d'estar per sota de 300.

6. Un cop el gel està a 55°C, es procedeix a retirar la pinta i es netegen els pouets de restes d'acrilamida injectant tampó a pressió amb l'ajut d'una xeringa.
7. Desnaturalitzar les mostres 3 minuts a 72°C i posar-les a 4°C (en gel).
8. Carregar les mostres, col·locar els elèctrodes i iniciar la reacció de seqüenciació.
9. Un cop acabada l'electroforesi, les seqüències es guarden automàticament en el software Sequence Analyser 2.10.

3.4.6. Assignació dels tipus i subtipus *emm*

Per a l'assignació dels tipus i subtipus *emm*, les seqüències obtingudes es van comparar amb les seqüències de la base del CDC utilitzant el BLAST 2.0 Server (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>). Es considera que una seqüència pertany a un tipus *emm* determinat si presenta una homologia $\geq 92\%$ en les 90 primeres bases que codifiquen la proteïna M madura amb el tipus *emm* de referència (dassignat com “.0”). Els subtipus es defineixen en base a qualsevol alteració en la seqüència nucleotídica que codifica els primers 50 aminoàcids de la proteïna M madura. En els casos en els que es van detectar nous subtipus, les seqüències obtingudes es van enviar al CDC per a la seva verificació i per a l'assignació del subtipus corresponent.

3.5. Detecció dels gens *speA-C*, *speF-J*, *speL*, *speM*, *ssa* i *smeZ*

La detecció dels gens *speA*, *speC*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speL*, *speM*, *ssa* i *smeZ* es va efectuar mitjançant PCR utilitzant iniciadors prèviament descrits i/o dissenyats en aquest estudi en base a la seqüència de cada gen disponible al GenBank (Taula 16). Es van utilitzar dos parells d'iniciadors diferents per a la detecció de cada gen excepte en el cas de *speL*, *speM* i *smeZ*. Per a la detecció dels gens de codificació cromosòmica *speB*, *speF* i *speG* es va emprar la tècnica de *Slot blot*.

Es van determinar les variants al·lèliques dels gens *speA* i *smeZ* mitjançant la seqüenciació del producte amplificat. En el cas del gen *speA* es va determinar la seqüència en totes les soques, mentre que el cas del gen *smeZ* només es va determinar la seqüència de 95 soques seleccionades que representaren tots els tipus i subtipus *emm* incloent les soques amb diferents patrons d'exotoxines.

En els experiments de PCR i *Slot Blot* es van incloure cinc soques control prèviament publicades proporcionades per T. Proft (Taula 17)³⁷².

Taula 17. Soques control utilitzades en els experiments de detecció d'exotoxines

Soca control	Contingut gens d'exotoxines
FP 4223	<i>speG, speJ, speM, smeZ</i>
FP 5417	<i>speA, speG, speJ, speL, smeZ</i>
FP5971	<i>speA, speC, speG, speH, speJ, smeZ</i>
1/5045	<i>speA, speC, speG, speJ, ssa, smeZ</i>
85/167	<i>speG, speH, speI, speJ, smeZ</i>

3.5.1. PCR

3.5.1.1. Extracció del DNA

L'obtenció del DNA es va realitzar seguint el protocol prèviament utilitzat per a la tipificació *emm* (apartat 3.4.1.).

3.5.1.2. Reacció d'amplificació

Procediment

- Preparar la barreja d'amplificació per a un volum de 50 µl:

Reactiu	Volum
Tampó 10X (15 mM MgCl ₂)	5 µl
dNTPs [Roche] (2 mM cada un)	5 µl
Iniciador up [Isogen-Life Science] (10 pmol/µl)	2 µl
Iniciador dw [Isogen-Life Science] (10 pmol/µl)	2 µl
Taq Expand [Roche] (3,5 U/ µl)	0,4 µl
Aigua	30,6 µl
DNA	5 µl

- Les condicions d'amplificació van ser les següents:

Etapa	Temperatura/Temps	Nº cicles
Desnaturalització inicial	94°C/5'	
Desnaturalització	94°C/30"	30
Hibridació	*/30"	
Extensió	72°C/ 1'	
Extensió final	72°C/10'	
Conservació	4°C	

*Les temperatures utilitzades amb cada parell d'iniciadors es mostren a la Taula 16.

3.5.1.3. Electroforesi en gel d'agarosa i visualització del producte amplificat

Per tal de visualitzar els resultats de l'amplificació, 5 µl de cada producte amplificat es van sotmetre a electroforesi convencional en gels d'agarosa al 1% en TBE 0,5X durant 60' a 120 volts seguint el procediment prèviament descrit (apartat 3.4.3.).

3.5.2. Seqüenciació dels gens *speA* i *smeZ*

La seqüenciació dels gens *speA* i *smeZ* es va portar a terme a partir dels productes de la PCR, purificats amb el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), emprant els mateixos iniciadors marcats amb Cy5 (Taula 16) i el kit fmol[®] DNA Cycle Sequencing System (Promega), tal com s'ha descrit per a la seqüenciació dels gens *emm* (apartat 3.4.5.).

Les condicions de la PCR de marcatge van ser les següents:

Temperatura/Temps	Nº cicles
95°C/30''	30
50°C ^a , 49°C ^b /30''	
72°C/1'	
4°C	

^a *speA*, ^b *smeZ*

Les seqüències obtingudes es van analitzar amb el Alfvinn Sequence Analyser 2.10 (Amersham Pharmacia Biotech) i es van comparar amb les seqüències publicades en el GenBank per tal d'assignar els al·lels corresponents. Els al·lels *smeZ* no descrits prèviament es van designar amb números correlatius consecutius al de l'últim al·lel descrit.

3.5.3. Slot blot

La tècnica de *Slot blot* es basa en la fixació del DNA a una membrana i en la detecció subsegüent de fragments específics mitjançant la hibridació amb sondes marcades. Per a la detecció dels gens *speB*, *speF* i *speG*, les mostres de DNA es van aplicar a una membrana de nylon carregada positivament (Hybond N⁺, Amersham Biosciences) utilitzant l'aparell Micro-Sample Filtration Manifold (Shleicher & Schuell) unit a un dispositiu de succió. Les sondes utilitzades per a la hibridació es van

obtenir mitjançant PCR, que es va realitzar amb els iniciadors mostrats a la taula 16 i les mateixes condicions que les emprades per a la detecció de les altres exotoxines (apartat 3.5.1.2.). Els productes de la PCR es van purificar amb el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Per al marcatge de les sondes, la hibridació i la detecció es va utilitzar el kit ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling (Amersham Biosciences) que es basa en el marcatge de la sonda amb peroxidasa i la detecció amb quimioluminiscència. Aquest marcatge s'aconsegueix desnaturalitzant completament la sonda i obtenint per tant cadenes carregades negativament. L'enzim peroxidasa acompanyada d'un polímer carregat positivament s'uneix al DNA per atracció electrostàtica i, posteriorment, de forma covalent mitjançant glutaraldehid. La sonda marcada s'uneix específicament als fragments de DNA homòlegs fixats a la membrana i desnaturalitzats per calor. Durant el procés de detecció, la peroxidasa catalitza l'oxidació del luminol que en presència d'un element químic intensificador emet llum que es pot detectar a través d'una pel·lícula radiogràfica. Els resultats de la hibridació es van confirmar mitjançant PCR en 38 soques seleccionades a l'atzar.

3.5.3.1. Extracció del DNA

L'extracció del DNA es va realitzar seguint el protocol prèviament descrit per Pan *et al.*³⁷³ a partir d'un cultiu pur en agar sang incubat durant 24 hores a 37°C en atmosfera suplementada amb 5% de CO₂.

Procediment

1. Resuspendre una nansa del cultiu en 500 µl d'una solució de TE (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA).
2. Centrifugar, resuspendre en 10 ml de la solució de TE amb 1% de SDS i proteïnasa K (50µg/ml).
3. Incubar a 37°C durant 2 hores i centrifugar.
4. Recuperar el sobrenadant i afegir la solució fenol-cloroform (1:1 v/v). Barrejar fins a l'obtenció d'una emulsió homogènia.
5. Centrifugar 1' a 6500 g.
6. Recuperar el sobrenadant i afegir 200 µl d'etanol absolut, agitar per inversió
7. Centrifugar 5' a 6500 g.
8. Eliminar el sobrenadant per decantació o amb l'ajut d'una bomba de succió.
9. Dissoldre el sediment amb 25 a 50 µl de 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA i conservar-lo a 4°C o a -20°C.

3.5.3.2. Fixació del DNA a la membrana

Procediment

1. Retallar la membrana de nylon a la mida de la base de l'aparell de transferència i submergir-la en SSC 5X (citratsòdic 0,3 M; NaCl 3M pH 7) durant 2 minuts.
2. Muntar l'aparell de transferència, connectar la bomba de buit i esperar a que s'absorbeixi el tampó.
3. Carregar els pouets amb 5 µl de DNA desnaturalitzat prèviament 5 minuts a 95°C.
4. Un cop la solució amb el DNA hagi estat absorbida, col·locar la membrana sobre un paper Whatman i procedir a la fixació del DNA situant-la a 80°C durant 30 minuts.

3.5.3.3. Marcatge de la sonda

Procediment

1. Diluir la sonda amb aigua destil·lada fins a una concentració de 10ng/ml amb un volum final de 10 µl.
2. Desnaturalitzar la sonda per ebullició durant 5 minuts i refredar-la immediatament en gel durant 5 minuts.
3. Afegir 10 µl del *DNA labelling reagent*.
4. Afegir 10 µl de glutaraldehyd.
5. Incubar a 37°C durant 10 minuts.
6. La sonda ja marcada es pot mantenir en gel durant 10 a 15 minuts o pot ser conservada amb un 30% de glicerol a -20°C un màxim de sis mesos.

3.5.3.4. Hibridació i detecció

Procediment

1. Introduir la membrana en un tub d'hibridació (evitar la formació de bombolles d'aire entre el tub i la membrana ja que poden dificultar el contacte de la sonda amb la membrana).
2. Per a la pre-hibridació, afegir 15 ml de tampó d'hibridació prèviament atemperat a 42°C i incubar en un forn d'hibridació a 42°C durant 2 hores a 6 rpm (Mini Oven MK II Hybind).
3. Per a la hibridació afegir 30 µl de la sonda marcada al tampó d'hibridació. Per a evitar el contacte directe de la sonda concentrada amb determinades regions de la membrana efectuar la barreja en un recipient a part.
4. Incubar tota la nit en el forn d'hibridació a 42°C a 6 rpm.
5. Descartar el tampó d'hibridació amb la sonda (es pot guardar en un tub per a una segona hibridació) i efectuar un rentat de 5 minuts amb SSC 5X.
6. Treure el SSC i realitzar dos rentats de 20 minuts cadascun a 42°C amb la solució de rentat 1 (0,4% SDS, 0,5% SSC).
7. Treure la membrana del tub i col·locar-la en una cubeta amb 500 ml de la solució de rentat 2 (SSC 2X). Rentar durant 5 minuts amb agitació i eliminar el líquid.
8. Repetir el rentat anterior.
9. Barrejar 15 ml d'*ECL detection reagent 1* i 15 ml de *ECL detection reagent 2*, col·locar la membrana prèviament escorreguda en una cubeta, afegir la barreja i agitar durant 1 minut.

10. Col·locar la membrana en un cassette (Hypercassette RPN-3646, Amersham), sobre papers de foli blanc que absorbiran l'excés de reactiu, i situar sobre la membrana un full de transparència que impedeixi el contacte directe amb la pel·lícula fotogràfica.
11. Col·locar la pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm ECL, Amersham) i tancar el cassette.
12. Després d'uns 30 o 40 minuts, revelar la pel·lícula submergint-la en el líquid de revelat (G153, Asla) durant uns segons fins observar l'aparició de bandes. Treure la pel·lícula i procedir a la fixació submergint-la en el líquid de fixació (G354, Asla) fins que passi d'opaca a translúcida.

3.6. Estudi dels mecanismes genètics de resistència

3.6.1. Detecció dels determinants genètics de resistència a macròlids i tetraciclines

La detecció dels gens de resistència a macròlids es va realitzar mitjançant PCR en totes les soques resistents a eritromicina. Es van estudiar els gens codificadors de metilases *erm(B)* i *erm(A)* subclasse *erm(TR)* i el gen responsable d'un sistema d'expulsió activa *mef(A)*. En les soques que van mostrar resistència a tetraciclina es va efectuar la detecció mitjançant PCR dels gens *tet(M)* i *tet(O)* que codifiquen proteïnes de protecció ribosomal.

La metodologia emprada per a l'obtenció del DNA va ser l'exposada anteriorment (apartat 3.4.1.). La preparació de la barreja d'amplificació es va realitzar tal com s'ha descrit en el cas dels gens d'exotoxines (apartat 3.5.1.2.) i els iniciadors i condicions de la PCR es mostren a la taula 18.

3.6.2. Estudi dels mecanismes genètics associats a la sensibilitat disminuïda o resistència a fluoroquinolones

En les soques que van mostrar una CIM de levofloxacino ≥ 2 µg/ml es va realitzar l'amplificació de les regions QRDR dels gens *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE* i la seva posterior seqüenciació. La metodologia emprada per a l'obtenció del DNA va ser l'exposada anteriorment (apartat 3.4.1.). La preparació de la barreja d'amplificació es va realitzar tal com s'ha descrit en el cas dels gens d'exotoxines (apartat 3.5.1.2.). A la taula 18 es mostren les condicions i els iniciadors utilitzats en les reaccions

d'amplificació. Els iniciadors es va dissenyar en base a les seqüències conegudes de cada gen disponibles al GenBank (números d'accés: *parC*, AF220946; *parE*, AE006540; *gyrA*, AF220945; *gyrB*, AE006524).

La seqüenciació es va portar a terme a partir els productes purificats de la PCR amb el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) utilitzant els mateixos iniciadors marcats amb Cy5 emprant el kit fmol[®] DNA Cycle Sequencing System (Promega) en el seqüenciador ALFexpress[™] DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech), tal com s'ha descrit per la seqüenciació dels gens *emm* (apartat 3.4.5.). Les seqüències es van comparar amb les seqüències salvatges de cada gen mencionades prèviament (números d'accés: *parC*, AF220946; *parE*, AE006540; *gyrA*, AF220945; *gyrB*, AE006524) per tal de determinar la posició i el tipus de mutació present en aquestes regions.

3.7. Anàlisi estadística

Les dades obtingudes es van analitzar amb el paquet estadístic SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estats Units). Per a comparar la distribució de variables categòriques es va utilitzar el test de chi quadrat o la prova exacta de Fisher i per a la comparació de mitjanes el test t de Student, considerant un valor de $p < 0,05$ estadísticament significatiu. Per a quantificar el risc relatiu es va aplicar el càlcul de l'Odds Ratio i de l'interval de confiança al 95%.

Taula 16. Inicialadors utilitzats per a l'amplificació dels gens *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speL*, *speM*, *ssa* i *smeZ*

Gen	Iniciador forward (5'-3')	Iniciador reverse (5'-3')	Posició ^a	Mida (pb)	T	Referència
<i>speA</i>	ACT(T/C)AAGAACC(A/G)AGAGATG(G/T) ^b	CTTTAT(T/C)CTTAG(G/A)TATGAAC ^b	273/628	356	50	Modificat de Chatellier <i>et al</i> ³⁷⁴
<i>speA</i>	CCAAGCCAACCTTCACAGATC	CTTTAT(T/C)CTTAG(G/A)TATGAAC ^b	106/628	523	50	Aquest estudi
<i>speB</i>	CAACCAGTTGTTAAATCTCT	CTAAGGTTTGTATGCCTACAA	436/1197	762	58,3	Modificat de Chatellier <i>et al</i> ³⁷⁴
<i>speC</i>	AAGTGACTCTAAGAAAGACA	TTGAGTATCAATGTTTAAATG	78/207	130	50	Chatellier <i>et al</i> ³⁷⁴
<i>speC</i>	TGTCTTATGAGGCCTCTC	ATCTGATCTAGTCCCTTC	245/630	386	50	Aquest estudi
<i>speF</i>	CGAAATTAGAAAAGAGGAC	GGCTGAGCAAAAGTGTGTG	-25/1168	1193	57,3	Aquest estudi
<i>speG</i>	GATGAAAATTTAAAAGATTTAA	GGGGGGAGAATAGCACTAGT	73/720	648	50	Modificat de Chatellier <i>et al</i> ³⁷⁴
<i>speH</i>	AATTCTTATAATACAACCAA	TTAGCTGATTGACACATCTA	97/711	615	52	Modificat de Chatellier <i>et al</i> ³⁷⁴
<i>speH</i>	CACATATTGATAAGAAAATCTACAGC	GAAATTGAGTTGAGTCTATTCTCTCG	23/688	666	59	Igwe <i>et al</i> ³⁷⁵
<i>speI</i>	ATGAGTAGTGTGGGAGTTATTA	TTATTTATTAATTTAACTAAG	1/678	678	50	Proft <i>et al</i> ³⁷⁶
<i>speI</i>	CTTTGGAGTATTCTCCTCCC	CTCTCTCTGTCACCATGTCC	212/593	382	59	Aquest estudi
<i>speJ</i>	GATAGTGAAAATATTAAGACG	GCTCCTATCTTATTTAGTCC	70/708	639	55	Modificat de Proft <i>et al</i> ³⁷⁶
<i>speJ</i>	GATAGTGAAAATATTAAGACG	TTATTTAGTCCAAAGGTAAATATC	70/699	630	55	Modificat de McCormick <i>et al</i> ³⁷⁷
<i>speJ</i>	GTTATAATAATCTTTCATGGGTACGG	CTTTCATGTTTATTGCCATTGATCGC	31/575	545	59	Igwe <i>et al</i> ³⁷⁵
<i>speL</i>	TTAGGATGGTTTCTGCGGAAGAGAC	TTCTCTTCTCGCTGAGCCGTG	89/684	596	60	Igwe <i>et al</i> ³⁷⁵
<i>speM</i>	GCTCTATACTACTGAGAGTGTC	CATATCAATCGTTTCATTATCTG	49/660	612	56	Igwe <i>et al</i> ³⁷⁵
<i>ssa</i>	AGTCAGCCTGACCCTACTCC	TAAGGTGAACCTCTATAGCT	82/772	691	57	Modificat de Chatellier <i>et al</i> ³⁷⁴
<i>ssa</i>	GTGCACAATTATTATCGATTAGTG	GGTGAACCTCTATAGCTATAGCTGAAG	47/769	723	60	Igwe <i>et al</i> ³⁷⁵
<i>smeZ</i>	TAGAAGTAGATAATAATTCC ^c	TTAGGAGTCAATTTCTATAT ^c	74/702	629	48,3	Modificat de Chatellier <i>et al</i> ³⁷⁴

^a Posició 5' de cada oligonucleòtid respecte al codó inicial de traducció de cada gen. No. accés GenBank: *speA*, *speA1*: X61560; *speA2*: X61561; *speA3*: X61568; *speA4*: X61573; *speA5*: AF029051; *speB*, L26161; *speC*, M35514; *speF*, AE006625; *speG*, AE006489; *speH*, AE006546; *speI*, AF438524 / AE006546; *speJ* AF321000 / AE006504; *speL*, AE010048; *speM*, AE010048; *ssa*, L29565; *smeZ*, AE010110. ^b Inicialadors utilitzats per a la seqüenciació del gen *speA*, marcats amb Cy5 a l'extrem 5'. ^c Inicialadors utilitzats per a la seqüenciació del gen *smeZ*, marcats amb Cy5 a l'extrem 5'.

Taula 18. Iniciadors i condicions utilitzats per a l'amplificació dels gens *erm(TR)*, *erm(B)*, *mef(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* i de les QRDR dels gens *parC*, *parE*, *gyrA* i *gyrB*

Gen	Iniciador	Seqüència (5'-3')	Posició ^a	Mida (pb)	Desnat. inicial	Desnat.	Híbrid.	Ext.	Cicles	Ext. final	Referència
<i>erm(TR)</i>	<i>ermTR.up</i>	TTATAACCGGCAAGGAGAAG	-26	678	94°C/5'	94°C/30''	60°C/30''	72°C/1'	30	72°C/10'	Modificat de Reinert <i>et al</i> ³⁷⁸
	<i>ermTR.dw</i>	GCTTCAGCACCTGTCTTAATTGAT	652								
<i>erm(B)</i>	<i>ermB.up</i>	CGAGTGAAAAAGTACTCAACC	38	617	94°C/5'	94°C/1'	60°C/1'	72°C/1,5'	30	72°C/10'	Weber <i>et al</i> ³⁷⁹
	<i>ermB.dw</i>	GGCGTGTTTCATTGCTTGATG	654								
<i>mef(A)</i>	<i>mefA.up</i>	CTATGACAGCCTCAATGCGT	-313	1435	94°C/5'	94°C/1'	60°C/1'	72°C/1,5'	30	72°C/10'	Modificat de Reinert <i>et al</i> ³⁷⁸
	<i>mefA.dw</i>	ACCGATTCTATCAGCAAAGA	1122								
<i>tet(M)</i>	<i>tetM.up</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG	106	406	94°C/5'	94°C/1'	64,5/1'	72°C/1,5'	35	72°C/10'	Ng <i>et al</i> ³⁸⁰
	<i>tetM.dw</i>	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	511								
<i>tet(O)</i>	<i>tetO.up</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	13	515	94°C/5'	94°C/1'	67/1'	72°C/1,5'	35	72°C/10'	Ng <i>et al</i> ³⁸⁰
	<i>tetO.dw</i>	TCCCACTGTTCCATATCGTCA	527								
<i>parC</i>	<i>parC.up</i>	GGATTGAAACCCGTTTCAGCG	106	364	94°C/5'	94°C/30''	55°C/30''	72°C/1'	30	72°C/10'	Aquest estudi
	<i>parC.dw</i>	CTGGTAAAACGGTGGGTTCT	469								
<i>parE</i>	<i>parE.up</i>	AAAGCGCGTGATGACTCACG	1189	290	94°C/5'	94°C/30''	55°C/30''	72°C/1'	30	72°C/10'	Aquest estudi
	<i>parE.dw</i>	TCAGTCCCCTCCAGCTCC	1478								
<i>gyrA</i>	<i>gyrA.up</i>	TCGTCGTATTCTCTATGGG	129	385	94°C/5'	94°C/30''	55°C/30''	72°C/1'	30	72°C/10'	Aquest estudi
	<i>gyrA.dw</i>	CCCTGTCGCTCCATTGACTA	513								
<i>gyrB</i>	<i>gyrB.up</i>	TTGGAAAACCCACAAGTTGC	1117	415	94°C/5'	94°C/30''	55°C/30''	72°C/1'	30	72°C/10'	Aquest estudi
	<i>gyrB.dw</i>	CATCGGCATCGGTCATGATA	1531								

^a Posició 5' de cada oligonucleòtid respecte al codó inicial de traducció de cada gen. No. accés GenBank: *erm(TR)*, AF002716; *erm(B)*, X52632; *mef(A)*, AF227521; *tet(M)*, X90939; *tet(O)*, Y07780; *parC*, AF220946; *parE*, AE006540; *gyrA*, AF220945; *gyrB*, AE006524.

4. RESULTATS

4.1. Característiques de la mostra

L'estudi inclou 126 soques de *S. pyogenes* obtingudes de 126 pacients entre gener de 1999 i juny de 2003. En funció del lloc d'aïllament i de les síndromes clíniques i complicacions associades a la infecció, 27 soques (21,4%) van correspondre a casos d'infecció invasiva i 99 soques (78,6%) a casos d'infecció no invasiva. La distribució de les soques en funció del tipus d'infecció i de l'any d'aïllament es mostra a la taula 19.

Taula 19. Distribució de les soques de *S. pyogenes* per tipus d'infecció i any d'aïllament

Any d'aïllament	Infeccions invasives	Infeccions no invasives
1999	5	19
2000	9	12
2001	4	15
2002	5	21
2003 (gener-juny)	4	32
Total	27	99

Totes les soques van mostrar els resultats esperats en les proves fenotípiques d'identificació amb l'excepció de dues soques (1,6%) que van presentar resistència a bacitracina.

4.2. Característiques demogràfiques i clíniques dels pacients

4.2.1. Infeccions invasives

La mitjana de l'edat dels pacients amb infecció invasiva va ser de 51,2 anys (mediana 55 anys; rang 10 mesos a 89 anys), registrant-se únicament tres pacients pediàtrics (10 mesos, 3 i 8 anys). Considerant la distribució per grups d'edat, la major proporció de casos es va observar en pacients d'edat superior a 65 anys (12 pacients, 44,4%), seguit d'un altre pic en el grup d'edat de 25-44 anys (7 pacients, 25,9%). (Figura 9). En quant a la distribució per sexes, 16 pacients (59,3%) eren homes i 11 pacients (40,7%) eren dones.

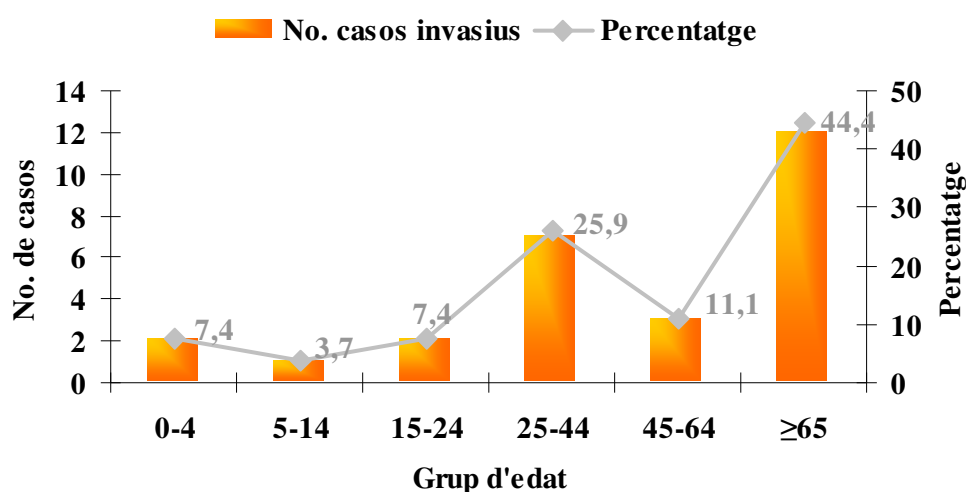


Figura 9. Distribució dels casos d'infecció invasiva per grups d'edat.

La major part dels pacients (17/27, 63%) van presentar bacterièmia. Entre els 10 pacients sense bacterièmia documentada, *S. pyogenes* es va aïllar del líquid articular (4), teixit de desbridament (4), líquid pleural (1), i material d'abscess de psoas (1). En un pacient la infecció va ser polimicrobiana i *S. pyogenes* es va aïllar conjuntament amb *S. pneumoniae*.

A la taula 20 es mostren les presentacions clíniques invasives objectivades i les característiques demogràfiques dels pacients. Les presentacions clíniques més freqüents dels casos invasius van correspondre a infeccions de la pell i teixits tous (11/27, 40,7%) en la forma de cel·lulitis (5), FN (4), tromboflebitis sèptica associada a la infecció del punt d'inserció del catèter (1) i sobreinfecció de varicel·la (1). Altres presentacions clíniques van incloure artritis (5), bacterièmia sense focus (4), pneumònia (3), meningitis (1), peritonitis (1), endocarditis (1) i abscess de psoas (1). En base als criteris de la definició de la SSTS, quatre dels casos invasius (14,8%) van ser catalogats com casos definitius de SSTS.

Dels casos invasius analitzats, 11 (40,7%) van requerir procediments quirúrgics i 6 (22,2%) l'admissió en unitats de cures intensives. La taxa de mortalitat va assolir l'11,1% (3 pacients), essent del 50% (2/4) en els casos de SSTS i del 4,3% (1/23) en la resta de casos invasius. La mortalitat es va registrar durant les primeres 24 hores després de la recollida de la mostra en dos pacients i als 7 dies en l'altre.

Taula 20. Característiques clíniques i demogràfiques dels 27 casos d'infecció invasiva

Presentació clínica	No. pacients	Edat Mitjana (rang)	No. pacients (%)		
			Sexe Home/Dona	SSTS	Mortalitat
Infeccions de la pell i teixits tous					
Cel·lulitis	5	67 (40-80)	1/4	-	-
FN	4	55,2 (38-78)	3/1	2	-
Altres ^a	2	2 (10 m-3)	1/1	-	-
Artritis	5	41,4 (20-89)	3/2	-	-
Bacterièmia sense focus	4	54 (8-88)	3/1	1	1
Pneumònia	3	61 (35-82)	3/-	-	-
Meningitis	1	79	1/-	-	1
Peritonitis	1	76	-/1	-	-
Endocarditis	1	45	1/-	1	1
Abscés de psoas	1	35	-/1	-	-
Total	27	51,2 (10 m-89)	16 (59,3)/11 (40,7)	4 (14,8)	3 (11,1)

^a Un pacient amb bacterièmia secundària a varicel·la i un pacient amb tromboflebitis sèptica secundària a infecció del lloc d'inserció del catèter.

A la taula 21 es detallen les característiques clíniques i demogràfiques corresponents als quatre casos de SSTS. Els pacients afectats de SSTS eren de sexe masculí, d'edats compreses entre els 38 i 55 anys i en tots els casos amb factors predisponents. La SSTS es va presentar com una complicació de FN en dos casos, en un cas d'endocarditis i en un cas de bacterièmia sense focus.

Taula 21. Característiques clíniques i demogràfiques dels quatre casos de SSTS

Data	Edat	Sexe	Clínica	Factor predisposant	Característiques de la SSTS	Lloc d'aïllament	Evolució
23/1/1999	45	H	Endocarditis	Immunosupressió	HI, AR, CID	Sang	Exitus
6/6/2002	55	H	Sèpsia	Enolisme	HI, AR, CID	Sang	Exitus
27/12/2002	40	H	FN	HIV, ADVP	HI, AR, N	Sang	Curació
1/3/2003	38	H	FN	HIV, ADVP	HI, AR, N	Sang	Curació

H, home; HI, hipotensió; AR, afectació renal; CID, coagulació intravascular disseminada; N, necrosi de teixits tous.

Únicament es va registrar un cas (3,7 %) d'infecció d'adquisició nosocomial que va correspondre a un pacient pediàtric amb tromboflebitis sèptica en el que el cultiu es va obtenir als quatre dies de l'ingrés

Es va obtenir informació sobre els factors de risc o malalties subjacents en 25 dels 27 pacients amb infecció invasiva. Com es mostra a la taula 22, 20 (80%) dels 25 pacients amb dades disponibles presentaven al menys un factor de risc. La pèrdua d'integritat de la barrera cutània per traumatismes o lesions prèvies va ser el factor més freqüent (8), seguit de l'ús de drogues per via parenteral i la infecció per HIV (4), neoplàsies (4), malaltia vascular perifèrica (3), immunosupressió (2), enolisme (2), diabetis (1) i varicel·la (1). Els quatre pacients HIV addictes a drogues per via parenteral presentaven edats compreses entre els 20 i el 40 anys i processos invasius consistents en FN associada a SSTS en dos casos, artritis i cel·lulitis. Tots els pacients de 45 anys o més amb dades disponibles van presentar al menys un factor de risc o malaltia subjacent, mentre que la major proporció de pacients sense factors de risc identificats es va concentrar en el grup d'edat de 25 a 44 anys (4 de 7 pacients). El cas de varicel·la va correspondre a un pacient pediàtric.

Taula 22. Factors predisposants en pacients amb infecció invasiva

Factor predisposant	No. pacients (%)
Un o més factors predisposants	20 (80)
Traumatismes cutanis	8 (40)
ADVP i infecció per HIV	4 (20)
Neoplàsies	4 (20)
Vasculopatia perifèrica	3 (15)
Immunosupressió ^a	2 (10)
Enolisme	2 (10)
Diabetis	1 (5)
Varicel·la	1 (5)

^aTractament amb corticoides per artritis reumatoide en un pacient i pancitopènia no filiada en un pacient.

4.2.2. Infeccions no invasives

En el grup de 99 pacients amb infecció no invasiva la mitjana de l'edat fou de 22,9 anys (mediana 8 anys; rang 1 mes a 91 anys), essent l'edat dels pacients significativament més baixa que en el grup invasiu ($p < 0,001$). La major proporció de

casos (54,5%) va correspondre als pacients d'edat inferior a 15 anys (34 pacients, 34,3% en el grup de 0-4 anys i 20 pacients, 20,2% en el grup de 5-14 anys), seguit d'un altre pic en el grup de pacients de 25-44 anys (19 pacients, 19,2%) (Figura 10). La proporció d'ambdós sexes va ser similar amb 49 (49,5%) homes i 50 (50,5%) dones.

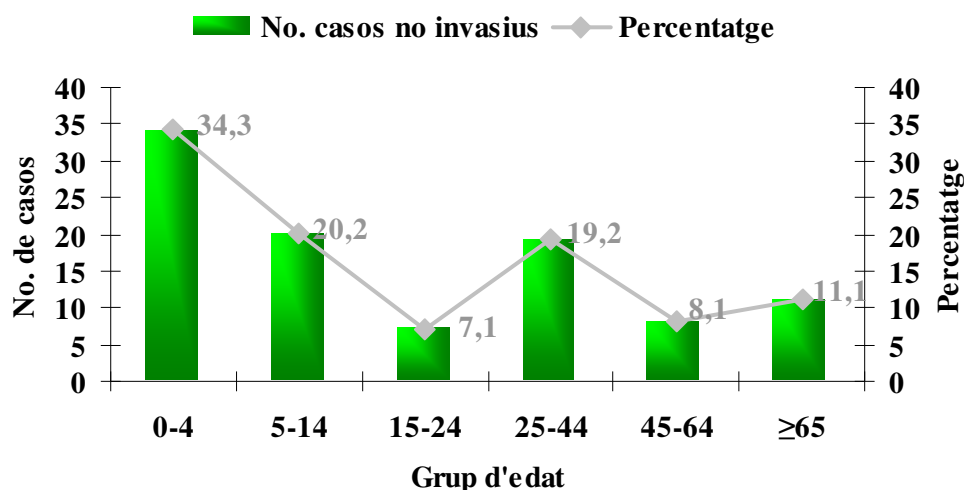


Figura 10. Distribució dels casos d'infecció no invasiva per grups d'edat.

Les presentacions clíniques o llocs d'aïllament dels casos no invasius van incloure infeccions cutànies superficials (infeccions de ferides i impetigen) (37), infeccions genitals (20), otitis (19), abscessos (11), faringitis (10), conjuntivitis (1) i orina (1) (Taula 23).

Taula 23. Presentacions clíniques i característiques demogràfiques dels 99 casos no invasius

Presentació clínica/ lloc d'aïllament	No. pacients	Edat Mitjana (Rang)	Sexe Home/Dona
Infeccions cutànies superficials ^a	37	28,2 (1 m-91)	26/11
Infeccions genitals ^b	20	21,3 (3-73)	3/17
Otitis	19	3,5 (1-15)	11/8
Abscessos ^c	11	47 (3-90)	5/6
Faringitis ^d	10	18 (1-68)	3/7
Conjuntivitis	1	1	1/-
Orina	1	29	-/1
Total	99	22,9 (1 m-91)	49(49,5)/50 (50,5)

^a Infecció de ferides 18 pacients, impetigen 13 pacients, dermatitis sobreinfectada 5 pacients, sobreinfecció de varicel·la 1 pacient. ^b Vulvovaginitis 17 pacients, balanitis 3 pacients. ^c Abscessos cutanis 10 pacients, abscessos amigdalars 1 pacient. ^d Dos pacients van presentar escarlatina.

