



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Berardinelli, Elena María; Lopardo, Horacio Ángel

**Estreptococos del grupo *Streptococcus anginosus* Parte I.
Taxonomía, características microbiológicas e identificación**

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 54, núm. 4, 2020, Octubre-, pp. 421-436
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53564616007>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEH
redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Estreptococos del grupo *Streptococcus anginosus*

Parte I. Taxonomía, características microbiológicas e identificación

► Elena María Berardinelli^{1a,b*}, Horacio Ángel Lopardo^{2b,c}

¹ Bioquímica, Especialista en Microbiología Clínica.

² Doctor en Ciencias Bioquímicas.

^a Hospital General de Agudos Dr. Abel Zubizarreta, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^b Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^c Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

Los estreptococos del grupo *Streptococcus anginosus* (EGA), también llamados "Streptococcus milleri" fueron reconocidos como parte de los estreptococos del grupo viridans (EGV) desde principios del siglo XX. Sin embargo, su rol como patógenos humanos comenzó a destacarse recién en la década de 1970. Esta actualización consta de tres partes: en esta primera parte se tratarán los aspectos taxonómicos y microbiológicos así como los métodos de identificación de los EGA. El crecimiento de estas bacterias es relativamente lento, las colonias son pequeñas, incluso a las 48-72 horas de incubación y la mayoría de las cepas despiden un olor a caramelo característico cuando crecen en agar sangre. Su crecimiento es estimulado en una atmósfera con 5% de CO₂. Últimamente, con el reconocimiento de la asociación de los EGA con episodios indeseables en pacientes con fibrosis quística se han desarrollado medios selectivos para poner de manifiesto su presencia en las vías aéreas. Los métodos fenotípicos e incluso algunos genotípicos carecen de precisión para identificar las tres especies del grupo (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*) e incluso pueden fallar en su clasificación a nivel de grupo. Dentro de los métodos moleculares, *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) no puede ser tomado como referencia para llegar a subespecie, pero sí es muy eficiente en la identificación a nivel de especie. Para algunos autores la secuenciación del gen *sodA* podría ser una buena opción, pero el *gold standard* es el *multilocus sequence analysis* (MLSA).

Palabras clave: *Streptococcus anginosus*; *Streptococcus constellatus*; *Streptococcus intermedius*; Taxonomía; Cultivo; Identificación

Streptococcus anginosus group

Part I. Taxonomy, microbiological characteristics and identification

Abstract

Streptococci from the Streptococcus anginosus group (SAG), also called "Streptococcus milleri", have been recognized as belonging to the viridans group (VGS) since the beginning of the 20th century. Their role as human pathogens, however, only began to emerge in the 1970s. This review

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

consists of three parts: the first part will deal with the taxonomic and microbiological aspects and the identification methods of SAGs. The growth of these bacteria is relatively slow; the colonies are small even after 48-72 hours of incubation and most of the strains give off a characteristic caramel odor when they grow on blood agar. Their growth is stimulated in an atmosphere with 5% CO₂. Lately, with the recognition of the association of SAGs with undesirable episodes in patients with cystic fibrosis, selective media have been developed to reveal their presence in the airways. Phenotypic and even some genotypic methods lack precision in identifying the three species in the group (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus intermedius*) and may even fail to classify at the group level. Among the molecular methods, MALDI-TOF MS cannot be taken as a reference to arrive at subspecies, but it is very efficient to identify at the species level. For some authors, sequencing the *sodA* gene may be a good option, but the gold standard is multilocus sequence analysis (MLSA).

Keywords: *Streptococcus anginosus*; *Streptococcus constellatus*; *Streptococcus intermedius*; Taxonomy; Culture; Identification

Estreptococos do grupo *Streptococcus anginosus*

Parte I. Taxonomia, características microbiológicas e identificação

Resumo

Os estreptococos do grupo *Streptococcus anginosus* (EGA), também chamados de “*Streptococcus milleri*”, foram reconhecidos como pertencentes ao grupo viridans (EGV) desde o início do século XX. Seu papel como patógenos humanos, no entanto, só começou a surgir na década de 1970. Esta atualização consiste em três partes: nesta primeira parte, trataremos dos aspectos taxonômicos e microbiológicos e dos métodos de identificação dos EGAs. O crescimento dessas bactérias é relativamente lento, as colônias são pequenas mesmo após 48-72 horas de incubação e a maioria das cepas emitem um cheiro de caramelo característico quando crescem em ágar sangue. Seu crescimento é estimulado em uma atmosfera com 5% de CO₂. Ultimamente, com o reconhecimento da associação dos EGAs com episódios indesejáveis em pacientes com fibrose cística, foram desenvolvidos meios seletivos para revelar sua presença nas vias aéreas. Os métodos fenotípicos e mesmo alguns genotípicos carecem de precisão na identificação das três espécies do grupo (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* e *Streptococcus intermedius*) e podem até falhar em sua classificação em nível de grupo. Entre os métodos moleculares, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) não pode ser tomado como referência para chegar a subespécie, mas é muito eficiente na identificação em nível de espécie. Para alguns autores, o sequenciamento do gene *sodA* poderia ser uma boa opção, mas o padrão-ouro é a análise de sequência multilocus (MLSA).

Palavras-chave: *Streptococcus anginosus*; *Streptococcus constellatus*; *Streptococcus intermedius*; Taxonomia; Cultura; Identificação

Introducción

Los estreptococos del grupo *Streptococcus anginosus* (EGA), también llamados “*Streptococcus milleri*” fueron reconocidos como pertenecientes al grupo viridans (EGV) desde principios del siglo XX; no obstante, el conocimiento de su rol en patología infecciosa humana se comenzó a difundir al promediar la década de 1970 (1) (2) y se potenció a partir de los trabajos de Ruoff y otros en las décadas siguientes (3) (4) (5).

Recién con los estudios moleculares realizados gracias a las nuevas tecnologías pudieron dilucidarse algunos aspectos de la patogenia de estos microorganismos hasta ahora desconocidos.

El objetivo de esta primera parte de la revisión fue describir los aspectos taxonómicos y microbiológicos así como los métodos de identificación de los EGA. Para

ello se realizó una búsqueda selectiva de los trabajos más trascendentes en este tema a través de PubMed, SciELO y otros motores de búsqueda con las palabras *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*. También se recurrió a revisiones previamente publicadas (3) (4).

Historia

En 1906 Andrewes y Horder denominaron a una bacteria beta-hemolítica como *Streptococcus anginosus* (6). Más tarde, en 1935, Lancefield *et al.* describieron a los estreptococos del grupo F dentro de los estreptococos beta-hemolíticos que formaban parte de la microbiota orofaríngea e intestinal (7).

Los EGA recibieron distintas denominaciones a lo largo de los años: “*minute haemolytic streptococci*” cuando

se aislaban de fauces (8); “cepas de Smith y Sherman”, aisladas de materia fecal (9) y estreptococos no hemolíticos MG (10). En 1956 Güthof denominó *Streptococcus milleri* a una bacteria no hemolítica aislada de abscesos de la cavidad oral y que no presentaba ninguno de los antígenos de grupo descritos por Lancefield. El nombre se eligió para honrar al microbiólogo W. D. Miller que se había dedicado al estudio de la microbiota oral (3) (11). En 1942 se llamó *Streptococcus evolutus* a una bacteria que luego fue considerada como *S. intermedius*. Ya en la década de 1920 se utilizaban nombres como *S. intermedius* y *S. constellatus* para designar EGV aislados en anaerobiosis que se diferenciaban entre sí por la fermentación de la lactosa (4). Todo esto dio origen a la especie *Streptococcus* MG-*intermedius* descrita por Atterbery *et al.* en 1972 como parte de la microbiota fecal humana (12).

Ottens y Winkler observaron que la mayoría de los aislados, tanto beta como gamma-hemolíticos, pertenecían al grupo F de Lancefield aunque podían tener otros de los antígenos propios de los estreptococos beta-hemolíticos (13).

Sobre la base de un análisis de la pared celular, de taxonomía numérica y de transformación del ADN, Colman y Williams agruparon bajo el nombre de *S. milleri* a las bacterias alfa, beta y no hemolíticas que podían aglutinar con antisueros para los grupos A, C, F y G o que no presentaban ninguno de estos antígenos (3). Sin embargo, esa revisión no fue aceptada en los EE. UU., donde Facklam encontró una gran similitud entre *Streptococcus* MG, *S. intermedius*, *S. constellatus* y *S. anginosus* y dividió el grupo ‘*S. milleri*’ en fermentadores de lactosa no beta-hemolíticos (*S. MG-intermedius*) y no fermentadores de lactosa no beta-hemolíticos (*S. anginosus-constellatus*) (14).

Estudios posteriores de Facklam publicados en 1984 y basados en características fisiológicas, contribuyeron a una mejor descripción de los microorganismos englobados dentro del grupo ‘*S. milleri*’ (*S. intermedius*, *S. constellatus* y *S. anginosus*), pero crearon mayor confusión por la disociación entre la nomenclatura británica y la norteamericana (15).

Resultaba evidente que el grupo ‘*S. milleri*’ no era homogéneo; también las especies mostraban heterogeneidad en las pruebas fenotípicas, hemólisis, seroagrupación, contenido de ácidos grasos de cadena larga, composición antigénica, proteínas celulares y contenido de guanina + citosina del ADN.

Coykendall *et al.*, basados en estudios de ADN, propusieron incluir a estas especies en un solo grupo que se denominó *S. anginosus*, por ser el nombre más antiguo (16). Whiley *et al.* encontraron que *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius* pertenecían a grupos separados de homología de ADN. Examinaron cepas por hibridación ADN-ADN y características fenotípicas, y encontraron tres grupos genéticos que se correspondían

con las especies *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius* (17). Esta clasificación fue posteriormente validada por combinación de pruebas convencionales con espectrometría de masa (18). Fue así que quedó conformado el grupo *S. anginosus* (o grupo ‘*S. milleri*’, todavía utilizado como nombre de fantasía) con las tres especies *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius* (19).

En 2015 se publicaron las secuencias del genoma completo de una cepa de *S. anginosus* que tenía 1 924 513 pares de bases y contenía dos profagos y múltiples elementos genéticos móviles (20).