En 24 casos (24,2%) la infecció va ser polimicrobiana. Els microorganismes aïllats conjuntament amb *S. pyogenes* van ser *Staphylococcus aureus* en 22 pacients (20 infeccions cutànies i dues genitals), *Proteus mirabilis* (infecció genital) i *Serratia marcescens* (infecció de ferida).

4.2.3. Distribució estacional

Atenent la distribució estacional, la major proporció de casos d'infecció invasiva va correspondre al període d'hivern i primavera, principalment entre els mesos de gener a juny (24 de 27 casos), no trobant-se cap cas durant els mesos de juliol a setembre (Figura 11). Les infeccions no invasives van mostrar un patró estacional similar amb una disminució en el nombre de casos durant els mesos estivals.

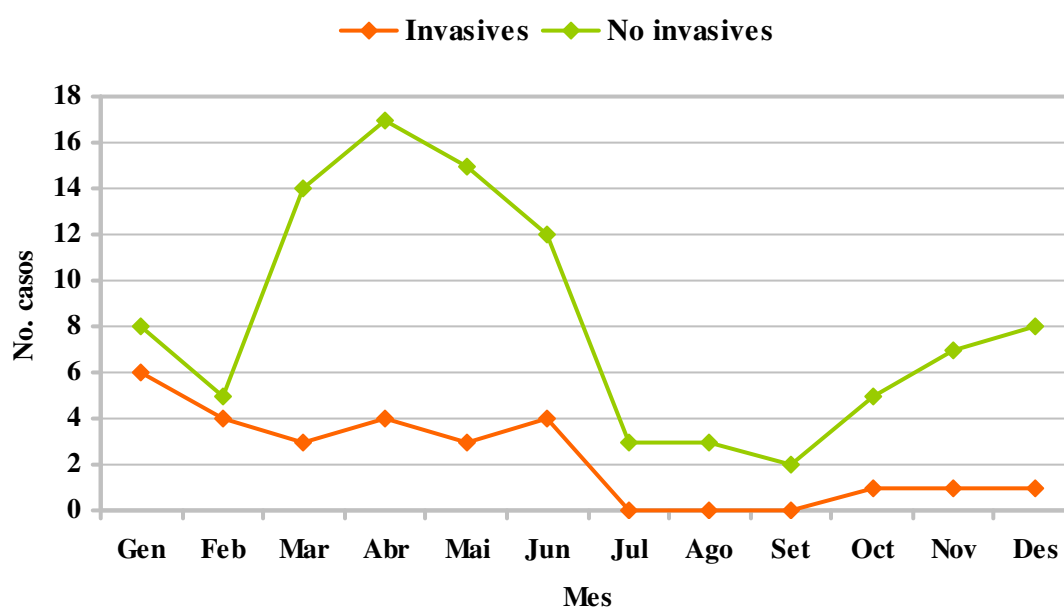


Figura 11. Distribució mensual acumulada dels casos d'infecció invasiva i no invasiva.

4.3. Distribució de tipus *emm*

En la col·lecció de 126 soques de *S. pyogenes* es van identificar un total de 29 tipus *emm*, dels quals *emm1* (17,5%) va ser el més prevalent, seguit per *emm3* (8,7%), *emm4* (8,7%), *emm12* (7,1%), *emm28* (7,1%), *emm11* (6,3%) i *emm77* (6,3%) (Taula 24). Aquest set tipus *emm* van correspondre al 61,9% del total de soques.

La major part de les soques (90 soques, 71,4%) van presentar tipus *emm* amb seqüències idèntiques a les seqüències de referència del CDC (designades per “.0”). Set tipus *emm* (*emm3*, *emm18*, *emm25*, *emm29*, *emm43*, *emm49* i *emm83*) es van trobar representats exclusivament per variants al·lèliques o subtipus de les respectives seqüències de referència. Dintre del mateix tipus, únicament es va trobar heterogeneïtat de subtipus en soques *emm1* (*emm1.0*, *emm1.25*), *emm3* (*emm3.1*, *emm3.2*), *emm4* (*emm4.0*, *emm4.2*) i *emm12* (*emm12.0*, *emm12.1*, *emm12.7*, *emm12.18*, *emm12.27*).

Taula 24. Tipus i subtipus *emm* de les 126 soques de *S. pyogenes* estudiades

Tipus <i>emm</i>	Subtipus <i>emm</i>	No. (%) de soques Total
1	1.0, 1.25^a	22 (17,5)
2	2.0	4 (3,2)
3	3.1, 3.2^a	11 (8,7)
4	4.0, 4.2^a	11 (8,7)
6	6.0	3 (2,4)
9	9.0	4 (3,2)
11	11.0	8 (6,3)
12	12.0, 12.1, 12.7, 12.18, 12.27^a	9 (7,1)
18	18.9	1 (0,8)
22	22.0	2 (1,6)
25	25.2	4 (3,2)
28	28.0	9 (7,1)
29	29.2	1 (0,8)
43	43.5	1 (0,8)
44/61	44/61.0	2 (1,6)
49	49.3	1 (0,8)
50	50.0	3 (2,4)
58	58.0	2 (1,6)
59	59.0	2 (1,6)
63	63.0	1 (0,8)
64	64.0	2 (1,6)
70	70.0	1 (0,8)
75	75.0	3 (2,4)
77	77.0	8 (6,3)
81	81.0	1 (0,8)
83	83.4	1 (0,8)
87	87.0	3 (2,4)
89	89.0	5 (4,0)
<i>st11014</i>	<i>st11014.0</i>	1 (0,8)

Es mostren en negreta els tipus i subtipus *emm* més prevalents (percentatge $\geq 5\%$)

^aEl nombre de soques de cada subtipus és el següent: *emm1.0* 11 soques, *emm1.25* 11 soques, *emm3.1* 10 soques, *emm3.2* 1 soca, *emm12.0* 5 soques, *emm12.1* 1 soca, *emm12.7* 1 soca, *emm12.18* 1 soca i *emm12.27* 1 soca.

En aquest estudi s'han identificat tres subtipus no descrits prèviament que han estat designats com *emm1.25*, *emm12.27* i *emm83.4* i figuren al GenBank amb els números d'accés AY686603, AY742805 i AY742806, respectivament. Aquests subtipus difereixen de les respectives seqüències de referència *emm1.0*, *emm12.0* i *emm83.0* per la presència d'una a tres mutacions puntuals no sinònimes en la regió hipervariable que codifica els primers 50 aminoàcids de la proteïna M madura (Taula 25).

Taula 25. Canvis aminoacídics dels nous subtipus *emm* identificats respecte a les seqüències de referència

Subtipus <i>emm</i> ^a	Seqüència aminoacídica (1-50 primers AA de la proteïna M)
<i>emm1.0</i>	1 NGDGNPREVIEDLAANNPAIQNIRLRHENKDLKARLENAMEVAGRDFKRA 50
<i>emm1.25</i>	1G..... 50
<i>emm12.0</i>	1 DHSDLVAEKQRLEDLGQKFERLKQRSELYLQQYYDNKSNKYKGDWYVQQL 50
<i>emm12.27</i>	1K...G..... 50
<i>emm83.0</i>	1 DNPRFTDAHNAVTVQGRVPLQNLHEMDKNGKLRSENEELKADLHKKEQE 50
<i>emm83.4</i>	1Y.....H.....Q..... 50

^a Els subtipus es designen amb un número precedit del punt decimal i es defineixen com qualsevol alteració en els primers 50 AA de la proteïna M madura respecte a la seqüència de la soca de referència del CDC designada com “.0”.

4.3.1. Distribució de tipus *emm* per any d'aïllament

La distribució anual dels tipus *emm* detectats es mostra a la taula 26. La major part dels tipus *emm* més freqüents es van mantenir al llarg de tot el període estudiat amb algunes fluctuacions, especialment en el cas del tipus *emm3.1*. Cal destacar l'aparició a partir de l'any 2002 dels tipus *emm25.2*, *emm11.0* i del nou subtipus *emm1.25*, arribant aquests dos últims a ser els més prevalents durant els anys 2002 i 2003 (gener a juny).

Taula 26. Distribució de subtipus *emm* per any d'aïllament

Subtipus <i>emm</i>	No. soques (%)					Total
	1999	2000	2001	2002	2003 (gener-juny)	
1.0	3 (12,5)	2 (9,5)	2 (10,5)	2 (7,7)	2 (5,5)	11
1.25	-	-	-	5 (19,2)	6 (16,7)	11
2.0	1 (4,2)	-	1 (5,3)	1 (3,8)	1 (2,8)	4
3.1	2 (8,3)	4 (19)	-	1 (3,8)	3 (8,3)	10
3.2	-	-	-	-	1 (2,8)	1
4.0	2 (8,3)	2 (9,5)	1 (5,3)	2 (7,7)	3 (8,3)	10
4.2	-	-	-	-	1 (2,8)	1
6.0	-	1 (4,8)	1 (5,3)	1 (3,8)	-	3
9.0	2 (8,3)	1 (4,8)	-	-	1 (2,8)	4
11.0	-	-	-	3 (11,5)	5 (13,9)	8
12.0	2(8,3)	1 (4,8)	1 (5,3)	-	1 (2,8)	5
12.1	-	-	-	-	1 (2,8)	1
12.7	-	-	1 (5,3)	-	-	1
12.18	-	1 (4,8)	-	-	-	1
12.27	-	-	-	-	1 (2,8)	1
18.9	-	-	1 (5,3)	-	-	1
22.0	2 (8,3)	-	-	-	-	2
25.2	-	-	-	3 (11,5)	1 (2,8)	4
28.0	2 (8,3)	-	3 (15,8)	2 (7,7)	2 (5,5)	9
29.2	-	-	-	1 (3,8)	-	1
43.5	1 (4,2)	-	-	-	-	1
44/61.0	-	1 (4,8)	1 (5,3)	-	-	2
49.3	-	-	-	-	1 (2,8)	1
50.0	-	2 (9,5)	-	-	1 (2,8)	3
58.0	-	1 (4,8)	-	-	1 (2,8)	2
59.0	-	-	2 (10,5)	-	-	2
63.0	-	-	-	1 (3,8)	-	1
64.0	-	2 (9,5)	-	-	-	2
70.0	1 (4,2)	-	-	-	-	1
75.0	1 (4,2)	-	2 (10,5)	-	-	3
77.0	3 (12,5)	2 (9,5)	1 (5,3)	2 (7,7)	-	8
81.0	-	-	-	-	1 (2,8)	1
83.4	1(4,2)	-	-	-	-	1
87.0	-	-	2 (10,5)	1 (3,8)	-	3
89.0	1 (4,2)	-	-	1 (3,8)	3 (8,3)	5
<i>st11014.0</i>	-	1 (4,8)	-	-	-	1
Total	24	21	19	26	36	126

4.3.2. Distribució de tipus *emm* en funció del tipus d'infecció i de variables demogràfiques dels pacients

En les 27 soques aïllades d'infeccions invasives es van identificar un total de 15 tipus *emm*. Tots aquests tipus *emm* excepte dos representats per soques úniques es van trobar també en les soques aïllades d'infeccions no invasives (Taula 27). Els tipus més prevalents en les soques invasives van ser *emm3* (14,8%), *emm4* (11,1%), *emm25* (11,1%), *emm77* (11,1%), *emm1* (7,4%), *emm6* (7,4%) i *emm9* (7,4%). En les 99 soques no invasives es van detectar 27 tipus *emm*, essent els més prevalents *emm1* (20,2%), *emm4* (8,1%), *emm12* (8,1%), *emm28* (8,1%), *emm3* (7,1%) i *emm11* (7,1%).

Taula 27. Distribució de tipus *emm* en les soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives

Tipus <i>emm</i>	No. soques (%)		
	Invasives	No invasives	Total
1	2 (7,4)	20 (20,2)	22 (17,5)
2	1 (3,7)	3 (3,0)	4 (3,2)
3	4 (14,8)	7 (7,1)	11 (8,7)
4	3 (11,1)	8 (8,1)	11 (8,7)
6	2 (7,4)	1 (1,0)	3 (2,4)
9	2 (7,4)	2 (2,0)	4 (3,2)
11	1 (3,7)	7 (7,1)	8 (6,3)
12	1 (3,7)	8 (8,1)	9 (7,1)
18	1 (3,7)	-	1 (0,8)
22	1 (3,7)	1 (1,0)	2 (1,6)
25	3 (11,1)	1 (1,0)	4 (3,2)
28	1 (3,7)	8 (8,1)	9 (7,1)
29	-	1 (1,0)	1 (0,8)
43	-	1 (1,0)	1 (0,8)
44/61	-	2 (2,0)	2 (1,6)
49	-	1 (1,0)	1 (0,8)
50	1 (3,7)	2 (2,0)	3 (2,4)
58	-	2 (2,0)	2 (1,6)
59	-	2 (2,0)	2 (1,6)
63	-	1 (1,0)	1 (0,8)
64	-	2 (2,0)	2 (1,6)
70	-	1 (1,0)	1 (0,8)
75	-	3 (3,0)	3 (2,4)
77	3 (11,1)	5 (5,1)	8 (6,3)
81	-	1 (1)	1 (0,8)
83	1 (3,7)	-	1 (0,8)
87	-	3 (3,0)	3 (2,4)
89	-	5 (5,1)	5 (4,0)
<i>st11014</i>	-	1 (1,0)	1 (0,8)

Encara que les freqüències relatives dels diferents tipus *emm* van variar en infeccions invasives o no invasives, no es va observar cap tipus *emm* associat de forma significativa a infeccions invasives amb la única excepció del tipus *emm25.2* ($p = 0,03$; OR 12,25 [IC 95% 1,2-123]) però amb un interval de confiança molt ampli degut al baix nombre de soques. Cal remarcar que totes les soques invasives *emm25.2* van ser aïllades de pacients ADVP i probablement formaven part d'un brot local descrit a la ciutat de Barcelona en pacients ADVP durant el mateix període³⁸¹.

La distribució de tipus *emm* en cadascuna de les manifestacions clíniques invasives es mostra a la taula 28. No es van observar tipus *emm* predominants en les sis soques aïllades d'infeccions invasives greus (FN i/o SSTS), que contràriament van presentar una elevada diversitat, incloent dues soques del tipus *emm25.2* i una soca de cadascun dels tipus *emm1.25*, *emm4.0*, *emm11.0* i *emm22.0*. Les soques procedents dels tres pacients amb evolució fatal van pertànyer als tipus *emm1.25*, *emm3.1* i *emm22.0*.

Taula 28. Distribució de tipus *emm* en les presentacions clíniques invasives

Presentació clínica	No. pacients	Subtipus <i>emm</i> (No. soques) ^a
Cel·lulitis	5	<i>emm9.0</i> , <i>emm12.0</i> , <i>emm25.2</i> , <i>emm50.0</i> , <i>emm77.0</i>
Artritis	5	<i>emm4.0</i> (2), <i>emm9.0</i> , <i>emm77.0</i> , <i>emm83.4</i>
FN	4	<i>emm25.2</i> (2) ^b , <i>emm4.0</i> , <i>emm11.0</i>
Bacterièmia sense focus	4	<i>emm1.25</i> (2) ^{b,c} , <i>emm6.0</i> , <i>emm77.0</i>
Pneumònia	3	<i>emm3.1</i> (2), <i>emm18.9</i>
Meningitis	1	<i>emm3.1</i> ^c
Peritonitis	1	<i>emm3.1</i>
Endocarditis	1	<i>emm22.0</i> ^{b,c}
Abscés de psoas	1	<i>emm28.0</i>
Bacterièmia amb varicel·la	1	<i>emm6.0</i>
Tromboflebitis sèptica	1	<i>emm2.0</i>

^a S'indica el nombre de soques dels tipus *emm* representats per més d'una soca. ^b Tipus *emm* de les soques aïllades dels casos de SSTS. ^c Tipus *emm* de les tres soques aïllades dels pacients amb evolució fatal.

Tal com es mostra a la taula 29, en les infeccions no invasives alguns dels tipus més comuns com *emm1*, *emm3*, *emm4* i *emm12* es van trobar tant en infeccions cutànies, genitals com del tracte respiratori superior, destacant el predomini de *emm1* en infeccions òtiques on representaren el 52,6% de les soques aïllades en aquesta

localització. Els tipus *emm11*, *emm28* i *emm77* es van trobar principalment en infeccions cutànies i genitals.

Taula 29. Distribució de tipus *emm* en en les presentacions clíniques no invasives

Tipus <i>emm</i>	No. soques (%)						Total
	Cutani	Genital	Òtic	Abscés	Faringi	Altres	
1	5 (13,5)	2 (10)	10 (52,6)	1 (9,1)	-	2 (100)	20
2	2 (5,4)	1 (5)	-	-	-	-	3
3	-	3 (15)	2 (10,5)	1 (9,1)	1 (10)	-	7
4	3 (8,1)	2 (10)	2 (10,5)	-	1 (10)	-	8
6	-	-	1 (5,3)	-	-	-	1
9	-	1 (5)	-	1 (9,1)	-	-	2
11	4 (10,8)	2 (10)	-	-	1 (10)	-	7
12	1 (2,7)	2 (10)	1 (5,3)	2 (18,2)	2 (20)	-	8
22	-	-	-	1 (9,1)	-	-	1
25	1 (2,7)	-	-	-	-	-	1
28	4 (10,8)	3 (15)	-	1 (9,1)	-	-	8
29	-	-	1 (5,3)	-	-	-	1
43	1 (2,7)	-	-	-	-	-	1
44/61	-	-	1 (5,3)	1 (9,1)	-	-	2
49	1 (2,7)	-	-	-	-	-	1
50	1 (2,7)	-	-	1 (9,1)	-	-	2
58	-	-	-	1 (9,1)	1 (10)	-	2
59	2 (5,4)	-	-	-	-	-	2
63	1 (2,7)	-	-	-	-	-	1
64	2 (5,4)	-	-	-	-	-	2
70	1 (2,7)	-	-	-	-	-	1
75	-	2 (10)	1 (5,3)	-	-	-	3
77	3 (8,1)	2 (10)	-	-	-	-	5
81	-	-	-	-	1 (10)	-	1
87	2 (5,4)	-	-	1 (9,1)	-	-	3
89	2 (5,4)	-	-	-	3 (30)	-	5
<i>st11014</i>	1 (2,7)	-	-	-	-	-	1
Total	37	20	19	11	10	2	99

Els resultats de la distribució de tipus *emm* per grups d'edat es detallen a la taula 30. La figura 12 mostra la distribució de les soques dels tipus *emm* més representats en els casos invasius i no invasius en funció del tipus d'infecció i del grup d'edat. Els tipus *emm* més prevalents en població pediàtrica (0-14 anys) van ser *emm1*, *emm12*, *emm4*, *emm3* i *emm11* que representaren en conjunt el 66,7% (38 de 57 soques) i es van associar exclusivament a processos no invasius en aquest grup de població. En el grup

d'adults majors de 65 anys aquests mateixos tipus *emm* representaren el 47,8% (11 de 23 soques), mentre que en adults de 15-64 anys la seva freqüència va ser del 26,1% (12 de 46 soques), trobant-se en ambdós casos tant en infeccions invasives com no invasives. Cal destacar l'especial prevalença de les soques *emm3* juntament amb *emm77* en adults d'edat avançada on es van trobar associades majoritàriament a infeccions invasives, i la distribució predominant de soques invasives *emm25* en el grup d'edat de 25-44 anys.

Taula 30. Distribució de tipus *emm* per grup d'edat

Tipus <i>emm</i>	No. soques (%)					
	0-4	5-14	15-24	25-44	45-64	≥65
1	9 (25)	6 (28,6)	-	3 (11,5)	2 (18,2)	2 (8,7)
2	1 (2,8)	2 (9,5)	-	1 (3,8)	-	-
3	3 (8,3)	2 (9,5)	-	-	1 (9,1)	5 (21,7)
4	6 (16,7)	-	2 (22,2)	2 (7,7)	-	1 (4,3)
6	2 (5,5)	1 (4,8)	-	-	-	-
9	-	-	-	2 (7,7)	2 (18,2)	-
11	4 (11,1)	1 (4,8)	-	1 (3,8)	-	2 (8,7)
12	3 (8,3)	4 (19)	-	1 (3,8)	-	1 (4,3)
18	-	-	-	1 (3,8)	-	-
22	1 (2,8)	-	-	-	1 (9,1)	-
25	-	-	-	3 (11,5)	-	1 (4,3)
28	1 (2,8)	1 (4,8)	1 (11,1)	2 (7,7)	2 (18,2)	2 (8,7)
29	-	1 (4,8)	-	-	-	-
43	-	-	-	1 (3,8)	-	-
44/61	-	-	1 (11,1)	-	1 (9,1)	-
49	-	-	-	1 (3,8)	-	-
50	-	-	-	1 (3,8)	-	2 (8,7)
58	-	-	1 (11,1)	-	-	1 (4,3)
59	-	-	1 (11,1)	1 (3,8)	-	-
63	-	-	-	-	1 (9,1)	-
64	1 (2,8)	-	1 (11,1)	-	-	-
70	-	-	-	1 (3,8)	-	-
75	2 (5,5)	-	-	1 (3,8)	-	-
77	2 (5,5)	1 (4,8)	-	2 (7,7)	-	3 (13)
81	-	-	1 (11,1)	-	-	-
83	-	-	1 (11,1)	-	-	-
87	-	-	-	1 (3,8)	-	2 (8,7)
89	1 (2,8)	2 (9,5)	-	1 (3,8)	-	1 (4,3)
<i>st11014</i>	-	-	-	-	1 (9,1)	-
Total	36	21	9	26	11	23

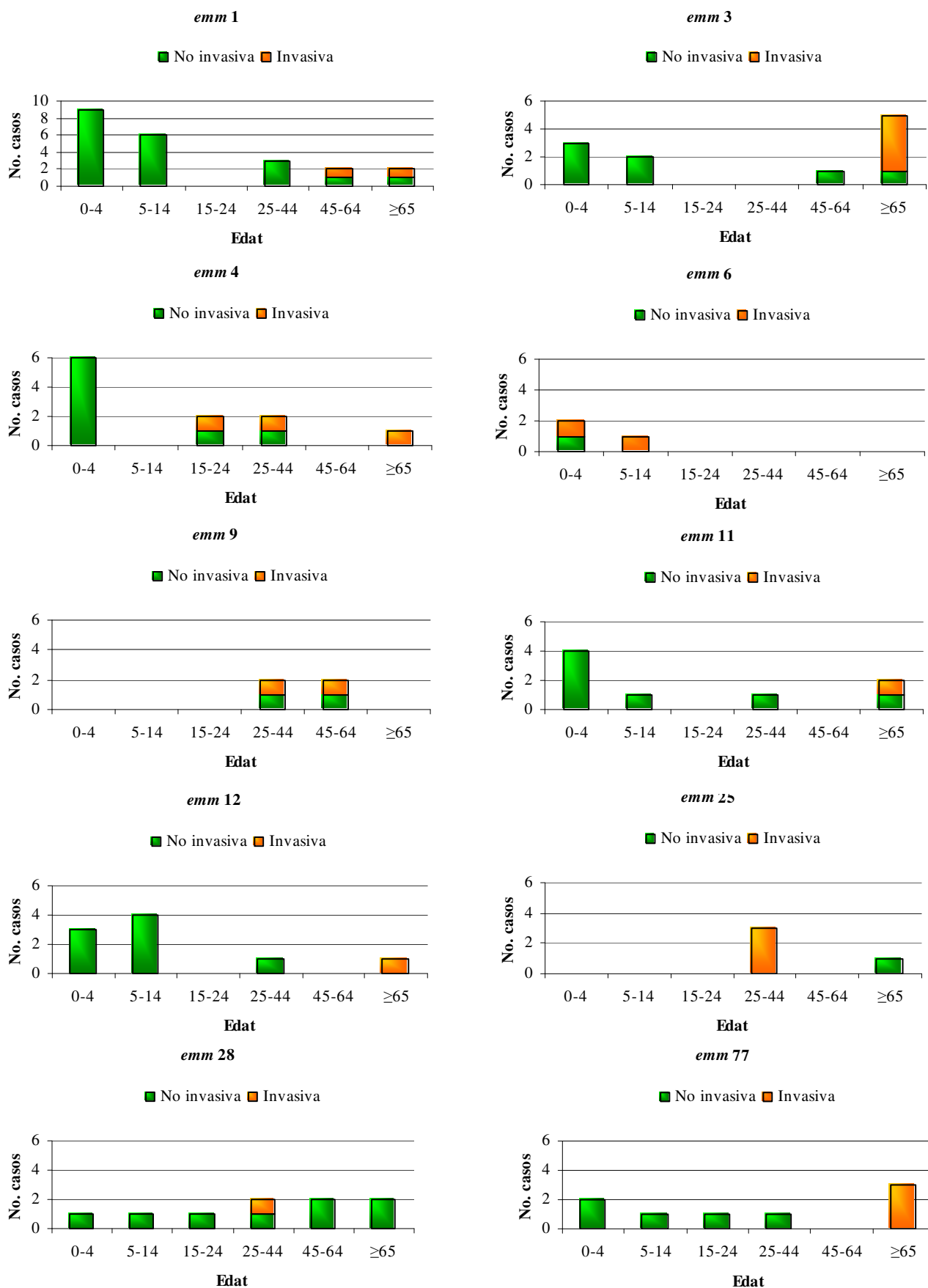


Figura 12. Distribució de les soques pertanyents als tipus *emm1*, *emm3*, *emm4*, *emm6*, *emm9*, *emm11*, *emm12*, *emm25*, *emm28* i *emm77* per grup d'edat i tipus d'infecció.

4.4. Distribució dels gens *speA-C*, *speF-J*, *speL*, *speM*, *ssa* i *smeZ*

Els superantígens (SAGs) es consideren importants mediadors de les infeccions invasives greus en virtut de la seva potent activitat immunoestimuladora. Donat que la major part de SAGs estan codificats per bacteriòfags i subjectes per tant a la transferència gènica horitzontal mitjançant transducció, l'estudi de la seva distribució representa una eina epidemiològica addicional per tal d'explorar la heterogeneïtat genòmica i la possible correlació entre el contingut d'exotoxines i el tipus d'infecció.

Es va efectuar la detecció dels gens *speA-C*, *speF-J*, *speL*, *speM*, *ssa* i *smeZ* mitjançant PCR i es van determinar les variants al·lèliques de *speA* i *smeZ*. La freqüència en el total de soques de cadascun dels gens analitzats es mostra a la taula 31. Entre els gens de codificació cromosòmica, *speB*, *speF*, *speG* i *smeZ* es van trobar a freqüències del 84,1% al 100%, mentre que *speJ* es va identificar en el 33,3% de les soques. Els SAGs codificats per bacteriòfags es van detectar a freqüències variables, essent el més abundant *speC* present en el 44,4% de les soques i el menys abundant *speL* present en el 8,7% de les soques

Taula 31. Distribució dels gens *speA-C*, *speF-J*, *speL*, *speM*, *ssa* i *smeZ* en les 126 soques de *S. pyogenes* estudiades

Gen	No. soques (%)
Cromosòmic	
<i>speB</i>	126 (100)
<i>speF</i>	126 (100)
<i>speG</i>	106 (84,1)
<i>speJ</i>	42 (33,3)
<i>smeZ</i> ^a	88 (91,7)
Associat a bacteriòfags	
<i>speA</i>	40 (31,7)
<i>speC</i>	56 (44,4)
<i>speH</i>	30 (23,8)
<i>speI</i>	24 (19)
<i>speL</i>	11 (8,7)
<i>speM</i>	41 (32,5)
<i>ssa</i>	36 (28,6)

^a La detecció del gen *smeZ* només es va realitzar en 96 soques.

4.4.1. Distribució dels al·lels *speA* i *smeZ*

L'anàlisi de la seqüència del gen *speA* va revelar la presència de quatre al·lels prèviament descrits, amb una distribució limitada de *speA2*, *speA3* i *speA4* en totes les soques *emm1*, *emm3* i *emm6*, respectivament (Taula 32). Addicionalment *speA2* es va trobar en una de les vuit soques *emm28*. L'al·lel *speA1* es va trobar en soques úniques de tres tipus *emm* diferents (*emm4.2*, *emm18.9* i *emm49.3*).

Taula 32. Distribució dels al·lels del gen *speA* en funció del tipus *emm*

Al·lel <i>speA</i>	Subtipus <i>emm</i>
<i>speA1</i>	<i>emm4.2</i> , <i>emm18.9</i> , <i>emm49.3</i>
<i>speA2</i>	<i>emm1.0</i> , <i>emm1.25</i> , <i>emm28.0</i>
<i>speA3</i>	<i>emm3.1</i> , <i>emm3.2</i>
<i>speA4</i>	<i>emm6.0</i>

L'anàlisi de la seqüència del gen *smeZ* va permetre identificar 23 al·lels, cinc dels quals designats com *smeZ-35* a *smeZ-39* es va identificar per primera vegada en aquest estudi i figuren al GenBank amb els números d'accés AY965265, AY965878, AY965879, DQ001538 i DQ001539, respectivament.

Es va trobar una forta associació entre l'al·lel *smeZ* i el tipus *emm* amb algunes excepcions (Taula 33). Les soques del mateix tipus *emm* van presentar el mateix al·lel *smeZ* excepte les soques del tipus *emm50* en les que es van detectar dos al·lels diferents (*smeZ-33* i *smeZ-35*) i l'única soca *emm4.2* que contenia el nou al·lel *smeZ-39* a diferència de les de soques *emm4.0* en les que es va detectar l'al·lel *smeZ-8*. Per altra banda, cinc al·lels *smeZ* (*smeZ-3*, *smeZ-4*, *smeZ-13*, *smeZ-17* i *smeZ-37*) es van trobar en soques de tipus *emm* diferents. Addicionalment la detecció del gen *smeZ* va donar resultats negatius en totes les soques analitzades dels tipus *emm2*, *emm81*, *emm63* i en una de les dues soques de cadascun dels tipus *emm44/61* i *emm64*.

Taula 33. Distribució dels al·lels del gen *smeZ* en funció del tipus *emm*

Al·lel <i>smeZ</i>	Subtipus <i>emm</i>
1spy ^a	<i>emm1.0, emm1.25</i>
3spy ^a	<i>emm3.1, emm3.2</i>
6spy ^a	<i>emm6.0</i>
<i>smeZ-3</i>	<i>emm12.0, emm12.1, emm12.7, emm12.18, emm12.27, emm49.3</i>
<i>smeZ-4</i>	<i>emm44/61.0, emm64.0</i>
<i>smeZ-5</i>	<i>emm87.0</i>
<i>smeZ-7</i>	<i>emm43.5</i>
<i>smeZ-8</i>	<i>emm4.0</i>
<i>smeZ-12</i>	<i>emm59.0</i>
<i>smeZ-13</i>	<i>emm89.0, emm18.9</i>
<i>smeZ-15</i>	<i>emm83.4</i>
<i>smeZ-16</i>	<i>emm28.0</i>
<i>smeZ-17</i>	<i>emm70.0, emm29.2</i>
<i>smeZ-22</i>	<i>emm22.0</i>
<i>smeZ-28</i>	<i>emm58.0</i>
<i>smeZ-29</i>	<i>emm75.0</i>
<i>smeZ-30/31</i>	<i>emm11.0</i>
<i>smeZ-33</i>	<i>emm50.0</i>
<i>smeZ-35</i>	<i>emm50.0</i>
<i>smeZ-36</i>	<i>emm9.0</i>
<i>smeZ-37</i>	<i>emm77.0, emm25.2</i>
<i>smeZ-38</i>	<i>st11014.0</i>
<i>smeZ-39</i>	<i>emm4.2</i>

^a Les seqüències nucleotídiques dels al·lels *smeZ* de les soques *emm1*, *emm3* i *emm6* són idèntiques a les de les soques M1 SF370 (AE004092), M3 MGAS315 (AE014074) i M6 MGAS10394 (CP000003), respectivament. No ha estat atribuïda una designació específica a aquests al·lels.

4.4.2. Distribució dels SAGs en soques invasives i no invasives

A la taula 34 es mostra la freqüència dels SAGs analitzats en les soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives. La recerca de diferències en la distribució de cadascun dels gens analitzats entre les soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives va revelar que únicament *ssa* presentava una freqüència significativament superior en les soques aïllades d'infeccions invasives ($p = 0,03$; OR 2,50 [IC 95% 1,27-4,91]). Per altra banda, *speJ* va mostrar una associació estadísticament significativa a infeccions no invasives ($p = 0,02$; OR 0,27 [IC 95% 0,09-0,87]).

Taula 34. Distribució dels gens *speA*, *speC*, *speG-J*, *speL*, *speM*, *ssa* i *smeZ* en les soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives

Gen	No. soques (%)		P	OR (IC 95%)
	Invasives	No invasives		
<i>speA</i>	9 (33,3)	31 (31,3)	0,84	1,09 (0,44-2,71)
<i>speC</i>	16 (59,3)	40 (40,4)	0,08	2,15 (0,90-5,10)
<i>speG</i>	22 (81,5)	84 (84,8)	0,67	0,78 (0,25-2,39)
<i>speH</i>	6 (22,2)	24 (24,2)	0,82	0,89 (0,32-2,46)
<i>speI</i>	5 (18,5)	19 (19,2)	0,93	0,96 (0,25-3,7)
<i>speJ</i>	4 (14,8)	38 (38,4)	0,02	0,27 (0,09-0,87)
<i>speL</i>	4 (14,8)	7 (7,1)	0,20	2,28 (0,61-8,47)
<i>speM</i>	10 (37)	31 (31,3)	0,57	1,29 (0,53-3,13)
<i>ssa</i>	12 (44,4)	24 (24,2)	0,03	2,50 (1,27-4,91)
<i>smeZ</i> ^a	20 (95,2)	68 (90,7)	0,50	2,05 (0,23-17,74)

^aLa detecció de *smeZ* només es va realitzar en 96 soques (21 invasives i 75 no invasives).

Es van analitzar els patrons de SAGs per adreçar la qüestió de si les soques procedents d'infeccions invasives presentaven un patró característic o comú que permetés definir una soca o un conjunt de soques “hipervirulentes”. Tal com es mostra a la taula 35, les soques aïllades dels casos invasius van presentar una elevada diversitat, identificant-se 15 patrons diferents en les 27 soques.

Tots els patrons de SAGs de les soques aïllades d'infeccions invasives amb l'excepció de tres corresponents a soques úniques es van identificar en soques aïllades d'infeccions no invasives. Cal remarcar també que les sis soques aïllades dels casos de FN i/o SSTS van presentar patrons diferents.

Taula 35. Patrons de SAGs de les 27 soques aïllades d'infeccions invasives

No. soques (%)	Patró de SAGs								
	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>
4 (14,8)	+	-	+	-	-	-	-	+	+
3 (11,1)	-	+	-	-	-	-	-	-	+
2 (7,4)	+	-	+	-	-	+	-	-	-
2 (7,4)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
2 (7,4)	-	+	+	+	+	-	-	-	-
2 (7,4)	-	+	+	-	-	-	+	+	-
2 (7,4)	-	-	+	+	+	-	-	-	+
2 (7,4)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2 (7,4)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1 (3,7)	+	+	+	-	-	+	+	+	-
1 (3,7)	-	-	+	-	-	-	+	+	+
1 (3,7)	-	+	+	+	+	-	-	-	+
1 (3,7)	-	+	+	-	-	+	-	-	-
1 (3,7)	-	+	-	+	-	-	-	-	+
1 (3,7)	-	+	-	-	-	-	-	-	-

+, presència; -, absència. S'indiquen colorejats els patrons corresponents a les sis soques aïllades dels casos de SSTS i/o FN.

Els patrons de SAGs es van trobar fortament associats al tipus *emm* independentment del tipus d'infecció (Taula 36). Així, les soques del mateix tipus *emm* van presentar un patró comú (tipus *emm* 1, 3, 6, 9, 59, 64, 87 i 89) o un patró numèric predominant amb variacions consistents majoritàriament en la presència o absència d'un o dos gens en comparació amb el patró predominant. La variabilitat més elevada en soques d'un mateix tipus *emm* es va observar en la soca *emm4.2* que diferia en quatre dels gens analitzats i en l'al·lel *smeZ* de les soques *emm4.0*.

A la figura 13 es mostra la distribució dels gens analitzats i els patrons característics de les soques dels tipus *emm* més prevalents.

Taula 36. Patrons de SAGs de les soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives de cada tipus *emm*

Subtipus <i>emm</i> (No. soques)	No. soques invasives/no invasives	Patró de SAGs									AI-lel <i>smeZ</i> (No. soques positives/testades)
		AI-lel <i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	
<i>emm1.0</i> (11)	0/11	<i>speA2</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	1spy (6/6) ^a
<i>emm1.25</i> (11)	2/9	<i>speA2</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	1spy (6/6) ^a
<i>emm2.0</i> (2)	1/1	-	+	+	-	-	-	+	+	-	(0/2)
<i>emm2.0</i> (1)	0/1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	(0/1)
<i>emm2.0</i> (1)	0/1	-	-	+	-	-	-	-	+	-	(0/1)
<i>emm3.1</i> (10)	4/6	<i>speA3</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	3spy (6/6) ^b
<i>emm3.2</i> (1)	0/1	<i>speA3</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	3spy (1/1) ^b
<i>emm4.0</i> (10)	3/7	-	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>smeZ-8</i> (5/5)
<i>emm4.2</i> (1)	0/1	<i>speA1</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>smeZ-39</i> (1/1)
<i>emm6.0</i> (3)	2/1	<i>speA4</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	6spy (3/3) ^c
<i>emm9.0</i> (4)	2/2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>smeZ-36</i> (4/4)
<i>emm11.0</i> (7)	1/6	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>smeZ-30/31</i> (4/4)
<i>emm11.0</i> (1)	0/1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>smeZ-30/31</i> (1/1)
<i>emm12.0</i> (3)	0/3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>smeZ-3</i> (3/3)
<i>emm12.0</i> (1)	1/0	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>smeZ-3</i> (1/1)
<i>emm12.0</i> (1)	0/1	-	-	+	+	+	-	-	-	+	<i>smeZ-3</i> (1/1)
<i>emm12.1</i> (1)	0/1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>smeZ-3</i> (1/1)
<i>emm12.7</i> (1)	0/1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>smeZ-3</i> (1/1)
<i>emm12.18</i> (1)	0/1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>smeZ-3</i> (1/1)
<i>emm12.27</i> (1)	0/1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>smeZ-3</i> (1/1)
<i>emm18.9</i> (1)	1/0	<i>speA1</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>smeZ-13</i> (1/1)
<i>emm22.0</i> (1)	0/1	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>smeZ-22</i> (1/1)
<i>emm22.0</i> (1)	1/0	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>smeZ-22</i> (1/1)
<i>emm25.2</i> (3)	2/1	-	-	+	+	+	-	-	-	+	<i>smeZ-37</i> (2/2)
<i>emm25.2</i> (1)	1/0	-	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>smeZ-37</i> (1/1)
<i>emm28.0</i> (6)	0/6	-	+	+	-	-	+	-	+	-	<i>smeZ-16</i> (2/2)
<i>emm28.0</i> (1)	0/1	-	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>smeZ-16</i> (1/1)
<i>emm28.0</i> (1)	0/1	<i>speA2</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>smeZ-16</i> (1/1)

Taula 36. Continuació

Subtipus <i>emm</i> (No. soques)	No. soques invasives/no invasives	Patró de SAgS									Al·lel <i>smeZ</i> (No. soques positives/testades)
		Al·lel <i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	
<i>emm28.0</i> (1)	1/0	-	+	+	-	-	+	-	-	-	<i>smeZ-16</i> (1/1)
<i>emm29.2</i> (1)	0/1	-	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>smeZ-17</i> (1/1)
<i>emm43.5</i> (1)	0/1	-	+	+	-	-	+	-	-	-	<i>smeZ-7</i> (1/1)
<i>emm44/61.0</i> (1)	0/1	-	-	+	+	-	+	-	+	+	(0/1)
<i>emm44/61.0</i> (1)	0/1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>smeZ-4</i> (1/1)
<i>emm49.3</i> (1)	0/1	<i>speA1</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>smeZ-3</i> (1/1)
<i>emm50.0</i> (2)	1/1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>smeZ-33</i> (1/1)
<i>emm50.0</i> (1)	0/1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	<i>smeZ-35</i> (1/1)
<i>emm58.0</i> (1)	0/1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>smeZ-28</i> (1/1)
<i>emm58.0</i> (1)	0/1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>smeZ-28</i> (1/1)
<i>emm59.0</i> (2)	0/2	-	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>smeZ-12</i> (2/2)
<i>emm63.0</i> (1)	0/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0/1)
<i>emm64.0</i> (2)	0/2	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>smeZ-4</i> (1/2)
<i>emm70.0</i> (1)	0/1	-	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>smeZ-17</i> (1/1)
<i>emm75.0</i> (2)	0/2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>smeZ-29</i> (2/2)
<i>emm75.0</i> (1)	0/1	-	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>smeZ-29</i> (1/1)
<i>emm77.0</i> (5)	1/4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>smeZ-37</i> (5/5)
<i>emm77.0</i> (1)	1/0	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>smeZ-37</i> (1/1)
<i>emm77.0</i> (1)	0/1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>smeZ-37</i> (1/1)
<i>emm77.0</i> (1)	1/0	-	+	-	+	-	-	-	-	+	<i>smeZ-37</i> (1/1)
<i>emm81.0</i> (1)	0/1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(0/1)
<i>emm83.4</i> (1)	1/0	-	+	+	-	-	-	+	+	-	<i>smeZ-15</i> (1/1)
<i>emm87.0</i> (3)	0/3	-	+	+	-	-	+	-	-	+	<i>smeZ-5</i> (2/2)
<i>emm89.0</i> (5)	0/5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>smeZ-13</i> (4/4)
<i>st11014</i> (1)	0/1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>smeZ-38</i> (1/1)
Total	27/99	40	56	106	30	24	42	11	41	36	88/96
Percentatge	21,4/78,6	31,7	44,4	84,1	23,8	19	33,3	8,7	32,5	28,6	91,7

^{a, b, c} Al·lells *smeZ* sense designació específica amb seqüències nucleotídiques idèntiques a les de les soques ^a SF370 (AE004092), ^b MGAS315 (AE014074) i ^c MGAS10394 (CP000003).

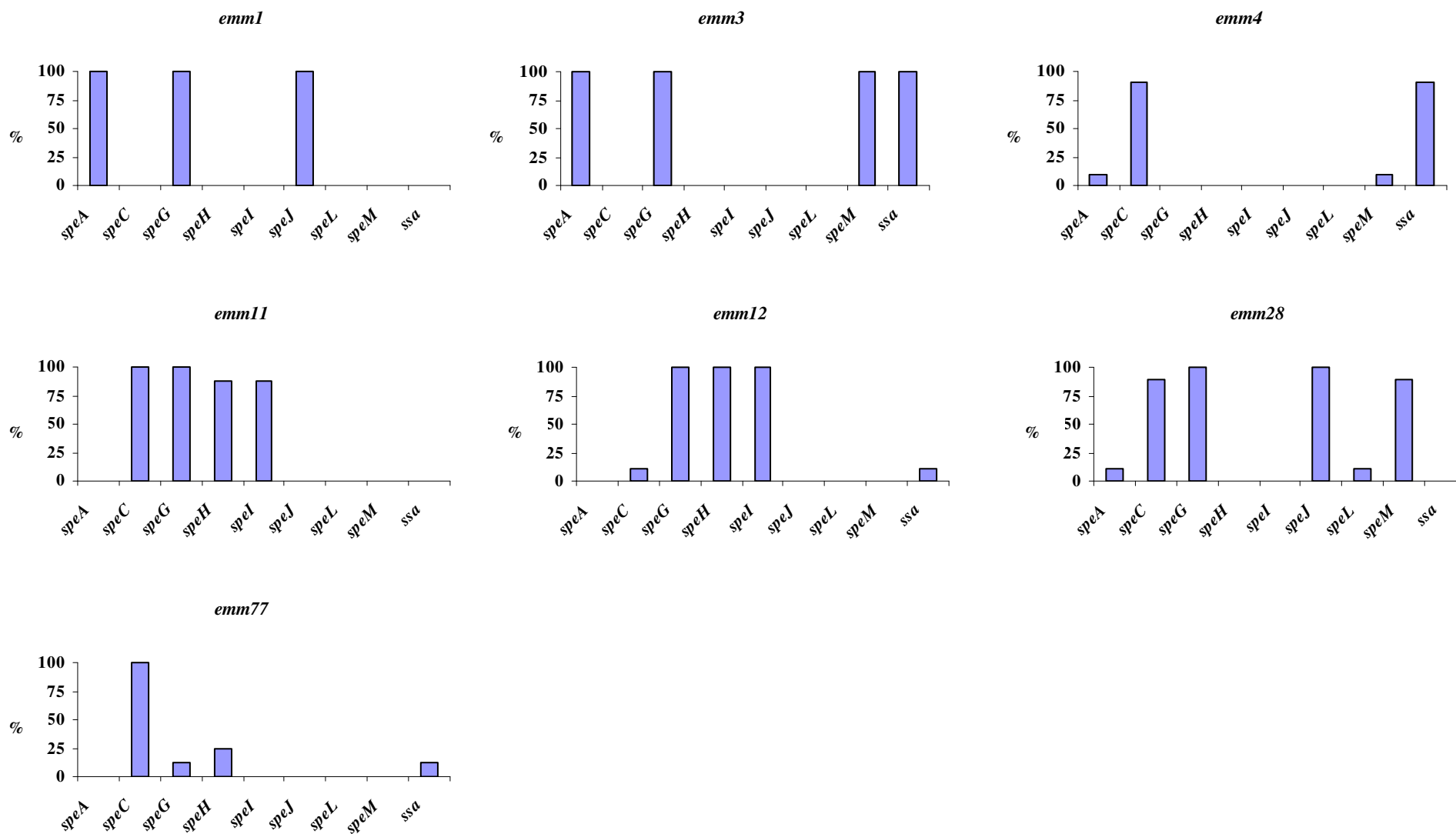


Figura 13. Patrons de SAg de les soques pertanyents als tipus *emm1*, *emm3*, *emm4*, *emm11*, *emm12*, *emm28* i *emm77*.

4.5. Estudi de sensibilitat als antimicrobians

Totes les soques es van mostrar sensibles a penicil·lina G, cefotaxima, rifampicina i vancomicina. El rang de CIM de penicil·lina fou $\leq 0,016-0,032$ $\mu\text{g/ml}$ i els valors de CIM₅₀ i CIM₉₀ $\leq 0,016$ $\mu\text{g/ml}$. El rang de CIM de cefotaxima es situà en $0,004-0,032$ $\mu\text{g/ml}$ i els valors de CIM₅₀ i CIM₉₀ en $0,016$ $\mu\text{g/ml}$ i $0,023$ $\mu\text{g/ml}$, respectivament.

Un total de 35 soques (27,8%) van presentar resistència a eritromicina, 18 soques (14,3%) a clindamicina (es van interpretar com a resistents les soques amb fenotip de resistència induïble) i 32 soques (25,4%) a tetraciclina. La coresistència a eritromicina i tetraciclina es va detectar en 15 soques (42,8% de les soques resistents a eritromicina i 11,9% del total).

Tal com s'ha descrit a l'apartat àmbit de l'estudi de la secció material i mètodes, el període d'estudi de la sensibilitat a levofloxacino es va ampliar fins a juny de 2004, avaluant-se un total de 189 soques. Durant aquest període es van detectar quatre soques amb sensibilitat disminuïda a levofloxacino (CIM 2-3 $\mu\text{g/ml}$) i dues soques amb resistència d'alt nivell (CIM >32 $\mu\text{g/ml}$), el que representa una freqüència del 3,2% durant el període avaluat.

4.5.1. Estudi de sensibilitat a eritromicina

4.5.1.1. Resistència a eritromicina en funció del grup d'edat i del tipus d'infecció

La freqüència de soques resistents a eritromicina fou del 30,5% en pacients pediàtrics (edat ≤ 14 anys) i del 25,4% en adults (edat >14 anys) ($p = 0,522$) (Taula 37). Considerant un rang més estret d'edats, la freqüència més elevada de resistència es va observar en el grup d'edat de 0-4 anys (41,7%) seguit del grup de 25-44 anys (38,5%).

Taula 37. Resistència a eritromicina en funció de l'edat dels pacients

Grup d'edat	No. soques (%)	
	Total	Eritromicina R
Pediàtrics	59	18 (30,5)
Adults	67	17 (25,4)
0-4	36	15 (41,7)
5-14	21	3 (14,3)
15-24	9	2 (22,2)
25-44	26	10 (38,5)
45-64	11	1 (9,1)
≥65	23	4 (17,4)

En relació al tipus d'infecció, la freqüència de resistència a eritromicina va ser del 22,2% en el grup invasiu i del 29,3% en el grup no invasiu ($p = 0,629$). Els tipus d'infecció en els que es van observar els percentatges més elevats de resistència van ser les infeccions genitals (45%) i les faringitis (40%) (Taula 38).

Taula 38. Resistència a eritromicina segons el tipus d'infecció

Tipus d'infecció	No. soques (%)	
	Total	Eritromicina R
Invasives	27	6 (22,2)
No invasives	99	29 (29,3)
Cutània	37	8 (21,6)
Genital	20	9 (45)
Otitis	19	5 (26,3)
Abscés	11	3 (27,3)
Faringitis	10	4 (40)
Altres	2	0

4.5.1.2. Evolució de la resistència a eritromicina, fenotips i determinants de resistència

La freqüència de soques resistents a eritromicina va mostrar un increment progressiu al llarg del període estudiat del 16,6% el 1999 al 38,8% el 2003 (gener a juny) (Taula 39).

Es van estudiar els fenotips de resistència a macròlids mitjançant la tècnica de difusió amb doble disc, detectant-se el fenotip M en 17 soques (48,6%), el fenotip

MLS_B(c) en 15 soques (42,8%) i el fenotip MLS_B(i) en tres soques (8,6%). Les freqüències relatives dels fenotips de resistència majoritaris M i MLS_B(c) van anar variant al llarg del període estudiat amb una tendència cap a l'increment del fenotip M fins l'any 2001, en el que va ser l'únic fenotip observat, i una inversió l'any 2002 en el que el fenotip MLS_B(c) va ser el majoritari. El fenotip MLS_B(i) no es va observar en soques aïllades abans de l'any 2002 (Taula 39 i Figura 14).

Taula 39. Distribució anual de les soques resistents a eritromicina i dels fenotips de resistència

Any	Total No. soques	Eritromicina R No. soques (%)	Fenotip de resistència No. soques (%)		
			M	MLS _B (c)	MLS _B (i)
1999	24	4 (16,6)	2 (50)	2 (50)	-
2000	21	4 (19)	3 (75)	1 (25)	-
2001	19	4 (21)	4 (100)	-	-
2002	26	9 (34,6)	2 (22,2)	6 (66,7)	1 (11,1)
2003 (gener-juny)	36	14 (38,8)	6 (42,8)	6 (42,8)	2 (14,3)
Total	126	35 (27,8)	17 (48,6)	15 (42,8)	3 (8,6)

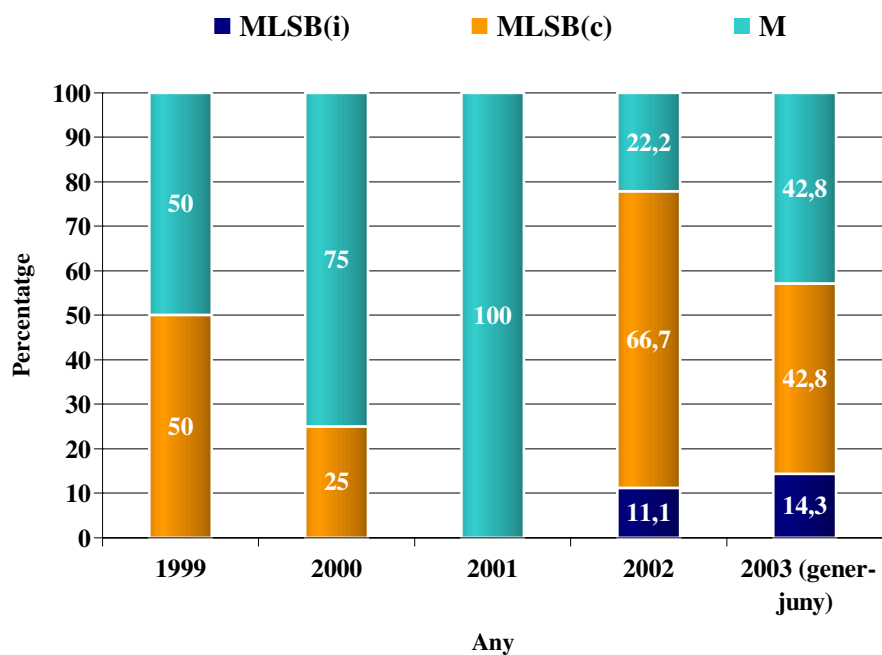


Figura 14. Distribució anual dels fenotips de resistència a antibiòtics MLS_B.

En totes les soques resistents a eritromicina es va efectuar la detecció mitjançant PCR del gen *mef(A)* codificador d'un sistema d'expulsió activa que confereix el fenotip M, i dels gens *erm(B)* i *erm(A)* subclasse *erm(TR)* (designat a partir d'ara com *erm(TR)*) responsables de la síntesi de metilases que confereixen el fenotip MLS_B.

A la taula 40 es mostren els fenotips de resistència i la seva correlació amb els gens de resistència investigats. En totes les soques que expressaven el fenotip M es va detectar el gen *mef(A)*. El fenotip MLS_{B(c)} es va trobar en associació amb el gen *erm(B)* en totes les soques excepte una en la que es va detectar el gen *erm(TR)*. De les tres soques que expressaven el fenotip MLS_{B(i)}, dues soques presentaven el gen *erm(B)* i l'altra soca el gen *erm(TR)*. No es va detectar cap soca portadora simultàniament de més d'un gen de resistència.

Taula 40. Correlació dels fenotips amb els genotips de resistència a macròlids

Fenotip	No. soques (%)			
	Total	<i>mef(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>erm(TR)</i>
M	17	17	-	-
MLS _{B(c)}	15	-	14	1
MLS _{B(i)}	3	-	2	1
Total	35	17 (48,6)	16 (45,7)	2 (5,7)

Les soques portadores del gen *mef(A)* van presentar nivells de resistència moderada (rang 6-16 µg/ml) a eritromicina, lleugerament superiors als de les dues soques portadores del gen *erm(TR)* (CIM 2 µg/ml en la soca amb fenotip MLS_{B(i)} i 4 µg/ml en la soca amb fenotip MLS_{B(c)}), mentre que la presència del gen *erm(B)* es va associar amb els nivells més elevats de resistència (>256 µg/ml en totes les soques) (Taula 41).

Taula 41. Valors de CIM d'eritromicina en funció del genotip de resistència

Genotip (No. soques)	CIM		
	Rang	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>mef(A)</i> (17)	6-16	8	16
<i>erm(B)</i> (16)	>256	>256	>256
<i>erm(TR)</i> (2)	2, 4	NA	NA

NA, no aplicable.

4.5.1.3. Distribució de tipus *emm* en les soques resistents a eritromicina

Les soques resistents a eritromicina van pertànyer a 11 tipus *emm*, essent els més prevalents *emm4*, *emm11*, *emm12* (subtipus *emm12.0*, *emm12.1*, *emm12.7*, *emm12.27*), *emm25* i *emm75* (Figura 15 i Taula 42).

Cal destacar la forta associació a la resistència a eritromicina dels tipus *emm4*, *emm11*, *emm25* i *emm75* en els que la major part de les soques van mostrar resistència (entre el 81,8% i el 100%), i en menor proporció la del tipus *emm12* (44,4% de soques resistents). En conjunt aquests cinc tipus van representar el 80% de les soques resistents a eritromicina, però només el 7,7% de les soques sensibles.

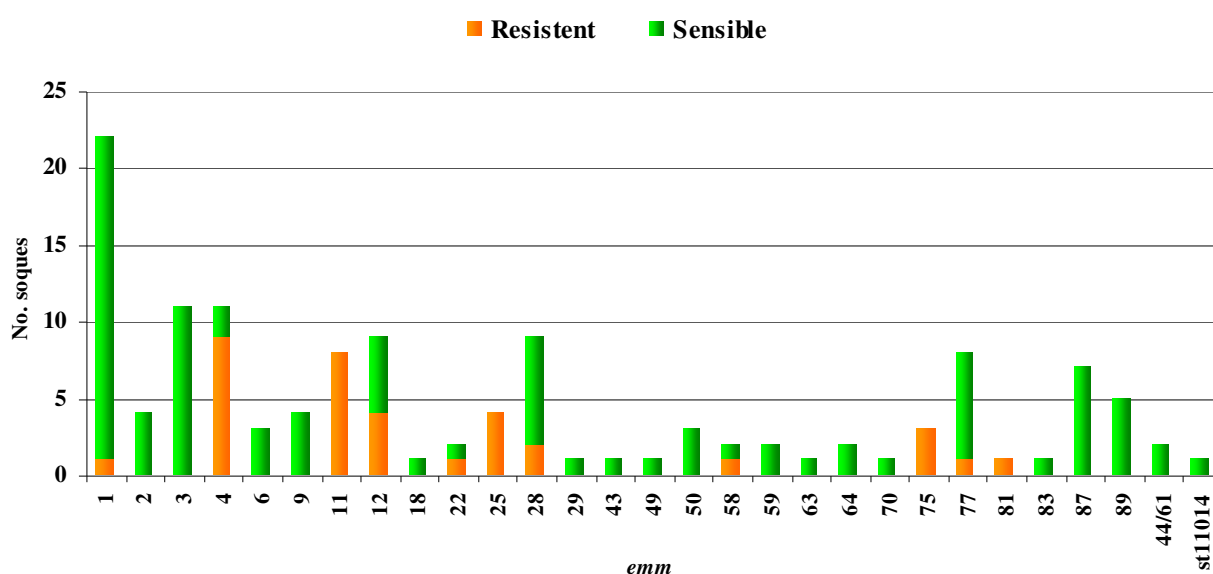


Figura 15. Nombre de soques sensibles i de soques resistents a eritromicina de cada tipus *emm*.

Com es pot observar a la taula 42, les soques resistents del mateix tipus *emm* van presentar el mateix fenotip de resistència amb l'excepció de les soques *emm25.2* que van mostrar resistència constitutiva o resistència induïble.

Els genotips de resistència van ser homogenis en soques del mateix tipus *emm*, trobant-se el gen *mef(A)* en soques dels tipus *emm4*, *emm12*, *emm75* i *emm81*, el gen *erm(B)* en soques dels tipus *emm1*, *emm11*, *emm25*, *emm28* i *emm75* i el gen *erm(TR)* en soques dels tipus *emm58* i *emm77* (Taula 42). Cal esmentar que les úniques dues soques resistents a bacitracina de la col·lecció van correspondre a les soques del tipus *emm28* resistents a eritromicina.

Taula 42. Tipus *emm*, fenotips i genotips de resistència de les soques resistents a eritromicina

Tipus <i>emm</i>	No. soques (%)		Fenotip No. soques			Gens de resistència No. soques		
	Eritro R	Eritro R/ Total de cada <i>emm</i>	M	MLS _B (c)	MLS _B (i)	<i>mef(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>erm(TR)</i>
1	1 (2,8)	1/22 (4,5)	-	1	-	-	1	-
4	9 (25,7)	9/11 (81,8)	9	-	-	9	-	-
11	8 (22,8)	8/8 (100)	-	8	-	-	8	-
12	4 (11,4)	4/9 (44,4)	4	-	-	4	-	-
22	1 (2,8)	1/2 (50)	-	1	-	-	1	-
25	4 (11,4)	4/4 (100)	-	2	2	-	4	-
28	2 (5,7)	2/9 (22,2)	-	2	-	-	2	-
58	1 (2,8)	1/2 (50)	-	-	1	-	-	1
75	3 (8,6)	3/3 (100)	3	-	-	3	-	-
77	1 (2,8)	1/8 (12,5)	-	1	-	-	-	1
81	1 (2,8)	1/1 (100)	1	-	-	1	-	-

Eritro R, eritromicina resistent

4.5.2. Estudi de la sensibilitat a tetraciclina

4.5.2.1. Resistència a tetraciclina en funció del grup d'edat i del tipus d'infecció

La freqüència de resistència a tetraciclina va ser significativament superior en soques aïllades de pacients adults (edat >14 anys) (34,3%) que en soques aïllades de pacients pediàtrics (edat ≤ 14 anys) (15,2%) ($p = 0,005$). Considerant un rang més estret

d'edats, la freqüència més elevada de resistència es va observar en els grup d'edat de 25-44 anys (38,8%) i de 45-64 anys (36,4%) (Taula 43).

Taula 43. Resistència a tetraciclina en funció de l'edat dels pacients

Grup d'edat	No. soques (%)	
	Total	Tetraciclina R
Pediàtrics	59	9 (15,2)
Adults	67	23 (34,3)
0-4	36	7 (19,4)
5-14	21	2 (9,5)
15-24	9	3 (33,3)
25-44	26	10 (38,8)
45-64	11	4 (36,4)
≥65	23	6 (26,1)

Tal com es mostra a la taula 44, la resistència a tetraciclina va ser superior en el grup invasiu que en el no invasiu (33,3% *versus* 23,2%), encara que la diferència no va ser significativa ($p = 0,322$). El percentatge més elevat de resistència va correspondre a les soques aïllades d'infeccions cutànies superficials (40,5%), situació que contrasta amb l'observada en les soques aïllades d'infeccions òtiques que es van mostrar sensibles en la seva totalitat.

Taula 44. Resistència a tetraciclina segons el tipus d'infecció

Tipus d'infecció	No. soques (%)	
	Total	Tetraciclina R
Invasives	27	9 (33,3)
No invasives	99	23 (23,2)
Cutània	37	15 (40,5)
Genital	20	3 (15)
Otitis	19	0
Abscés	11	3 (27,3)
Faringitis	10	2 (20)
Altres	2	0

4.5.2.2. Evolució de la resistència a tetraciclina i determinants de resistència

La resistència a tetraciclina en la col·lecció de soques analitzades fou del 25,4%, observant-se en el 42,8% de les soques resistents a eritromicina i en el 18,7% de les sensibles ($p = 0,01$). El percentatge de resistència a tetraciclina va fluctuar durant el període estudiat assolint la freqüència màxima (34,6%) l'any 2002 i la mínima (15,8%) l'any 2001 (Taula 45).

En totes les soques resistents a tetraciclina es va estudiar la presència dels determinants de resistència *tet(M)* i *tet(O)* mitjançant PCR. El gen *tet(M)* es va detectar en 18 soques (56,2%), el gen *tet(O)* en sis soques (18,7%) i ambdós gens en una soca (Taula 45). En set soques resistents a tetraciclina no es va trobar cap dels dos gens estudiats.

Taula 45. Distribució anual dels genotips de resistència de les soques resistents a tetraciclina

Any	Total No. soques	Tetraciclina R No. soques (%)	Gens de resistència No. soques			
			<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(M)+ tet(O)</i>	Cap
1999	24	8 (33,3)	5	3	-	-
2000	21	4 (19)	2	2	-	-
2001	19	3 (15,8)	3	-	-	-
2002	26	9 (34,6)	4	1	1	3
2003 (gener-juny)	36	8 (22,2)	4	-	-	4
Total	126	32 (25,4)	18 (56,2)	6 (18,7)	1 (3,1)	7 (21,9)

4.5.2.3. Distribució de tipus *emm* en les soques resistents a tetraciclina

Les soques resistents a tetraciclina van pertànyer a 14 tipus *emm*, essent els predominants *emm11*, *emm77* i *emm25* (Taula 46).

El gen *tet(M)* es va trobar en una àmplia diversitat de tipus *emm*, mentre que el gen *tet(O)* es va trobar exclusivament en soques *emm77*. Les soques resistents a tetraciclina en les que es van obtenir resultats negatius en la detecció d'ambdós gens van correspondre a set de les vuit soques *emm11*.

Taula 46. Tipus *emm* i genotips de resistència de les soques resistents a tetraciclina

Tipus <i>emm</i>	No. soques (%)		Gens de resistència No. soques			
	Tetraciclina R	Tetraciclina R/ Total de cada <i>emm</i>	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (O)	<i>tet</i> (M)+ <i>tet</i> (O)	Cap
11	8 (25)	8/8 (100)	1	-	-	7
22	2 (6,2)	2/2 (100)	2	-	-	-
25	4 (12,5)	4/4 (100)	4	-	-	-
43	1 (3,1)	1/1 (100)	1	-	-	-
44/61	1 (3,1)	1/2 (50)	1	-	-	-
49	1 (3,1)	1/1 (100)	1	-	-	-
50	1 (3,1)	1/3 (33,3)	1	-	-	-
58	1 (3,1)	1/2 (50)	1	-	-	-
59	2 (6,2)	2/2 (100)	2	-	-	-
63	1 (3,1)	1/1 (100)	1	-	-	-
70	1 (3,1)	1/1 (100)	1	-	-	-
77	7 (21,9)	7/8 (87,5)	-	6	1	-
83	1 (3,1)	1/1 (100)	1	-	-	-
<i>st11014</i>	1 (3,1)	1/1 (100)	1	-	-	-

4.5.2.4. Associacions dels determinants de resistència en les soques corresponsants a eritromicina i tetraciclina

En les soques resistents a eritromicina es va trobar una forta associació entre la resistència mitjançada pels gens *erm*(B) i *erm*(TR) i la resistència a tetraciclina (Taula 47). Per contra, cap de les soques resistents a eritromicina portadores del gen *mef*(A) van mostrar resistència a tetraciclina. A la taula 48 es detallen els tipus *emm* de les 15 soques corresponsants a eritromicina i tetraciclina i els determinants de resistència associats.

Taula 47. Distribució dels gens de resistència a eritromicina i tetraciclina en les soques corresponsants

Gen	No. soques (%)	No. soques (%)		
		Tetraciclina R	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (O)
<i>erm</i> (B)	16 (45,7)	13 (81,2)	6	-
<i>erm</i> (TR)	2 (5,7)	2 (100)	1	1
<i>mef</i> (A)	17 (48,6)	-	-	-
Total	35 (100)	15 (42,8)	7	1

Taula 48. Tipus *emm* i determinants de resistència de les soques corresponsives a eritromicina i tetraciclina

Tipus <i>emm</i>	No. soques		Gens de resistència No. soques			
	Total	Tetra-Eritro R	<i>erm(B)+ tet(M)</i>	<i>erm(TR)+ tet(M)</i>	<i>erm(TR)+ tet(O)</i>	<i>erm(B)+ Tetra R</i>
11	8	8	1	-	-	7
22	2	1	1	-	-	-
25	4	4	4	-	-	-
58	2	1	-	1	-	-
77	8	1	-	-	1	-

Tetra R, tetraciclina resistent; Eritro R, eritromicina resistent.

La contribució anual durant el període estudiat dels diferents tipus *emm* a la resistència a eritromicina i/o tetraciclina i els determinants de resistència associats es mostra a la taula 49. Cal destacar que l'increment del fenotip MLS_B majoritàriament de tipus constitutiu associat al gen *erm(B)* en els anys 2002 i 2003 es va trobar relacionat principalment amb l'emergència de soques dels tipus *emm11* i *emm25* que eren també corresponsives a tetraciclina i en menor proporció amb soques *emm28* resistentes a bacitracina no detectades en anys anteriors. Aquesta situació contrasta amb la del tipus *emm4* que es va trobar durant tot el període estudiat i va ser el tipus predominant en les soques resistentes a eritromicina amb fenotip M portadores del gen *mef(A)*.

En quant a la resistència a tetraciclina, la seva associació amb la resistència a eritromicina i els tipus *emm* implicats es van observar dos períodes diferenciats. Entre 1999 i 2001 la resistència a tetraciclina va estar causada per soques de 10 tipus *emm* diferents tots ell poc prevalents en el conjunt de soques analitzades amb l'excepció del tipus *emm77*. De les 15 soques resistentes a tetraciclina aïllades durant aquest període només dues (13,3%) van mostrar corresponsivitat a eritromicina. Per contra, en els anys 2002 i 2003 es van observar 6 tipus *emm* en les 17 soques resistentes a tetraciclina aïllades durant aquests període, de les quals 13 (76,5%) van mostrar corresponsivitat a eritromicina i tal com s'ha esmentat anteriorment es van associar principalment als tipus *emm11* i *emm25*.