Entre 1994 y 2013 se describieron transposones (Tn3705 y MTnSag1 en *S. anginosus* y Tn916S en *S. intermedius*), una región genómica relacionada con fagos (21) (22) y en 2014 una isla cromosómica en *S. anginosus* y *S. intermedius* (23). Tabata *et al.* identificaron el plásmido pSAA0430-08 en una cepa de *S. anginosus* subsp. *anginosus*. Este plásmido no era portador de marcadores de resistencia ni de virulencia (24).

Olson *et al.* informaron que estos elementos móviles podían representar hasta un 10% del genoma de los EGA (25). Hacen falta más estudios para conocer la naturaleza y la función de estos elementos.

Los métodos de identificación fenotípicos fueron completados y en parte reemplazados por métodos moleculares. Hoy, con estas nuevas tecnologías se ha podido profundizar en el conocimiento de muchos aspectos de estos estreptococos.

Taxonomía actual

Los EGA pertenecen al conjunto heterogéneo conocido como “estreptococos del grupo viridans” (EGV). Éste es un grupo de microorganismos que se encuentran habitualmente colonizando la mucosa orofaríngea y los tractos gastrointestinal y genitourinario del hombre y de algunos animales. Normalmente viven en armonía con otros comensales en dichos sitios, desde donde pueden pasar a colonizar la piel en forma transitoria o a desarrollar infecciones en calidad de microorganismos oportunistas (26). El conocimiento de la secuencia completa de varios microorganismos del grupo y otros detalles de la composición molecular de los mismos ha determinado la subclasificación de las viejas especies de EGV, ahora transformadas en grupos de especies: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* (antes *Streptococcus sanguis* y por varios autores incluido en el grupo *S. mitis*), *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus bovis* y *S. anginosus*. El nombre ‘*S. milleri*’ no fue aprobado oficialmente y por esa razón no se debe escribir con letras cursivas (3). La especie *S. anginosus*, sumada a otras dos (*S. intermedius* y *S. constellatus*) comprenden el grupo *S. anginosus* (17) (27).

La especie *S. constellatus* fue desdoblada en dos subespecies: *S. constellatus* subsp. *constellatus* y *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, esta última asociada a faringitis aguda,

pero cuyo impacto en este contexto todavía es incierto (28). En 1998 se publicó un trabajo en el que se analizaron dos grupos de aislados que presentaban pruebas bioquímicas atípicas respecto de un esquema basado en los resultados de las pruebas de α -glucosidasa, hialuronidasa y sialidasa. Se diseñó un método de PCR basado en secuencias del gen *23S rRNA* con una posterior hibridación de los productos con sondas de ADN específicas de especie. Se analizaron 28 aislados: 21 dieron señal al hibridar con su correspondiente sonda. De los 7 que no lo hicieron, cuatro eran *refinosa* positivos, daban negativa la prueba de Voges-Proskauer y presentaban patrones bioquímicos discordantes con los de las tres especies de EGA. En el análisis filogenético se vio que estaban emparentados con *Streptococcus parasanguis* y que no pertenecían entonces al grupo *S. anginosus*. Los otros tres aislados eran del grupo C, presentaban hemólisis beta y daban positiva la prueba de hialuronidasa; filogenéticamente eran cercanas a *S. anginosus* (98,5-98,8% de similitud de secuencias) (29).

En 2013 se propusieron otras tres nuevas subespecies: *S. anginosus* subsp. *anginosus* y dos subespecies beta-hemolíticas que fueron aisladas de las fauces y aglutinaban con el antisuero C de Lancefield (*S. anginosus* subsp. *whileyi* y *S. constellatus* subsp. *viborgensis*) (30). No obstante, los aislados correspondientes son escasos como para poder establecer cuál es la importancia de su diferenciación.

Características culturales

Los EGA crecen en agar sangre y agar chocolate como colonias puntuales (no más de 0,5 mm de diámetro). El crecimiento de algunas cepas puede ser estimulado por una atmósfera enriquecida en CO₂ (31) (32). Las colonias pueden ser secas y adherentes en el 75% de las cepas pertenecientes a la especie *S. intermedius* y en el 26% de las de la especie *S. constellatus* (33).

Para Kitada *et al.* las colonias pueden ser lisas en más de la mitad de los casos o rugosas. Algunas cepas (13,2%) forman grumos en agar infusión cerebro-cora-zón (BHI) (34).

En el Japón se describió un 16,5% de EGA beta-hemolíticos, un 38,5% de alfa y un 45% de no hemolíticos (34). De las cepas de origen humano estudiadas por Ball y Parker en 1979, el 19% eran alfa-hemolíticas, el 25% beta y el 56% restante no presentaban hemólisis (35).

Arinto-García *et al.* publicaron más recientemente resultados similares: 24,6% eran alfa-hemolíticas, el 22,6 eran beta y el 52,8%, no hemolíticas. Todos los aislados pertenecientes a las subespecies *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, *S. anginosus* subsp. *whileyi* y *S. constellatus* subsp. *viborgensis* presentaron hemólisis beta, mientras que todos los de la especie *S. intermedius* eran alfa- o gamma-hemolíticos. *S. anginosus* subsp. *anginosus* y *S. constellatus* subsp. *constellatus* presentaron los tres tipos de hemólisis (36).

Los aislados beta-hemolíticos pertenecían en su mayoría a la especie *S. constellatus* (70,8% vs. 29,2% para los de la especie *S. anginosus*) y se caracterizaban porque el halo de hemólisis superaba en cinco o más veces su diámetro. En otro estudio se describieron cifras similares: *S. constellatus* 69%, *S. anginosus* 15% y *S. intermedius* 11% de hemólisis beta a las 48 h en agar sangre con base de agar Columbia (33).

Una característica de gran utilidad para la sospecha inicial es que, en alrededor de un 80% de los casos, las colonias de EGA despiden un olor a caramelo característico (37). Este olor se atribuye a la producción de diacetilo en concentraciones mayores de 22 mg/L, aunque hay cepas que producen diacetilo pero no despiden olor a caramelo (38). Esta característica solo puede servir de sospecha porque también hay otros EGV que pueden presentarla y no todos los EGA lo hacen.

Un fenómeno no estudiado posteriormente fue una especie de movilidad deslizante observada en cuatro aislados de *S. anginosus* provenientes de muestras del tracto genitourinario (39).

El medio ácido puede estimular el crecimiento de los EGA (31). *S. constellatus* y *S. anginosus* toleran mejor los medios ácidos que *S. intermedius*. No obstante, bajo condiciones de anaerobiosis, *S. anginosus* y *S. intermedius* son más tolerantes a pH<4,5 que *S. constellatus* (40).

Para aislar estas bacterias de muestras polimicrobianas se han confeccionado distintos medios de cultivo selectivos. En el medio semiselectivo NAS (ácido nalidíxico + sulfametazina) los EGA crecían de igual modo que en medios no selectivos, pero este medio también permitía el crecimiento de otras bacterias del grupo viridans. El medio NAS consiste en una base de *Sensitivity Test Agar* (40 g/L) (*STA Lab012; Lab M Ltd., Lancs, United Kingdom*), 30 µg/mL de ácido nalidíxico, 1000 µg/mL de sulfametazina y 6% de sangre equina desfibrinada. Este medio, incubado en condiciones de anaerobiosis, parecería tener un mejor rendimiento (41).

Otro medio selectivo para el aislamiento de EGA, el agar McKay, consiste de caldo nutritivo, glucosa, extracto de levadura, triptona, bicarbonato de sodio, *buffer* de fosfatos, cloruro de sodio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, Tween 80, cristal violeta, vitamina K, púrpura de bromocresol, hemina y agar. Una vez esterilizado se agrega L-arginina y una solución esterilizada por filtración de sulfadiazina, sulfato de colistina y ácido oxolínico (42). Se incluye púrpura de bromocresol como un indicador de pH colorimétrico para identificar los aislamientos que producen un ambiente ácido en este medio, una característica distintiva adicional de las colonias de los EGA. Este medio tiene como desventaja que en él pueden crecer también al menos 18 especies diferentes de otros grupos de EGV, dos tercios de las cuales también tienen la capacidad de dar co-

lonias amarillas. Además, no inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ni de otros miembros de la microbiota orofaríngea.

El medio NAS resultó ser muy superior en la recuperación de EGA de 123 muestras de materia fecal y de esputo. No obstante, la selectividad fue muy baja ya que permitió el crecimiento de muchas otras especies tanto anaeróbicas facultativas como estrictas. Dentro de las primeras se pueden destacar *Burkholderia cenocepacia*, *Candida* spp., *S. aureus*, otros estafilococos, *Rothia mucilaginosa*, *Lactobacillus* spp., *Gemella morbillorum*, *Granulicatella* spp., *Abiotrophia defectiva*, *Neisseria* spp., *Facklamia hominis* y otros EGV (43).

El medio Mitis-Salivarius es un medio selectivo y diferencial utilizado desde hace décadas en el aislamiento de estreptococos del grupo viridans. Suplementado con 0,001% de telurito de potasio y optimizado con el agregado de sulfametazina (1 g/L) y aztreonam (0,2 g/L) (MSSAA) permitió el desarrollo de EGA procedentes de saliva e impidió el crecimiento de otras bacterias, excepto enterococos (44). Otro medio selectivo es el CROSGANG-ATB, que es un medio cromogénico para *Streptococcus agalactiae* (CHROMagar™ StrepB) adicionado de 5% de plasma inactivado a 56 °C por 15 min, sulfadiazina (500 mg/L), sulfato de colistina (10 mg/L) y ácido nalidíxico (5 mg/L) (45).

Vandeplassche *et al.* desarrollaron un medio (Agar Luria Bertani con 0,31 µg/mL de triclosan e incubado en anaerobiosis) considerado selectivo por inhibir a *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *R. mucilaginosa* y *Gemella haemolysans* (46). Los autores fallaron en no ensayarlo frente a otras bacterias colonizantes habituales de la cavidad oral, tal como fue realizado por Berardinelli (45).

Estructura

El ácido lipoteicoico, que contiene poliglicerolfosfato, no está presente en todas las bacterias gram positivas y, de hecho, hay EGV que no lo poseen, como *S. mitis* y *Streptococcus oralis*. Todos los EGA analizados lo contenían, según informó un estudio realizado con extractos fenólicos de estreptococos liofilizados mediante un in-

munoensayo en el que se usó un anticuerpo monoclonal específico para el poliglicerolfosfato (47).