Taula 49. Distribució anual de tipus *emm* i de gens de resistència de les soques resistents a eritromicina i/o tetraciclina

Genotip de resistència	Subtipus <i>emm</i> (No. soques)					
	1999	2000	2001	2002	2003	Total
<i>mef</i> (A)	<i>emm</i> 4.0 (1) <i>emm</i> 75.0 (1)	<i>emm</i> 4.0 (2) <i>emm</i> 12.0 (1)	<i>emm</i> 4.0 (1) <i>emm</i> 12.7 (1) <i>emm</i> 75.0 (2)	<i>emm</i> 4.0 (2)	<i>emm</i> 4.0 (3) <i>emm</i> 12.1 (1) <i>emm</i> 12.27 (1) <i>emm</i> 81.0 (1)	<i>emm</i> 4.0 (9) <i>emm</i> 12 (4) <i>emm</i> 75.0 (3) <i>emm</i> 81.0 (1)
<i>erm</i> (B)		<i>emm</i> 1.0 (1)		<i>emm</i> 28.0 (1)	<i>emm</i> 28.0 (1)	<i>emm</i> 28.0 (2) <i>emm</i> 1.0 (1)
<i>erm</i> (B)+ <i>tet</i> (M)	<i>emm</i> 22.0 (1)			<i>emm</i> 25.2 (3)	<i>emm</i> 25.2 (1) <i>emm</i> 11.0 (1)	<i>emm</i> 25.2 (4) <i>emm</i> 11.0 (1) <i>emm</i> 22.0 (1)
<i>erm</i> (B)+Tet-R				<i>emm</i> 11.0 (3)	<i>emm</i> 11.0 (4)	<i>emm</i> 11.0 (7)
<i>erm</i> (TR)+ <i>tet</i> (M)					<i>emm</i> 58.0 (1)	<i>emm</i> 58.0 (1)
<i>erm</i> (TR)+ <i>tet</i> (O)	<i>emm</i> 77.0 (1)					<i>emm</i> 77.0 (1)
<i>tet</i> (M)	<i>emm</i> 22.0 (1) <i>emm</i> 43.5 (1) <i>emm</i> 70.0 (1) <i>emm</i> 83.4 (1)	<i>emm</i> 50.0 (1) <i>st</i> 11014.0 (1)	<i>emm</i> 59.0 (2) <i>emm</i> 44/61.0 (1)	<i>emm</i> 63.0 (1)	<i>emm</i> 49.3 (1)	<i>emm</i> 59.0 (2) <i>emm</i> 22.0 (1) <i>emm</i> 43.5 (1) <i>emm</i> 44/61 (1) <i>emm</i> 49.3 (1) <i>emm</i> 50.0 (1) <i>emm</i> 63.0 (1) <i>emm</i> 70.0 (1) <i>emm</i> 83.4 (1) <i>st</i> 11014.0 (1)
<i>tet</i> (O)	<i>emm</i> 77.0 (2)	<i>emm</i> 77.0 (2)		<i>emm</i> 77.0 (1)		<i>emm</i> 77.0 (5)
<i>tet</i> (M)+ <i>tet</i> (O)				<i>emm</i> 77.0 (1)		<i>emm</i> 77.0 (1)

Tet-R, tetraciclina resistent

4.5.3. Estudi de la sensibilitat a fluoroquinolones

El rang de CIM de levofloxacino de les 189 soques de *S. pyogenes* analitzades entre gener de 1999 i juny de 2004 es situà en 0,023->32 µg/ml i els valors de CIM₅₀ i CIM₉₀ en 0,38 µg/ml i 1 µg/ml, respectivament. Es van detectar quatre soques amb sensibilitat disminuïda o resistència intermèdia a levofloxacino (CIM 2-3 µg/ml) i dues soques amb resistència d'alt nivell (CIM >32 µg/ml), el que representa una prevalença del 3,2% durant el període estudiat. Aquestes sis soques es van seleccionar per al seu posterior anàlisi respecte a la sensibilitat enfront de cinc fluoroquinolones addicionals (norfloxacino, ciprofloxacino, esparfloxacino, moxifloxacino i clinafloxacino) i per a l'estudi de la presència de mutacions en les QRDR dels gens *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE*. Encara que els punts de tall de CIM de levofloxacino establerts pel CLSI per a *S.*

pyogenes són de ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ per a definir la categoria sensible, 4-8 $\mu\text{g/ml}$ per a la categoria de resistència intermèdia i ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ per a la categoria resistent, en el present estudi el valor de CIM de levofloxacino de 2 $\mu\text{g/ml}$ es va considerar arbitràriament com a sensibilitat disminuïda degut a ser superior als valors de CIM₅₀ i CIM₉₀ i a la troballa en estudis previs tant en *S. pyogenes* com en *S. pneumoniae* de la presència de mutacions en *parC* en soques que exhibeixen aquest valor de CIM^{266,382,383}.

Les soques van ser aïllades de sang (3), exsudat cutani, esput, i teixit pulmonar de necròpsia de tres pacients adults i tres pacients pediàtrics (Taula 50). Si bé en els tres pacients pediàtrics no es va documentar tractament previ amb quinolones, en dos dels pacients adults les soques es van aïllar durant el tractament amb ciprofloxacino de processos respiratoris. El tercer pacient adult presentava una història d'infeccions respiratòries recurrents i havia rebut diferents tractament incloent levofloxacino tres mesos abans de l'aïllament.

A la taula 50 es mostren els valors de CIM de norfloxacino, ciprofloxacino, levofloxacino, esparfloxacino, moxifloxacino i clinafloxacino de les sis soques de *S. pyogenes*. Les soques van pertànyer als tipus *emm3.1*, *emm6.0* (dues soques), *emm12.27* i *emm12.26* (dues soques). Cal destacar que el subtipus *emm12.26* identificat l'any 2004 en les soques altament resistents a fluoroquinolones és un altre dels subtipus descrits per primera vegada arrel d'aquest estudi i figura al GenBank amb el número d'accés AY742804.

Taula 50. Característiques dels pacients, tipus *emm* i valors de CIM de fluoroquinolones de les sis soques de *S. pyogenes*

Soca	Data d'aïllament	Edat/Sexe	Lloc d'aïllament	Subtipus <i>emm</i>	NOR	CIP	LEV	SPA	MOX	CLI
342-D	19-3-2000	71/H	Sang	3.1	32	2	2	1	0,25	0,125
357-D	2-6-2000	3/H	Sang	6.0	64	4	3	1	0,38	0,125
363-D	18-1-2001	8/H	Sang	6.0	64	4	3	1	0,38	0,125
P0064	10-5-2003	3/D	Exsudat cutani	12.27	128	4	3	1,5	0,38	0,125
P0287	20-3-2004	79/H	Esput	12.26	>256	>32	>32	>32	1,5	0,38
P0292	24-3-2004	87/H	Pulmó (necròpsia)	12.26	>256	>32	>32	>32	1,5	0,38

NOR, norfloxacino; CIP, ciprofloxacino; LEV, levofloxacino; SPA, esparfloxacino; MOX, moxifloxacino; CLI, clinafloxacino. H, home; D, dona.

Es va observar una relació epidemiològica entre els dos pacients dels quals es van aïllar les dues soques altament resistents *emm12.6*. Els dos pacients es trobaven ingressats en la mateixa sala d'hospitalització i les soques van ser aïllades en un interval de 72 hores, el que suggereix una possible transmissió nosocomial.

4.5.3.1. Anàlisi de les QRDR dels gens *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE*

Es van determinar les seqüències de les QRDR dels gens *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE* de les sis soques amb sensibilitat disminuïda o resistència a fluoroquinolones i es van comparar amb seqüències salvatges de cada gen disponibles al GenBank (*gyrA*, AF220945; *gyrB*, AE006524; *parC*, AF220946; *parE*, AE006540).

Les mutacions identificades es mostren a les figures 16 i 17. Les quatre soques amb sensibilitat disminuïda o resistència intermèdia a levofloxacino presentaven una o dues mutacions en *parC* consistents en les substitucions Ser80→Pro (TCT→CCT) en la soca *emm3.1* (CIM levofloxacino 2 µg/ml), Ser79→Ala (TCC→GCC) en les dues soques *emm6.0* (CIM levofloxacino 3 µg/ml), i la substitució doble Ser79→Phe (TCC→TTC) i Ala121→Val (GCT→GTT) en la soca *emm12.27* (CIM levofloxacino 3 µg/ml). Les dues soques *emm12.26* amb alt nivell de resistència (CIM levofloxacino >32 µg/ml) van presentar la mateixa doble substitució en *parC* Ser79→Phe i Ala121→Val que la soca *emm12.27* i el canvi Ser81→Tyr (TCT→TAT) en *gyrA*. Addicionalment, es van identificar diverses mutacions silents en diferents posicions de les regions analitzades dels gens *gyrA*, *parC* i *parE* amb patrons idèntics en soques del mateix tipus *emm*.

		Codó											
		<i>parC</i>											
Soca	<i>emm</i>	52	69	75	79	80	86	97	99	110	121	127	142
		Gly (GGC)	Ile (ATT)	Pro (CCA)	Ser (TCC)	Ser (TCT)	Val (GTA)	Ile (ATC)	Val (GTT)	Gly (GGT)	Ala (GCT)	Ala (GCG)	Ala (GCT)
342-D	<i>emm3.1</i>					Pro (CCT)							Ala (GCG)
357-D	<i>emm6.0</i>			Pro (CCG)	Ala (GCC)		Val (GTT)			Gly (GGC)		Ala (GCA)	Ala (GCG)
363-D	<i>emm6.0</i>			Pro (CCG)	Ala (GCC)		Val (GTT)			Gly (GGC)		Ala (GCA)	Ala (GCG)
P0064	<i>emm12.27</i>	Gly (GGT)	Ile (ATC)	Pro (CCG)	Phe (TTC)			Ile (ATT)	Val (GTG)	Gly (GGC)	Val (GTT)		Ala (GCG)
P0187	<i>emm12.26</i>	Gly (GGT)	Ile (ATC)	Pro (CCG)	Phe (TTC)			Ile (ATT)	Val (GTG)	Gly (GGC)	Val (GTT)		Ala (GCG)
P0292	<i>emm12.26</i>	Gly (GGT)	Ile (ATC)	Pro (CCG)	Phe (TTC)			Ile (ATT)	Val (GTG)	Gly (GGC)	Val (GTT)		Ala (GCG)

Figura 16. Canvis aminoacídics i mutacions silents detectats en les QRDR del gen *parC* de les sis soques amb sensibilitat disminuïda o resistència a fluoroquinolones.

		Codó									
		<i>parE</i>				<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>				
Soca	<i>emm</i>	419	422	444	469	81	400	425	458	481	492
		Leu (CTA)	Ala (GCT)	Ala (GCC)	Lys (AAG)	Ser (TCT)	Arg (CGC)	Asp (GAC)	Arg (CGC)	Leu (CTC)	Asp (GAT)
342-D	<i>emm3.1</i>	Leu (TTA)	Ala (GCC)		Lys (AAA)		Arg (CGT)	Asp (GAT)		Leu (CTT)	Asp (GAC)
357-D	<i>emm6.0</i>	Leu (TTA)	Ala (GCC)		Lys (AAA)			Asp (GAT)	Arg (CGT)	Leu (CTT)	
363-D	<i>emm6.0</i>	Leu (TTA)	Ala (GCC)		Lys (AAA)			Asp (GAT)	Arg (CGT)	Leu (CTT)	
P0064	<i>emm12.27</i>	Leu (TTA)	Ala (GCC)	Ala (GCT)				Asp (GAT)			Asp (GAC)
P0187	<i>emm12.26</i>	Leu (TTA)	Ala (GCC)	Ala (GCT)		Tyr (TAT)		Asp (GAT)			Asp (GAC)
P0292	<i>emm12.26</i>	Leu (TTA)	Ala (GCC)	Ala (GCT)		Tyr (TAT)		Asp (GAT)			Asp (GAC)

Figura 17. Canvis aminoacídics i mutacions silents detectats en les QRDR dels gens *parE*, *gyrA* i *gyrB* de les sis soques amb sensibilitat disminuïda o resistència a fluoroquinolones.

5. DISCUSSIÓ

La introducció d'agents antimicrobians i vacunes en l'arsenal terapèutic durant l'últim segle inspirà optimistes prediccions sobre la possibilitat de controlar i fins i tot eradicar determinades malalties infeccioses. Aquesta perspectiva s'ha vist desdibuixada pel nou repte plantejat per les malalties infeccioses emergents i reemergents i pel desenvolupament de resistència antimicrobiana, reflex del potencial evolutiu i la capacitat d'adaptació dels microorganismes i de les dinàmiques relacions entre aquests, els seus hostes i l'ambient³⁸⁴.

En el cas de *S. pyogenes*, si bé es manté uniformement sensible a la penicil·lina, en els últims 20 anys ha ressorgit com agent causal de formes clíniques particularment greus després de dècades de declivi en la mortalitat i morbiditat associada a les infeccions i seqüeles causades pel microorganisme¹³⁻²³. El ressorgiment i persistència de formes clíniques greus associades a una elevada mortalitat, malgrat l'administració d'antimicrobians i la disponibilitat de sofisticades mesures pel suport vital dels pacients, ha motivat una intensa recerca sobre els aspectes microbiològics, epidemiològics i clínics de les infeccions produïdes pel microorganisme i dels factors de l'hoste que puguin suposar una major sensibilitat a la infecció. Són nombrosos els estudis arreu del món que han analitzat les característiques de les soques causants d'infeccions invasives, però són més escasses les investigacions que han examinat la seva relació amb soques aïllades d'infeccions no invasives o de portadors. La inclusió de soques procedents de casos no invasius es considera important per tal de distingir entre les propietats virulentes de soques determinades i la seva prevalença a la població³⁸⁵.

En la present investigació s'han analitzat les característiques de soques de *S. pyogenes* aïllades d'infeccions invasives i no invasives en pacients atesos al nostre hospital en relació a la distribució de tipus *emm*, perfils genètics de SAgS (*speA-C*, *speF-J*, *speL*, *speM*, *ssa* i *smeZ*), així com els patrons de sensibilitat a diversos agents antimicrobians i els mecanismes de resistència implicats. El sistema de tipificació *emm* ha esdevingut una important eina epidemiològica per a la investigació de la dinàmica de les infeccions produïdes per *S. pyogenes*. A més, amb el continu interès en el desenvolupament de vacunes efectives basades en la proteïna M, resulta de gran importància la vigilància de la distribució dels tipus *emm* circulants per tal d'identificar la possible emergència de tipus menys predominants o de noves seqüències que puguin representar un impacte en la formulació de vacunes. Degut a que una gran part dels gens

que codifiquen els SAGs coneguts en *S. pyogenes* estan codificats per bacteriòfags i sotmesos per tant a la possible transferència horitzontal, l'estudi de la seva distribució constitueix una eina epidemiològica addicional per tal d'explorar diferències entre soques del mateix serotip i la seva correlació amb el tipus d'infecció.

5.1. Presentacions clíniques

L'espectre de presentacions clíniques invasives objectivat en el nostre estudi fou bastant similar al descrit en altres estudis realitzats tant a Amèrica del Nord com a Europa^{15,90,121,122,138,386-389}. Les infeccions de la pell i teixits tous, que representaren el 40,7% dels casos, van constituir les formes predominants d'infecció invasiva i s'han descrit també com les més comuns en la major part dels estudis. Altres presentacions clíniques relativament freqüents van incloure artritis, bacterièmia sense focus i pneumònia, essent molt més infreqüents altres entitats clíniques com meningitis, peritonitis, i endocarditis que van estar representades per casos únics. Addicionalment es va registrar un cas d'abscess de psoas, una forma clínica que s'ha associat excepcionalment a *S. pyogenes*³⁹⁰. A diferència d'altres sèries publicades no es va trobar cap cas de sèpsia puerperal, entitat que representà el 2,2% dels casos invasius causats per *S. pyogenes* en un estudi de base poblacional realitzat als Estats Units (1995-2000)³⁹¹, però que s'ha descrit a freqüències més elevades en altres països com Holanda (1992-1996) on es va trobar en el 7% dels pacients afectats de quadres invasius³⁸⁶.

Dels casos invasius analitzats en la nostra sèrie, quatre pacients (14,8%) van presentar SSTS, complicació que es va trobar associada al 50% dels casos de FN. En altres estudis epidemiològics d'infecció invasiva per *S. pyogenes* la freqüència de SSTS es situa entre el 6 i el 24%, i tal com ha estat observat en el present estudi la FN és una de les presentacions clíniques més comunament associades a la SSTS^{15,90,121,122,138,386-389}. Així per exemple, en un estudi prospectiu poblacional realitzat a Ontàrio (Canadà) la presentació clínica en la que es va registrar una major proporció de casos complicats amb SSTS va ser la FN (55%), seguida de la infecció del tracte respiratori inferior (26%) i de la bacterièmia sense focus (16%)¹⁵.

Contrastant amb la distribució d'edats dels casos no invasius on més de la meitat dels pacients eren pediàtrics, la majoria de casos d'infecció invasiva es va registrar en

adults, corresponent la major proporció a pacients majors de 65 anys seguit d'un altre pic en adults joves (25-44 anys). Diversos estudis epidemiològics de base poblacional indiquen que els valors màxims d'incidència d'infecció invasiva corresponen al grup d'edat de majors de 65 anys, trobant-se també en alguns estudis una elevada incidència en infants de curta edat^{15,90,121,122,138,386-389}. Així per exemple, en un estudi prospectiu realitzat als Estats Units la incidència d'infecció invasiva en adults majors de 65 es va situar en 9,3 casos per 100.000 habitants i la corresponent a nens d'edat inferior a dos anys en 6,3 casos, valors que superen clarament la taxa global que va ser de 3,5 casos⁹⁰. En alguns països s'ha observat un pic d'incidència addicional en adults joves relacionat en certa mesura amb l'addició a drogues per via parenteral, però també en pacients sense factors predisposants^{15,138,386,389,392,393}. Aquesta situació coincideix amb l'observada en el nostre estudi en el que prop de la meitat dels pacients d'aquest grup d'edat eren ADVP i HIV i en la resta no es van identificar factors predisposants. S'ha suggerit que el pic d'incidència en adults joves o de mitjana edat pot estar relacionat amb una elevada exposició a nens a la llar donat que aquests constitueixen el principal reservori de *S. pyogenes*. En aquest sentit, en un estudi de casos i controls en el que es van avaluar els factors de risc d'infecció invasiva en contactes familiars, els principals factors de risc identificats en pacients d'edats compreses entre els 18 i 44 anys van ser l'exposició a un o més nens amb faringitis, la infecció per HIV i l'ús de drogues per via parenteral³⁹⁴.

En una de les majors sèries realitzada a Espanya on es van estudiar de forma prospectiva 103 episodis de bacterièmia per *S. pyogenes* ocorreguts al llarg d'un període de 10 anys (1985-1994), el 62% dels pacients eren ADVP i el percentatge més elevat d'infecció va correspondre al grup d'edat de 25 a 40 anys³⁹². Aquesta proporció d'ADVP, però, és considerablement superior a l'observada en el present estudi que va ser del 14,8%. Altres estudis han destacat també la importància de l'ús de drogues per via parenteral com a factor de risc d'infeccions invasives per *S. pyogenes*^{395,396}, havent-se detectat en un estudi epidemiològic d'infecció invasiva realitzat al Regne Unit un increment en la proporció de pacients ADVP de <5% al 15% entre 1995 i 2002³⁹³.

A més de l'ús de drogues per via parenteral, diverses condicions mèdiques subjacents com diabetis, càncer, alcoholisme, malaltia pulmonar crònica, malaltia cardíaca, ús de corticosteroids, infecció per HIV, i la pèrdua d'integritat de la barrera

cutània s'han descrit com importants factors de risc d'infecció invasiva per *S. pyogenes*, amb percentatges que varien entre un 56% i més del 80% dels pacients en estudis publicats^{15,90,121,122,138,278,386-389}. Aquest fet també ha estat constatat en el present estudi on una elevada proporció dels pacients amb formes invasives presentaven malalties subjacents o factors predisposants locals, destacant la pèrdua d'integritat de la barrera cutània observada pràcticament en tots els grups d'edat, la infecció per HIV i l'addicció a drogues per via parenteral en pacients adults joves, i diverses condicions mèdiques com neoplàsies i vasculopatia perifèrica que van ser especialment prevalents en pacients d'edat avançada. La varicel·la, observada en un dels pacients pediàtrics d'aquest estudi, s'ha descrit com un dels principals factors de risc d'infecció invasiva per *S. pyogenes* en infants^{15,121,138,397}. La importància de la vacunació contra la varicel·la com a mesura preventiva ha estat emfatitzada en un estudi realitzat als Estats Units on després de la implantació de la vacuna es va constatar una reducció de les hospitalitzacions pediàtriques per infeccions invasives causades per *S. pyogenes* associades a varicel·la³⁹⁸.

En relació a les característiques dels pacients afectats de SSTS de la nostra sèrie, tots els pacients eren de sexe masculí, d'edats compreses entre els 38 i 55 anys i en tots els casos amb factors de comorbiditat, incloent la infecció per HIV i l'addicció a drogues per via parenteral, enolisme i immunosupressió. Si bé la SSTS s'ha descrit en tots els grups d'edat i en pacients sense factors predisposants^{17,120}, aquesta complicació s'ha observat amb més freqüència en pacients adults amb factors de comorbiditat^{15,90,121-124}. En un estudi realitzat a València de 13 casos de SSTS (12 casos definitius i un cas probable) diagnosticats entre 1985 i 2003 la major part dels pacients eren d'edat avançada, sexe masculí, i tots ells amb alguna malaltia de base¹²³. Zurawski *et al.* en un estudi prospectiu realitzat a Atlanta (Estats Units) identificaren la presència de factors predisposants en el 80% dels pacients afectats de SSTS, trobant la major proporció de casos (72%) en pacients d'edats compreses entre 10 i 65 anys i la resta distribuït en proporcions similars en pacients de menys de 10 anys (12%) i en majors de 65 anys (16%)¹²¹. Addicionalment, en un estudi realitzat a Ontàrio (Canadà) es van observar diferències estadísticament significatives comparant els pacients afectats de SSTS amb els que presentaven altres infeccions invasives sense SSTS en relació a l'edat (mitjana 61 anys *versus* 38 anys; $p < 0,001$) i a la presència de factors predisposants (71% *versus*

51%; $p = 0,003$)¹⁵, situació que contrasta amb la descrita a Suècia on no s'observaren diferències en cap dels dos paràmetres entre els dos grups de pacients³⁸⁷.

La taxa global de mortalitat objectivada en el present estudi va ser de l'11%, però molt superior (50%) en els pacients que van desenvolupar SSTS. Aquestes troballes són concordants amb els resultats d'altres estudis que descriuen taxes de mortalitat de l'11%-20% dels casos invasius i del 36%-85% en els pacients afectats de SSTS^{15,90,121-124,138,386-389}.

En la nostra sèrie només es va detectar un cas d'infecció invasiva d'adquisició nosocomial. Les infeccions invasives per *S. pyogenes* d'adquisició nosocomial són relativament infreqüents, havent-se descrit a la literatura freqüències que oscil·len entre el 6% observat en estudis realitzats als Estats Units^{90,388} i l'11-14% al Canadà^{15,283} i alguns països europeus com Dinamarca³⁸⁹ i Suècia¹²².

L'ocurrència d'infeccions invasives va mostrar un patró estacional característic concentrant-se la major part dels casos a finals d'hivern i en primavera, patró similar a l'observat en els casos no invasius. Aquesta fluctuació estacional coincideix amb l'observada en altres estudis i pot estar relacionada amb un major efecte d'amuntegament durant els mesos freds, situació que influencia de manera important la transmissió del microorganisme^{15,90,138,389,399}.

5.2. Distribució de tipus *emm* i de SAg

En la present investigació es van identificar un total de 29 tipus *emm* en les 126 soques de *S. pyogenes* analitzades, essent el tipus *emm1* (17,5%) el més prevalent, seguit dels tipus *emm3* (8,7%), *emm4* (8,7%), *emm12* (7,1%), *emm28* (7,1%), *emm11* (6,3%) i *emm77* (6,3%). Aquests set tipus representaren el 61,9% del total de soques i han estat identificats entre els més freqüents a Amèrica del Nord i Europa^{15,90,399-405}. A Espanya, si bé la distribució de tipus *emm* en relació a la resistència a macròlids està ben caracteritzada⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁹, són escassos els estudis on s'hagi avaluat la distribució general dels tipus circulants a la població. Un estudi recent del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, en el que s'han analitzat 708 soques de *S. pyogenes* aïllades de mostres clíniques diverses entre 1994 i 2005 en 63 centres espanyols, indica una distribució encapçalada pels tipus *emm4* i *emm1*, ambdós a

frequències al voltant del 14%, seguits per *emm28* (10,3%), *emm6* (8%), *emm12* (7,8%), *emm3* (6,8%) i *emm75* (6,4%)⁴¹⁰.

La distribució dels tipus *emm* de soques causants d'infeccions invasives ha estat extensivament caracteritzada en diversos països europeus gràcies en gran part a la iniciativa del programa Strep-EURO. Els estudis de base poblacional realitzats en els últims anys mostren en general un predomini dels tipus *emm1*, *emm3*, *emm12* i *emm28*, encara que amb variacions en diferents països i importants fluctuacions temporals en alguns tipus. Un fet remarcable observat darrerament en diversos països és l'emergència de tipus *emm* més elevats (77, 78, 81, 82, 83, 87, 89) com a causa significativa d'infeccions invasives⁴¹¹. Així per exemple, a Suècia en un estudi realitzat entre 2002 i 2004 els tipus *emm89* i *emm81* encapçalen per primer cop en un país europeu la relació de tipus *emm* causants d'infeccions invasives³⁸⁷. Per altra banda, en un estudi realitzat entre 1994 i 2003 a Holanda el tipus *emm1* va ser el més prevalent, seguit de *emm3*, *emm89*, *emm28*, *emm12* i *emm6* demostrant-se en aquest cas un notable increment de soques *emm1* del 11-12% el 1995-1999 al 40% el 2001³⁹⁹, situació similar a la descrita a Dinamarca entre 1999 i 2002⁴¹². A Itàlia, un estudi en que s'han analitzat les dades corresponents a 11 anys de vigilància epidemiològica (1994-2005) indica que la major part de les soques causants d'infeccions invasives pertanyen als tipus *emm1*, *emm89*, *emm3*, *emm12*, *emm4*, *emm6* i *emm18*, amb una proporció estable durant el període estudiat dels tipus *emm1*, *emm3* i *emm6*, un increment més recent dels tipus *emm12*, *emm4* i *emm18*, i una notable disminució del tipus *emm89*⁴⁰⁴.

En altres països industrialitzats fora d'Europa els tipus més comuns observats en estudis poblacionals d'infecció invasiva són M1, M3, MPT2967 (*emm114*) i M12 a Canadà (2000-2002)¹³⁸; *emm1*, *emm3*, *emm28*, *emm12* i *emm89* als Estats Units (2000-2004)³⁸⁸; i *emm3*, *emm28*, *emm2*, *emm62* i *emm41* a Israel (1995-1997) on s'ha observat una inusual baixa prevalença de soques *emm1*^{413,414}.

En el cas de les infeccions no invasives, en el major estudi de base poblacional realitzat als Estats Units en el que es va analitzar 1.975 soques aïllades de faringitis no complicada durant un període de dos anys (2000-2002), a banda de fluctuacions temporals i variacions en funció de l'àrea geogràfica, els tipus *emm* més freqüentment implicats en el dos anys del estudi van ser *emm1*, *emm12*, *emm28*, *emm3*, *emm4*, *emm2* i *emm6* que representaren en conjunt el 78% de les soques analitzades⁴⁰⁵.

L'epidemiologia de les infeccions produïdes per *S. pyogenes* és complexa, fet que es troba emfatitzat pel patró fluctuant tant temporal com geogràfic en la distribució dels tipus *emm*, la qual cosa és consistent amb la natura tipus específica de la immunitat contra les infeccions produïdes pel microorganisme^{37,42}. En el present estudi, encara que no es van observar importants fluctuacions anuals en els tipus *emm* més prevalents, es va constatar l'aparició a partir de l'any 2002 dels tipus *emm11*, *emm25* i del nou subtipus *emm1.25* en un nombre significatiu de soques.

L'anàlisi de les seqüències determinants dels tipus *emm* va revelar una notable conservació, i si bé alguns tipus es van trobar representats exclusivament per variants al·lèliques, la major part de les soques (71,4%) van presentar seqüències idèntiques a les respectives seqüències de referència del CDC (designades “.0”) moltes de les quals corresponen a soques aïllades fa entre 20 i 70 anys. Com a resultat de la present investigació es van afegir tres nous subtipus a la base de seqüències del CDC designats *emm1.25*, *emm12.27* i *emm83.4* que difereixen de les respectives seqüències de referència en un a tres canvis aminoacídics. En altres estudis epidemiològics recents s'ha observat també una notable proporció de soques caracteritzades per tipus *emm* única o principalment representats per seqüències idèntiques a les respectives seqüències de referència del CDC amb una contribució de subtipus relativament minoritària^{405,415}. Una notable excepció és el tipus *emm3* del qual el subtipus *emm3.1* és el més freqüent en les soques contemporànies, fet que ha estat també constatat en aquest estudi. En anys recents la descripció de nous tipus *emm* és relativament infreqüent i prové principalment de països on l'epidemiologia de les infeccions produïdes per *S. pyogenes* ha estat menys estudiada com Etiòpia²⁹², Malàisia⁴¹⁶, Tailàndia²⁹⁰ i Brasil⁴¹⁷. Així, malgrat que la porció amino-terminal de la proteïna M es troba sotmesa a la pressió selectiva exercida per la resposta immune de l'hoste^{8,37}, aquestes dades suggereixen que deuen existir restriccions estructurals o funcionals que limitin l'aparició d'infinites seqüències.

El coneixement de la distribució dels tipus *emm* més prevalents ha servit de base per a la formulació d'una vacuna 26-valent¹⁶⁷ que ha estat avaluada en adults i pot cobrir teòricament el 86% de les soques causants de faringitis⁴⁰⁵ i el 79% de les soques invasives aïllades als Estats Units³⁸⁸. En base als tipus *emm* detectats en la col·lecció analitzada en el nostre estudi, la cobertura d'aquesta vacuna abastaria el 70,6% del total

de soques (62,9% de les aïlades en infeccions invasives i 72,2% de les aïlades en infeccions no invasives).

Per altra banda, s'ha observat que la distribució de tipus *emm* de soques recuperades a Amèrica del Nord i Europa difereix notablement de la de països menys desenvolupats com Etiòpia, Nepal i l'Índia on a més s'ha evidenciat una major diversitat de tipus^{291,292,418,419}. Així per exemple, en un estudi realitzat al Nepal amb soques aïlades d'infeccions no invasives en infants només es van trobar 7 tipus *emm* (19,2% de les soques) inclosos a la vacuna 26-valent²⁹¹.

Un tema que roman controvertit és si les soques causants d'infeccions invasives són simplement un reflex de les aïlades d'infeccions no invasives o si hi ha evidències de que alguns serotips o soques pertanyents a determinats serotips presentin un major potencial virulent. Els primers estudis publicats als inicis dels anys 1990 coincidint amb el ressorgiment d'infeccions invasives van identificar un canvi en els serotips prevalents i una major associació de serotips particulars a infeccions invasives. Al Regne Unit l'anàlisi de 12.469 soques de *S. pyogenes* enviades a un centre de referència per a la seva tipificació entre 1980-1987 va revelar que dels serotips M6, M49 i M81 predominants durant els primers anys de l'estudi es passava a un predomini dels serotips M1, M3 i M28 a finals d'aquest⁴²⁰. De forma notable, el 80% de les soques procedents d'infeccions greus pertanyien al serotip M1. Els brots epidèmics d'infecció invasiva descrits al Nord d'Europa el 1988-1989 semblen confirmar aquestes dades ja que la major part de les soques pertanyien també al serotip M1, essent del 70% a Suècia⁴²¹ i del 89% a Noruega⁴²². Als Estats Units l'estudi d'una col·lecció de soques enviades al CDC per a la seva tipificació entre 1972 i 1988 va evidenciar també un increment significatiu de soques dels serotips M1, M3 en el període 1980-1988 en relació a 1972-1979 i una major prevalença d'aquests serotips en infeccions invasives i en casos fatals respecte a la d'altres serotips¹⁸. Johnson *et al.* van examinar més de 1.100 soques aïlades als Estats Units entre 1988 i 1990 i observaren una associació estadísticament significativa d'aquests mateixos serotips a infeccions invasives en comparació a casos de faringitis no complicada¹⁷⁵. Subsegüentment es va postular que l'emergència de clons altament virulents possiblement com a variants de soques preexistents podia explicar al menys en part l'inesperat fenomen epidemiològic observat a finals de la dècada del 1980. En aquest sentit, Musser *et al.* van analitzar la diversitat genètica

mitjançant MEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) d'una col·lecció de 108 soques de *S. pyogenes* aïllades de pacients afectats de SSTS i altres infeccions invasives als Estats Units entre 1986 i 1990, i encara que es va observar una considerable variació genètica en les soques analitzades que es van distribuir en 33 tipus electroforètics, prop de la meitat dels episodis invasius i fins a dos terços dels casos de SSTS estaven causats per soques pertanyents a dos clons designats com tipus electroforètics ET1 i ET2 que expressaven els serotips M1 i M3, respectivament⁴²³. En aquest mateix estudi es va observar també una forta correlació entre la producció de l'exotoxina SpeA i els casos de SSTS tant en soques clonals com en soques de llinatges filogenètics distants, correlació que va ser igualment evidenciada en altres estudis coetanis^{17,424,425}. Aquestes dades es van interpretar com una forta evidència circumstancial de que SpeA era un factor primordial en la patogènesi de la SSTS. En un estudi subsegüent en el que es van comparar soques contemporànies procedents d'Amèrica del Nord i Europa aïllades de casos invasius amb soques recuperades durant els anys 1920 i 1930 es va demostrar que les soques contemporànies assignades als tipus electroforètics ET1/M1 i ET2/M3 es trobaven àmpliament disseminades i presentaven les variants al·lèliques *speA2* i *speA3*, respectivament, mentre que les soques dels mateixos serotips i tipus electroforètics recuperades abans contenien l'al·lel *speA1*⁴²⁶. Els autors van proposar que el canvi al·lèlic de SpeA1 a SpeA2 i SpeA3 podia haver contribuït al progressiu increment en la virulència del bacteri. Kline *et al.* van demostrar posteriorment que SpeA3 presenta una activitat mitogènica i una afinitat per molècules del CMH de Classe II significativament incrementades respecte a SpeA1, mentre que en el cas de SpeA2, si bé la seva afinitat per molècules de Classe II és lleugerament superior a la de SpeA1, no mostra una major activitat mitogènica⁴²⁷. Més recentment, Sumby *et al.* analitzant una col·lecció de soques M1 temporal i geogràficament diversa han suggerit que el reemplaçament clonal representa un factor clau en el recent increment en la freqüència i gravetat de les infeccions invasives causades per soques del serotip M1⁹³. Com a resultat d'estudis de seqüenciació genòmica, DNA-DNA *microarrays* i anàlisis de SNP (*single-nucleotide polymorphism*) els autors proposen que el clon actual M1 ha evolucionat a través d'una sèrie d'esdeveniments genètics que inclouen la transducció de profags portadors de SpeA2 i la DNasa SdaD2 i la recombinació recíproca d'un segment de 36 kb que codifica les toxines extracel·lulars NAD-glicohidrolasa (NADasa) i estreptolisina O

procedent probablement d'una soca M12. De forma similar Beres *et al.* han suggerit que l'adquisició seqüencial de factors de virulència codificats per bacteriòfags pot haver originat un inusual subclon virulent del serotip M3 àmpliament disseminat en l'actualitat⁹⁵. No obstant això, en un altre estudi recent en que es va analitzar la dinàmica del contingut de profags i dels respectius gens de virulència associats en soques de *S. pyogenes* dels serotips M1 i M28 aïllades d'infeccions invasives i no invasives entre 1959 i 1996 a Holanda, encara que es va observar un increment en el contingut de profags en les soques contemporànies, aquest enriquiment va ser similar en soques corresponents a ambdues categories d'infecció⁴²⁸. Els autors suggereixen que l'augment en la freqüència d'infeccions invasives es pot haver vist afavorit per aquest increment general en el potencial virulent més que per l'emergència de clons hipervirulents.

En base a la distribució dels tipus *emm* obtinguda en la nostra investigació, si bé les freqüències relatives dels tipus més prevalents van variar entre infeccions invasives i infeccions superficials, no es va poder establir clarament una associació entre tipus *emm* particulars i infecció invasiva encara que la possibilitat de trobar aquestes associacions es pot haver vist limitada pel baix nombre de soques de cada tipus *emm*. Es va trobar força heterogeneïtat de tipus *emm* en les soques causants d'infecció invasiva, identificant-se 15 tipus diferents en les 27 soques. Els tipus *emm3*, *emm4*, *emm25* i *emm77* van ser els més freqüents en els casos invasius i es van trobar també entre els més prevalents en infeccions no invasives amb l'excepció del tipus *emm25*. Cal remarcar però, que les soques invasives *emm25* van ser aïllades de pacients HIV i ADVP i probablement formaven part d'un brot en pacients ADVP descrit a la ciutat de Barcelona durant el mateix període³⁸¹. Així, l'associació de soques *emm25* a infeccions invasives observada en aquest estudi podria reflectir un brot epidèmic en pacients amb una major vulnerabilitat a quadres invasius d'origen cutani degut al comportament de risc, més que una virulència intrínseca associada a aquest tipus *emm* particular. De fet, el tipus *emm25* és extremadament infreqüent tant a Amèrica del Nord com a Europa on curiosament s'ha descrit principalment formant part de brots en pacients ADVP^{429,430}. A Berna (Suïssa), la investigació d'un brot en pacients ADVP causat per un clon *emm25* es va relacionar amb un distribuïdor específic o un lloc comú d'adquisició de la droga i amb els hàbits de consum⁴³⁰, situació similar a la referida a Barcelona³⁸¹.

Per altra banda, el tipus *emm25* s'ha documentat encara que amb baixa prevalença en altres zones geogràfiques com Tailàndia²⁹⁰, Nepal²⁹¹, Taiwan⁴³¹ i Etiòpia²⁹² sense que existeixi constància d'una associació particular a infeccions invasives.

Coincidint amb les dades obtingudes en la present investigació, diversos estudis recents en els que s'ha comparat la distribució de tipus *emm* en infeccions invasives i no invasives en una mateixa àrea geogràfica durant un mateix període s'ha observat també un notable encavalcament en la distribució dels tipus *emm* més freqüents en ambdues categories d'infecció⁴³²⁻⁴³⁴. Degut a que pot existir variabilitat genètica en soques del mateix tipus *emm*, altres investigadors han aplicat aproximacions genètiques addicionals com REA (*restriction enzyme analysis*), PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) o RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) sense identificar cap clon particularment associat a infeccions invasives^{385,401,435-440}. Així per exemple, Muotiala *et al.* van trobar una elevada homologia genètica entre soques del serotip M1 aïllades d'infeccions invasives i faringitis a Finlàndia entre 1988-1995⁴⁴¹. Johnson *et al.* amb la premissa de que si un clon determinat presentava propietats que incrementaven la seva virulència aquest s'hauria de trobar sobrerrepresentat en els casos invasius, van comparar soques dels serotips M1, M3 i M28 procedents de diversos quadres invasius i de faringitis no complicada als Estats Units mitjançant REA i PFGE sense trobar cap clon amb una associació estadísticament significativa a infeccions invasives³⁸⁵. Un altre exemple il·lustratiu va ser aportat per Cockerill *et al.* en un estudi en el que es descriu un brot de set casos d'infecció invasiva greu atribuït a un únic clon del serotip M3⁴⁴². En aquest estudi el brot es va produir en pacients adults amb malalties subjacents en la major part dels casos. De forma notable, la soca clonal associada a aquest brot es va detectar en el 26,5% dels casos de faringitis produïda per *S. pyogenes* en la mateixa àrea i en el 78% dels portadors faringis analitzats, que eren tots ells nens en edat escolar. Aquests estudis van aportar l'argument de que els clons causants d'infecció invasiva es troben àmpliament distribuïts en la població, essent especialment la població pediàtrica on la prevalença d'infeccions superficials i de portadors asimptomàtics és elevada el principal reservori per a la disseminació de soques causants d'infecció invasiva en individus susceptibles.

En contrast amb aquestes dades, Cleary *et al.* en un estudi de 56 soques de *S. pyogenes* del serotip M1 aïllades en els anys 1980 als Estats Units van trobar una

associació significativa de soques amb un determinat perfil RFLP (*random fragment length polymorphism*) (perfil I) a infeccions invasives respecte d'infeccions no complicades⁴²⁵. En un recent estudi poblacional realitzat a Dinamarca, s'ha observat una associació significativa de soques *emm1* a casos invasius en comparació a infeccions no invasives i variacions en el patró de SAgS de les soques *emm1*⁴⁰³. En el nostre estudi totes les soques *emm1* compartien un mateix patró de SAgS (*speA*, *speB*, *speF*, *speG*, *speJ*, *smeZ*) i el mateix al·lel *speA* i *smeZ*, i si bé les dues soques *emm1* causants d'infecció invasiva eren del nou subtipus *emm1.25*, aquest mateix subtipus va ser freqüent en els casos no invasius. Aquest mateix patró de SAgS coincideix també amb l'observat per altres investigadors en soques *emm1* associades a un ampli espectre de manifestacions clíniques^{374,402,440,443}. Un altre dels estudis on s'ha suggerit un major potencial virulent de determinats clons ha estat un estudi de base poblacional realitzat a Suècia en el que els resultats combinats de PFGE, tipificació *emm* i perfil genètic de SAgS revelaren subgrups en tipus *emm* específics (*emm89* i *emm81*) amb una major associació a infeccions invasives que altres soques dels mateixos tipus *emm*³⁸⁷. En el nostre cas si bé no es va aplicar la tècnica de PFGE, les soques *emm89* que van representar el 3,7% del total van ser aïllades exclusivament d'infeccions no invasives (faringitis i infeccions cutànies superficials) i presentaven totes elles el mateix patró de SAgS (*speB*, *speF*, *speG* i *smeZ*) que l'observat en el subgrup associat a infeccions invasives de l'estudi esmentat anteriorment.

La relació entre la dotació genètica de factors de virulència específics i el tipus d'infecció ha estat avaluada en diversos estudis sense que s'hagi assolit un clar consens. Contrastant amb estudis inicials en els que es descriu una forta associació de *speA* a infeccions invasives i a casos greus^{17,423,424}, en la present investigació només una de les sis soques aïllades dels pacients afectats de SSTS i/o FN presentava el gen *speA*. De fet, la freqüència del gen *speA* va ser pràcticament idèntica en soques causants d'infeccions invasives i no invasives (33,3% *versus* 31,3%), situació similar a la descrita en un estudi realitzat a Bèlgica on es va trobar també que una elevada proporció de soques aïllades de casos invasius (70,8%) no presentaven el gen *speA*⁴⁰¹. En una investigació realitzada als Estats Units en població pediàtrica sobre la relació entre soques aïllades de faringitis i soques aïllades de casos invasius es va trobar una proporció significativament més elevada de soques positives per *speC* en casos de faringitis que en casos invasius,

mentre que la proporció de soques portadores de *speA* va ser similar en ambdues categories d'infecció⁴³⁵. Tal com s'ha descrit prèviament, l'anàlisi de la seqüència del gen *speA* va revelar una forta associació dels al·lels *speA2*, *speA3* i *speA4* a soques *emm1*, *emm3* i *emm6*, respectivament^{98,219,220,444}. L'al·lel *speA1* es va trobar en soques úniques pertanyents a tres tipus *emm* diferents (*emm18*, *emm4* i *emm49*). En altres estudis *speA1* s'ha descrit en llinatges filogenètics diversos i en soques aïllades durant la primera part del segle passat i es presumeix que constitueix la variant ancestral^{219,220,426,444}.

SmeZ s'ha descrit com un dels més potents superantígens de *S. pyogenes*⁴⁴⁵, havent-se demostrat que indueix una resposta de citocines en leucòcits mononuclears humans aproximadament 10 vegades més alta que *SpeA*⁴⁴⁶. Aquesta toxina és de codificació cromosòmica i exhibeix una remarcable variació al·lèlica²²⁵. En la nostra investigació el gen *smeZ* es va detectar en el 91,7% de les soques analitzades fet que pot ser degut a que els iniciadors utilitzats no cobrien totes les possibles variants al·lèliques. L'anàlisi de la seqüència del gen *smeZ* va revelar la presència de 23 al·lels, cinc dels quals designats com *smeZ-35* a *smez-39* es van identificar per primera vegada en aquest estudi. Coincidint amb observacions prèvies²²⁵, es va trobar una forta associació entre l'al·lel *smeZ* i el tipus *emm*, amb escasses excepcions de soques del mateix tipus *emm* i diferent al·lel *smeZ*, i el mateix al·lel *smeZ* en soques de diferents tipus *emm*.

Considerant les diferències en la distribució individual dels gens analitzats (*speA-C*, *speF-J*, *speM*, *speL*, *ssa* i *smeZ*) entre infeccions invasives i no invasives, únicament es va observar una associació estadísticament significativa a infeccions invasives del gen *ssa* (44,4% versus 24,2%, $p = 0,03$). La distribució del gen *ssa* en soques invasives ha estat investigada en diversos estudis, havent-se observat a freqüències que varien considerablement. Així per exemple s'han descrit prevalences del 76% en un estudi realitzat al Japó (1994-1999)⁴⁴⁷, del 44% a Dinamarca (1999-2002)⁴¹², del 23,6% en un estudi multicèntric europeu (1997-1998)⁴⁰², i del 4,9% a Polònia (1997-2005)⁴⁴⁸. Coincidint amb els resultats de la present investigació, Murakami *et al.* observaren en un estudi realitzat al Japó una major freqüència del gen *ssa* en soques aïllades d'infeccions invasives respecte de no invasives (76% versus 37%, $p < 0,01$)⁴⁴⁷, però aquesta associació no ha esta confirmat en altres estudis^{401,434,440}. En la nostra sèrie el gen *ssa* es va trobar en soques de determinats tipus *emm* incloent totes

les soques *emm3*, *em4.0*, *emm22.0*, *emm25.2*, *emm44/61.0* i *emm87.0* i en soques úniques d'altres tipus. La forta associació del gen *ssa* a determinats tipus *emm*, especialment *emm3* i *emm4*, ha estat també evidenciada en altres treballs^{401,402,412,440,447,449,450}. Les variacions en la prevalença del gen *ssa* en diferents estudis podrien dependre per tant de la distribució de tipus *emm* en la població de soques de *S. pyogenes* analitzada.

L'anàlisi detallada dels patrons de SAGs de les soques investigades en el present estudi va revelar una forta correlació entre el patró de SAGs i el tipus *emm* independentment del tipus d'infecció. Les soques del mateix tipus *emm* compartien un perfil d'exotoxines comú en el cas dels tipus *emm1*, *emm3*, *emm6*, *emm9*, *emm59*, *emm64*, *emm87* i *emm89*, i encara que es va observar certa heterogeneïtat dintre d'altres tipus, en general presentaven un perfil predominant amb variacions consistents principalment en la presència o absència d'un o dos gens d'exotoxines respecte del perfil majoritari. La principal excepció va ser la soca *emm4.2* que diferia en quatre dels gens analitzats i en l'al·lel *smeZ* del perfil dominant de les soques *emm4.0*. No es va identificar un patró de SAGs comú o predominant en les soques aïllades dels casos invasius ni en les sis soques aïllades pacients afectats de SSTS i/o FN, que contràriament van presentar una notable diversitat de tipus *emm* i consegüentment múltiples patrons de SAGs. Similars resultats han estat obtinguts en altres estudis en els que si bé s'han trobat perfils de SAGs específics de tipus *emm* no s'ha trobat un perfil específic associat a infeccions invasives ni a SSTS el que suggereix que no es requereix una dotació particular de SAGs per incrementar la virulència^{374,401,402,433,450,451}. Així, en un estudi europeu en el que s'han analitzat un major nombre de soques, malgrat la presència d'un nombre variable de perfils de SAGs en soques del mateix tipus *emm*, cada tipus *emm* estava caracteritzat per un o dos perfils dominants i particulars de cada tipus, sense observar diferències significatives entre soques aïllades d'infeccions invasives, faringitis o infeccions de ferides⁴⁰². En un altre estudi realitzat a Holanda en el que es va analitzar la diversitat genètica de 76 soques clíniques dels vuit serotips més freqüents en aquell país (M1, M3, M12, M28, M4, M6, M11 i M89) i la possible associació entre una dotació genètica particular i SSTS no es va identificar un perfil genòmic comú en les soques associades a SSTS, essent aquestes similars a les no

associades a SSTS en el contingut de gens de virulència i en altres biomarcadors analitzats⁴⁵¹.

Per tal d'aportat una perspectiva més global entre el contingut genòmic de factors de virulència coneguts i de gens encara no investigats, en un estudi recent s'han comparat soques invasives amb no invasives de diversos serotips utilitzant *microarrays* dissenyats per a detectar la presència de 226 gens incloent els que codifiquen factors de virulència clàssics, gens homòlegs als que codifiquen factors de virulència en altres espècies i ORFs (*open reading frames*) que codifiquen proteïnes de funció putativa o desconeguda⁴⁴³. Malgrat el gran nombre de gens estudiats no es van obtenir diferències significatives en la distribució de cap dels gens investigats entre soques invasives i no invasives utilitzant mètodes estadístics estàndard. Utilitzant altres metodologies que permeten una anàlisi més complexa (*genetic algorithm neural network* GANN, *support vector regression* i *classification trees*) únicament es van trobar tres gens (*ssa*, *mf4* i *spa*) amb una associació marginal a soques invasives.

La manca d'associació de forma conclouent d'una dotació específica de factors de virulència amb un major potencial invasiu emfatitza la complexitat de la malaltia estreptocòccica. Cal considerar també que diferències en l'expressió de gens implicats en la virulència o determinats factors relacionats amb l'hoste poden ser més decisius en l'evolució de la infecció. L'expressió de factors de virulència de *S. pyogenes* es troba sota el control d'un complex conjunt global de reguladors transcripcionals. Així per exemple, l'anàlisi de l'expressió gènica de soques de *S. pyogenes* fagocitades ha revelat que la resposta del regulador Ink/Inrr és crítica per a la supervivència del microorganisme a l'interior de les cèl·lules fagocítiques⁴⁵² i que l'eliminació del gen regulador *irr* dona lloc a una soca mutant amb virulència notablement atenuada en un model animal d'infecció necrosant⁴⁵³. Un altre dels reguladors de dos components més ben caracteritzats és CovR-CovS (*control of virulence*) que modula l'expressió de diversos factors de virulència incloent la càpsula, la proteasa SpeB i la citotoxina SLS i juga un paper rellevant en l'adaptació de *S. pyogenes* a diverses condicions d'estrès com calor, àcid i hiperosmolaritat⁴⁵⁴. Sumbly *et al.* analitzant l'expressió gènica de soques procedents de faringitis i d'infeccions invasives van obtenir dos transcritomes clarament diferenciats en funció del tipus d'infecció i van evidenciar també que mutacions en el

locus covR-covS es podien correlacionar amb un canvi fenotípic de formes d'infecció superficials a invasives¹⁰⁴.

La intensitat de la resposta individual a la infecció és un altre paràmetre que pot ser determinant en l'evolució de la infecció. La importància de la immunitat humoral en la progressió de la infecció ha estat emfatitzada en diversos estudis, havent-se observat que baixos nivells d'anticossos protectors contra la proteïna M i contra altres antígens de superfície i d'anticossos neutralitzants de SAgS constitueixen importants factors de risc en el desenvolupament d'infeccions invasives⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁹. En un estudi realitzat per Basma *et al.* es van comparar 23 pacients afectats d'infeccions invasives greus (SSTS/FN) amb 12 casos no greus (bacterièmia, cel·lulitis sense signes d'hipotensió o fracàs multiorgànic) i amb controls sans i s'observà que si bé els casos invasius presentaven nivells significativament més baixos d'anticossos protectors contra la proteïna M i d'anticossos neutralitzants de SAgS en relació als controls sans, els nivells eren igualment baixos en els casos invasius greus i no greus⁴⁵⁵. En base a aquests resultats els autors van suggerir que si bé la manca d'immunitat humoral pot conferir un major risc d'infecció invasiva, no sembla modular l'evolució de la infecció a quadres sistèmics greus i apuntaren el paper rellevant de factors immunogenètics involucrats en la resposta a la infecció. En aquest sentit, diverses línies d'investigació han aportat evidències de que polimorfismes en les molècules HLA de classe II influeixen la magnitud de la resposta als SAgS, el que podria significar una major predisposició de determinats individus als efectes tòxics dels SAgS i oferir una possible explicació a les diferències individuals en la sensibilitat a infeccions greus produïdes per *S. pyogenes*^{227,228,460}. Addicionalment, les diferències individuals a la infecció d'un microorganisme que colonitza primàriament superfícies mucoses poden implicar variacions en la producció de pèptids antibacterians presents en superfícies mucoses. S'han realitzat estudis en aquesta línia utilitzant un model animal defectiu en la producció del pèptid antimicrobià CRAMP (*cathelicidin-related antimicrobial peptide*) en el que s'ha evidenciat una major sensibilitat a la infecció cutània necròtica per *S. pyogenes*⁴⁶¹.

5.3. Resistència antimicrobiana

Una característica remarcable de *S. pyogenes* confirmada en el present estudi és la seva continuada sensibilitat a la penicil·lina amb baixos valors de CIM (rang $\leq 0,016$ - $0,032$ $\mu\text{g/ml}$, $\text{CIM}_{90} \leq 0,016$). De fet, no s'ha descrit cap soca clínica resistent, i un estudi en el que es va analitzar la sensibilitat de soques de *S. pyogenes* aïllades en un període de 80 anys va revelar que l'activitat *in vitro* de la penicil·lina no s'havia modificat en tots aquests anys²⁴⁶. El perquè d'aquesta situació tenint en compte l'adquisició de resistència en altres espècies del gènere com *S. pneumoniae* i estreptococs del grup viridans continua essent una qüestió per dilucidar. No està clar si l'existència de barreres fisiològiques o genètiques actuen prevenint l'adquisició i manteniment de la resistència a β -lactàmics en *S. pyogenes* o si el desenvolupament de resistència en aquesta espècie és imminent²⁴⁷.

Encara que en condicions de laboratori s'han obtingut soques de *S. pyogenes* resistents a penicil·lina que expressen PBPs de baixa afinitat, l'observació en aquests mutants de greus defectes fisiològics amb taxes de creixement extremadament baixes i importants anormalitats morfològiques suggereix que és altament improbable que aquestes soques puguin aparèixer i mantenir-se com aïllats clínics⁴⁶². En el cas de *S. pneumoniae* la resistència a penicil·lina es deu a alteracions en una o més de les PBPs causades per l'adquisició i incorporació de fragments de DNA per transformació a partir d'altres espècies relacionades donant lloc a gens *pbp* amb estructura en mosaic⁴⁶³. A diferència de *S. pneumoniae*, no s'ha demostrat que *S. pyogenes* sigui naturalment competent per a la transformació i a més presenta barreres per a l'adquisició i incorporació de DNA exogen que inclouen la producció de diferents DNAses extracel·lulars i d'enzims de restricció codificats per bacteriòfags.

Els macròlids constitueixen el tractament d'elecció en pacients al·lèrgics als β -lactàmics i també s'han mostrat eficaços en l'eradicació del microorganisme en casos de faringitis recurrent degut al fracàs terapèutic previ amb β -lactàmics^{77,268}. La clindamicina està recomanada en el tractament d'infeccions invasives greus com FN i SSTs degut al seu efecte en la inhibició de la producció de toxines. Contrastant amb la uniforme sensibilitat de *S. pyogenes* als β -lactàmics, des de la descripció de les primeres soques de *S. pyogenes* resistents a eritromicina el 1959 al Regne Unit²⁴⁹ i el 1968 als

Estats Units²⁵⁰ i Canadà²⁵¹, la resistència a macròlids s'ha observat en diversos països encara que amb una remarcable variabilitat en la freqüència de resistència en diferents àrees geogràfiques. A Espanya les primeres soques de *S. pyogenes* resistents a eritromicina es van descriure a finals del 1980^{464,465}, i a partir del 1990 la resistència es va incrementar progressivament assolint freqüències l'any 1995 de fins el 34,8% en algunes àrees geogràfiques^{257,258,466}. Subsegüents estudis multicèntrics realitzats a Espanya han evidenciat un patró fluctuant en la freqüència de resistència observant-se un increment significatiu del 23,5% el 1998⁴⁶⁷ al 29,7% el 2001⁴⁶⁸ i una disminució fins el 21,7% l'any 2004⁴⁶⁹. En la nostra sèrie la freqüència de resistència a eritromicina durant el període estudiat va ser del 27,8%, observant-se un increment anual progressiu de la resistència del 16,6% el 1999 fins el 38,8% de gener a juny del 2003.

Altres països com Canadà, Polònia, França i Bèlgica també han experimentat recentment importants augments en la freqüència de resistència a macròlids en *S. pyogenes*. A Toronto (Canadà) la resistència a eritromicina es va incrementar més de 6 vegades en un període de cinc anys passant del 2,1% el 1997 al 14,4% el 2001^{470,471}. A Polònia la resistència va augmentar de l'1,8% en el període 1996-1997 fins el 25,1% en 2000-2002⁴⁷². De forma similar, a França es va documentar una freqüència de resistència a eritromicina del 6,2%⁴⁷³ entre 1996-1999 que assolí el 22,4% durant el període 2002-2003⁴⁷⁴, i a Bèlgica la resistència es va duplicar entre els períodes 1995-1997 (6,5%) i 1999-2003 (13%)^{475,476}. En altres països europeus els estudis realitzats en els últims anys revelen elevades freqüències de resistència en països de l'àrea mediterrània com Itàlia (25,5%, 2002-2003)⁴⁷⁷, Portugal (26,6%, 1998-2003)⁴⁷⁸ i Grècia (24%, 1999-2002)⁴⁷⁹, moderades a Alemanya (14%, 2002-2003)⁴⁸⁰, i baixes a Turquia (2,6%, 2000-2002)⁴⁸¹, Bulgària (2,1%, 1995-2001)⁴⁸², Dinamarca (2,7% 2001)⁴⁸³ i Noruega (2,7%, 1993-2002)⁴⁸⁴. Freqüències de resistència variables també han estat observades en un estudi realitzat entre 2000 i 2001 en deu països d'Europa Central i de l'Est, on les taxes de resistència van oscil·lar entre el 0,9% i el 25%⁴⁸⁵.

Als Estats Units diversos estudis multicèntrics publicats en els últims anys indiquen que la resistència a macròlids en *S. pyogenes* es manté al voltant del 4-6%^{340,486,487}, situació similar a la descrita en alguns països d'Amèrica del Sud com Argentina (8%)⁴⁸⁸ i Brasil (2%)⁴⁸⁹. A Àsia s'han descrit elevades taxes de resistència a Corea (44,8%)⁴⁹⁰, Hong Kong (26%)⁴³⁶ i considerablement més baixes a l'Índia (2,7%

entre 1986-2002 però que assoleix el 13,8% l'any 2002)⁴⁹¹. A Taiwan, en comparació a les elevades freqüències de resistència registrades abans de l'any 2000 (40-70%), la resistència ha disminuït considerablement en els últims anys fins a situar-se en valors inferiors al 20%^{492,493}

Les variacions en la freqüència de resistència entre diferents àrees geogràfiques o en una mateixa àrea s'han atribuït a variacions en el consum de macròlids i a fluctuacions naturals en els clons prevalents, però donada la complexitat de l'ecologia de la resistència que es troba influenciada per múltiples variables, les causes de les oscil·lacions en la resistència són sovint difícils d'esbrinar. Diversos estudis han emfatitzat la relació temporal entre el consum de macròlids a la comunitat i la freqüència de resistència en *S. pyogenes*^{466,471,494-499}. Seppälä *et al.* van proporcionar evidències d'aquesta relació temporal en un estudi nacional realitzat a Finlàndia on després d'una reducció en l'ús de macròlids, principalment d'eritromicina, es va constatar una disminució significativa en la freqüència de resistència en *S. pyogenes* del 16,5% el 1992 fins el 8,6% el 1996⁴⁹⁷. Una experiència similar es va descriure a Taiwan on les mesures per alleugerar el problema creixent de la resistència a macròlids van donar lloc a una reducció en el consum del 52% entre 1999 i 2003 i a una concomitant disminució de la resistència a eritromicina en *S. pyogenes* del 46% el 1999 al 17% el 2003⁴⁹³.

A Espanya Granizo *et al.* en un estudi realitzat entre 1986-1997 van trobar una correlació positiva entre l'increment en el consum de macròlids, especialment dels nous derivats de llarga activitat que s'administren una vegada (azitromicina, diritromicina) o dues vegades (claritromicina, roxitromicina) al dia, i l'augment de la freqüència de soques de *S. pyogenes* resistents a eritromicina⁴⁶⁶. Aquest mateix efecte s'ha observat en altres països com Canadà⁴⁷¹ i Eslovènia⁴⁹⁹. En base a criteris farmacodinàmics s'ha suggerit que l'exposició bacteriana a concentracions baixes i perllongades de macròlids pot tenir una paper important en la selecció de resistència. Així, els macròlids amb baixa C_{max} i elevada vida mitja (com els que s'administren una o dues vegades al dia) proporcionen probablement una finestra selectiva més ampla, representant una exposició bacteriana més perllongada a concentracions subinhibitòries que poden afavorir de manera més eficient la selecció de resistència⁵⁰⁰.

Per altra banda, en un estudi realitzat en un hospital de Cantàbria es va constatar una reducció significativa en la resistència a eritromicina en *S. pyogenes* sense que es produís una variació en el consum⁵⁰¹. Aquest fenomen es va atribuir a l'emergència i disseminació clonal de soques sensibles dels tipus *emm1* i *emm3*.

Al Japó la progressiva escalada de la resistència durant els anys 1970 fins assolir freqüències properes al 70%, i que va disminuir fins el 22% als inicis dels anys 1980, va ser causada majoritàriament per soques del serotip T12^{252,502}. En aquest cas, si bé la resistència es va trobar influenciada per l'ús elevat de macròlids va estar clarament associada a la disseminació d'un serotip particular. Altres exemples que posen de manifest la presència de focus geogràfics d'elevades freqüències de resistència en combinació amb la disseminació i rellevament clonal han estat proporcionats per dos recents estudis longitudinals de soques de *S. pyogenes* recuperades de mostres faríngies a Pittsburgh (Estats Units). En la primera investigació realitzada entre 1998 i 2001, el 100% de les soques eren sensibles a macròlids fins a l'últim període de l'estudi (octubre 2000 a maig 2001) en el que la resistència es va incrementar fins el 48% degut a la disseminació d'un únic clon del tipus *emm6*⁵⁰³. En un estudi subsegüent realitzat a la mateixa localitat entre setembre de 2001 i maig de 2002 es va observar una resistència mitja del 9,6% però que assolí el 35% en els dos últims mesos de l'estudi, associada en aquesta ocasió a dos únics clons dels tipus *emm75* (87%) i *emm1* (13%)⁵⁰⁴.

La prevalença dels diferents mecanismes de resistència a macròlids en *S. pyogenes* és variable en diferents àrees geogràfiques i també pot presentar un patró fluctuant en una mateixa àrea al llarg del temps. En les soques resistents a eritromicina de la nostra sèrie es van analitzar els fenotips de resistència a macròlids i es va efectuar la detecció dels determinats de resistència *mef(A)*, *erm(B)* i *erm(A)* subclasse *erm(TR)*. Es va observar una correlació absoluta entre l'expressió del fenotip M i la presència del gen *mef(A)*, una associació del fenotip MLS_B(c) amb la presència del gen *erm(B)* en totes les soques excepte una en la que es va trobar el gen *erm(TR)*, mentre que les escasses soques amb fenotip MLS_B(i) van presentar indistintament els gens *erm(B)* o *erm(TR)*. Si bé en *S. pyogenes* el fenotip de resistència constitutiu es relaciona amb més freqüència amb la presència del gen *erm(B)* i el fenotip induïble amb el gen *erm(TR)*, altres autors també han constatat que qualsevol dels dos gens es pot relacionar amb el fenotip de resistència constitutiu o induïble^{340,408,472,477,484,505}. Els fenotips de resistència

a macròlids van presentar una variable distribució cronològica amb una tendència cap a l'increment del fenotip M fins l'any 2001, en el que va ser l'únic fenotip observat, i un subsegüent increment del fenotip MLS_B majoritàriament de tipus constitutiu que va suposar el 77,8% de les soques resistents aïllades el 2002 i el 57,1% de les aïllades entre gener i juny de 2003. A Espanya si bé el fenotip M s'ha mantingut extremadament prevalent durant els anys 1990 i inicis del 2000 representant el 90-98,6% de les soques resistents^{257,258,265,406,467,468}, en anys recents diversos estudis indiquen un increment en la prevalença del fenotip MLS_B. Així, l'anàlisi de l'evolució de la resistència a macròlids en soques de *S. pyogenes* aïllades entre 1999-2005 a Guipúscoa i Madrid ha revelat un increment del fenotip MLS_B a partir de l'any 2003 que ha passat a representar el 50% de les soques resistents en els anys 2004 i 2005, mentre que en aquest mateix estudi el 85% de les soques aïllades el 1999 expressaven el fenotip M⁴⁰⁹. Una experiència similar ha estat descrita en un altre hospital de Barcelona entre 1996 i 2003 on es va observar un reemplaçament de soques amb fenotip M per soques amb fenotip MLS_B(c) que van suposar el 59% de les soques resistents durant els anys 2002-2003⁵⁰⁶. Un estudi multicèntric espanyol també ha revelat un increment significatiu de soques amb el fenotip MLS_B(c) l'any 2004, encara que el fenotip M (67,8%) ha continuat essent el predominant⁴⁶⁹. Curiosament al país veí Portugal s'ha descrit una situació inversa amb una disminució progressiva del fenotip MLS_B (85% de les soques resistents el 1998) i un increment del fenotip M (76,6% de les soques resistents el 2003)⁴⁷⁸.

El fenotip M, descrit en *S. pyogenes* inicialment a Finlàndia el 1990, es va incrementar ràpidament en aquest país passant del 38% de les soques resistents el 1990 al 82% el 1992^{306,507}. Les soques resistents amb fenotip M van assolir prevalença en alguns països com Suècia⁵⁰⁸, Canadà⁴⁷⁰, Taiwan⁵⁰⁹ i també a Espanya tal com s'ha comentat anteriorment. En estudis publicats en els últims anys el fenotip M s'ha descrit com el més prevalent a Bèlgica (55%)⁴⁷⁶, Grècia (51-61%)^{479,510}, Alemanya (55-94%)^{480,511}, Argentina (95,7%)⁴⁸⁸, Estats Units (68-70%)^{486,487} i Canadà (62-91%)^{471,512}, mentre que el fenotip MLS_B(c) és prevalent a França (69,4%)⁴⁷⁴ i Dinamarca (46%)⁴⁸³, i el fenotip MLS_B(i) a Noruega (75%)⁴⁸⁴, Polònia (66,6%)⁴⁷² i Bulgària (57,7%)⁴⁸².

En el nostre estudi les soques resistents a eritromicina van pertànyer a 11 tipus *emm*, però cal destacar que cinc tipus *emm* cadascun dels quals associat a un únic genotip de resistència a macròlids (*emm4/mef(A)*, *emm12/mef(A)*, *emm75/mef(A)*,

emm11/erm(B) i *emm25/erm(B)*) van representar el 80% de les soques resistents. De forma notable, les soques d'aquests tipus van constituir només el 7,7% de les soques sensibles el que suggereix una forta associació d'aquests tipus *emm* a la resistència. En un estudi realitzat en tres províncies espanyoles (Madrid, Guipúscoa i Àlaba) entre 1988-1997, encara que es va establir la natura policlonal de les soques de *S. pyogenes* resistents a eritromicina, el 78,8% pertanyien a dos clons *emm4/mef(A)* i *emm75/mef(A)*⁴⁰⁶. En un altre estudi multicèntric realitzat a Espanya entre 1996 i 1999 es va mostrar que les soques dels tipus *emm4*, *st1815*, *emm12* i *emm75* constituïen el 85% de les soques resistents i el 19% de les sensibles⁴⁰⁷. Similars resultats es van obtenir en un estudi realitzat als Estats Units entre 2000-2003 amb soques de *S. pyogenes* aïllades de faringitis en població pediàtrica, on les soques dels tipus *emm75*, *emm12* i *emm4* representaren el 61,7% de les soques resistents i el 28,4% de les sensibles⁴⁸⁶. Els mateixos tipus *emm4*, *emm12* i *emm75* que van constituir la pràctica totalitat de les soques resistents a eritromicina portadores del gen *mef(A)* en el present estudi representaren el 83%, 63,3%, 94,7%, de les soques de *S. pyogenes mef(A)* positives a Grècia⁴⁷⁹, Alemanya⁴⁸⁰ i França⁴⁷³, respectivament.

L'increment de la resistència mitjançada pel mecanisme MLS_B a partir de l'any 2002 observada en el present estudi va ser causada principalment per soques pertanyents a dos tipus *emm* portadores del gen *erm(B)* que no havien estat identificades en anys anteriors, essent les soques del tipus *emm11* les més prevalents seguides per les del tipus *emm25*. Les restants soques portadores del gen *erm(B)* van correspondre a dues soques *emm28* que presentaven la característica de ser resistents a bacitracina i es van detectar també per primera vegada l'any 2002. A Guipúscoa i Madrid, el recent increment de les soques de *S. pyogenes* amb fenotip MLS_B s'ha relacionat especialment amb la ràpida difusió d'un clon *emm11/T11/ST403* que es va començar a detectar el 2002 i va esdevenir el més prevalent entre 2003 i 2005, seguit en ordre de prevalença per un clon *emm28/T28/ST52* que comprenia dos subclons, un bacitracina resistent i l'altre bacitracina sensible⁴⁰⁹. Soques de *S. pyogenes* del tipus *emm11* portadores del gen *erm(B)* s'han descrit amb freqüència en altres països europeus com Bèlgica⁴⁷⁶, França⁴⁷⁴ i ocasionalment a Itàlia⁵¹³. A Espanya es van detectar per primera vegada soques *emm28* portadores del gen *erm(B)* resistents a bacitracina el 1999²³⁸, havent-se descrit també a Portugal⁵¹⁴, França²³⁹ i Bèlgica²³⁷, el que indica la seva disseminació per Europa⁴⁰⁹. La

trobada de soques de *S. pyogenes* resistents a bacitracina emfatitza la necessitat d'utilitzar proves complementaries en la identificació del microorganisme.

En la present investigació la freqüència de resistència a eritromicina va ser lleugerament superior en població pediàtrica que en adults (30,5% *versus* 25,3%) encara que les diferències no van ser significatives. Els resultats obtinguts en altres estudis consultats mostren escassa uniformitat, descrivint-se en alguns casos freqüències similars en ambdós grups de població^{436,471,515}, freqüències significativament més elevades en població pediàtrica^{258,482} o més elevades en adults^{472,481}. No s'evidenciaren diferències significatives en la freqüència de resistència a eritromicina entre soques aïllades d'infeccions invasives o no invasives (22,2% *versus* 29,3%), situació que coincideix amb l'observada en altres estudis^{433,436,437}. Aquestes dades contrasten amb les obtingudes per York *et al.* en un estudi realitzat a l'àrea de San Francisco (Estats Units) durant els anys 1994-1995 en el que s'observà una freqüència de resistència a eritromicina significativament superior en soques de *S. pyogenes* aïllades de casos invasius (32%) que en soques procedents de faringitis (9%)²³⁶.