Identificación

La clasificación inicial de los estreptococos, basada en el tipo de hemólisis, si bien tuvo un sentido práctico, no refleja las relaciones genéticas de estas bacterias, dado que cepas de una misma especie pueden presentar distintos tipos de hemólisis. También puede haber ambigüedades en la diferenciación según el grupo de Lancefield (ver más adelante). Por otra parte, muchos estudios previos estuvieron basados en descripciones poco precisas (englobaban todo en la denominación EGV) o erróneas (utilizaban métodos fenotípicos clásicos, miniaturizados, automatizados y hasta moleculares imprecisos). Esto ha complicado la interpretación de las tendencias de las especies de los EGA a producir determinados tipos de infecciones o a resistir la acción de ciertos antibióticos.

IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS FENOTÍPICOS

Métodos convencionales

Los métodos de identificación fenotípicos de los estreptococos del grupo viridans habitualmente producen resultados inciertos o erróneos cuando se los compara con métodos de referencia. No obstante, en la mayoría de los casos puede sospecharse su identidad a nivel de grupo por el olor a caramelo típico de sus colonias, la producción de acetoina en la reacción de Voges-Proskauer y algunas otras reacciones positivas o negativas (Tabla I) (Tabla II). Los EGA que dan hemólisis beta se pueden diferenciar inicialmente de otros estreptococos beta-hemolíticos por las pruebas que se muestran en la Tabla I y de otros alfa o gamma-hemolíticos, en forma preliminar, por las pruebas indicadas en la Tabla II.

Ruoff y Ferraro, a mediados de la década del 80, lograron diferenciar presuntivamente a los estreptococos del grupo *S. anginosus* del resto de los EGV en 5 horas con pruebas miniaturizadas de producción de acetoina, hidrólisis de arginina y fermentación del sorbitol (50).

Tabla I. Diferenciación de estreptococos beta-hemolíticos del grupo viridans (grupo *S. anginosus*) respecto de *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* y *S. agalactiae* (48)

Especie o grupo de especies	Grupo	Colonia	BAC ^a	PYR ^b	β-GUR ^c	VP ^d	ESC ^e
<i>S. pyogenes</i>	A	grande	S	+	-	-	V ^f
<i>S. agalactiae</i>	B	grande	R	-	-	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	C, G	grande	R ^g	-	+	-	+
Grupo <i>S. anginosus</i>	A,C,F,G, NT ^g	pequeña ^h	R ^g	-	-	+	V

^a BAC: sensibilidad a 0,04 UI de bacitracina. ^b PYR: pirrolidoniil arilamidasa. ^c β-GUR: beta-glucuronidasa. ^d VP: Voges-Proskauer. ^e ESC: desarrollo de colonias negras en agar esculina. ^f V: variable. ^g NT: no agrupable por método serológico. ^h Las colonias despiden un olor característico a caramelo.

Tabla II. Identificación a nivel de grupos de especies de estreptococos del grupo viridans por pruebas bioquímicas convencionales (49)

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

+ Más del 90% de los aislados dan la prueba positiva. - Más del 90% de los aislados dan la prueba negativa. (+) o (-) Una minoría de los aislados dan la prueba positiva o negativa. ^a VP: Voges-Proskauer. ^b ARG: arginina dihidrolasa. ^c ESC: esculina. ^d MAN: manitol. ^e SBL: sorbitol. ^f *S. constellatus* subsp. *constellatus* da la prueba de esculina en forma variable. ^g Las especies *S. cristatus*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis* y *S. sanguinis* dan positiva la prueba de arginina. ^h *S. sanguinis* biotipos 1 y 2 y *S. gordonii* dan positiva la prueba de esculina, *S. parasanguinis* y *S. oralis* la dan en forma variable y *S. sanguinis* biotipo 3, *S. crista*, *S. mitis*, *S. peroris* y *S. infantis* dan la prueba negativa. ⁱ *S. sanguinis* biotipos 1 y 2 dan variable la prueba de sorbitol. ^j *S. mutans* da la prueba de esculina en forma variable. ^k *S. sobrinus* da la prueba de sorbitol en forma variable. ^l *S. salivarius* da la prueba de urea en forma variable. ^m *S. vestibularis* da negativa la prueba de Voges-Proskauer. ⁿ *S. vestibularis* da la prueba de esculina en forma variable. ^o *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* da positiva la prueba de manitol. El resto de las especies la da negativa.

La sialidasa es producida por todas las cepas de *S. oralis*, *S. intermedius* y por la mayoría de las cepas de *S. mitis*. Por el contrario, los otros EGV, incluso *S. anginosus* y *S. constellatus*, son uniformemente negativos (51).

Whiley *et al.* utilizaron esta prueba en un esquema de identificación de 3 horas basado también en la prueba de hialuronidasa y en el uso de 4-metilumbeliferil derivados fluorogénicos de α -glucosidasa, β -galactosidasa, β -D-fucosidasa, β -N-acetilgalactosaminidasa y β -N-acetilglucosaminidasa (Tabla III) (52).

En 1999 estos mismos autores definieron dos grupos dentro de los EGA beta-hemolíticos del grupo C, sobre la base de la homología de su ADN. El grupo 1 comprendía a seis cepas con un 86-100% de homología entre sí. Cinco de ellas provenían de exudados faríngeos y por eso al grupo se lo denominó *S. constellatus* subsp. *pharyngis*. Estas cepas tenían un 61-77% de relación con cepas de referencia de *S. constellatus* (*S. constellatus* subsp. *constellatus*). El grupo 2 (81-100% de relación intragrupo) tenía un 60-72% de homología en su ADN con cepas de referencia de *S. anginosus*, especie de la que se podía diferenciar por dar positiva la prueba de hialuronidasa y β -D-galactosidasa. Estos autores encontraron que la subespecie *S. constellatus*

subsp. *pharyngis* daba positivas la pruebas de β -D-fucosidasa y β -N-acetilgalactosaminidasa, pero no la de sialidasa, con lo que podía diferenciarse de *S. intermedius*. Confirmaron también que las pruebas de hialuronidasa, β -D-fucosidasa, β -N-acetilglucosaminidasa β -N-acetilgalactosaminidasa y sialidasa eran consistentemente negativas para *S. anginosus* (28).

Grinwis *et al.* propusieron el uso de tres pruebas fenotípicas para definir especies: hialuronidasa, condroitín sulfatasa y grupo de Lancefield (53).

En 2013 se describieron las características fenotípicas de las subespecies de *S. anginosus* (54). Allí se confeccionó una tabla para su identificación presuntiva (Tabla IV).

No obstante, actualmente se considera que los métodos moleculares son los de elección para la identificación de estas especies y subespecies (55).

Métodos comerciales miniaturizados y automatizados

Los métodos miniaturizados y automatizados en general producen resultados poco confiables en la identificación de los EGA, incluso a nivel de grupo. Chang *et al.* informaron más de 20% de resultados erróneos tan-

Tabla III. Porcentaje de positividad de pruebas fenotípicas para diferenciar las tres especies del grupo. (Modificado de 52)

Prueba	<i>S. constellatus</i> (n=49)	<i>S. intermedius</i> (n=61)	<i>S. anginosus</i> (n=47)
β -D-fucosidasa	0	100	0
β -N-acetilglucosaminidasa	0	100	0
β -N-acetilgalactosaminidasa	0	100	0
Sialidasa	0	100	0
α -glucosidasa	90	100	19
Hialuronidasa	88	98	4

Tabla IV. Pruebas fenotípicas que caracterizan a las especies y subespecies de estreptococos del grupo *S. anginosus*

Prueba	<i>S. INT</i> ^a	<i>SCC</i> ^b	<i>SCP</i> ^c	<i>SCV</i> ^d	<i>SAA</i> ^e	<i>SAW</i> ^f
Hialuronidasa	+	+	+	+	-	+
α-D-glucuronidasa	+	+	+	+	v ^g	-
β-D-glucosidasa	+	-	+	+	+	+
Neuraminidasa	+	-	-	-	-	-
β-galactosidasa (ONPG)	+	v	+	-	-	-
N-acetil-β-galactosaminidasa	+	-	+	-	-	-

^a *S. intermedius*; ^b *S. constellatus* subsp. *constellatus*; ^c *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, todos beta-hemolíticos del grupo C; ^d *S. constellatus* subsp. *viborgensis*, todos beta-hemolíticos del grupo C; ^e *Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus*; ^f *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi*, todos beta-hemolíticos del grupo C; ^g v: variable. Se sombreadon las pruebas que mejor definen las subespecies.

to para Rapid ID32 (22,2 %), como para Api 20 Strep (59,3%) y Vitek 2 (43%) (56).

Los resultados obtenidos por Rapid ID32 Strep fueron inaceptables cuando se los comparó con *multilocus sequencing analysis* (MLSA) (36): 10,4% de errores de género, 3,8% de mala identificación a nivel de grupo de especies dentro del género *Streptococcus* y 17,9% de errores a nivel de especie. Estos resultados no fueron sorprendentes dado que estas bacterias presentan gran variabilidad intraespecie en las pruebas bioquímicas, debida a su frecuente intercambio genético. Incluso la desactualización de la base de datos, tanto de los métodos miniaturizados como de los automatizados, puede aumentar los resultados erróneos si se compara el bionúmero generado con las pruebas básicas de urea, arginina, esculina, sorbitol, manitol y Voges-Proskauer o pruebas individuales del panel, para definir el grupo EGA (55).

Métodos como Fluo-Card Milleri o Wee-tabs (*Key Scientific Products*) pueden dar resultados incorrectos que analizados cuidadosamente pueden aproximarse a la identificación correcta (55). Por ejemplo, con Fluo-Card Milleri solo el 45% de las cepas de *S. anginosus* pudieron ser identificadas como tales porque el resto daba una reacción positiva con la β-fucosidasa. No obstante, como todas las cepas de *S. anginosus* son β-glucosidasa negativas no se confundirían con *S. intermedius*. Por otra parte, la mala identificación de *S. constellatus* se debió a que el 24% daba positiva la prueba de β-glucosidasa. De manera que si se corrige la tabla propuesta por el fabricante según las pautas recomendadas por Suommanen

et al. (Tabla V) podría utilizarse este método para una identificación presuntiva de las especies de EGA.