Si bé i en l'actualitat les tetraciclines no es consideren un tractament d'elecció de les infeccions produïdes per *S. pyogenes* degut a l'elevada freqüència de resistència observada en molts països i a l'existència d'altres alternatives terapèutiques, en els últims anys l'estudi dels determinants genètics de resistència a tetraciclina i el seu possible paper com a cofactor en la selecció de resistència a macròlids ha rebut considerable atenció^{345,483}. La freqüència de resistència a tetraciclina en *S. pyogenes* varia en diferents països, havent-se descrit taxes del 40-50% al Brasil⁵¹⁶, l'Iran⁵¹⁷ i alguns països europeus com Polònia⁴⁷², del 33,7% a Dinamarca³⁴⁶ i de l'11% a Espanya⁵¹⁵. Les dades obtingudes en la present investigació reflecteixen una prevalença de resistència a tetraciclina del 25,4% amb un patró fluctuant al llarg del període estudiat (33% 1999, 19% 2000, 15,8% 2001, 34,4% 2002 i 24,2% de gener a juny de 2003). Comparant la freqüència de resistència a tetraciclina en soques resistents a eritromicina respecte de les sensibles, aquesta va ser superior en les soques resistents a eritromicina (42,8% *versus* 18,7%), trobant-se en el 83,3% de les soques amb fenotip MLS_B i absent en soques amb fenotip M. Aquest resultat són concordants amb els objectivats en estudis realitzats a Espanya i en altres països on una elevada proporció de les soques resistents a eritromicina i especialment les que expressen el fenotip MLS_B,

mostren coresistència a tetraciclina^{409,472,478,483,484,518}, si bé en alguns països com Itàlia s'ha observat també una elevada freqüència de resistència a tetraciclina (69,5%) en soques que expressen el fenotip M⁵⁰⁵.

La resistència a tetraciclina en *S. pyogenes* s'ha associat principalment al gen *tet(M)* i menys freqüentment al gen *tet(O)*³⁴⁵, els quals poden trobar-se en el mateix element genètic mòbil que els gens que codifiquen resistència a macròlids^{302,519}. Coincidint amb les dades aportades per altres investigadors, el gen *tet(M)* va ser el predominant en les soques resistents a tetraciclina analitzades i es va trobar en soques pertanyents a 13 tipus *emm*. El gen *tet(O)* va presentar una distribució restringida a soques *emm77*. A Espanya, Itàlia i Noruega el gen *tet(O)* s'ha observat predominantment en soques *emm77*, havent-se descrit la disseminació clonal de soques *emm77/erm(A)* subclasse *erm(TR)-tet(O)*^{408,409,520}. En el nostre cas, si bé la major part de les soques *emm77* portaven el gen *tet(O)*, només una va ser coresistent a eritromicina i portadora del gen *erm(TR)*. Prop del 60% de les soques resistents a tetraciclina del nostre estudi es van distribuir en els tipus *emm11*, *emm25* i *emm77*, essent els dos primers els predominats en les soques coresistents a eritromicina. Cal assenyalar que en set soques resistents a tetraciclina totes elles del tipus *emm11* es van obtenir resultats negatius en la detecció dels gens *tet(M)* i *tet(O)*, el que suggereix la possible existència d'altres gens de resistència a tetraciclina no investigats.

A diferència de *S. pneumoniae* on la resistència a fluoroquinolones està àmpliament reconeguda i caracteritzada no ha estat fins els últims anys que s'han començat a descriure soques clíniques de *S. pyogenes* amb sensibilitat disminuïda a fluoroquinolones. Els resultats publicats indiquen una prevalença de *S. pyogenes* amb sensibilitat disminuïda a ciprofloxacino (CIM ≥ 2 µg/ml o ≥ 4 µg/ml segons els autors) del 3,5% a Espanya (1998-99)²⁶⁵, del 5,4% a Bèlgica (1999-2002)²⁶⁶ i de fins el 10,9% en un estudi realitzat als Estats Units (2002-2003)⁵²¹. Les soques de *S. pyogenes* altament resistents a fluoroquinolones (CIM levofloxacino >32 µg/ml) són infreqüents i es limiten de moment a casos esporàdics documentat als Estats Units, Espanya i a altres països europeus com Alemanya i Suècia²⁶⁰⁻²⁶⁴. En la present investigació es van detectar dues soques altament resistents a fluoroquinolones (CIM levofloxacino >32 µg/ml) i quatre soques amb sensibilitat disminuïda (CIM ciprofloxacino 2-4 µg/ml, CIM levofloxacino 2-3 µg/ml), el que representa una taxa del 3,2% durant el període estudiat

(gener 1999- juny 2004). Si bé en la meitat dels casos les soques van ser aïllades de pacients d'edat avançada (71-87 anys) afectats de processos respiratoris en els que es va documentar tractament previ amb fluoroquinolones, resulta notori l'aïllament de la resta de soques de pacients pediàtrics (3-8 anys), en els que l'ús de fluoroquinolones no està generalment indicat⁵²². En un estudi realitzat a Bèlgica el 55% de les soques amb sensibilitat disminuïda a fluoroquinolones procedien de pacients pediàtrics i a Espanya en una anàlisi de 226 soques amb sensibilitat disminuïda a ciprofloxacino la proporció corresponent a població pediàtrica va ser fins i tot superior (79,6%)^{259,266}.

En *S. pyogenes* els mecanismes relacionats amb la resistència a fluoroquinolones s'han associat a alteracions localitzades en regions específiques (QRDR) de les dianes DNA girasa i topoisomerasa II i semblen ser anàlegs als descrits en *S. pneumoniae* i altres estreptococs³⁵⁵. Els resultats de la present investigació coincideixen amb els observats prèviament tant en soques clíniques de *S. pyogenes* com en mutants seleccionats al laboratori on s'ha observat que les soques amb sensibilitat disminuïda a fluoroquinolones presenten mutacions únicament en *parC*^{263,266,521,523-527}, mentre que la resistència d'alt nivell s'associa a mutacions addicionals en *gyrA*^{260-264,526}. En les quatre soques amb sensibilitat disminuïda a ciprofloxacino (CIM 2-4 µg/ml) i levofloxacino (CIM 2-3 µg/ml) l'anàlisi de la seqüència de les QRDR va revelar la presència de substitucions en ParC consistents en els canvis aminoacídics Ser80Pro, Ser79Ala, o la doble mutació Ser79Phe i Ala121Val, mentre que les dues soques altament resistents van presentar la doble substitució en ParC Ser79Phe i Ala121Val, i el canvi Ser81Tyr en GyrA. Aquestes dades també confirmen les obtingudes en estudis previs on s'ha evidenciat que en *S. pyogenes* les substitucions més comuns en ParC es situen en la posició aminoacídica 79 on la Ser és reemplaçada per Ala, Phe o Tyr i les substitucions observades amb més freqüència en GyrA afecten al residu 81 amb el reemplaçament de Ser per Tyr o Phe. Alonso *et al.* observaren en una soca de *S. pyogenes* amb sensibilitat disminuïda a ciprofloxacino (CIM 4 µg/ml) la presència d'una única substitució Ser79Ala en ParC, idèntica a l'observada en el present estudi, i demostraren la seva contribució a la resistència mitjançant la transformació amb el fragment de DNA que contenia la mutació en una soca de *S. pneumoniae* prèviament sensible⁵²⁴. En la primera publicació de la caracterització d'una soca de *S. pyogenes* altament resistent a fluoroquinolones (CIM levofloxacino ≥ 32 µg/ml) l'any 2000, Yan *et al* demostraren la

presència de mutacions en ParC (Ser79Tyr) y GyrA (Ser81Phe i Met99Leu)²⁶⁰. Richter *et al.* van descriure en una soca de *S. pyogenes emm12* amb alts nivells de resistència a fluoroquinolones les substitucions Ser79Phe i Ala121Val en ParC i Ser81Tyr en GyrA que són idèntiques a les observades en les soques *emm12.26* altament resistents del present estudi²⁶¹. Els canvis aminoacídics en ParC Ser80Pro i Ala121Val s'han documentat de manera inusual en *S. pyogenes* i en estreptococs β -hemolítics d'altres grups^{261,263,266}. La contribució d'aquestes mutacions a la resistència a fluoroquinolones sembla ser dubtosa ja que s'han observat per si soles en soques de *S. pyogenes* sensibles a levofloxacin (CIM $\leq 0,5$ i $1 \mu\text{g/ml}$)⁵²⁷. Aquestes dades suggereixen, almenys en la soca en la que es va detectar únicament la mutació Ser80Pro i va presentar valors de CIM de ciprofloxacino i levofloxacin de $2 \mu\text{g/ml}$ la possible existència d'altres mecanismes de resistència com sistemes d'expulsió^{368,369} no investigats en aquest estudi.

Les quatre soques amb sensibilitat disminuïda a fluoroquinolones van pertànyer a tres tipus *emm*, incloent *emm6.0* (dues soques), *emm3.1* i *emm12.27*, i les dues soques altament resistents eren del nou subtipus identificat en aquest estudi *emm12.26*. De forma notable, es van identificar diverses mutacions sinònimes en les regions analitzades dels gens *parC*, *parE* i *gyrB* que eren idèntiques en soques del mateix tipus *emm* independentment del subtipus. Es va trobar una relació epidemiològica entre els dos pacients dels quals es van aïllar les soques *emm12.26* altament resistents a fluoroquinolones. Aquest pacients es trobaven ingressats en la mateixa sala d'hospitalització i les soques van ser aïllades en un lapse de temps de 72 hores, el que suggereix una possible transmissió nosocomial.

Diversos estudis han aportat evidències de la disseminació clonal de soques de *S. pyogenes* no sensibles a fluoroquinolones particularment del tipus *emm6*. Albertí *et al.* en un estudi en el que es van analitzar soques de *S. pyogenes* aïllades en 17 hospitals espanyols observaren que el 63,3% de les soques amb sensibilitat disminuïda a ciprofloxacino exhibien el tipus *emm6* i el 50% d'aquestes presentaven patrons de PFGE indistingibles⁵²³. Coincidint amb aquests resultats, Alonso *et al.* van documentar la disseminació clonal de soques de *S. pyogenes* amb sensibilitat disminuïda a ciprofloxacino pertanyents al tipus *emm6* en població pediàtrica a Bilbao⁵²⁵. A Bèlgica en una anàlisi de 152 soques de *S. pyogenes* amb sensibilitat disminuïda a

ciprofloxacino, dos clons pertanyents als tipus *emm6* i *emm75* construïren el 88% de les soques analitzades, i de forma notable el clon *emm6* representà per si sol el 74% de les soques no sensibles a fluoroquinolones²⁶⁶. En tots els estudis citats anteriorment i en el nostre cas, la mutació identificada en les soques *emm6* va ser invariablement el canvi Ser79Ala en ParC. Orschen *et al.* han proposat que la sensibilitat disminuïda a fluoroquinolones en soques de *S. pyogenes* del tipus *emm6* és intrínseca com a resultat d'un polimorfisme en *parC* que codifica el canvi Ser79Ala⁵²¹. En un estudi realitzar entre 2002-2003 als Estats Units en el que els autors van evidenciar una freqüència inusualment elevada (10,9%) de soques de *S. pyogenes* amb sensibilitat disminuïda a ciprofloxacino, van trobar que el 90,3% de les soques eren del tipus *emm6* i contenien totes elles la substitució Ser79Ala en ParC. En aquest mateix estudi, l'anàlisi de soques addicionals del tipus *emm6* aïllades en diferents períodes i en diverses zones geogràfiques arreu del món va revelar la presència de la mateixa mutació, incloent la soca de referència M6 aïllada el 1918 i caracteritzada per R. Lancefield i altres soques recuperades abans de la introducció de ciprofloxacino en la pràctica clínica el 1987.

Malgrat l'existència de soques de *S. pyogenes* amb una menor sensibilitat a fluoroquinolones degut a la presència d'una primera mutació en *parC* i que poden ser les precursoras de mutants altament resistents si desenvolupen mutacions addicionals, la resistència a fluoroquinolones en *S. pyogenes* és actualment inusual i no constitueix un problema clínic. No obstant, la freqüència de soques resistents pot incrementar-se a mesura que continua la pressió selectiva exercida per l'ús d'aquests agents. Seran necessaris esforços en la vigilància epidemiològica per a determinar si la resistència a fluoroquinolones en aquesta espècie constitueix un fenomen emergent.

6. CONCLUSIONS

1. Les infeccions de la pell i teixits tous van constituir les formes predominants d'infecció invasiva. La SSTS es va registrar en quatre pacients i es va trobar associada a fascitis necrosant en la meitat dels casos.
2. La majoria dels pacients afectats de quadres invasius eren adults, principalment d'edat avançada (≥ 65 anys) (44,4%) i adults joves (25-44 anys) (25,9%), mentre que la major proporció de casos no invasius (54,5%) va correspondre a pacients pediàtrics (< 15 anys).
3. Es va observar la presència de factors predisposants en una elevada proporció dels casos invasius, destacant l'alteració de la barrera cutània, la infecció per HIV, l'ús de drogues per via parenteral, i les neoplàsies entre els més objectivats.
4. El tipus *emm* més prevalent en la col·lecció de soques analitzada va ser *emm1*, seguit dels tipus *emm3*, *emm4*, *emm12*, *emm28*, *emm11* i *emm77*. Aquests set tipus representaren en conjunt el 61,9% de les soques analitzades.
5. No es van observar diferències significatives en la distribució de tipus *emm* entre soques aïllades d'infeccions invasives i no invasives. L'única excepció fou el tipus *emm25*, que es va trobar associat a infeccions invasives en ADVP i que s'ha descrit prèviament en el context de brots en aquest grup de població.
6. Es va trobar una forta correlació entre el patró de superantígens i el tipus *emm* independentment del tipus d'infecció.
7. No es va identificar un patró de superantígens comú o predominant en les soques aïllades d'infeccions invasives ni en les associades a les formes més greus d'infecció (FN i SSTS), que contràriament van mostrar una elevada diversitat de tipus *emm* i consegüentment múltiples patrons de superantígens.

8. En base als gens de virulència analitzats, la manca d'associació de forma concloent entre una dotació particular de gens de virulència i un major potencial invasiu suggereix que l'evolució de la infecció pot dependre d'altres factors de virulència del microorganisme, de mecanismes involucrats en la regulació de la seva expressió i de factors intrínsecs de l'hoste.
9. La resistència a eritromicina va mostrar un increment progressiu al llarg del període estudiat del 16,6% el 1999 al 38,8% en la primera meitat de 2003.
10. Les freqüències relatives dels fenotips de resistència a macròlids van fluctuar durant el període estudiat amb una tendència cap a l'increment del fenotip M fins l'any 2001 i un increment subsegüent del fenotip MLS_B.
11. Es va observar una correlació absoluta entre l'expressió del fenotip M i la presència del gen *mef(A)*, mentre que en les soques amb fenotip MLS_B es va detectar el gen *erm(B)* i en menor proporció el gen *erm(TR)*.
12. Es va detectar una moderada diversitat de tipus *emm* en les soques resistents a eritromicina (35 soques, 11 tipus), amb un predomini dels tipus *emm4*, *emm11*, *emm12*, *emm75* i *emm25*. Aquests cinc tipus van constituir el 80% de les soques resistents però només el 7,7% de les sensibles, el que indica una forta associació d'aquests tipus a la resistència.
13. La freqüència de resistència a tetraciclina va fluctuar durant el període estudiat (màxim 34,6% el 2002 i mínim 15,8% el 2001) i va ser significativament superior en les soques resistents a eritromicina que en les soques sensibles (42,8% versus 18,7%).
14. En les soques resistents a tetraciclina el gen *tet(M)* va ser el predominant i es va trobar distribuït en soques pertanyents a 14 tipus *emm*, mentre que la distribució del gen *tet(O)* va estar restringida a soques *emm77*.

15. No es van observar diferències significatives en la prevalença de resistència a eritromicina ni a tetraciclina en el grup de soques aïllades d'infeccions invasives respecte del de soques aïllades d'infeccions no invasives.
16. S'observà una baixa prevalença de resistència a levofloxacino (3,2%) i va ser majoritàriament de baix nivell.
17. La resistència de baix nivell a fluoroquinolones es va associar a substitucions únicament en ParC consistents en els canvis Ser79Ala o Ser79Phe, observant-se també els polimorfismes Ser80Pro i Ala121Val. Les soques que van mostrar resistència d'alt nivell van presentar alteracions en dues dianes, la substitució Ser79Phe en ParC i la substitució Ser81Tyr en GyrA.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Katz AR, Morens DM. Severe streptococcal infections in historical perspective. *Clin Infect Dis* 1992; 14 (1): 298-307.
2. Descamps V, Aitken J, Lee MG. Hippocrates on necrotising fasciitis. *Lancet* 1994; 344: 556.
3. Sydenham T. Febris scarlatina. A: Sydenham T, ed. *Observationes medicae circa morborum acutorum historiam et curationem*. Kettilby G; London, 1676: 387-9.
4. Johnstone J. Remarks on the angina and scarlet fever of 1778. *Memoirs of the Medical Society of London* 1778; 3: 355-67.
5. Whitelegge BA. The Milroy lectures on changes of type in epidemic diseases. Lecture II. Diseases of more stable type. *BMJ* 1893; 1: 449-51.
6. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933; 57: 571-95.
7. Lancefield RC. The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J Exp Med* 1928; 47: 91-103.
8. Lancefield RC. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* 1962; 89: 307-13.
9. Griffith F. The serological classification of *Streptococcus pyogenes*. *J Hyg (Cambridge)* 1934; 34: 542-84.
10. Todd EW. Antigenic streptococcal haemolysin. *J Exp Med* 1932; 55: 267-80.
11. Krause RM. A half-century of streptococcal research: then & now. *Indian J Med Res* 2002; 115: 215-41.
12. Denny FW, Jr. A 45-year perspective on the streptococcus and rheumatic fever: the Edward H. Kass Lecture in infectious disease history. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 1110-22.
13. Bisno AL. Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N Engl J Med* 1991; 325: 783-93.
14. Cone LA, Woodard DR, Schlievert PM, Tomory GS. Clinical and bacteriologic observations of a toxic shock-like syndrome due to *Streptococcus pyogenes*. *N Engl J Med* 1987; 317: 146-9.
15. Davies HD, McGeer A, Schwartz B, Green K, Cann D, Simor AE, *et al*. Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario Group A Streptococcal Study Group. *N Engl J Med* 1996; 335: 547-54.
16. Kaplan EL. The resurgence of group A streptococcal infections and their sequelae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 55-7.
17. Stevens DL, Tanner MH, Winship J, Swartz R, Ries KM, Schlievert PM, *et al*. Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. *N Engl J Med* 1989; 321: 1-7.

18. Schwartz B, Facklam RR, Breiman RF. Changing epidemiology of group A streptococcal infection in the USA. *Lancet* 1990; 336: 1167-71.
19. Veasy LG, Wiedmeier SE, Orsmond GS, Ruttenberg HD, Boucek MM, Roth SJ, *et al.* Resurgence of acute rheumatic fever in the intermountain area of the United States. *N Engl J Med* 1987; 316: 421-7.
20. Carapetis J, Robins-Browne R, Martin D, Shelby-James T, Hogg G. Increasing severity of invasive group A streptococcal disease in Australia: clinical and molecular epidemiological features and identification of a new virulent M-nontypeable clone. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1220-7.
21. Hoge CW, Schwartz B, Talkington DF, Breiman RF, MacNeill EM, Englander SJ. The changing epidemiology of invasive group A streptococcal infections and the emergence of streptococcal toxic shock-like syndrome. A retrospective population-based study. *JAMA* 1993; 269: 384-9.
22. Martin PR, Hoiby EA. Streptococcal serogroup A epidemic in Norway 1987-1988. *Scand J Infect Dis* 1990; 22: 421-9.
23. Stromberg A, Romanus V, Burman LG. Outbreak of group A streptococcal bacteremia in Sweden: an epidemiologic and clinical study. *J Infect Dis* 1991; 164: 595-8.
24. Hardie JM. Genus *Streptococcus* Rosenbach 1984, 22^{AL}. A: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. The Williams and Wilkins Co, Baltimore Md., 1986: 1043-71.
25. Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. *Streptococcus*. A: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press, Washington D.C., 2003: 405-21.
26. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 613-30.
27. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45: 406-8.
28. Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA, 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: 631-45.
29. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 846-9.

30. 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.
31. 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.
32. Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 41-7.
33. Teng LJ, Hsueh PR, Tsai JC, Chen PW, Hsu JC, Lai HC, *et al.* *groESL* sequence determination, phylogenetic analysis, and species differentiation for viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3172-8.
34. De Gheldre Y, Vandamme P, Goossens H, Struelens MJ. Identification of clinically relevant viridans streptococci by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 1591-8.
35. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 174-229.
36. Stoolmiller A.C., A. D. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. *J Biol Chem* 1969; 244: 236-46.
37. Fischetti VA. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 285-314.
38. Jones KF, Manjula BN, Johnston KH, Hollingshead SK, Scott JR, Fischetti VA. Location of variable and conserved epitopes among the multiple serotypes of streptococcal M protein. *J Exp Med* 1985; 161: 623-8.
39. Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 191-200.
40. Swift HF, Wilson AT, Lancefield RC. Typing group A hemolytic streptococci by M precipitin reaction in capillary pipettes. *J Exp Med* 1943; 78: 127-33.
41. Rotta J, Krause RM, Lancefield RC, Everly W, Lackland H. New approaches for the laboratory recognition of M types of group A streptococci. *J Exp Med* 1971; 134: 1298-315.
42. Lancefield RC. Persistence of type specific antibodies in man following infection with group A streptococci. *J Exp Med* 1959; 110: 271-92.
43. Moody MD. International Committee on Nomenclature of Bacteria, Subcommittee on Streptococci and Pneumococci. Minutes of meeting held in Moscow, July 1966. *Int J Syst Bacteriol* 1967; 17: 281-314.

44. Facklam R, Beall B, Efstratiou A, Fischetti V, Johnson D, Kaplan E, *et al.* *emm* typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 247-53.
45. Johnson DR, Kaplan EL, VanGheem A, Facklam RR, Beall B. Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M-protein and *emm*-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. *J Med Microbiol* 2006; 55: 157-64.
46. Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 953-8.
47. Facklam RF, Martin DR, Lovgren M, Johnson DR, Efstratiou A, Thompson TA, *et al.* Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: *emm*103 to *emm*124. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 28-38.
48. 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.
49. Single LA, Martin DR. Clonal differences within M-types of the group A *Streptococcus* revealed by pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 70: 85-9.
50. Carriço JA, Silva-Costa C, Melo-Cristino J, Pinto FR, de Lencastre H, Almeida JS, *et al.* Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2524-32.
51. Simpson WJ, Musser JM, Cleary PP. Evidence consistent with horizontal transfer of the gene (*emm*12) encoding serotype M12 protein between group A and group G pathogenic streptococci. *Infect Immun* 1992; 60: 1890-3.
52. Collins CM, Kimura A, Bisno AL. Group G streptococcal M protein exhibits structural features analogous to those of class I M protein of group A streptococci. *Infect Immun* 1992; 60: 3689-96.
53. Bisno AL, Collins CM, Turner JC. M proteins of group C streptococci isolated from patients with acute pharyngitis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2511-5.
54. Albertí S, García-Rey C, García-Laorden MI, Dal-Ré R, García-de-Lomas J. Survey of *emm*-like gene sequences from pharyngeal isolates of group C and group G streptococci collected in Spain. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1433-6.
55. Bessen DE, Kalia A. Genomic localization of a T serotype locus to a recombinatorial zone encoding extracellular matrix-binding proteins in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 2002; 70: 1159-67.
56. Mora M, Bensi G, Capo S, Falugi F, Zingaretti C, Manetti AG, *et al.* Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15641-6.

57. Courtney HS, Zhang YM, Frank MW, Rock CO. Serum opacity factor, a streptococcal virulence factor that binds to apolipoproteins A-I and A-II and disrupts high density lipoprotein structure. *J Biol Chem* 2006; 281: 5515-21.
58. Kreikemeyer B, Martin DR, Chhatwal GS. SfbII protein, a fibronectin binding surface protein of group A streptococci, is a serum opacity factor with high serotype-specific apolipoproteinase activity. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 178: 305-11.
59. Top FH, Lewis J, Wannamaker W. The serum opacity reaction of *Streptococcus pyogenes*: the demonstration of multiple, strain-specific lipoproteinase antigens. *J Exp Med* 1968; 127: 1013-34.
60. Maxted WR, Widdowson JP, Fraser CA, Ball LC, Bassett DC. The use of the serum opacity reaction in the typing of group-A streptococci. *J Med Microbiol* 1973; 6: 83-90.
61. Beall B, Gherardi G, Lovgren M, Facklam RR, Forwick BA, Tyrrell GJ. *emm* and *sof* gene sequence variation in relation to serological typing of opacity-factor-positive group A streptococci. *Microbiology* 2000; 146: 1195-209.
62. Wannamaker LW. Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin. I. *N Engl J Med* 1970; 282: 23-31.
63. Wannamaker LW. Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin (second of two parts). *N Engl J Med* 1970; 282: 78-85.
64. Stollerman GH. Rheumatic fever in the 21st century. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 806-14.
65. Bessen D, Jones KF, Fischetti VA. Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. *J Exp Med* 1989; 169: 269-83.
66. Bessen DE, Fischetti VA. Differentiation between two biologically distinct classes of group A streptococci by limited substitutions of amino acids within the shared region of M protein-like molecules. *J Exp Med* 1990; 172: 1757-64.
67. Bessen DE, Veasy LG, Hill HR, Augustine NH, Fischetti VA. Serologic evidence for a class I group A streptococcal infection among rheumatic fever patients. *J Infect Dis* 1995; 172: 1608-11.
68. Hollingshead SK, Readdy TL, Yung DL, Bessen DE. Structural heterogeneity of the *emm* gene cluster in group A streptococci. *Mol Microbiol* 1993; 8: 707-17.
69. Hollingshead SK, Arnold J, Readdy TL, Bessen DE. Molecular evolution of a multigene family in group A streptococci. *Mol Biol Evol* 1994; 11: 208-19.
70. Bessen DE, Sotir CM, Readdy TL, Hollingshead SK. Genetic correlates of throat and skin isolates of group A streptococci. *J Infect Dis* 1996; 173: 896-900.
71. Dicuonzo G, Gherardi G, Lorino G, Angeletti S, De Cesaris M, Fiscarelli E, *et al.* Group A streptococcal genotypes from pediatric throat isolates in Rome, Italy. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1687-90.

72. Bessen DE, Carapetis JR, Beall B, Katz R, Hibble M, Currie BJ, *et al.* Contrasting molecular epidemiology of group A streptococci causing tropical and nontropical infections of the skin and throat. *J Infect Dis* 2000; 182: 1109-16.
73. Fiorentino TR, Beall B, Mshar P, Bessen DE. A genetic-based evaluation of the principal tissue reservoir for group A streptococci isolated from normally sterile sites. *J Infect Dis* 1997; 176: 177-82.
74. Scaramuzzino DA, McNiff JM, Bessen DE. Humanized in vivo model for streptococcal impetigo. *Infect Immun* 2000; 68: 2880-7.
75. McGregor KF, Spratt BG, Kalia A, Bennett A, Bilek N, Beall B, *et al.* Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known *emm* types and distinctions among subpopulation genetic structures. *J Bacteriol* 2004; 186: 4285-94.
76. Kaplan EL. The group A streptococcal upper respiratory tract carrier state: an enigma. *J Pediatr* 1980; 97: 337-45.
77. Bisno AL, Stevens DL. *Streptococcus pyogenes*. A: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. Sixth ed. Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005: 2362-79.
78. Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER. Group A streptococci among school-aged children: clinical characteristics and the carrier state. *Pediatrics* 2004; 114: 1212-9.
79. Levy RM, Leyden JJ, Margolis DJ. Colonisation rates of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* in the oropharynx of a young adult population. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 153-5.
80. Leyden JJ, Stewart R, Kligman AM. Experimental infections with group A streptococci in humans. *J Invest Dermatol* 1980; 75: 196-201.
81. Hamburger M. Studies on the transmission of hemolytic streptococcus infections: II. Beta hemolytic streptococci in the saliva of persons with positive throat cultures. *J Infect Dis* 1944; 75: 71-8.
82. Hamburger M, Robertson O. Expulsion of group A hemolytic streptococci in droplets and droplet nuclei by sneezing, coughing, and talking. *Am J Med* 1948; 1948: 690-701.
83. Tanaka D, Shima T, Isobe J, Watahiki M, Matsumoto M, Endoh M, *et al.* Epidemiology and molecular analysis of group A streptococci from patients involved in food-borne disease outbreaks in Japan between 1996 and 2003. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 202-3.
84. Gallo G, Berzero R, Cattai N, Recchia S, Orefici G. An outbreak of group A food-borne streptococcal pharyngitis. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 292-7.
85. Sarvghad MR, Naderi HR, Naderi-Nassab M, Majdzadeh R, Javanian M, Faramarzi H, *et al.* An outbreak of food-borne group A *Streptococcus* (GAS) tonsillopharyngitis among residents of a dormitory. *Scand J Infect Dis* 2005; 37: 647-50.

86. Takahashi A, Yomoda S, Tanimoto K, Kanda T, Kobayashi I, Ike Y. *Streptococcus pyogenes* hospital-acquired infection within a dermatological ward. *J Hosp Infect* 1998; 40: 135-40.
87. Bassett DC. Hippelates flies and streptococcal skin infection in Trinidad. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970; 64: 138-47.
88. Blaser MJ, Musser JM. Bacterial polymorphisms and disease in humans. *J Clin Invest* 2001; 107: 391-2.
89. Musser JM. Molecular population genetic analysis of emerged bacterial pathogens: selected insights. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 1-17.
90. O'Brien KL, Beall B, Barrett NL, Cieslak PR, Reingold A, Farley MM, *et al.* Epidemiology of invasive group A *Streptococcus* disease in the United States, 1995-1999. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 268-76.
91. Smoot JC, Korgenski EK, Daly JA, Veasy LG, Musser JM. Molecular analysis of group A *Streptococcus* type *emm18* isolates temporally associated with acute rheumatic fever outbreaks in Salt Lake City, Utah. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 1805-10.
92. Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, *et al.* Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4658-63.
93. Sumbly P, Porcella SF, Madrigal AG, Barbian KD, Virtaneva K, Ricklefs SM, *et al.* Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype M1 group A *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events. *J Infect Dis* 2005; 192: 771-82.
94. Beres SB, Musser JM. Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS ONE* 2007; 2: e800.
95. Beres SB, Sylva GL, Barbian KD, Lei B, Hoff JS, Mammarella ND, *et al.* Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10078-83.
96. Nakagawa I, Kurokawa K, Yamashita A, Nakata M, Tomiyasu Y, Okahashi N, *et al.* Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Res* 2003; 13: 1042-55.
97. Holden MT, Scott A, Cherevach I, Chillingworth T, Churcher C, Cronin A, *et al.* Complete genome of acute rheumatic fever-associated serotype M5 *Streptococcus pyogenes* strain Manfredo. *J Bacteriol* 2007; 189: 1473-7.
98. Banks DJ, Porcella SF, Barbian KD, Beres SB, Philips LE, Voyich JM, *et al.* Progress toward characterization of the group A *Streptococcus* metagenome: complete genome sequence of a macrolide-resistant serotype M6 strain. *J Infect Dis* 2004; 190: 727-38.

99. Smoot JC, Barbian KD, Van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, *et al.* Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4668-73.
100. Green NM, Zhang S, Porcella SF, Nagiec MJ, Barbian KD, Beres SB, *et al.* Genome sequence of a serotype M28 strain of group A streptococcus: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J Infect Dis* 2005; 192: 760-770.
101. Banks DJ, Beres SB, Musser JM. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol* 2002; 10: 515-21.
102. Shelburne SA, 3rd, Sumby P, Sitkiewicz I, Granville C, DeLeo FR, Musser JM. Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16037-42.
103. Graham MR, Virtaneva K, Porcella SF, Gardner DJ, Long RD, Welty DM, *et al.* Analysis of the transcriptome of group A *Streptococcus* in mouse soft tissue infection. *Am J Pathol* 2006; 169: 927-42.
104. Sumby P, Whitney AR, Graviss EA, DeLeo FR, Musser JM. Genome-wide analysis of group A streptococci reveals a mutation that modulates global phenotype and disease specificity. *PLoS Pathog* 2006; 2: e5.
105. Musser JM, DeLeo FR. Toward a genome-wide systems biology analysis of host-pathogen interactions in group A *Streptococcus*. *Am J Pathol* 2005; 167: 1461-72.
106. Bisno AL. Acute pharyngitis. *N Engl J Med* 2001; 344: 205-11.
107. Bisno AL, Stevens DL. Streptococcal infections of skin and soft tissues. *N Engl J Med* 1996; 334: 240-5.
108. Stevens DL. Invasive group A streptococcus infections. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 2-11.
109. Hassell M, Fagan P, Carson P, Currie BJ. Streptococcal necrotising fasciitis from diverse strains of *Streptococcus pyogenes* in tropical northern Australia: case series and comparison with the literature. *BMC Infect Dis* 2004; 4: 60.
110. Kaul R, McGeer A, Low DE, Green K, Schwartz B. Population-based surveillance for group A streptococcal necrotizing fasciitis: Clinical features, prognostic indicators, and microbiologic analysis of seventy-seven cases. Ontario Group A Streptococcal Study. *Am J Med* 1997; 103: 18-24.
111. Haywood CT, McGeer A, Low DE. Clinical experience with 20 cases of group A streptococcus necrotizing fasciitis and myonecrosis: 1995 to 1997. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103: 1567-73.

112. Chelsom J, Halstensen A, Haga T, Hoiby EA. Necrotising fasciitis due to group A streptococci in western Norway: incidence and clinical features. *Lancet* 1994; 344: 1111-5.
113. Adams EM, Gudmundsson S, Yocum DE, Haselby RC, Craig WA, Sundstrom WR. Streptococcal myositis. *Arch Intern Med* 1985; 145: 1020-3.
114. Sommer R, Rohner P, Garbino J, Auckenthaler R, Malinverni R, Lew D, *et al.* Group A beta-hemolytic streptococcus meningitis: clinical and microbiological features of nine cases. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 929-31.
115. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Sela S, Vermeulen M, Dankert J. Group a streptococcal meningitis in adults: report of 41 cases and a review of the literature. *Clin Infect Dis* 2002; 34: e32-6.
116. Abouzeid H, Wu P, Mohammed N, Al-Samarrai M. Group A streptococcal puerperal sepsis: the return of a potentially fatal disease. *J Obstet Gynaecol* 2005; 25: 806-8.
117. The Working Group on Severe Streptococcal Infections. Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. Rationale and consensus definition. *JAMA* 1993; 269: 390-1.
118. Bradley JS, Schlievert PM, Peterson BM. Toxic shock-like syndrome, a complication of strep throat. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 790.
119. Chapnick EK, Gradon JD, Lutwick LI, Kim J, Levi M, Kim MH, *et al.* Streptococcal toxic shock syndrome due to noninvasive pharyngitis. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1074-7.
120. Stevens DL. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 69-78.
121. Zurawski CA, Bardsley M, Beall B, Elliott JA, Facklam R, Schwartz B, *et al.* Invasive group A streptococcal disease in metropolitan Atlanta: a population-based assessment. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 150-7.
122. Eriksson BK, Andersson J, Holm SE, Norgren M. Epidemiological and clinical aspects of invasive group A streptococcal infections and the streptococcal toxic shock syndrome. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1428-36.
123. Vallalta-Morales M, Salavert-Lleti M, Artero-Mora A, Mahiques-Santos L, Solaz-Moreno E, Pérez-Belles C. Síndrome del shock tóxico estreptocócico: experiencia de los últimos 10 años en un hospital terciario. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23: 540-4.
124. Barnham MR, Weightman NC, Anderson AW, Tanna A. Streptococcal toxic shock syndrome: a description of 14 cases from North Yorkshire, UK. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 174-81.
125. Bisno AL. Nonsuppurative poststreptococcal sequelae: rheumatic fever and glomerulonephritis. A: Mandell LG, Bennett JA, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and

Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. Sixth ed. Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005: 2380-92.

126. Carapetis JR, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. *Lancet* 2005; 366: 155-68.

127. Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones Criteria, 1992 update. Special Writing Group of the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young of the American Heart Association. *JAMA* 1992; 268: 2069-73.

128. World Health Organization. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO Expert Consultation, 29 October-1 November 2001. Geneva: World Health Organization. 2001.

129. Snider LA, Swedo SE. PANDAS: current status and directions for research. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 900-7.

130. Swedo SE, Leonard HL, Garvey M, Mittleman B, Allen AJ, Perlmutter S, *et al.* Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *Am J Psychiatry* 1998; 155: 264-71.

131. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 685-94.

132. Dingle JH, Badger GF, Jordan WS. A: Dingle JH, Badger GF, Jordan WS, eds. Streptococcal infections. Illness in the home: a study of 25,000 illnesses in a group of Cleveland families. Press of Western Reserve University, Cleveland, 1964: 97-117.

133. Breese BB, Disney FA, Talpey W. The nature of a small pediatric group practice. 1. *Pediatrics* 1966; 38: 264-77.

134. Cornfeld D, Hubbard JP, Harris TN, Weaver R. Epidemiologic studies of streptococcal infection in school children. *Am J Public Health Nations Health* 1961; 51: 242-9.

135. Danchin MH, Rogers S, Selvaraj G, Kelpie L, Rankin P, Vorich R, *et al.* The burden of group A streptococcal pharyngitis in Melbourne families. *Indian J Med Res* 2004; 119 Suppl: 144-7.

136. Nandi S, Kumar R, Ray P, Vohra H, Ganguly NK. Group A streptococcal sore throat in a periurban population of northern India: a one-year prospective study. *Bull World Health Organ* 2001; 79: 528-33.

137. Lamagni T, Efstratiou A, Vuopio-Varkila J, Jasir A, Schalen C. The epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* associated disease in Europe. *Euro Surveill* 2005; 10: 179-84.

138. Tyrrell GJ, Lovgren M, Kress B, Grimsrud K. Invasive group A streptococcal disease in Alberta, Canada (2000 to 2002). *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1678-83.

139. Carapetis JR, Walker AM, Hibble M, Sriprakash KS, Currie BJ. Clinical and epidemiological features of group A streptococcal bacteraemia in a region with hyperendemic superficial streptococcal infection. *Epidemiol Infect* 1999; 122: 59-65.
140. Norton R, Smith HV, Wood N, Siegbrecht E, Ross A, Ketheesan N. Invasive group A streptococcal disease in North Queensland (1996 - 2001). *Indian J Med Res* 2004; 119 Suppl: 148-51.
141. Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, Williams T, Bauni E, Mwarumba S, *et al*. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N Engl J Med* 2005; 352: 39-47.
142. The WHO Young Infants Study Group. Bacterial etiology of serious infections in young infants in developing countries: results of a multicenter study. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18 (Suppl): S17-S22.
143. Olivier C. Rheumatic fever -is it still a problem? *J Antimicrob Chemother* 2000; 45 (Suppl): 13-21.
144. Shulman ST, Stollerman G, Beall B, Dale JB, Tanz RR. Temporal changes in streptococcal M protein types and the near-disappearance of acute rheumatic fever in the United States. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 441-7.
145. Veasy LG, Tani LY, Hill HR. Persistence of acute rheumatic fever in the intermountain area of the United States. *J Pediatr* 1994; 124: 9-16.
146. Hynes W. Virulence factors of the group A streptococci and genes that regulate their expression. *Front Biosci* 2004; 9: 3399-433.
147. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 470-511.
148. Courtney HS, Hasty DL, Dale JB. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med* 2002; 34: 77-87.
149. Kreikemeyer B, McIver KS, Podbielski A. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol* 2003; 11: 224-32.
150. LaPenta D, Rubens C, Chi E, Cleary PP. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12115-9.
151. Cue D, Dombek PE, Lam H, Cleary PP. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66: 4593-601.
152. Osterlund A, Popa R, Nikkila T, Scheynius A, Engstrand L. Intracellular reservoir of *Streptococcus pyogenes in vivo*: a possible explanation for recurrent pharyngotonsillitis. *Laryngoscope* 1997; 107: 640-7.
153. Dombek PE, Cue D, Sedgewick J, Lam H, Ruschkowski S, Finlay BB, *et al*. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci:

M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol* 1999; 31: 859-70.

154. Jadoun J, Ozeri V, Burstein E, Skutelsky E, Hanski E, Sela S. Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J Infect Dis* 1998; 178: 147-58.

155. Talay SR, Zock A, Rohde M, Molinari G, Oggioni M, Pozzi G, *et al.* Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* 2000; 2: 521-35.

156. Kreikemeyer B, Oehmcke S, Nakata M, Hoffrogge R, Podbielski A. *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding protein F2: expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions. *J Biol Chem* 2004; 279: 15850-9.

157. Ozeri V, Rosenshine I, Mosher DF, Fassler R, Hanski E. Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol Microbiol* 1998; 30: 625-37.

158. Podbielski A, Kreikemeyer B. Persistence of group A streptococci in eukaryotic cells - a safe place? *Lancet* 2001; 358: 3-4.

159. Molinari G, Chhatwal GS. Invasion and survival of *Streptococcus pyogenes* in eukaryotic cells correlates with the source of the clinical isolates. *J Infect Dis* 1998; 177 : 1600-7.

160. Sela S, Neeman R, Keller N, Barzilai A. Relationship between asymptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to and be internalised by cultured epithelial cells. *J Med Microbiol* 2000; 49: 499-502.

161. Facinelli B, Spinaci C, Magi G, Giovanetti E, P EV. Association between erythromycin resistance and ability to enter human respiratory cells in group A streptococci. *Lancet* 2001; 358: 30-3.

162. Goldmann O, Rohde M, Chhatwal GS, Medina E. Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect Immun* 2004; 72: 2956-63.

163. Berggard K, Johnsson E, Morfeldt E, Persson J, Stalhammar-Carlemalm M, Lindahl G. Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 2001; 42: 539-51.

164. Blackmore TK, Fischetti VA, Sadlon TA, Ward HM, Gordon DL. M protein of the group A *Streptococcus* binds to the seventh short consensus repeat of human complement factor H. *Infect Immun* 1998; 66: 1427-31.

165. Johnsson E, Berggard K, Kotarsky H, Hellwage J, Zipfel PF, Sjobring U, *et al.* Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. *J Immunol* 1998; 161: 4894-901.

166. Horstmann RD, Sievertsen HJ, Leippe M, Fischetti VA. Role of fibrinogen in complement inhibition by streptococcal M protein. *Infect Immun* 1992; 60: 5036-41.

167. Hu MC, Walls MA, Stroop SD, Reddish MA, Beall B, Dale JB. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infect Immun* 2002; 70: 2171-7.
168. de Malmanche SA, Martin DR. Protective immunity to the group A *Streptococcus* may be only strain specific. *Med Microbiol Immunol* 1994; 183: 299-306.
169. Villaseñor-Sierra A, McShan WM, Salmi D, Kaplan EL, Johnson DR, Stevens DL. Variable susceptibility to opsonophagocytosis of group A streptococcus M-1 strains by human immune sera. *J Infect Dis* 1999; 180: 1921-8.
170. Herwald H, Cramer H, Morgelin M, Russell W, Sollenberg U, Norrby-Teglund A, et al. M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell* 2004; 116: 367-79.
171. Albertí S, Ashbaugh CD, Wessels MR. Structure of the *has* operon promoter and regulation of hyaluronic acid capsule expression in group A *Streptococcus*. *Mol Microbiol* 1998; 28: 343-53.
172. Wessels MR, Bronze MS. Critical role of the group A streptococcal capsule in pharyngeal colonization and infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12238-42.
173. Moses AE, Wessels MR, Zalcmán K, Alberti S, Natanson-Yaron S, Menes T, et al. Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A *Streptococcus*. *Infect Immun* 1997; 65: 64-71.
174. Dale JB, Washburn RG, Marques MB, Wessels MR. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun* 1996; 64: 1495-501.
175. Johnson DR, Stevens DL, Kaplan EL. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis* 1992; 166: 374-82.
176. Veasy LG, Tani LY, Daly JA, Korgenski K, Miner L, Bale J, et al. Temporal association of the appearance of mucoid strains of *Streptococcus pyogenes* with a continuing high incidence of rheumatic fever in Utah. *Pediatrics* 2004; 113: e168-72.
177. Cywes C, Wessels MR. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* 2001; 414: 648-52.
178. Okamoto S, Kawabata S, Terao Y, Fujitaka H, Okuno Y, Hamada S. The *Streptococcus pyogenes* capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal bacterial-viral superinfection. *Infect Immun* 2004; 72: 6068-75.
179. Wexler DE, Chenoweth DE, Cleary PP. Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 8144-8.
180. Ji Y, McLandsborough L, Kondagunta A, Cleary PP. C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice. *Infect Immun* 1996; 64: 503-10.

- 181.** Rasmussen M, Müller HP, Björck L. Protein GRAB of *Streptococcus pyogenes* regulates proteolysis at the bacterial surface by binding α_2 -macroglobulin. *J Biol Chem* 1999; 274: 15336-44.
- 182.** Boyle MD, Lottenberg R. Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1-10.
- 183.** Winram SB, Lottenberg R. The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology* 1996; 142: 2311-20.
- 184.** Pancholi V, Fischetti VA. α -Enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* 1998; 273: 14503-15.
- 185.** Berge A, Sjöbring U. PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 1993; 268: 25417-24.
- 186.** Walker MJ, McArthur JD, McKay F, Ranson M. Is plasminogen deployed as a *Streptococcus pyogenes* virulence factor? *Trends Microbiol* 2005; 13: 308-13.
- 187.** Akesson P, Sjöholm AG, Björck L. Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J Biol Chem* 1996; 271: 1081-8.
- 188.** Hoe NP, Ireland RM, DeLeo FR, Gowen BB, Dorward DW, Voyich JM, *et al.* Insight into the molecular basis of pathogen abundance: group A *Streptococcus* inhibitor of complement inhibits bacterial adherence and internalization into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7646-51.
- 189.** Frick IM, Akesson P, Rasmussen M, Schmidtchen A, Björck L. SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J Biol Chem* 2003; 278: 16561-6.
- 190.** Lukomski S, Hoe NP, Abdi I, Rurangirwa J, Kordari P, Liu M, *et al.* Nonpolar inactivation of the hypervariable streptococcal inhibitor of complement gene (*sic*) in serotype M1 *Streptococcus pyogenes* significantly decreases mouse mucosal colonization. *Infect Immun* 2000; 68: 535-42.
- 191.** Stockbauer KE, Grigsby D, Pan X, Fu YX, Mejía LM, Cravioto A, *et al.* Hypervariability generated by natural selection in an extracellular complement-inhibiting protein of serotype M1 strains of group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3128-33.
- 192.** Hoe NP, Nakashima K, Lukomski S, Grigsby D, Liu M, Kordari P, *et al.* Rapid selection of complement-inhibiting protein variants in group A *Streptococcus* epidemic waves. *Nat Med* 1999; 5: 924-9.
- 193.** Hoe NP, Vuopio-Varkila J, Vaara M, Grigsby D, De Lorenzo D, Fu YX, *et al.* Distribution of streptococcal inhibitor of complement variants in pharyngitis and invasive isolates in an epidemic of serotype M1 group A *Streptococcus* infection. *J Infect Dis* 2001; 183: 633-9.

194. Matsumoto M, Hoe NP, Liu M, Beres SB, Sylva GL, Brandt CM, *et al.* Intrahost sequence variation in the streptococcal inhibitor of complement gene in patients with human pharyngitis. *J Infect Dis* 2003; 187: 604-12.
195. Collin M, Olsén A. Extracellular enzymes with immunomodulating activities: variations on a theme in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 2003; 71: 2983-92.
196. Sun H, Ringdahl U, Homeister JW, Fay WP, Engleberg NC, Yang AY, *et al.* Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science* 2004; 305: 1283-6.
197. Kapur V, Kanjilal S, Hamrick MR, Li LL, Whittam TS, Sawyer SA, *et al.* Molecular population genetic analysis of the streptokinase gene of *Streptococcus pyogenes*: mosaic alleles generated by recombination. *Mol Microbiol* 1995; 16: 509-19.
198. Kalia A, Bessen DE. Natural selection and evolution of streptococcal virulence genes involved in tissue-specific adaptations. *J Bacteriol* 2004; 186: 110-21.
199. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-5.
200. Wannamaker LW, Yasmineh W. Streptococcal nucleases. I. Further studies on the A, B, and C enzymes. *J Exp Med* 1967; 126: 475-96.
201. Ayoub EM. Streptococcal antibody tests in rheumatic fever. *Clin Immunol Newsl* 1982; 3: 107-111.
202. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, *et al.* DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 2006; 16: 396-400.
203. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 183: 201-7.
204. Starr CR, Engleberg NC. Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus. *Infect Immun* 2006; 74: 40-8.
205. Alouf JE. Pore-forming bacterial protein toxins: an overview. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 257: 1-14.
206. Limbago B, Penumalli V, Weinrick B, Scott JR. Role of streptolysin O in a mouse model of invasive group A streptococcal disease. *Infect Immun* 2000; 68: 6384-90.
207. Bricker AL, Carey VJ, Wessels MR. Role of NADase in virulence in experimental invasive group A streptococcal infection. *Infect Immun* 2005; 73: 6562-6.
208. Wessels MR. Streptolysin S. *J Infect Dis* 2005; 192: 13-5.
209. Miyoshi-Akiyama T, Takamatsu D, Koyanagi M, Zhao J, Imanishi K, Uchiyama T. Cytocidal effect of *Streptococcus pyogenes* on mouse neutrophils *in vivo* and the critical role of streptolysin S. *J Infect Dis* 2005; 192: 107-16.

210. Weightman NC, Barnham MR. Report of unusual clinical appearance in bacteraemia with nonhaemolytic M-type 58 *Streptococcus pyogenes*. *Indian J Med Res* 2004; 119 (Suppl): 17-21.
211. Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 299-306.
212. Llewelyn M, Cohen J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 156-62.
213. Sriskandan S, Faulkner L, Hopkins P. *Streptococcus pyogenes*: Insight into the function of the streptococcal superantigens. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 12-9.
214. Norrby-Teglund A, Thulin P, Gan BS, Kotb M, McGeer A, Andersson J, et al. Evidence for superantigen involvement in severe group A streptococcal tissue infections. *J Infect Dis* 2001; 184: 853-60.
215. Eriksson A, Norgren M. The superantigenic activity of streptococcal pyrogenic exotoxin B is independent of the protease activity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 355-63.
216. Norrby-Teglund A, Newton D, Kotb M, Holm SE, Norgren M. Superantigenic properties of the group A streptococcal exotoxin SpeF (MF). *Infect Immun* 1994; 62: 5227-33.
217. Sriskandan S, Unnikrishnan M, Krausz T, Cohen J. Mitogenic factor (MF) is the major DNase of serotype M89 *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology* 2000; 146: 2785-92.
218. Gerlach D, Schmidt KH, Fleischer B. Basic streptococcal superantigens (SPEX/SMEZ or SPEC) are responsible for the mitogenic activity of the so-called mitogenic factor (MF). *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 30: 209-16.
219. Nelson K, Schlievert PM, Selander RK, Musser JM. Characterization and clonal distribution of four alleles of the *speA* gene encoding pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin) in *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med* 1991; 174: 1271-4.
220. Bessen DE, Izzo MW, Fiorentino TR, Caringal RM, Hollingshead SK, Beall B. Genetic linkage of exotoxin alleles and *emm* gene markers for tissue tropism in group A streptococci. *J Infect Dis* 1999; 179: 627-36.
221. Kapur V, Nelson K, Schlievert PM, Selander RK, Musser JM. Molecular population genetic evidence of horizontal spread of two alleles of the pyrogenic exotoxin C gene (*speC*) among pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 1992; 60: 3513-7.
222. Norrby-Teglund A, Holm SE, Norgren M. Detection and nucleotide sequence analysis of the *speC* gene in Swedish clinical group A streptococcal isolates. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 705-9.
223. Stockbauer KE, Magoun L, Liu M, Burns EH, Jr., Gubba S, Renish S, et al. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A *Streptococcus* with

an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins $\alpha_V\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 242-7.

224. Reda KB, Kapur V, Goela D, Lamphear JG, Musser JM, Rich RR. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of *ssa* within *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 1996; 64: 1161-5.

225. Proft T, Moffatt SL, Weller KD, Paterson A, Martin D, Fraser JD. The streptococcal superantigen SMEZ exhibits wide allelic variation, mosaic structure, and significant antigenic variation. *J Exp Med* 2000; 191: 1765-76.

226. Norrby-Teglund A, Chatellier S, Low DE, McGeer A, Green K, Kotb M. Host variation in cytokine responses to superantigens determine the severity of invasive group A streptococcal infection. *Eur J Immunol* 2000; 30: 3247-55.

227. Kotb M, Norrby-Teglund A, McGeer A, El-Sherbini H, Dorak MT, Khurshid A, *et al.* An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nat Med* 2002; 8: 1398-404.

228. Nooh MM, El-Gengehi N, Kansal R, David CS, Kotb M. HLA transgenic mice provide evidence for a direct and dominant role of HLA class II variation in modulating the severity of streptococcal sepsis. *J Immunol* 2007; 178: 3076-83.

229. McDonald MI, Towers RJ, Andrews RM, Bengner N, Currie BJ, Carapetis JR. Low rates of streptococcal pharyngitis and high rates of pyoderma in Australian aboriginal communities where acute rheumatic fever is hyperendemic. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 683-9.

230. 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.

231. Guilherme L, Fae K, Oshiro SE, Kalil J. Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Expert Rev Mol Med* 2005; 7: 1-15.

232. Goroncy-Bermes P, Dale JB, Beachey EH, Opferkuch W. Monoclonal antibody to human renal glomeruli cross-reacts with streptococcal M protein. *Infect Immun* 1987; 55: 2416-9.

233. Nordstrand A, Norgren M, Ferretti JJ, Holm SE. Streptokinase as a mediator of acute post-streptococcal glomerulonephritis in an experimental mouse model. *Infect Immun* 1998; 66: 315-21.

234. Nordstrand A, McShan WM, Ferretti JJ, Holm SE, Norgren M. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect Immun* 2000; 68: 1019-25.

235. Cu GA, Mezzano S, Bannan JD, Zabriskie JB. Immunohistochemical and serological evidence for the role of streptococcal proteinase in acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 54: 819-26.

236. York MK, Gibbs L, Perdreau-Remington F, Brooks GF. Characterization of antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates from the San Francisco Bay area of northern California. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1727-31.
237. Malhotra-Kumar S, Wang S, Lammens C, Chapelle S, Goossens H. Bacitracin-resistant clone of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Belgium. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5282-4.
238. Pérez-Trallero E, García C, Orden B, Marimón JM, Montes M. Dissemination of *emm28* erythromycin-, clindamycin- and bacitracin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 123-6.
239. Mihaila-Amrouche L, Bouvet A, Loubinoux J. Clonal spread of *emm* type 28 isolates of *Streptococcus pyogenes* that are multiresistant to antibiotics. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3844-6.
240. Matthys J, De Meyere M, van Driel ML, De Sutter A. Differences among international pharyngitis guidelines: not just academic. *Ann Fam Med* 2007; 5: 436-43.
241. El Kholy AE, Facklam R, Sabri G, Rotta J. Serological identification of group A streptococci from throat scrapings before culture. *J Clin Microbiol* 1978; 8: 725-8.
242. Gerber MA, Shulman ST. Rapid diagnosis of pharyngitis caused by group A streptococci. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 571-80.
243. Bourbeau PP. Role of the microbiology laboratory in diagnosis and management of pharyngitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3467-72.
244. Davignon L, Walter EA, Mueller KM, Barrozo CP, Stenger DA, Lin B. Use of resequencing oligonucleotide microarrays for identification of *Streptococcus pyogenes* and associated antibiotic resistance determinants. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5690-5.
245. Damrosch DS. Chemoprophylaxis and sulfonamide resistant streptococci. *JAMA* 1946; 130: 124-5.
246. Macris MH, Hartman N, Murray B, Klein RF, Roberts RB, Kaplan EL, *et al.* Studies of the continuing susceptibility of group A streptococcal strains to penicillin during eight decades. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 377-81.
247. Horn DL, Zabriskie JB, Austrian R, Cleary PP, Ferretti JJ, Fischetti VA, *et al.* Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1341-5.
248. Lowbury EJ, Cason JS. Aureomycin and erythromycin therapy for *S. pyogenes* in burns. *Br Med J* 1954; 2: 914-5.
249. Lowbury EJ, Hurst L. The sensitivity of staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleandomycin, and spiramycin. *J Clin Pathol* 1959; 12: 163-9.
250. Sanders E, Foster MT, Scott D. Group A beta-hemolytic streptococci resistant to erythromycin and lincomycin. *N Engl J Med* 1968; 278: 538-40.

251. Dixon JM. Group A *Streptococcus* resistant to erythromycin and lincomycin. *Can Med Assoc J* 1968; 99: 1093-4.
252. Maruyama S, Yoshioka H, Fujita K, Takimoto M, Satake Y. Sensitivity of group A streptococci to antibiotics. Prevalence of resistance to erythromycin in Japan. *Am J Dis Child* 1979; 133: 1143-5.
253. Gerber MA. Antibiotic resistance in group A streptococci. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42: 539-51.
254. Seppälä H, Nissinen A, Jarvinen H, Huovinen S, Henriksson T, Herva E, *et al.* Resistance to erythromycin in group A streptococci. *N Engl J Med* 1992; 326: 292-7.
255. Cornaglia G, Ligozzi M, Mazzariol A, Masala L, Lo Cascio G, Orefici G, *et al.* Resistance of *Streptococcus pyogenes* to erythromycin and related antibiotics in Italy. The Italian Surveillance Group for Antimicrobial Resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27 (Suppl 1): S87-92.
256. Cresti S, Lattanzi M, Zanchi A, Montagnani F, Pollini S, Cellesi C, *et al.* Resistance determinants and clonal diversity in group A streptococci collected during a period of increasing macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1816-22.
257. Pérez-Trallero E, Urbieto M, Montes M, Ayestaran I, Marimón JM. Emergence of *Streptococcus pyogenes* strains resistant to erythromycin in Gipuzkoa, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 25-31.
258. Orden B, Pérez-Trallero E, Montes M, Martínez R. Erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes* in Madrid. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 470-3.
259. Latorre C, García-Rey C, García-Perea A, Perea E, Aguilar L, Cercenado E, *et al.* Activity of six quinolones against 226 recent clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* with reduced susceptibility to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 301-3.
260. Yan SS, Fox ML, Holland SM, Stock F, Gill VJ, Fedorko DP. Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3196-8.
261. Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP, Almer LS, Shortridge VD, Zeitler R, *et al.* Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 380-3.
262. Reinert RR, Lutticken R, Al-Lahham A. High-level fluoroquinolone resistance in a clinical *Streptococcus pyogenes* isolate in Germany. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 659-62.
263. Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Characterization of fluoroquinolone-resistant β -hemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 119-27.

264. Alonso R, Mateo E, Ezpeleta G, Cisterna R. Characterisation of levofloxacin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* in Bilbao, Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 183-5.
265. Pérez-Trallero E, Fernández-Mazarrasa C, García-Rey C, Bouza E, Aguilar L, García-de-Lomas J, *et al.* Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3334-40.
266. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Chapelle S, Mallentjer C, Weyler J, Goossens H. Clonal spread of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 320-5.
267. Kaplan EL, Gastanaduy AS, Huwe BB. The role of the carrier in treatment failures after antibiotic for group A streptococci in the upper respiratory tract. *J Lab Clin Med* 1981; 98: 326-35.
268. Kaplan EL, Johnson DR. Unexplained reduced microbiological efficacy of intramuscular benzathine penicillin G and of oral penicillin V in eradication of group A streptococci from children with acute pharyngitis. *Pediatrics* 2001; 108: 1180-6.
269. Pichichero ME, Casey JR. Systematic review of factors contributing to penicillin treatment failure in *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 137: 851-857.
270. Block SL. Short-course antimicrobial therapy of streptococcal pharyngitis. *Clin Pediatr (Phila)* 2003; 42: 663-71.
271. Stevens DL, Yan S, Bryant AE. Penicillin-binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy *in vitro* and *in vivo*: an explanation for the inoculum effect. *J Infect Dis* 1993; 167: 1401-5.
272. Stevens DL, Gibbons AE, Bergstrom R, Winn V. The Eagle effect revisited: efficacy of clindamycin, erythromycin, and penicillin in the treatment of streptococcal myositis. *J Infect Dis* 1988; 158: 23-8.
273. Zimbelman J, Palmer A, Todd J. Improved outcome of clindamycin compared with β -lactam antibiotic treatment for invasive *Streptococcus pyogenes* infection. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 1096-100.
274. Norrby-Teglund A, Kaul R, Low DE, McGeer A, Newton DW, Andersson J, *et al.* Plasma from patients with severe invasive group A streptococcal infections treated with normal polyspecific IgG inhibits streptococcal superantigen-induced T cell proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1996; 156: 3057-64.
275. Basma H, Norrby-Teglund A, McGeer A, Low DE, El-Ahmedy O, Dale JB, *et al.* Opsonic antibodies to the surface M protein of group A streptococci in pooled normal immunoglobulins (IVIG): potential impact on the clinical efficacy of IVIG therapy for severe invasive group A streptococcal infections. *Infect Immun* 1998; 66: 2279-83.

276. Kaul R, McGeer A, Norrby-Teglund A, Kotb M, Schwartz B, O'Rourke K, *et al.* Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome -a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 800-7.
277. Darenberg J, Ihendyane N, Sjolín J, Aufwerber E, Haidl S, Follin P, *et al.* Intravenous immunoglobulin G therapy in streptococcal toxic shock syndrome: a European randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 333-40.
278. Smith A, Lamagni TL, Oliver I, Efstratiou A, George RC, Stuart JM. Invasive group A streptococcal disease: should close contacts routinely receive antibiotic prophylaxis? *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 494-500.
279. Schwartz B, Elliott JA, Butler JC, Simon PA, Jameson BL, Welch GE, *et al.* Clusters of invasive group A streptococcal infections in family, hospital, and nursing home settings. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 277-84.
280. Gamba MA, Martinelli M, Schaad HJ, Streuli RA, DiPersio J, Matter L, *et al.* Familial transmission of a serious disease-producing group A streptococcus clone: case reports and review. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1118-21.
281. Huang YC, Hsueh PR, Lin TY, Yan DC, Hsia SH. A family cluster of streptococcal toxic shock syndrome in children: clinical implication and epidemiological investigation. *Pediatrics* 2001; 107: 1181-3.
282. Roy S, Kaplan EL, Rodriguez B, Schreiber JR, Salata RA, Palavecino E, *et al.* A family cluster of five cases of group A streptococcal pneumonia. *Pediatrics* 2003; 112: e61-5.
283. Daneman N, McGeer A, Low DE, Tyrrell G, Simor AE, McArthur M, *et al.* Hospital-acquired invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada, 1992-2000. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 334-42.
284. Greene CM, Van Beneden CA, Javadi M, Skoff TH, Beall B, Facklam R, *et al.* Cluster of deaths from group A streptococcus in a long-term care facility -Georgia, 2001. *Am J Infect Control* 2005; 33: 108-13.
285. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of invasive group A streptococcal disease among household contacts of case patients and among postpartum and postsurgical patients: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 950-9.
286. Robinson KA, Rothrock G, Phan Q, Sayler B, Stefonek K, Van Beneden C, *et al.* Risk for severe group A streptococcal disease among patients' household contacts. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 443-7.
287. Bisno AL, Rubin FA, Cleary PP, Dale JB. Prospects for a group A streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles -report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1150-6.

288. Kotloff KL, Corretti M, Palmer K, Campbell JD, Reddish MA, Hu MC, *et al.* Safety and immunogenicity of a recombinant multivalent group A streptococcal vaccine in healthy adults: phase 1 trial. *JAMA* 2004; 292: 709-15.
289. McNeil SA, Halperin SA, Langley JM, Smith B, Warren A, Sharratt GP, *et al.* Safety and immunogenicity of 26-valent group A streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1114-22.
290. Pruksakorn S, Sittisombut N, Phornphutkul C, Pruksachatkunakorn C, Good MF, Brandt E. Epidemiological analysis of non-M-typeable group A *Streptococcus* isolates from a Thai population in northern Thailand. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1250-4.
291. Sakota V, Fry AM, Lietman TM, Facklam RR, Li Z, Beall B. Genetically diverse group A streptococci from children in far-western Nepal share high genetic relatedness with isolates from other countries. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2160-6.
292. Tewodros W, Kronvall G. M protein gene (*emm* type) analysis of group A beta-hemolytic streptococci from Ethiopia reveals unique patterns. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4369-76.
293. Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, Vercaigne LM, Embil JM, Gin AS, *et al.* Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs* 2001; 61: 443-98.
294. Douthwaite S, Champney WS. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 (Suppl T1): 1-8.
295. Spizek J, Novotna J, Rezanka T. Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Adv Appl Microbiol* 2004; 56: 121-54.
296. Cocito C, Di Giambattista M, Nyssen E, Vannuffel P. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39 (Suppl A): 7-13.
297. Gaynor M, Mankin AS. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem* 2003; 3: 949-61.
298. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 482-92.
299. Lai CJ, Weisblum B. Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 856-60.
300. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppälä H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2823-30.
301. Rice LB. *Tn916* family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1871-7.

- 302.** Brenciani A, Bacciaglia A, Vecchi M, Vitali LA, Varaldo PE, Giovanetti E. Genetic elements carrying *erm(B)* in *Streptococcus pyogenes* and association with *tet(M)* tetracycline resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1209-16.
- 303.** Seppälä H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 257-62.
- 304.** Reig M, Galán J, Baquero F, Pérez-Díaz JC. Macrolide resistance in *Peptostreptococcus* spp. mediated by *ermTR*: possible source of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 630-2.
- 305.** Camilli R, Del Grosso M, Iannelli F, Pantosti A. A new genetic element carrying the erythromycin resistance determinant *erm(TR)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 619-25.
- 306.** Seppälä H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 885-91.
- 307.** Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2727-34.
- 308.** Clarebout G, Leclercq R. Fluorescence assay for studying the ability of macrolides to induce production of ribosomal methylase. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2269-72.
- 309.** Rosato A, Vicarini H, Leclercq R. Inducible or constitutive expression of resistance in clinical isolates of streptococci and enterococci cross-resistant to erythromycin and lincomycin. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 559-62.
- 310.** Weisblum B. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 797-805.
- 311.** Fines M, Gueudin M, Ramon A, Leclercq R. *In vitro* selection of resistance to clindamycin related to alterations in the attenuator of the *erm(TR)* gene of *Streptococcus pyogenes* UCN1 inducibly resistant to erythromycin. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 411-6.
- 312.** Doktor SZ, Shortridge V. Differences in the DNA sequences in the upstream attenuator region of *erm(A)* in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* and their correlation with macrolide/lincosamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3070-2.
- 313.** Culebras E, Rodríguez-Avial I, Betriu C, Picazo JJ. Differences in the DNA sequence of the translational attenuator of several constitutively expressed *erm(A)* genes from clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 836-40.

- 314.** Schmitz FJ, Petridou J, Astfalk N, Scheuring S, Kohrer K, Verhoef J, *et al.* Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *erm(A)* genes in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1603-4.
- 315.** Lewis JS, 2nd, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis* 2005; 40: 280-5.
- 316.** Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* 1990; 4: 1207-14.
- 317.** 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.
- 318.** Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 1996; 22: 867-79.
- 319.** Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, Dib-Hajj F, Wondrack L, Yuan W, *et al.* *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2251-5.
- 320.** Sangvik M, Littauer P, Simonsen GS, Sundsfjord A, Dahl KH. *mef(A)*, *mef(E)* and a new *mef* allele in macrolide-resistant *Streptococcus* spp. isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 841-6.
- 321.** Cochetti I, Vecchi M, Mingoia M, Tili E, Catania MR, Manzin A, *et al.* Molecular characterization of pneumococci with efflux-mediated erythromycin resistance and identification of a novel *mef* gene subclass, *mef(I)*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4999-5006.
- 322.** Cai Y, Kong F, Gilbert GL. Three new macrolide efflux (*mef*) gene variants in *Streptococcus agalactiae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2754-5.
- 323.** Amezaga MR, McKenzie H. Molecular epidemiology of macrolide resistance in beta-haemolytic streptococci of Lancefield groups A, B, C and G and evidence for a new *mef* element in group G streptococci that carries allelic variants of *mef* and *msr(D)*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 443-9.
- 324.** Klaassen CH, Mouton JW. Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between *mef(A)* and *mef(E)*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1271-8.
- 325.** Gay K, Stephens DS. Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 2001; 184: 56-65.
- 326.** Santagati M, Iannelli F, Oggioni MR, Stefani S, Pozzi G. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2585-7.

327. Santagati M, Iannelli F, Cascone C, Campanile F, Oggioni MR, Stefani S, *et al.* The novel conjugative transposon Tn1207.3 carries the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 243-7.
328. Banks DJ, Porcella SF, Barbian KD, Martin JM, Musser JM. Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A *Streptococcus*. *J Infect Dis* 2003; 188: 1898-908.
329. Giovanetti E, Brenciani A, Vecchi M, Manzin A, Varaldo PE. Prophage association of *mef(A)* elements encoding efflux-mediated erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 445-51.
330. Daly MM, Doktor S, Flamm R, Shortridge D. Characterization and prevalence of MefA, MefE, and the associated *msr(D)* gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3570-4.
331. Giovanetti E, Brenciani A, Burioni R, Varaldo PE. A novel efflux system in inducibly erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3750-5.
332. Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. 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.
333. Dina J, Malbruny B, Leclercq R. Nonsense mutations in the *lsa*-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and Streptogramins A. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2307-9.
334. Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 936-9.
335. Chesneau O, Ligeret H, Hosan-Aghaie N, Morvan A, Dassa E. Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by the *Vga* proteins of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 973-80.
336. Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1-12.
337. Jalava J, Vaara M, Huovinen P. Mutation at the position 2058 of the 23S rRNA as a cause of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3: 5.
338. Farrell DJ, Shackcloth J, Barbadora KA, Green MD. *Streptococcus pyogenes* isolates with high-level macrolide resistance and reduced susceptibility to telithromycin associated with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 817-8.
339. Davies TA, Bush K, Sahm D, Evangelista A. Predominance of 23S rRNA mutants among non-*erm*, non-*mef* macrolide-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in the United States in 1999-2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3031-3.