El método Fluo-Card Milleri fue estudiado también por Flynn y Ruoff en 1995. Lo compararon con su método convencional de reacciones con metilumbeliferil derivados de varias sustancias. Su correlación fue del 98% para *S. anginosus*, 97% para *S. constellatus* y 88% para *S. intermedius*. Sin embargo, no fue comparado con ningún método de referencia (57). En otro estudio, el Fluo-Card y el Api20 Strep no dieron buenos resultados al ser comparados con métodos moleculares: un 23% de los aislados de *S. constellatus* hubieran sido identificados como *S. intermedius* o *S. anginosus* por los métodos fenotípicos. Además, el 8% de las cepas no reaccionaron en la plataforma Fluo-Card (33).

Para llegar a identificar especies dentro del grupo, Summanen *et al.* evaluaron varios métodos fenotípicos y los contrastaron contra dos métodos moleculares para llegar a identificar especies dentro del grupo (55).

Las tres especies no pudieron separarse con el equipo API 20 Strep. No obstante, *S. intermedius* podría diferenciarse de las otras dos especies por las reacciones beta-galactosidasa (ONPG) y beta-N-acetil-glucosaminidasa. La reacción de beta-glucosidasa del equipo Rapid ID 32 Strep fue útil para separar las cepas de *S. anginosus* de *S. constellatus*. De esta manera, si se seleccionan correctamente las pruebas individuales clave de los equipos, se podría tener una mejor identificación de las especies (55).

En 1998 se anunció que un método comercial miniaturizado [*BBL Crystal Gram-Positive (GP) Identification*

Tabla V. Pruebas utilizadas en el método comercial Fluo-Card Milleri para separar las especies de EGA y su modificación según criterios tomados de Summanen PH *et al.* (55)

Especie	β-fucosidasa	β-glucosidasa	α-glucosidasa
<i>S. anginosus</i>	-	+	+/-
	+	-	+/-
<i>S. constellatus</i>	-	-/+	+
<i>S. intermedius</i>	+	+	+

System; Becton Dickinson Microbiology Systems, Germany] arrojaba un 90% de resultados correctos al ser comparado con Api 20 Strep y pruebas convencionales para EGV, cuando ya existían métodos moleculares de mejor desempeño para ser utilizados como referencia. Solo 5 aislados de EGA fueron incluidos en ese estudio (58).

Brigante *et al.* evaluaron el sistema Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, EE.UU.) para la identificación de estreptococos y enterococos. Ellos afirmaron que los mejores resultados fueron obtenidos con los EGA. Desafortunadamente utilizaron solo 8 aislados de este grupo (7 *S. anginosus*, 1 *S. intermedius* y ninguno perteneciente a la especie *S. constellatus*). Además, supusieron que las identificaciones coincidentes por Phoenix y por dos sistemas Api [Api 20 Strep y Rapid ID32 Strep, (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)] eran correctas y solo analizaron por métodos moleculares a las discordantes (59).

Un trabajo contrastado con un análisis filogenético demostró la poca confiabilidad de los métodos fenotípicos para la identificación de los EGV. Los equipos miniaturizados Rapid ID32 Strep (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) y STREPTOGRAM (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) tuvieron mejor desempeño para la identificación de los EGA que para especies de otros grupos. Aún así, sobre 28 aislados de EGA que se probaron, hubo una cepa mal identificada por ambos y dos no identificadas por el segundo (60).

Los equipos Vitek 2 y Rapid ID32 Strep (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) mostraron una concordancia con el método de pirosecuenciación completa del gen *mpB* del 75% y 77%, respectivamente. Los 7 EGA incluidos fueron correctamente identificados a nivel de grupo (61).

Un trabajo español evaluó un método genotípico (hibridación de secuencias parciales del gen *16S rRNA* posterior a una amplificación por PCR) con lo que denominaron un método de referencia basado en pruebas diferenciales con sustratos fluorogénicos (concordancia del 80%) (Tabla VI). Los métodos comerciales también evaluados mostraron una moderada concordancia con el método molecular (76%) aunque resultaron inferiores en la identificación de *S. intermedius* (57,5%) (62).

Los datos obtenidos de los estudios de ADN y geles SDS-PAGE por Whiley *et al.* demostraron que los EGA podrían dividirse en tres grupos distintos estrechamen-

te relacionados. La inclusión de cepas de *S. constellatus*, *S. intermedius* y *S. anginosus* en grupos separados se correlacionó con los resultados de Kilpper-Balz *et al.* (63).

Un cuarto grupo, más distantesmente relacionado, estuvo integrado por variantes de *S. intermedius*.

De las pruebas utilizadas en dicho estudio, las más útiles parecieron ser la producción de ácido de amíglina y lactosa, la producción de peróxido de hidrógeno y la hialuronidasa. Sin embargo, la ubicación en los distintos grupos de cepas con características bioquímicas homólogas o heterólogas resultó equívoca (64).

Serotipos y serogrupos

La mayor parte de las cepas de este grupo de especies aglutina con el antisuero F de Lancefield y todos los estreptococos del grupo F pertenecen al grupo *S. anginosus* (33) (65).

Algunas cepas pueden aglutinar en forma cruzada con antisueros A, C, G o directamente no aglutinan con ninguno (66). Lawrence *et al.* mostraron que un alto porcentaje de los estreptococos no seroagrupables y más de la mitad de los estreptococos beta-hemolíticos del grupo C aislados en California a mediados de la década de 1980 pertenecían al grupo *S. anginosus* (56,2%). Por otra parte, los EGA aglutinaban menos frecuentemente con los antisueros de los grupos A o G (13% y 11,9% respectivamente). Si se consideran los 91 EGA aislados, 3 pertenecían al grupo A, 27 al grupo C, 41 al F, 5 al G y 15 no pudieron ser seroagrupados (65). Otros estudios incluso informaron cifras mayores de 70% de participación de EGA dentro de los estreptococos del grupo C (67) (68). Esto llevó a Vance a alertar a los microbiólogos para no utilizar la agrupación según Lancefield como único medio para identificar estreptococos beta-hemolíticos (69).

Clarridge *et al.* seroagruparon EGA y encontraron que el 25% de los aislados de *S. intermedius* pertenecían al grupo F y el 75% restante no eran agrupables; el 36% de *S. constellatus* pertenecían al grupo F, el 14% al grupo C y el 50% restante no eran agrupables. Una de las cepas aglutinó tanto con el antisuero C como con el A. El 44% de los aislados de *S. anginosus* eran del grupo F, 26% del grupo C, 6% del grupo G y 24% no eran agrupables (33). La presencia de EGA del grupo A puede

Tabla VI. Resultados de las pruebas diferenciales para 180 EGA con sustratos fluorogénicos según el esquema de Whiley *et al.* (52)

Especie (número)	α -ANA ^a	β -NAG ^b	β -NAGA ^c	β -FUC ^d	α -GLU ^e	β -GLU ^f	β -GAL ^g
<i>S. anginosus</i> (77)	0	13,1	0	0	1,3	100	11,5
<i>S. constellatus</i> (55)	1,8	3,6	0	0	100	0	25,4
<i>S. intermedius</i> (29)	93,1	100	100	89,9	96,6	24,1	100
No identificados (19)	0	0	0	0	0	0	26,3

^a α -acetil neuraminidasa (sialidasa), ^b N-acetil- β -D-glucosaminidasa, ^c N-acetil- β -D-galactosaminidasa, ^d β -D-fucosidasa, ^e α -D-glucosidasa, ^f β -D-glucosidasa, ^g β -D-galactosidasa.

llevar a confusiones en la falsa identificación de estas cepas como *S. pyogenes*, si se aíslan de las fauces (70).

En Portugal se vio que entre 212 aislados 11 pertenecían al grupo A, 32 al grupo C, 73 al grupo F, 16 al grupo G y 80 no eran seroagrupables. Además, los autores notaron que todos los de grupo A eran *S. anginosus* subsp. *anginosus*, los de grupo C eran *S. anginosus* o *S. constellatus*, los de grupo F, *S. anginosus* subsp. *anginosus* y *S. constellatus* subsp. *constellatus*, los de grupo G, *S. anginosus* subsp. *anginosus* y los no agrupables eran *S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. constellatus* subsp. *constellatus* y *S. intermedius*. La mayoría de los integrantes de la especie *S. intermedius* carecen de antígenos de grupo (no seroagrupables). En este estudio todos (n=7) fueron no agrupables (36).

En un estudio de 29 episodios de infección por EGA en Inglaterra, se vio que el 64% eran *S. anginosus*, el 27% *S. constellatus* y el 9% *S. intermedius*. Casi la mitad no eran agrupables (45%) y la mayor parte de la otra mitad aglutinaron con el antisuero F (41%) (71). En Chile se observó que la mayoría de los EGA pertenecían al grupo F (59,4%) y al grupo C (26,7%) con unos pocos no agrupables (10,9%) o del grupo G (3%). El 71,3% eran beta-hemolíticos y, con las limitaciones que implica el uso de pruebas fenotípicas, el 58% pertenecerían a la especie *S. constellatus*, el 37% a *S. anginosus* y el 5% a *S. intermedius* (72).

La distribución de los serogrupos presenta bastante diversidad geográfica. En la India, en un estudio de estreptococos de los grupos G y C a partir de infecciones severas, se observó que de los 59 aislados de EGA ninguno aglutinó con el antisuero C (todos eran del grupo G) (73).

Los EGA han mostrado una amplia variación serológica sobre la base de hidratos de carbono de la superficie celular diferentes de los antígenos de Lancefield. En principio, Ottens *et al.* propusieron una clasificación en cinco serotipos (I a V) que incluían tanto a cepas agrupables como no agrupables por el método de Lancefield (13). Osano *et al.* describieron a su vez cinco serotipos dentro de la especie *S. intermedius*, que fueron también denominados I a V (74). Otros investigadores demostraron la presencia de 11 antígenos en los EGA (a – k) (75) (76) (77). Varios estudios caracterizaron inmunológicamente a estos serotipos (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86).

En un estudio realizado en el Japón se efectuó la seroagrupación según Lancefield y también una serotipificación en base a otros hidratos de carbono de la pared. Se vio que de 91 EGA, 47 pertenecían a alguno de los grupos de Lancefield (A=1, C=8, F=33, G=5) y 42 pudieron ser serotipificados (a=3, b=20, c=6, d=1, e= 4, f= 4, g=2, k=2). alguna correlación se observó entre las bacterias de los grupos A, C y F y los serotipos a, c y f respectivamente (75) (77).

Inoue *et al.* mostraron que solo dos de los 21 serotipos (f y Ottens-III) fueron idénticos. Los otros serotipos fueron independientes. De 248 cepas analizadas, 197 fueron serotipificables y 23 cepas llevaban dos antígenos de tipo. En general, los antígenos Ottens I, II, III (serotipo f), IV y

Osano IV, frecuentemente junto con el grupo F de Lancefield, se encontraron en *S. anginosus* y *S. constellatus*. Además, los serotipos a, c, d, e y k se distribuyeron en *S. anginosus* junto con los antígenos de los grupos A, C o G, el antígeno b en *S. constellatus* y los antígenos g, h, i, j y Osano I, II y III en *S. intermedius*. Veinticinco de las cepas no tipificables podían agruparse con el método de Lancefield (principalmente eran del grupo F) (87).

En un trabajo de caracterización de EGA, en el que se definieron las especies por hibridación ADN-ADN, se informó que las bacterias de la especie *S. anginosus* pertenecían a los siguientes serogrupos/serotipos: A/a, no agrupable (NA)/b, C/c, NA/d, NA/e, F/f o G/k; las de la especie *S. constellatus* pertenecían a F/no tipificable (NT) y las de *S. intermedius* a NA/g, NA/h, NA/i, NA/j, o NA/NT (88). Por el contrario, en la India las cepas del grupo F eran más frecuentemente de la especie *S. anginosus* (67%), que de *S. intermedius* (25%) o *S. constellatus* (7%) (89).

IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES

Los primeros métodos basados en la composición molecular de las estructuras bacterianas fueron el estudio de patrones de polipéptidos derivados de células enteras en SDS-PAGE (64) y la determinación cuali y cuantitativa de los ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa (90).

Los EGA formaron un grupo muy homogéneo según la composición de ácidos grasos y se diferenciaron fácilmente de otros grupos. Sin embargo, dentro del grupo, Labbé *et al.* no pudieron diferenciar *S. constellatus*, *S. anginosus* y *S. intermedius* solo por la composición de ácidos grasos (91).

Diversas alternativas han sido empleadas para identificar los EGA a nivel de grupo y/o especie por métodos moleculares: primeramente la hibridación de ADN (64) (92) (93). La secuencia de la región espaciadora intergénica 16S-23S (94) (95) también fue empleada en distintas formas para identificar a los EGA.

El polimorfismo en la longitud del espaciador 16S-23S determinado por PCR proporcionó un complemento rápido y útil para la identificación de cepas de *S. anginosus* y *S. constellatus*, que no se podían diferenciar fácilmente por pruebas fenotípicas (96).

Este método puede ser de utilidad a pesar de variaciones intraespecie reconocidas por Whiley *et al.* para *S. anginosus* (tamaños de 350, 380, 450 y 600 bp en diferentes cepas) que podrían corresponder al menos a las dos subespecies posteriormente descritas (*S. anginosus* subsp. *anginosus* y *S. anginosus* subsp. *wileyi*) (97).

También se ha descrito el análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) de los genes del ARN ribosomal 16S para identificar EGV de clasificación incierta (98).

Otros métodos de identificación a nivel de especies son el uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida al gen de la D-ala-D-ala ligasa (*ddl*) (99), la secuenciación del gen del factor Tu de elongación (*tuf*) (100) y la secuenciación del gen de la proteína del shock térmico (*groESL*) (101).

Un método de PCR dirigido al gen *groESL* resultó útil para diferenciar EGA del grupo C de los pertenecientes a la subespecie *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Incluso, la amplificación por PCR acoplada a una técnica de RFLP permitió la diferenciación entre *S. anginosus* y *S. constellatus* (102).

El uso de PCR dirigida al gen *ily* de *S. intermedius* permite lograr una buena identificación de esa especie, que por otros métodos suele confundirse con *S. constellatus* subsp. *pharyngis* (103).

Otros métodos de identificación son: secuenciación del gen de la superóxido dismutasa (*sodA*) (104), secuenciación del gen de la proteína de recombinación y reparación (*recN*) (105), análisis por PCR de la longitud de las secuencias del espacio intergénico de ADN de transferencia (106) y secuenciación del gen *rpoB* (107).

Se desarrolló también un método de identificación para los EGA a nivel de grupo por PCR utilizando un par de cebadores basado en las secuencias específicas del grupo del gen de la proteína ligadora de penicilina 2B (*pbp2b*). La identificación adicional a nivel de especies o subespecies fue posible mediante una PCR múltiple con cebadores para el gen de 16S rRNA de *S. anginosus*, los genes de hialuronato liasa de *S. intermedius* y *S. constellatus* subsp. *constellatus* y el gen de la intermedilina (*ily*) de *S. intermedius* (108).

Aunque el gen 16S rRNA ha sido utilizado por varios investigadores para la identificación de estreptococos, el intercambio genético entre especies ha limitado su aplicación (33). Se encontraron estructuras en mosaico que sugieren la probabilidad de transferencia horizontal de segmentos que componen el gen 16S rRNA entre las distintas especies del grupo *S. anginosus* (109).

Lal *et al.* exploraron características internas del gen 16S rRNA para investigar la posibilidad de su uso en la identificación preliminar de especies de estreptococos, de modo de suplementar otros métodos preexistentes. El uso de enzimas de restricción resultó de ayuda para generar marcadores que podían distinguir especies cercanas genéticamente, como son las que integran el grupo *S. anginosus* (110).

Olson *et al.* desarrollaron un método de PCR en tiempo real para identificar las especies que conforman el grupo *S. anginosus*, tanto a partir de cultivo puro como de muestras de esputo de pacientes fibroquísticos (111).

Otras alternativas que también mostraron algunas fallas en la identificación de EGV fueron las que se basaron en el uso de otros genes como *sodA*, *groESL*, *tuf*, *rpoB* o genes de la D-ala:D-ala ligasa en métodos de PCR simple (55) (99) (104) (112).

El método de identificación de referencia parecería ser el MLSA (113). En un estudio de 148 cepas de EGA se vio que utilizando la secuenciación de varios de estos genes (*ddl*, *gdh*, *rpoB* y *sodA*) y haciendo un análisis filogenético [*multilocus sequence analysis* (MLSA)], ocurrían desviaciones en los tres primeros genes, derivadas probablemente por recombinaciones con otras especies. En base a eso, Hoshino *et al.* propusieron la secuenciación del gen *sodA* como alternativa más práctica de identificación (60).

Se evaluó la tecnología de pirosecuenciación para la identificación de especies dentro del género *Streptococcus*. Se secuenciaron en dos reacciones las regiones variables en el gen *rnpB*, que codifica la subunidad de ARN de la endonucleasa P. En 43 especies no pudieron identificarse correctamente las cepas de los pares de especies *S. anginosus*/*S. constellatus* y *S. infantis*/*S. peroris*. Un total de 113 aislados de hemocultivo fueron identificados por análisis de pirosecuenciación de secuencias parciales de *rnpB*. Todos menos ocho pudieron ser inequívocamente asignados a una especie específica cuando se compararon los primeros 30 nucleótidos de las dos regiones de *rnpB* con una base de datos que comprendía 107 cepas de estreptococos (61).

Un método de PCR múltiple dirigida, entre otros, a los genes *ily* y *moaC* para detectar distintas especies de estreptococos, podría servir para identificar los EGA a nivel de grupo, ya que no discrimina entre *S. anginosus* y *S. constellatus*. Lamentablemente, los autores no probaron suficientes aislados y solo lo contrastaron contra Api 20 Strep (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) y contra pruebas convencionales (114).

Una técnica basada en la amplificación del gen *pbp2b* seguida de una PCR múltiple (109) fue validada para la identificación de EGA en comparación con MLSA, un método considerado de referencia. Solo falló en la diferenciación de *S. constellatus* subsp. *pharyngis* y *S. constellatus* subsp. *viborgensis* (36).

Un método de PCR en tiempo real aplicado directamente en muestras de abscesos o biopsias para el caso de pie diabético dio resultados promisorios respecto de métodos convencionales de cultivo. Detectó EGA en 13 casos en los que el cultivo resultó negativo (115).

Se describió un ensayo de PCR en tiempo real para la identificación rápida y precisa de los miembros del grupo *S. anginosus*. Según el análisis de la curva de *melting*, los EGA podrían subdividirse en dos subgrupos, cada uno asociado con diferentes ribotipos clínicamente relevantes de *S. anginosus* (116).

El método de hibridación con un arreglo (*array*) de oligonucleótidos consiste en una amplificación por PCR de las regiones ITS utilizando un par de cebadores (*primers*) universales, seguida de una hibridación de los productos de la PCR marcados con digoxigenina con un panel de oligonucleótidos específicos de especie inmovilizados en una membrana de *nylon*. Con

este método se ensayaron 120 aislados de 15 especies de EGV (entre ellas, las tres del grupo *S. anginosus*) y 91 cepas de otras bacterias y se demostró una especificidad y sensibilidad del 100%. Se requerirá el estudio de un mayor número de cepas para validar este método (117).

Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test (BC-GP) (Nanosphere, Northbrook, IL, Estados Unidos) es un método de *microarray assay* que detecta bacterias gram positivas relevantes directamente desde las botellas de hemocultivos en aproximadamente dos horas y media. La experiencia con EGA, que están dentro de los microorganismos detectables con este método, sin embargo, es escasa (118) (119).

Espectrometría de masa

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) parece identificar bien los EGA a nivel de género (100%) y especie (93,1%) previa extracción, no así cuando se emplea en forma directa. No obstante 8 de los 9 aislados de *S. intermedius* fueron incorrectamente identificados (120). Las tres especies que conforman el grupo presentan una similitud del 60% en los picos del espectro (121).

MALDI-TOF MS tuvo una excelente *performance* en comparación con MLSA: 3,3% de imposibilidad de dar resultados, 0,5% de errores de género (un caso de identificación incorrecta de *S. anginosus* como *Clostridium halophilum*), sin errores a nivel de grupo y 3,8% de errores a nivel de especie (principalmente, *S. anginosus* subsp. *anginosus* fueron mal identificados como *S. constellatus* subsp. *pharyngis*). Sin embargo, los errores en la identificación de subespecies fueron del 40,1%. En este caso fue notorio que todos los aislados pertenecientes a la subespecie *S. constellatus* subsp. *constellatus* hayan sido erróneamente identificados como *S. constellatus* subsp. *pharyngis*. Para Arinto-García *et al.* los datos obtenidos con un *score* entre 1700 y 1999, normalmente considerados como de baja discriminación, en este caso, para EGA, resultaron confiables (36).