- 340.** Richter SS, Heilmann KP, Beekmann SE, Miller NJ, Miller AL, Rice CL, *et al.* Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in the United States, 2002-2003. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 599-608.
- 341.** Bingen E, Leclercq R, Fitoussi F, Brahim N, Malbruny B, Deforche D, *et al.* Emergence of group A streptococcus strains with different mechanisms of macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1199-203.
- 342.** Prunier AL, Malbruny B, Tande D, Picard B, Leclercq R. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3054-6.
- 343.** Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65: 232-60.
- 344.** Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 245: 195-203.
- 345.** Ayer V, Tewodros W, Manoharan A, Skariah S, Luo F, Bessen DE. Tetracycline resistance in group A streptococci: emergence on a global scale and influence on multiple-drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1865-8.
- 346.** Hammerum AM, Nielsen HU, Agerso Y, Ekelund K, Frimodt-Moller N. Detection of *tet(M)*, *tet(O)* and *tet(S)* in tetracycline/minocycline-resistant *Streptococcus pyogenes* bacteraemia isolates. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 118-9.
- 347.** Clermont D, Chesneau O, De Cespedes G, Horaud T. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of *tet(T)* isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 112-6.
- 348.** Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 (Suppl 1): 13-20.
- 349.** Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 256-80.
- 350.** Roychoudhury S, Ledoussal B. Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; 2: 51-65.
- 351.** Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* 2000; 46 (Suppl T1): 17-24.
- 352.** Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 377-92.
- 353.** Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (Suppl 1): S9-S15.
- 354.** Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (Suppl 2): S120-6.

- 355.** Schmitz FJ, Higgins PG, Mayer S, Fluit AC, Dalhoff A. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 647-59.
- 356.** Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-9.
- 357.** Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3050-2.
- 358.** Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 118-25.
- 359.** Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12: 83-8.
- 360.** Pan XS, Fisher LM. DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2810-6.
- 361.** Sáenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1001-5.
- 362.** Janoir C, Zeller V, Kitzis MD, Moreau NJ, Gutmann L. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2760-4.
- 363.** Stanhope MJ, Walsh SL, Becker JA, Italia MJ, Ingraham KA, Gwynn MN, *et al.* Molecular evolution perspectives on intraspecific lateral DNA transfer of topoisomerase and gyrase loci in *Streptococcus pneumoniae*, with implications for fluoroquinolone resistance development and spread. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4315-26.
- 364.** Pletz MW, McGee L, Van Beneden CA, Petit S, Bardsley M, Barlow M, *et al.* Fluoroquinolone resistance in invasive *Streptococcus pyogenes* isolates due to spontaneous mutation and horizontal gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 943-8.
- 365.** Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 20-51.
- 366.** Truong-Bolduc QC, Dunman PM, Strahilevitz J, Projan SJ, Hooper DC. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2005; 187: 2395-405.
- 367.** Truong-Bolduc QC, Strahilevitz J, Hooper DC. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1104-7.
- 368.** Boos M, Mayer S, Fischer A, Kohrer K, Scheuring S, Heisig P, *et al.* *In vitro* development of resistance to six quinolones in *Streptococcus pneumoniae*,

Streptococcus pyogenes, and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 938-42.

369. Jones HE, Brenwald NP, Owen KA, Gill MJ. A multidrug efflux phenotype mutant of *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 707-10.

370. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Eighth Informational Supplement. Approved Standard M2-A8. NCCLS: Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.

371. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth Informational Supplement. Approved Standard M100-S14. NCCLS: Wayne, Pennsylvania, USA, 2004.

372. Proft T, Webb PD, Handley V, Fraser JD. Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*. *Infect Immun* 2003; 71: 1361-9.

373. Pan XS, Fisher LM. Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. *J Bacteriol* 1996; 178: 4060-9.

374. Chatellier S, Ihendyane N, Kansal RG, Khambaty F, Basma H, Norrby-Teglund A, *et al.* Genetic relatedness and superantigen expression in group A *Streptococcus* serotype M1 isolates from patients with severe and nonsevere invasive diseases. *Infect Immun* 2000; 68: 3523-34.

375. Igwe EI, Shewmaker PL, Facklam RR, Farley MM, van Beneden C, Beall B. Identification of superantigen genes *speM*, *ssa*, and *smeZ* in invasive strains of beta-hemolytic group C and G streptococci recovered from humans. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 229: 259-64.

376. Proft T, Arcus VL, Handley V, Baker EN, Fraser JD. Immunological and biochemical characterization of streptococcal pyrogenic exotoxins I and J (SPE-I and SPE-J) from *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* 2001; 166: 6711-9.

377. McCormick JK, Pragman AA, Stolpa JC, Leung DY, Schlievert PM. Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen. *Infect Immun* 2001; 69: 1381-8.

378. Reinert RR, Lutticken R, Bryskier A, Al-Lahham A. Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in the pediatric population in Germany during 2000-2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 489-93.

379. Weber P, Filipecki J, Bingen E, Fitoussi F, Goldfarb G, Chauvin JP, *et al.* Genetic and phenotypic characterization of macrolide resistance in group A streptococci isolated from adults with pharyngo-tonsillitis in France. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 291-4.

380. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes* 2001; 15: 209-15.

381. Sierra JM, Sánchez F, Castro P, Salvadó M, de la Red G, Libois A, *et al.* Group A streptococcal infections in injection drug users in Barcelona, Spain: epidemiologic,

clinical, and microbiologic analysis of 3 clusters of cases from 2000 to 2003. *Medicine (Baltimore)* 2006; 85: 139-46.

382. Davies TA, Evangelista A, Pflieger S, Bush K, Sahn DF, Goldschmidt R. Prevalence of single mutations in topoisomerase type II genes among levofloxacin-susceptible clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in the United States in 1992 to 1996 and 1999 to 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 119-24.

383. Lim S, Bast D, McGeer A, de Azavedo J, Low DE. Antimicrobial susceptibility breakpoints and first-step *parC* mutations in *Streptococcus pneumoniae*: redefining fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 833-7.

384. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 2004; 430: 242-9.

385. Johnson DR, Wotton JT, Shet A, Kaplan EL. A comparison of group A streptococci from invasive and uncomplicated infections: are virulent clones responsible for serious streptococcal infections? *J Infect Dis* 2002; 185: 1586-95.

386. Vlaminckx B, van Pelt W, Schouls L, van Silfhout A, Elzenaar C, Mascini E, *et al.* Epidemiological features of invasive and noninvasive group A streptococcal disease in the Netherlands, 1992-1996. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 434-44.

387. Darenberg J, Luca-Harari B, Jasir A, Sandgren A, Pettersson H, Schalen C, *et al.* Molecular and clinical characteristics of invasive group A streptococcal infection in Sweden. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 450-8.

388. O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, Lynfield R, Gershman K, Craig A, *et al.* The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 853-62.

389. Bogdan L, Ekelund K, van der Linden M, Staum-Kaltoft M, Hammerum AM, Jasir A. Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003-2004. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 79-86.

390. Lau SK, Woo PC, Yim TC, To AP, Yuen KY. Molecular characterization of a strain of group A *Streptococcus* isolated from a patient with a psoas abscess. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4888-91.

391. Chuang I, Van Beneden C, Beall B, Schuchat A. Population-based surveillance for postpartum invasive group A streptococcus infections, 1995-2000. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 665-70.

392. Bernaldo de Quirós JC, Moreno S, Cercenado E, Díaz D, Berenguer J, Miralles P, *et al.* Group A streptococcal bacteremia. A 10-year prospective study. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76: 238-48.

393. Efstratiou A, Emery M, Lamagni TL, Tanna A, Warner M, George RC. Increasing incidence of group A streptococcal infections amongst injecting drug users in England and Wales. *J Med Microbiol* 2003; 52: 525-6.

394. Factor SH. Invasive group A streptococcal disease: risk factors for adults. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 970-7.

- 395.** Engler KH, Perrett K. Group A streptococcal bacteraemia in Yorkshire and the Humber: evidence of another problematic infection among injecting drug users. *Commun Dis Public Health* 2004; 7: 123-7.
- 396.** Navarro VJ, Axelrod PI, Pinover W, Hockfield HS, Kostman JR. A comparison of *Streptococcus pyogenes* (group A streptococcal) bacteremia at an urban and a suburban hospital. The importance of intravenous drug use. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2679-84.
- 397.** Laupland KB, Davies HD, Low DE, Schwartz B, Green K, McGeer A. Invasive group A streptococcal disease in children and association with varicella-zoster virus infection. Ontario Group A Streptococcal Study Group. *Pediatrics* 2000; 105: e60.
- 398.** Patel RA, Binns HJ, Shulman ST. Reduction in pediatric hospitalizations for varicella-related invasive group A streptococcal infections in the varicella vaccine era. *J Pediatr* 2004; 144: 68-74.
- 399.** Vlamincx BJ, van Pelt W, Schouls LM, van Silfhout A, Mascini EM, Elzenaar CP, *et al.* Long-term surveillance of invasive group A streptococcal disease in The Netherlands, 1994-2003. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 226-31.
- 400.** Tyrrell GJ, Lovgren M, Forwick B, Hoe NP, Musser JM, Talbot JA. M types of group a streptococcal isolates submitted to the National Centre for *Streptococcus* (Canada) from 1993 to 1999. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4466-71.
- 401.** Descheemaeker P, Van Loock F, Hauchecorne M, Vandamme P, Goossens H. Molecular characterisation of group A streptococci from invasive and non-invasive disease episodes in Belgium during 1993-1994. *J Med Microbiol* 2000; 49: 467-71.
- 402.** Schmitz FJ, Beyer A, Charpentier E, Normark BH, Schade M, Fluit AC, *et al.* Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J Infect Dis* 2003; 188: 1578-86.
- 403.** Ekelund K, Darenberg J, Norrby-Teglund A, Hoffmann S, Bang D, Skinhoj P, *et al.* Variations in *emm* type among group A streptococcal isolates causing invasive or noninvasive infections in a nationwide study. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3101-9.
- 404.** Creti R, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Recchia S, Alfarone G, *et al.* *emm* Types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: What has changed in 11 years? *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2249-56.
- 405.** Shulman ST, Tanz RR, Kabat W, Kabat K, Cederlund E, Patel D, *et al.* Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000-2002. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 325-32.
- 406.** Pérez-Trallero E, Marimón JM, Montes M, Orden B, de Pablos M. Clonal differences among erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 235-40.
- 407.** Albertí S, García-Rey C, Domínguez MA, Aguilar L, Cercenado E, Gobernado M, *et al.* Survey of *emm* gene sequences from pharyngeal *Streptococcus pyogenes* isolates

collected in Spain and their relationship with erythromycin susceptibility. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2385-90.

408. Montes M, Orden B, Tamayo E, Alós JI, Pérez-Trallero E. Characterisation of the main clones of *Streptococcus pyogenes* carrying the *ermA* (subclass TR) gene in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 408-12.

409. Pérez-Trallero E, Montes M, Orden B, Tamayo E, García-Arenzana JM, Marimón JM. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates displaying the MLSB phenotype of macrolide resistance in Spain, 1999 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1228-33.

410. Sáez-Nieto JA, Álvarez D, Rubio V, Valdezate S, Vindel A. Cepas invasivas y no invasivas de *Streptococcus pyogenes* aisladas en España (1994-2005). Marcadores fenotípicos y moleculares y susceptibilidad frente a 14 antimicrobianos. *Abstracts del XII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(Espec Congr): 31. Abstract 082.

411. Tanna A, Emery M, Dhami C, Arnold E, Efstratiou A. Molecular characterization of clinical isolates of M non-typable group A streptococci from invasive disease cases. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1419-23.

412. Ekelund K, Skinhoj P, Madsen J, Konradsen HB. Reemergence of *emm1* and a changed superantigen profile for group A streptococci causing invasive infections: results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1789-96.

413. Moses AE, Goldberg S, Korenman Z, Ravins M, Hanski E, Shapiro M. Invasive group A streptococcal infections, Israel. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 421-6.

414. Moses AE, Hidalgo-Grass C, Dan-Goor M, Jaffe J, Shetzigovsky I, Ravins M, *et al.* *emm* typing of M nontypeable invasive group A streptococcal isolates in Israel. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4655-9.

415. Li Z, Sakota V, Jackson D, Franklin AR, Beall B. Array of M protein gene subtypes in 1064 recent invasive group A streptococcus isolates recovered from the Active Bacterial Core Surveillance. *J Infect Dis* 2003; 188: 1587-92.

416. Jamal F, Pit S, Facklam R, Beall B. New *emm* (M protein gene) sequences of group A streptococci isolated from Malaysian patients. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 182-3.

417. Teixeira LM, Barros RR, Castro AC, Peralta JM, Da Gloria SCM, Talkington DF, *et al.* Genetic and phenotypic features of *Streptococcus pyogenes* strains isolated in Brazil that harbor new *emm* sequences. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3290-5.

418. Abdissa A, Asrat D, Kronvall G, Shittu B, Achiko D, Zeidan M, *et al.* High diversity of group A streptococcal *emm* types among healthy schoolchildren in Ethiopia. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1362-7.

419. Dey N, McMillan DJ, Yarwood PJ, Joshi RM, Kumar R, Good MF, *et al.* High diversity of group A Streptococcal *emm* types in an Indian community: the need to tailor multivalent vaccines. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 46-51.
420. Gaworzewska E, Colman G. Changes in the pattern of infection caused by *Streptococcus pyogenes*. *Epidemiol Infect* 1988; 100: 257-69.
421. Holm SE, Norrby A, Bergholm AM, Norgren M. Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infections in Sweden, 1988-1989. *J Infect Dis* 1992; 166: 31-7.
422. Bucher A, Martin PR, Hoiby EA, Halstensen A, Odegaard A, Hellum KB, *et al.* Spectrum of disease in bacteraemic patients during a *Streptococcus pyogenes* serotype M-1 epidemic in Norway in 1988. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 416-26.
423. Musser JM, Hauser AR, Kim MH, Schlievert PM, Nelson K, Selander RK. *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2668-72.
424. Hauser AR, Stevens DL, Kaplan EL, Schlievert PM. Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1562-7.
425. Cleary PP, Kaplan EL, Handley JP, Wlazlo A, Kim MH, Hauser AR, *et al.* Clonal basis for resurgence of serious *Streptococcus pyogenes* disease in the 1980s. *Lancet* 1992; 339: 518-21.
426. Musser JM, Kapur V, Kanjilal S, Shah U, Musher DM, Barg NL, *et al.* Geographic and temporal distribution and molecular characterization of two highly pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes* expressing allelic variants of pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin). *J Infect Dis* 1993; 167: 337-46.
427. Kline JB, Collins CM. Analysis of the superantigenic activity of mutant and allelic forms of streptococcal pyrogenic exotoxin A. *Infect Immun* 1996; 64: 861-9.
428. Vlaminckx BJ, Schuren FH, Montijn RC, Caspers MP, Beitsma MM, Wannet WJ, *et al.* Dynamics in prophage content of invasive and noninvasive M1 and M28 *Streptococcus pyogenes* isolates in The Netherlands from 1959 to 1996. *Infect Immun* 2007; 75: 3673-9.
429. Lehot P, Schaad HJ, Graf S, Täuber M, Muhlemann K. Group A streptococcus clones causing repeated epidemics and endemic disease in intravenous drug users. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 41-6.
430. Böhlen LM, Mühlemann K, Dubuis O, Aebi C, Täuber MG. Outbreak among drug users caused by a clonal strain of group A streptococcus. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 175-9.
431. Yan JJ, Liu CC, Ko WC, Hsu SY, Wu HM, Lin YS, *et al.* Molecular analysis of group A streptococcal isolates associated with scarlet fever in southern Taiwan between 1993 and 2002. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4858-61.

432. Eriksson BK, Norgren M, McGregor K, Spratt BG, Normark BH. Group A streptococcal infections in Sweden: a comparative study of invasive and noninvasive infections and analysis of dominant T28 *emm28* isolates. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37: 1189-93.
433. Creti R, Gherardi G, Imperi M, von Hunolstein C, Baldassarri L, Pataracchia M, *et al.* Association of group A streptococcal *emm* types with virulence traits and macrolide-resistance genes is independent of the source of isolation. *J Med Microbiol* 2005; 54: 913-7.
434. Jing HB, Ning BA, Hao HJ, Zheng YL, Chang D, Jiang W, *et al.* Epidemiological analysis of group A streptococci recovered from patients in China. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1101-7.
435. Haukness HA, Tanz RR, Thomson RB, Jr., Pierry DK, Kaplan EL, Beall B, *et al.* The heterogeneity of endemic community pediatric group A streptococcal pharyngeal isolates and their relationship to invasive isolates. *J Infect Dis* 2002; 185: 915-20.
436. Ho PL, Johnson DR, Yue AW, Tsang DN, Que TL, Beall B, *et al.* Epidemiologic analysis of invasive and noninvasive group A streptococcal isolates in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 937-42.
437. Kao CH, Chen PY, Huang FL, Chen CW, Chi CS, Lin YH, *et al.* Clinical and genetic analysis of invasive and non-invasive group A streptococcal infections in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; 38: 105-11.
438. Kiska DL, Thiede B, Caracciolo J, Jordan M, Johnson D, Kaplan EL, *et al.* Invasive group A streptococcal infections in North Carolina: epidemiology, clinical features, and genetic and serotype analysis of causative organisms. *J Infect Dis* 1997; 176: 992-1000.
439. Nakashima K, Ichiyama S, Iinuma Y, Hasegawa Y, Ohta M, Ooe K, *et al.* A clinical and bacteriologic investigation of invasive streptococcal infections in Japan on the basis of serotypes, toxin production, and genomic DNA fingerprints. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 260-6.
440. Rogers S, Commons R, Danchin MH, Selvaraj G, Kelpie L, Curtis N, *et al.* Strain prevalence, rather than innate virulence potential, is the major factor responsible for an increase in serious group A *Streptococcus* infections. *J Infect Dis* 2007; 195: 1625-33.
441. Muotiala A, Seppälä H, Huovinen P, Vuopio-Varkila J. Molecular comparison of group A streptococci of T1M1 serotype from invasive and noninvasive infections in Finland. *J Infect Dis* 1997; 175 (2): 392-9.
442. Cockerill FR, 3rd, MacDonald KL, Thompson RL, Roberson F, Kohner PC, Besser-Wiek J, *et al.* An outbreak of invasive group A streptococcal disease associated with high carriage rates of the invasive clone among school-aged children. *JAMA* 1997; 277: 38-43.
443. McMillan DJ, Beiko RG, Geffers R, Buer J, Schouls LM, Vlamincx BJ, *et al.* Genes for the majority of group A streptococcal virulence factors and extracellular

surface proteins do not confer an increased propensity to cause invasive disease. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 884-91.

444. Mascini EM, Jansze M, Schouls LM, Fluit AC, Verhoef J, van Dijk H. Invasive and noninvasive group A streptococcal isolates with different *speA* alleles in The Netherlands: genetic relatedness and production of pyrogenic exotoxins A and B. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3469-74.

445. Unnikrishnan M, Altmann DM, Proft T, Wahid F, Cohen J, Fraser JD, *et al.* The bacterial superantigen streptococcal mitogenic exotoxin Z is the major immunoactive agent of *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* 2002; 169: 2561-9.

446. Müller-Alouf H, Proft T, Zollner TM, Gerlach D, Champagne E, Desreumaux P, *et al.* Pyrogenicity and cytokine-inducing properties of *Streptococcus pyogenes* superantigens: comparative study of streptococcal mitogenic exotoxin Z and pyrogenic exotoxin A. *Infect Immun* 2001; 69: 4141-5.

447. Murakami J, Kawabata S, Terao Y, Kikuchi K, Totsuka K, Tamaru A, *et al.* Distribution of *emm* genotypes and superantigen genes of *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan, 1994-9. *Epidemiol Infect* 2002; 128: 397-404.

448. Szczypa K, Sadowy E, Izdebski R, Hryniewicz W. Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3975-79.

449. Reda KB, Kapur V, Mollick JA, Lamphear JG, Musser JM, Rich RR. Molecular characterization and phylogenetic distribution of the streptococcal superantigen gene (*ssa*) from *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 1994; 62: 1867-74.

450. Vlamincx BJ, Mascini EM, Schellekens J, Schouls LM, Paauw A, Fluit AC, *et al.* Site-specific manifestations of invasive group a streptococcal disease: type distribution and corresponding patterns of virulence determinants. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4941-9.

451. Vlamincx BJ, Schuren FH, Montijn RC, Caspers MP, Fluit AC, Wannet WJ, *et al.* Determination of the relationship between group A streptococcal genome content, M type, and toxic shock syndrome by a mixed genome microarray. *Infect Immun* 2007; 75: 2603-11.

452. Voyich JM, Sturdevant DE, Braughton KR, Kobayashi SD, Lei B, Virtaneva K, *et al.* Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1996-2001.

453. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Vuong C, Kobayashi SD, Porcella SF, *et al.* Engagement of the pathogen survival response used by group A *Streptococcus* to avert destruction by innate host defense. *J Immunol* 2004; 173: 1194-201.

454. Dalton TL, Scott JR. CovS inactivates CovR and is required for growth under conditions of general stress in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 2004; 186: 3928-37.

- 455.** Basma H, Norrby-Teglund A, Guedez Y, McGeer A, Low DE, El-Ahmedy O, *et al.* Risk factors in the pathogenesis of invasive group A streptococcal infections: role of protective humoral immunity. *Infect Immun* 1999; 67: 1871-7.
- 456.** Eriksson BK, Andersson J, Holm SE, Norgren M. Invasive group A streptococcal infections: T1M1 isolates expressing pyrogenic exotoxins A and B in combination with selective lack of toxin-neutralizing antibodies are associated with increased risk of streptococcal toxic shock syndrome. *J Infect Dis* 1999; 180: 410-8.
- 457.** Norrby-Teglund A, Pauksens K, Holm SE, Norgren M. Relation between low capacity of human sera to inhibit streptococcal mitogens and serious manifestation of disease. *J Infect Dis* 1994; 170: 585-91.
- 458.** Mascini EM, Jansze M, Schellekens JF, Musser JM, Faber JA, Verhoef-Verhage LA, *et al.* Invasive group A streptococcal disease in the Netherlands: evidence for a protective role of anti-exotoxin A antibodies. *J Infect Dis* 2000; 181: 631-8.
- 459.** Akesson P, Rasmussen M, Mascini E, von Pawel-Rammingen U, Janulczyk R, Collin M, *et al.* Low antibody levels against cell wall-attached proteins of *Streptococcus pyogenes* predispose for severe invasive disease. *J Infect Dis* 2004; 189: 797-804.
- 460.** Llewelyn M, Sriskandan S, Peakman M, Ambrozak DR, Douek DC, Kwok WW, *et al.* HLA class II polymorphisms determine responses to bacterial superantigens. *J Immunol* 2004; 172: 1719-26.
- 461.** Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, *et al.* Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001; 414: 454-7.
- 462.** Gutmann L, Tomasz A. Penicillin-resistant and penicillin-tolerant mutants of group A streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 128-36.
- 463.** Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, George RC, Hansman D, Liñares J, *et al.* Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8842-6.
- 464.** Pérez Trallero E, García Arenzana JM, Urbieta Egana M. Erythromycin resistance in streptococci. *Lancet* 1989; 2: 444-5.
- 465.** Prats G, Mirelis B, Ausina V, Pericas R, Coll P, Rabella N. A: Epidemiología de las resistencias bacterianas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (1984-89). JR Prous SA, Barcelona, 1991.
- 466.** Granizo JJ, Aguilar L, Casal J, Dal-Ré R, Baquero F. *Streptococcus pyogenes* resistance to erythromycin in relation to macrolide consumption in Spain (1986-1997). *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 959-64.
- 467.** Alós JI, Aracil B, Oteo J, Torres C, Gómez-Garcés JL, and the Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 605-9.

468. Alós JI, Aracil B, Oteo J, Gómez-Garcés JL, and the Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting (IAP-SEIMC). Significant increase in the prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin- and miconazole-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes* in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 333-7.
469. Tamayo J, Pérez-Trallero E, Gómez-Garcés JL, Alós JI, on behalf of the Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting (IAP-SEIMC). Resistance to macrolides, clindamycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolated in Spain during 2004. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 780-2.
470. De Azavedo JC, Yeung RH, Bast DJ, Duncan CL, Borgia SB, Low DE. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of group A streptococci from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2144-7.
471. Katz KC, McGeer AJ, Duncan CL, Ashi-Sulaiman A, Willey BM, Sarabia A, *et al.* Emergence of macrolide resistance in throat culture isolates of group A streptococci in Ontario, Canada, in 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2370-2.
472. 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.
473. Bingen E, Fitoussi F, Doit C, Cohen R, Tanna A, George R, *et al.* Resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* in France in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1453-7.
474. Bingen E, Bidet P, Mihaila-Amrouche L, Doit C, Forcet S, Brahimi N, *et al.* Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3559-62.
475. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, *et al.* Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 167-73.
476. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Chapelle S, Wijdooghe M, Piessens J, Van Herck K, *et al.* Macrolide- and telithromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium, 1999-2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 939-42.
477. Mazzariol A, Koncan R, Bahar G, Cornaglia G. Susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* to macrolides and telithromycin: data from an Italian multicenter study. *J Chemother* 2007; 19: 500-7.
478. Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J, the Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and *emm* types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2109-11.
479. Grivea IN, Al-Lahham A, Katopodis GD, Syrogiannopoulos GA, Reinert RR. Resistance to erythromycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolates obtained between 1999 and 2002 from Greek children with tonsillopharyngitis: phenotypic and genotypic analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 256-61.

- 480.** Reinert RR, Franken C, van der Linden M, Luticken R, Cil M, Al-Lahham A. Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002-2003. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 43-7.
- 481.** Acikgoz ZC, Gocer S, Tuncer S. Macrolide resistance determinants of group A streptococci in Ankara, Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 110-2.
- 482.** Detcheva A, Facklam RR, Beall B. Erythromycin-resistant group A streptococcal isolates recovered in Sofia, Bulgaria, from 1995 to 2001. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3831-4.
- 483.** Nielsen HU, Hammerum AM, Ekelund K, Bang D, Pallesen LV, Frimodt-Møller N. Tetracycline and macrolide co-resistance in *Streptococcus pyogenes*: co-selection as a reason for increase in macrolide-resistant *S. pyogenes*? *Microb Drug Resist* 2004; 10: 231-8.
- 484.** Littauer P, Caugant DA, Sangvik M, Hoiby EA, Sundsfjord A, Simonsen GS. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Norway: population structure and resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1896-9.
- 485.** Bozdogan B, Appelbaum PC, Kelly LM, Hoellman DB, Tambic-Andrasevic A, Drukalska L, *et al.* Activity of telithromycin compared with seven other agents against 1039 *Streptococcus pyogenes* pediatric isolates from ten centers in central and eastern Europe. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 741-5.
- 486.** Tanz RR, Shulman ST, Shortridge VD, Kabat W, Kabat K, Cederlund E, *et al.* Community-based surveillance in the United States of macrolide-resistant pediatric pharyngeal group A streptococci during 3 respiratory disease seasons. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1794-801.
- 487.** Green MD, Beall B, Marcon MJ, Allen CH, Bradley JS, Dashefsky B, *et al.* Multicentre surveillance of the prevalence and molecular epidemiology of macrolide resistance among pharyngeal isolates of group A streptococci in the USA. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1240-3.
- 488.** Martínez S, Amoroso AM, Famiglietti A, de Mier C, Vay C, Gutkind GO. Genetic and phenotypic characterization of resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* from Argentina. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 95-8.
- 489.** d'Oliveira RE, Barros RR, Mendonca CR, Teixeira LM, Castro AC. Antimicrobial susceptibility and survey of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pyogenes* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 87-91.
- 490.** Kim S, Yong Lee N. Antibiotic resistance and genotypic characteristics of group A streptococci associated with acute pharyngitis in Korea. *Microb Drug Resist* 2004; 10: 300-5.
- 491.** Brahmadathan KN, Anitha P, Gladstone P. Increasing erythromycin resistance among group A streptococci causing tonsillitis in a tertiary care hospital in southern India. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 335-7.

492. Hsueh PR, Chen HM, Huang AH, Wu JJ. Decreased activity of erythromycin against *Streptococcus pyogenes* in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2239-42.
493. Hsueh PR, Shyr JM, Wu JJ. Decreased erythromycin use after antimicrobial reimbursement restriction for undocumented bacterial upper respiratory tract infections significantly reduced erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Taiwan. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 903-5.
494. Albrich WC, Monnet DL, Harbarth S. Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 514-7.
495. Bergman M, Huikko S, Pihlajamäki M, Laippala P, Palva E, Huovinen P, *et al.* Effect of macrolide consumption on erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Finland in 1997-2001. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1251-6.
496. García-Rey C, Aguilar L, Baquero F, Casal J, Martín JE. Pharmacoepidemiological analysis of provincial differences between consumption of macrolides and rates of erythromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* isolates in Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2959-63.
497. Seppälä H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J, Muotiala A, Helenius H, Lager K, *et al.* The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *N Engl J Med* 1997; 337: 441-6.
498. Hsueh PR, Shyr JM, Wu JJ. Changes in macrolide resistance among respiratory pathogens after decreased erythromycin consumption in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 296-8.
499. Cizman M, Pokorn M, Seme K, Orazem A, Paragi M. The relationship between trends in macrolide use and resistance to macrolides of common respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 475-7.
500. Baquero F. Evolving resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*: a link with long-acting macrolide consumption? *J Chemother* 1999; 11 (Suppl 1): 35-43.
501. Oliver MA, García-Delafuente C, Cano ME, Pérez-Hernández F, Martínez-Martínez L, Albertí S. Rapid decrease in the prevalence of macrolide-resistant group A streptococci due to the appearance of two epidemic clones in Cantabria (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 450-2.
502. Fujita K, Murono K, Yoshikawa M, Murai T. Decline of erythromycin resistance of group A streptococci in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 1075-8.
503. Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER. Erythromycin-resistant group A streptococci in schoolchildren in Pittsburgh. *N Engl J Med* 2002; 346: 1200-6.
504. Green M, Martin JM, Barbadora KA, Beall B, Wald ER. Reemergence of macrolide resistance in pharyngeal isolates of group A streptococci in southwestern Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 473-6.

- 505.** Giovanetti E, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1935-40.
- 506.** Gené A, Ardanuy C, Palacín E, García-García JJ. Aumento de la resistencia a macrólidos mediada por metilasas en *Streptococcus pyogenes* en un hospital pediátrico de Barcelona. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 26-8.
- 507.** Kataja J, Huovinen P, Muotiala A, Vuopio-Varkila J, Efstratiou A, Hallas G, *et al.* Clonal spread of group A streptococcus with the new type of erythromycin resistance. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *J Infect Dis* 1998; 177: 786-9.
- 508.** Jasir A, Schalen C. Survey of macrolide resistance phenotypes in Swedish clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 135-7.
- 509.** Yan JJ, Wu HM, Huang AH, Fu HM, Lee CT, Wu JJ. Prevalence of polyclonal *mefA*-containing isolates among erythromycin-resistant group A streptococci in Southern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2475-9.
- 510.** Zachariadou L, Papaparaskevas J, Paraskakis I, Efstratiou A, Pangalis A, Legakis NJ, *et al.* Predominance of two M-types among erythromycin-resistant group A Streptococci from Greek children. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 310-4.
- 511.** Reinert RR, Lutticken R, Sutcliffe JA, Tait-Kamradt A, Cil MY, Schorn HM, *et al.* Clonal relatedness of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1369-73.
- 512.** 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.
- 513.** Zampaloni C, Cappelletti P, Prenna M, Vitali LA, Ripa S. *emm* Gene distribution among erythromycin-resistant and -susceptible Italian isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1307-10.
- 514.** Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 513-8.
- 515.** Morosini MI, Cantón R, Loza E, del Campo R, Almaraz F, Baquero F. *Streptococcus pyogenes* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms in Spain: *in vitro* activities of telithromycin and cethromycin. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 50-5.
- 516.** de Melo MC, Sa Figueiredo AM, Ferreira-Carvalho BT. Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of *Streptococcus pyogenes* isolated in 1978-1997 in different Brazilian cities. *J Med Microbiol* 2003; 52: 251-8.
- 517.** Jasir A, Tanna A, Noorani A, Mirsalehian A, Efstratiou A, Schalen C. High rate of tetracycline resistance in *Streptococcus pyogenes* in Iran: an epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2103-7.

- 518.** Kataja J, Huovinen P, Skurnik M, Seppälä H. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. The Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 48-52.
- 519.** Giovanetti E, Brenciani A, Lupidi R, Roberts MC, Varaldo PE. Presence of the *tet(O)* gene in erythromycin- and tetracycline-resistant strains of *Streptococcus pyogenes* and linkage with either the *mef(A)* or the *erm(A)* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2844-9.
- 520.** Palmieri C, Vecchi M, Littauer P, Sundsfjord A, Varaldo PE, Facinelli B. Clonal spread of macrolide- and tetracycline-resistant [*erm(A) tet(O)*] *emm77 Streptococcus pyogenes* isolates in Italy and Norway. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4229-30.
- 521.** Orscheln RC, Johnson DR, Olson SM, Presti RM, Martin JM, Kaplan EL, *et al.* Intrinsic reduced susceptibility of serotype 6 *Streptococcus pyogenes* to fluoroquinolone antibiotics. *J Infect Dis* 2005; 191: 1272-9.
- 522.** Gendrel D, Chalumeau M, Moulin F, Raymond J. Fluoroquinolones in paediatrics: a risk for the patient or for the community? *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 537-46.
- 523.** Albertí S, Cortés G, García-Rey C, Rubio C, Baquero F, García-Rodríguez JA, *et al.* *Streptococcus pyogenes* pharyngeal isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Spain: mechanisms of resistance and clonal diversity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 418-20.
- 524.** Alonso R, Galimand M, Courvalin P. *parC* mutation conferring ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pyogenes* BM4513. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3686-7.
- 525.** Alonso R, Mateo E, Galimand M, Garaizar J, Courvalin P, Cisterna R. Clonal spread of pediatric isolates of ciprofloxacin-resistant, *emm* type 6 *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2492-3.
- 526.** Billal DS, Fedorko DP, Yan SS, Hotomi M, Fujihara K, Nelson N, *et al.* *In vitro* induction and selection of fluoroquinolone-resistant mutants of *Streptococcus pyogenes* strains with multiple *emm* types. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 28-34.
- 527.** Powis J, McGeer A, Duncan C, Goren R, de Azavedo JC, Bast DJ, *et al.* Prevalence and characterization of invasive isolates of *Streptococcus pyogenes* with reduced susceptibility to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2130-2.