Friedrichs *et al.* lograron identificar correctamente 23 EGA a nivel de especie (19 *S. anginosus*, 2 *S. constellatus* y 2 *S. intermedius*) por MALDI-TOF MS. Se comparó con la identificación realizada en forma coincidente por tres métodos diferentes (Api 20 Strep, una reacción de PCR específica de especie y secuenciación del gen *16S rRNA*) (122).

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Los estudios de epidemiología molecular permiten establecer criterios de no identidad entre bacterias aisladas en el contexto de un brote, en episodios sucesivos o coexistentes de un mismo individuo o en la caracterización de grupos clonales para conocer su distribución

geográfica. En el caso de los EGA se desarrollaron distintas técnicas para diferentes fines.

Jacobs *et al.* analizaron una colección de 267 cepas de *S. anginosus* mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos en un ensayo de transferencia de línea inversa. Se reconocieron cinco ribogrupos según las sondas de oligonucleótidos del gen *16S rRNA* (123).

La diversidad genética de los EGA puede estudiarse por análisis de macrorrestricción empleando el método denominado electroforesis en campos pulsados (PFGE, del inglés: *pulse field gel electrophoresis*). En uno de los estudios se emplearon exitosamente las enzimas *SmaI* y *ApaI*. En él se estudiaron 91 aislados epidemiológicamente no relacionados (37 comensales y 49 infectantes). Al igual que en otros estudios se observó una amplia diversidad genética y la agrupación en un dendrograma fue coherente con las especies reconocidas según la taxonomía actual (124).

Se desarrolló también un método de tipificación de EGA basado en la detección de repeticiones en tándem entre 9 *loci*, conocido como *multilocus variable number tandem repeats fingerprint* (MLVF). Este método se aplica para determinar la relación entre cepas con fines epidemiológicos (125).

Los mismos autores describieron un método de PFGE que utiliza *Bsp120I* en lugar de *SmaI* o *EagI*, ya que los ADN de los EGA tienen muy pocos sitios de corte para esas enzimas (126).

Obviamente, los métodos de MLSA pueden permitir la identificación de grupos clonales a través de la confección de árboles filogenéticos. Los genes “housekeeping” *map*, *pfl*, *ppaC*, *pyk*, *rpoB*, *sodA* y *tuf* se han utilizado para definir especies y subespecies, pero permitieron también definir *clusters* dentro de una misma especie (127).

Noventa y siete EGA [*S. anginosus* (n=34), *S. constellatus* (n=55) y *S. intermedius* (n=8)] fueron estudiados por análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos ampliados (AFLP) para evaluar la duración de la infección o colonización. Se incluyeron un total de 97 aislamientos de EGA recuperados de 30 pacientes. El análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados produjo patrones discriminatorios y reproducibles. Se encontraron aislamientos consecutivos de EGA con tipos de AFLP idénticos en 27 de 30 (90%) pacientes. En seis pacientes con bacteriemia, los aislados EGA de sangre y de otros sitios, apareados, mostraron tipos de AFLP idénticos (128).

Conclusiones

Los EGA (a veces llamados estreptococos del grupo ‘*S. milleri*’) son un grupo heterogéneo de estreptococos que comprende tres especies (*S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*) y cinco subespecies (*S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. anginosus* subsp. *whileyi*, *S. constella-*

tus subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* y *S. constellatus* subsp. *viborgensis*). Crecen lentamente, forman colonias pequeñas en agar sangre y presentan los tres tipos de hemólisis. Su crecimiento es estimulado en presencia de 5% de CO₂. Pueden aglutinar con los antiseros para los grupos A, C, F y G de Lancefield o no aglutinar. Se han desarrollado medios selectivos para ser utilizados en el estudio de muestras polimicrobianas. La identificación por métodos fenotípicos, tanto convencionales como miniaturizados o automatizados, frecuentemente presenta fallas que pueden minimizarse si se eligen pruebas individuales de mayor confiabilidad que si se utilizan los bionúmeros. MALDI-TOF MS es un buen método para la identificación de especies, pero para tener mayor certeza a nivel de subespecie, son necesarios otros métodos moleculares. En epidemiología molecular se pueden utilizar métodos de PFGE, AFLP o MLSA.

Fuentes de financiación

Este trabajo no requirió de un financiamiento específico.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Bioq. ELENA MARÍA BERARDINELLI

Correo electrónico: eleberardinelli@hotmail.com

Referencias bibliográficas

- Bateman NT, Eykyn SJ, Phillips I. Pyogenic liver abscess caused by *Streptococcus milleri*. Lancet 1975; 1: 657-9.
- de Louvois J, Gortavai P, Hurley R. Bacteriology of abscesses of the central nervous system: a multicentre prospective study. Br Med J 1977 Oct 15; 2 (6093): 981-4.
- Ruoff KL. *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri"): the unrecognized pathogen. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 102-8.
- Gossling J. Occurrence and pathogenicity of the Streptococcus milleri group. Rev Infect Dis 1988 Mar-Apr; 10 (2): 257-85.
- Piscitelli SC, Shwed J, Schreckenberger P, Danziger LH. Streptococcus milleri group: renewed interest in an elusive pathogen. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992 Jun; 11 (6): 491-8.
- Andrewes FW, Horder TJ. A study of the streptococci pathogenic for man. Lancet 1906; 2: 708-13.
- Lancefield RC, Hare R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. J Exp Med 1935; 61: 335-49.
- Long PH, Bliss EA. Studies upon minute hemolytic streptococci. I. The isolation and cultural characteristics of minute beta-hemolytic streptococci. J Exp Med 1934; 60: 619-31.
- Smith FR, Sherman JM. The hemolytic streptococci of human feces. J Infect Dis 1938; 62: 186-9.
- Mirick GS, Thomas L, Curnen EC, Horsfall FL. Studies on a non-hemolytic streptococcus isolated from the respiratory tract of human beings. I. Biological characteristics of *Streptococcus* MG. J Exp Med 1944; 80 (5): 391-407.
- Guthof O. Ueber pathogene 'vergrünende Streptokokken': Streptokokken-Befunde bei dentogenen Abszessen und infiltraten im Bereich der Mundhöhle. Zbl Bakt Hyg I Orig A 1956; 166: 553-64.
- Atterbery HR, Sutter VL, Feingold SM. Effect of a partially chemically defined diet on normal human fecal flora. Am J Clin Nutr 1972; 25: 1391-8.
- Ottens H, Winkler KC. Indifferent and haemolytic streptococci possessing group-antigen F. J Gen Microbiol 1962; 28: 181-91.
- Facklam RR. Physiological differentiation of viridans streptococci. J Clin Microbiol 1977; 5: 184-201.
- Facklam RR. The major differences in the American and British *Streptococcus* taxonomy schemes with special reference to *Streptococcus milleri*. Eur J Clin Microbiol 1984; 3: 91-3.
- Coykendall AL, Wesbecher PM, Gustafson KB. Genetic similarities among four species of *Streptococcus*. *S. milleri*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, and *S. intermedius*. Int J Syst Bacteriol 1987; 37: 222-8.
- Whiley RA, Beighton D. Emended descriptions and recognition of *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, and *Streptococcus anginosus* as distinct species. Int J Syst Bacteriol 1991; 41: 1-5.
- Winstanley TG, Magee JT, Limb DI, Hindmarch JM, Spencer RC, Whiley RA, et al. A numerical taxonomic study of the "Streptococcus milleri" group based upon conventional phenotypic tests and pyrolysis mass spectrometry. J Med Microbiol 1992 Mar; 36 (3): 149-55.
- Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. J Appl Microbiol 1997; 83 (S1): 1S-11S.
- Rahman M, Nguyen SV, McCullor KA, King CJ, Jorgensen JH, McShan WM. Complete genome sequence of *Streptococcus anginosus* J4211, a clinical isolate. Genome Announc 2015 Nov-Dec; 3 (6): e01440-15.
- Clermont D, Horaud T. Genetic and molecular studies of a composite chromosomal element (Tn3705) containing a Tn916-modified structure (Tn3704) in *Streptococcus anginosus* F22. Plasmid 1994 Jan; 31 (1): 40-8.
- Gravey F, Galopin S, Grail N, Auzou M, Andremont A, Leclercq R, et al. Lincosamide resistance mediated by *Inu(C)* (L phenotype) in a *Streptococcus anginosus* clinical isolate. J Antimicrob Chemother 2013 Nov; 68 (11): 2464-7.

23. Nguyen SV, McShan WM. Chromosomal islands of *Streptococcus pyogenes* and related streptococci: molecular switches for survival and virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 2014 Aug 12; 4: 109.
24. Tabata A, Deutsch D, Otsuka S, Verratti K, Tomoyasu T, Nagamune H, *et al.* A novel plasmid, *pSAA0430-08*, from *Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus* strain 0430-08. *Plasmid* 2018 Jan; 95: 16-27.
25. Olson AB, Kent H, Sibley CD, Grinwis ME, Mabon P, Ouellette C, *et al.* Phylogenetic relationship and virulence inference of *Streptococcus anginosus* group: curated annotation and whole-genome comparative analysis support distinct species designation. *BMC Genomics* 2013 Dec 17; 14: 895.
26. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 613-30.
27. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. En: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 11 ed., Washington DC: ASM Press, EE.UU; 2015, p. 383-402.
28. Whiley RA, Hall LM, Hardie JM, Beighton D. A study of small-colony, beta-hemolytic, Lancefield group C streptococci within the anginosus group: description of *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* subsp. nov. associated with the human throat and pharyngitis. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 1443-9.
29. Sultana F, Kawamura Y, Hou XG, Shu SE, Ezaki T. Determination of 23S rRNA sequences from members of the genus *Streptococcus* and characterization of genetically distinct organisms previously identified as members of the *Streptococcus anginosus* group. *FEMS Microbiol Lett* 1998 Jan 15; 158 (2): 223-30.
30. Jensen A, Hoshino T, Kilian M. Taxonomy of the anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63 (Pt 7): 2506-19.
31. Gray T. *Streptococcus anginosus* group. Clinical significance of an important group of pathogens. *Clin Microbiol Newsl* 2005 Oct 15; 27 (20): 155-9.
32. Sisson PR, Ingham HR, Selkon JB. A study of carbon dioxide-dependent strains of *Streptococcus milleri*. *J Med Microbiol* 1978; 11: 111-6.
33. Clarridge 3rd JE, Osting C, Jalali M, Osborne J, Waddington M. Genotypic and phenotypic characterization of "Streptococcus milleri" group isolates from a Veterans Administration Hospital Population. *J Clin Microbiol* 1999 Nov; 37 (11): 3681-7.
34. Kitada K, Nagata K, Yakushiji T, Eifuku H, Inoue M. Serological and biological characteristics of "Streptococcus milleri" isolates from systemic purulent infections. *J Med Microbiol* 1992 Mar; 36 (3): 143-8.
35. Ball LC, Parker MT. The cultural and biochemical characters of *Streptococcus milleri* strains isolated from human sources. *J Hyg* 1979; 8: 63-78.
36. Arinto-Garcia R, Pinho MD, Carriço JA, Melo-Cristino J, Ramirez M. Comparing matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and phenotypic and molecular methods for identification of species within the *Streptococcus anginosus* group. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3580-8.
37. Brogan O, Malone J, Fox C, Whyte AS. Lancefield grouping and smell of caramel for presumptive identification and assessment of pathogenicity in the *Streptococcus milleri* group. *J Clin Pathol* 1997; 50: 332-5.
38. Chew TA, Smith JMB. Detection of diacetyl (caramel odor) in presumptive identification of the "Streptococcus milleri" group. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3028-9.
39. Bergman S, Selig M, Collins MD, Farrow JA, Baron EJ, Dickersin GR, *et al.* "Streptococcus milleri" strains displaying a gliding type of motility. *Int J Syst Bacteriol* 1995 Apr; 45 (2): 235-9.
40. Osawa R, Whiley RA. Effects of different acidulants on growth of 'Streptococcus milleri group' strains isolated from various sites of the human body. *Lett Appl Microbiol* 1995 May; 20 (5): 263-7.
41. Waite RD, Wareham DW, Gardiner S, Whiley RA. A simple, semiselective medium for anaerobic isolation of anginosus group streptococci from patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1430-2.
42. Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Parkins MD, Norgaard JC, Gregson DB, *et al.* McKay agar enables routine quantification the *Streptococcus milleri* group in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 2010; 59: 534-40.
43. Raclavsky V, Novotny R, Stary L, Navratilova L, Zatloukal J, Jakubec P. NAS agar is more suitable than McKay agar for primary culture of *Streptococcus milleri* group (SMG) fastidious bacteria, *S. intermedius* in particular. *Folia Microbiol (Praha)* 2017 Jan; 62 (1): 11-5.
44. Băncescu G, Băncescu A, Neagu AS, Radu-Popescu M, Bărbuceanu SF. Contribution towards developing a new semi-selective medium for *Streptococcus anginosus* group. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2009; 113: 1243-8.
45. Berardinelli E. Desarrollo de un medio simple y selectivo para el aislamiento de *Streptococcus anginosus* a partir de muestras polimicrobianas. Facultad de Posgrado en Ciencias de la Salud. Pontificia Universidad Católica Argentina "Santa María de los Buenos Aires". Trabajo de especialización en Microbiología Clínica. Buenos Aires, 2019.
46. Vandeplasse E, Coenye T, Crabbé A. Developing selective media for quantification of multispecies biofilms following antibiotic treatment. *PLoS One* 2017 Nov 9; 12 (11): e0187540.
47. Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol* 1997 Jan; 47 (1): 62-6.
48. Sparo M, Sutich E, Lopardo H. Estreptococos β-hemolíticos. En: Lopardo H, Predari SC, Vay C. (editores). *Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Volumen I. Bacterias de importancia clínica. Parte II.a.2. Cocos gram positivos*

- vos catalasa negativos. 2016, p. 12-81, 2016. <https://aam.org.ar/manual-microbiologia.php> (fecha de acceso: 6 de agosto de 2020).
49. Lopardo H. Estreptococos del grupo viridans. En: Lopardo H, Predari SC, Vay C. (editores). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Volumen I. Bacterias de importancia clínica. Parte II.a.2. Cocos gram positivos catalasa negativos. 2016, p. 132-74, <https://aam.org.ar/manual-microbiologia.php> (fecha de acceso: 6 de agosto de 2020).
 50. Ruoff KL, Ferraro MJ. Presumptive identification of "Streptococcus milleri" in 5 h. J Clin Microbiol 1986; 24: 495-7.
 51. Beighton D, Whiley RA. Sialidase activity of the "Streptococcus milleri group" and other viridans group streptococci. J Clin Microbiol 1990 Jun; 28 (6): 1431-3.
 52. Whiley RA, Fraser H, Hardie JM, Beighton D. Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "Streptococcus milleri group". J Clin Microbiol 1990 Jul; 28 (7): 1497-501.
 53. Grinwis ME, Sibley CD, Parkins MD, Eshaghurshan CS, Rabin HR, Surette MG. Characterization of Streptococcus milleri group isolates from expectorated sputum of adult patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2010 Feb; 48 (2): 395-401.
 54. Jensen A, Hoshino T, Kilian M. Taxonomy of the anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2013; 63 (Pt 7): 2506-19.
 55. Summanen PH, Rowlinson M-C, Wooton J, Finegold SM. Evaluation of genotypic and phenotypic methods for differentiation of the members of the anginosus group streptococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 1123-8.
 56. Chang YC, Lo HH. Identification, clinical aspects, susceptibility pattern, and molecular epidemiology of beta-haemolytic group G *Streptococcus anginosus* group isolates from central Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2013 Jul; 76 (3): 262-5.
 57. Flynn CE, Ruoff KL. Identification of "Streptococcus milleri" group isolates to the species level with a commercially available rapid test system. J Clin Microbiol 1995 Oct; 33 (10): 2704-6.
 58. von Baum H, Klemme FR, Geiss HK, Sonntag HG. Comparative evaluation of a commercial system for identification of gram-positive cocci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998 Dec; 17 (12): 849-52.
 59. Brigante G, Luzzaro F, Bettaccini A, Lombardi G, Meacci F, Pini B, et al. Use of the Phoenix automated system for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* spp. J Clin Microbiol 2006 Sep; 44 (9): 3263-7.
 60. Hoshino T, Fujiwara T, Kilian M. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. J Clin Microbiol 2005; 43: 6073-85.
 61. Innings A, Krabbe M, Ullberg M, Herrmann B. Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the *rnpB* gene. J Clin Microbiol 2005 Dec; 43 (12): 5983-91.
 62. Limia A, Alarcón T, Jiménez ML, López-Brea M. Comparison of three methods for identification of Streptococcus milleri group isolates to species level. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000 Feb; 19 (2): 128-31.
 63. Kilpper-Bälz R, Williams BL, Lütticken R, Schleifer KH. Relatedness of "Streptococcus milleri" with *Streptococcus anginosus* and *Streptococcus constellatus*. Syst Appl Microbiol 1984 Dec; 5 (4): 494-500.
 64. Whiley RA, Hardie JM. DNA-DNA hybridization studies and phenotypic characteristics of strains within the 'Streptococcus milleri group'. J Gen Microbiol 1989 Oct; 135 (10): 2623-33.
 65. Lawrence J, Yajko DM, Hadley WK. Incidence and characterization of beta-hemolytic Streptococcus milleri and differentiation from *S. pyogenes* (group A), *S. equisimilis* (group C), and large-colony group G streptococci. J Clin Microbiol 1985 Nov; 22 (5): 772-7.
 66. Willcox MDP, Knox KW. Surface-associated properties of Streptococcus milleri group strains and their potential relation to pathogenesis. J Med Microbiol 1990; 31: 259-70.
 67. Lebrun L, Guibert M, Wallet P, de Maneville MM, Pillet J. Human Fc ('Y) receptors for differentiation in throat cultures of group C "Streptococcus equisimilis" and group C "Streptococcus milleri." J Clin Microbiol 1986; 24: 705-7.
 68. Ruoff K, Kunz U, Ferraro MJ. Occurrence of Streptococcus milleri among beta-hemolytic streptococci isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1985; 22: 149-51.
 69. Vance DW Jr. Group C streptococci: "Streptococcus equisimilis" or Streptococcus anginosus? Clin Infect Dis 1992 Feb; 14 (2): 616-7.
 70. Rubin LG, Kahn RA, Vellozzi EM, Isenberg HD. False positive detection of group A Streptococcus antigen resulting from cross-reacting Streptococcus intermedius (Streptococcus milleri group). Pediatr Infect Dis J 1996 Aug; 15 (8): 715-7.
 71. Weightman NC, Barnham MR, Dove M. Streptococcus milleri group bacteraemia in North Yorkshire, England (1989-2000). Indian J Med Res 2004 May; 119 Suppl: 164-7.
 72. Caro G, Riedel I, García P. Caracterización clínica y microbiológica de las infecciones causadas por Streptococcus grupo anginosus. Rev Chil Infect 2004; 21 (3): 254-60.
 73. Reissmann S, Friedrichs C, Rajkumari R, Itzek A, Fulde M, Rodloff AC, et al. Contribution of Streptococcus anginosus to infections caused by groups C and G streptococci, southern India. Emerg Infect Dis 2010 Apr; 16 (4): 656-63.
 74. Osano E, Tanaka T, Ozeki M, Makita I, Moriyama T. Serogrouping of oral Streptococcus intermedius. Microbiol Immunol 1990; 34: 211-9.
 75. Yakushiji T, Konagawa R, Oda M, Inoue M. Serological variation in oral Streptococcus milleri. J Med Microbiol 1988; 27: 145-51.

76. Yakushiji T, Kitada K, Okita Y, Inoue M. Distribution of *Streptococcus milleri* in the oral cavities of Japanese children. *Microb Ecol Health Dis* 1990; 3: 171-9.
77. Kitada K, Nagata K, Yakushiji T, Eifuku H, Inoue M. Serological and biological characteristics of 'Streptococcus milleri' isolates from systemic purulent infections. *J Med Microbiol* 1992; 36: 143-8.
78. Kitada K, Inoue M. Immunochemical characterization of the carbohydrate antigens of serotype k and Lancefield group G "Streptococcus milleri". *Oral Microbiol Immunol* 1996 Feb; 11 (1): 22-8.
79. Kitada K, Yakushiji T, Inoue M. Immunochemical characterization of the carbohydrate antigens of serotype c/ Lancefield group C "Streptococcus milleri". *Oral Microbiol Immunol* 1993 Jun; 8 (3): 161-6.
80. Konagawa R, Yakushiji T, Inoue M. Immunochemical characterization of type i carbohydrate antigen of "Streptococcus milleri" (*Streptococcus anginosus*). *Zentralbl Bakteriell* 1990 Oct; 274 (1): 40-9.
81. Inoue M, Yakushiji T, Konagawa R. Carbohydrate antigen of serotype g "Streptococcus milleri": immunochemical characterization. *Oral Microbiol Immunol* 1991 Oct; 6 (5): 295-8.
82. Michel MF, van Vonn J, Krause RM. Studies on the chemical structure and the antigenic determinant of type II antigen of group F streptococci. *J Immunol* 1969; 102: 215-21.
83. Willers JMN, Michel MF, Benner R. Immunochemical studies of type IV and two group-like (Z) carbohydrate antigens of minute streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 1973; 39: 609-17.
84. Willers JMN, Michel MF, Huis in't Veld JHJ, Alderkamp GHJ. The type antigen III of group F streptococci. Separation of group and type antigens and partial characterization of type III antigen. *Antonie van Leeuwenhoek* 1973; 39: 349-82.
85. Willers JMN, Michel MF, Sysma MJ, Winkler KC. Chemical analysis and inhibition reactions of the group and type antigens of group F streptococci. *J Gen Microbiol* 1964; 36: 95-105.
86. Yakushiji T, Inoue M, Koga T. Purification and immunochemical studies of type b carbohydrate antigen of oral *Streptococcus milleri*. *Infect Immun* 1988; 56: 2264-9.
87. Inoue M, Eifuku-Koreeda H, Kitada K, Takamatsu-Matsushita N, Okada Y, Osano E. Serotype variation in *Streptococcus anginosus*, *S. constellatus* and *S. intermedius*. *J Med Microbiol* 1998 May; 47 (5): 435-9.
88. Taketoshi M, Yakushiji T, Inoue M. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characteristics of oral *Streptococcus milleri* strains. *Microbios* 1993; 73 (297): 269-80.
89. Krishna RM, Brahmadathan KN, Lalitha MK, John TJ. Biological characterisation of Group F streptococci causing human infections. *Indian J Med Res* 1992 May; 95: 130-5.
90. Cookson B, Talsania H, Chinn S, Phillips I. A Qualitative and Quantitative study of the cellular fatty acids of 'Streptococcus milleri' with capillary gas chromatography. *J Gen Microbiol* 1989 Apr; 135 (4): 831-8.
91. Labbé M, Van der Auwera P, Glupczynski Y, Crockaert F, Yourassowsky E. Fatty acid composition of *Streptococcus milleri*. *Eur J Clin Microbiol* 1985 Aug; 4 (4): 391-3.
92. Adnan S, Li N, Miura H, Hashimoto Y, Yamamoto H, Ezaki T. Covalently immobilized DNA plate for luminometric DNA-DNA hybridization to identify viridans streptococci in under 2 hours. *FEMS Microbiol Lett* 1993 Jan 15; 106 (2): 139-42.
93. Jacobs JA, Schot CS, Bunschoten AE, Schouls LM. Rapid species identification of "Streptococcus milleri" strains by line blot hybridization: identification of a distinct 16S rRNA population closely related to *Streptococcus constellatus*. *J Clin Microbiol* 1996 Jul; 34 (7): 1717-21.
94. Nielsen XC, Justesen US, Dargis R, Kemp M, Christensen JJ. Identification of clinically relevant nonhemolytic streptococci on the basis of sequence analysis of 16S-23S intergenic spacer region and partial *gdh* gene. *J Clin Microbiol* 2009 Apr; 47 (4): 932-9.
95. Chen CC, Teng LJ, Chang TC. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. *J Clin Microbiol* 2004 Jun; 42 (6): 2651-7.
96. Whaley RA, Duke B, Hardie JM, Hall LM. Heterogeneity among 16S-23S rRNA intergenic spacers of species within the 'Streptococcus milleri group'. *Microbiology* 1995 Jun; 141 (Pt 6): 1461-7.
97. Whaley RA, Hall LM, Hardie JM, Beighton D. Intra-specific diversity within *Streptococcus anginosus*. *Adv Exp Med Biol* 1997; 418: 367-9.
98. Rudney JD, Larson CJ. Use of restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes to assign species to unknown clinical isolates of oral viridans streptococci. *J Clin Microbiol* 1994 Feb; 32 (2): 437-43.
99. 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 Sep; 35 (9): 2337-41.
100. Picard FJ, Ke D, Boudreau DK, Boissinot M, Huletsky A, Richard D, et al. Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J Clin Microbiol* 2004 Aug; 42 (8): 3686-95.
101. 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 Sep; 40 (9): 3172-8.
102. Liu LC, Tsai JC, Hsueh PR, Teng LJ. Rapid differentiation between members of the anginosus group and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* within beta-hemolytic group C and G streptococci by PCR. *J Clin Microbiol* 2006 May; 44 (5): 1836-8.
103. Goto T, Nagamune H, Miyazaki A, Kawamura Y, Ohnishi O, Hattori K. Rapid Identification of *Streptococcus intermedius* by PCR with the *ily* gene as a species marker gene. *J Med Microbiol* 2002 Feb; 51 (2): 178-86.
104. Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-depen-

- dent superoxide dismutase J Clin Microbiol 1998 Jan; 36 (1): 41-7.
105. Glazunova OO, Raoult D, Roux V. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. Int J Syst Evol Microbiol 2010 Sep; 60 (Pt 9): 2140-8.
 106. 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 Oct; 49 Pt 4: 1591-8.
 107. 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 Feb; 42 (2): 497-504.
 108. Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett 2004 Apr 1; 233 (1): 83-9.
 109. Schouls LM, Schot CS, Jacobs JA. Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. J Bacteriol 2003 Dec; 185 (24): 7241-6.
 110. Lal D, Verma M, Lal R. Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2011 Jun 25; 10: 28.
 111. Olson AB, Sibley CD, Schmidt L, Wilcox MA, Surette MG, Corbett CR. Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* group from cystic fibrosis clinical specimens by targeting the *cpn60* and 16S rRNA genes. J Clin Microbiol 2010; 48: 1150-60.
 112. Glazunova OO, Raoult D, Roux V. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59: 2317-ac2.
 113. Bishop CJ, Aanensen DM, Jordan GE, Kilian M, Hanage WP, Spratt BG. Assigning strains to bacterial species via the internet. BMC Biol 2009 Jan 26; 7: 3.
 114. Hatrongjit R, Akeda Y, Hamada S, Gottschalk M, Kerdin A. Multiplex PCR for identification of six clinically relevant streptococci. J Med Microbiol 2017 Nov; 66 (11): 1590-5.
 115. Stappers MH, Hagen F, Reimnitz P, Mouton JW, Meis JF, Gyssens IC. Direct molecular versus culture-based assessment of gram-positive cocci in biopsies of patients with major abscesses and diabetic foot infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015 Sep; 34 (9): 1885-92.
 116. Desai IM, de Boer M, Bens CC, Jacobs JA, Mouton JW, Dofferhoff AS, et al. Rapid and reliable identification of *Streptococcus anginosus* group isolates to the species level by real-time PCR and melting curve analysis. J Microbiol Methods 2008 Oct; 75 (2): 372-4.
 117. Chen CC, Teng LJ, Kaiung S, Chang TC. Identification of clinically relevant viridans streptococci by an oligonucleotide array. J Clin Microbiol 2005 Apr; 43 (4): 1515-21.
 118. Sullivan KV, Turner NN, Roundtree SS, Young S, Brock-Haag CA, Lacey D, et al. Rapid detection of gram-positive organisms by use of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test and the BacT/Alert Pediatric FAN system in a multicenter pediatric evaluation. J Clin Microbiol 2013 Nov; 51 (11): 3579-84.
 119. Beal SG, Ciurca J, Smith G, John J, Lee F, Doern CD, et al. Evaluation of the nanosphere verigene gram-positive blood culture assay with the VersaTREK blood culture system and assessment of possible impact on selected patients. J Clin Microbiol 2013 Dec; 51 (12): 3988-92.
 120. Woods K, Beighton D, Klein JL. Identification of the '*Streptococcus anginosus* group' by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. J Med Microbiol 2014 Sep; 63 (Pt 9): 1143-7.
 121. Welker M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. Syst Appl Microbiol 2011 Feb; 34 (1): 2-11.
 122. Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. J Clin Microbiol 2007 Aug; 45 (8): 2392-7.
 123. Jacobs JA, Schot CS, Schouls LM. The *Streptococcus anginosus* species comprises five 16S rRNA ribogroups with different phenotypic characteristics and clinical relevance. Int J Syst Evol Microbiol 2000 May; 50 Pt 3: 1073-9.
 124. Bartie KL, Wilson MJ, Williams DW, Lewis MA. Macrorestriction fingerprinting of "*Streptococcus milleri*" group bacteria by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 2000 Jun; 38 (6): 2141-9.
 125. Obszańska K, Kern-Zdanowicz I, Sitkiewicz I. MLVF analysis of anginosus (*milleri*) group streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis 2015 Oct; 83 (2): 124-9.
 126. Obszańska K, Kern-Zdanowicz I, Sitkiewicz I. Optimized protocol for PFGE analysis of anginosus (*milleri*) streptococci. Pol J Microbiol 2015; 64 (1): 61-4.
 127. Jensen A, Hoshino T, Kilian M. Taxonomy of the anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2013; 63 (Pt 7): 2506-19.
 128. Jacobs JA, Tjhie JHT, Smeets MGJ, Schot CS, Schouls LM. Genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis reveals persistence and recurrence of infection with *Streptococcus anginosus* group organisms. J Clin Microbiol 2003 Jul; 41 (7): 2862-6.

Recibido: 15 de junio de 2020

Aceptado: 30 de julio de 2020