

Fernando Artilles Campelo,  
Ana Cañas Pedrosa,  
Isabel Álamo Antúnez,  
Bernardo Lafarga Capuz.

# Fenotipos y mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas en aislados de *Streptococcus agalactiae* con significación clínica en un período de ocho años (2002-2010)

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria.

## RESUMEN

**Introducción.** *Streptococcus agalactiae* es el agente etiológico más prevalente de enfermedad invasiva en el recién nacido (sepsis, neumonía y meningitis), además de tener un papel importante en fiebres puerperales, infecciones del tracto urinario e infecciones postquirúrgicas. El objetivo de nuestro trabajo fue conocer la evolución de la resistencia a macrólidos y lincosamidas.

**Métodos.** El fenotipo de resistencia se estableció mediante aproximación de discos (eritromicina-clindamicina): M (bomba de expulsión) o MLS<sub>B</sub> (metilasa). Los mecanismos genéticos de resistencia se establecieron mediante PCR para los genes *ermB*, *ermA*, *ermTR*, *mefA/E*. El tipado molecular se realizó por marcorrestricción de ADN cromosómico y electroforesis en campo pulsado.

**Resultados.** Durante 8 años se aislaron 300 cepas de *S. agalactiae*, de las que 78 (26%) cepas fueron resistentes a eritromicina y 70 (23%) cepas fueron resistentes a lincosamidas. El 21% presentaron fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (todas portadoras del gen *ermB*, excepto una) y CMI<sub>90</sub> para eritromicina  $\geq$  256 mg/L. El 2.3% presentaron fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (todas portadoras del gen *ermTR*) con CMI<sub>90</sub> = 6 mg/L y el 2.7% fenotipo M (todas portadoras de los genes *mefA/E*) con CMI<sub>90</sub> = 6 mg/L. El estudio de identidad clonal reveló dos clones predominantes que incluían el 56,6% de las cepas estudiadas. El 90,5% de las cepas del clon A portaban el gen *ermB*.

**Conclusiones.** El estado de resistencia en nuestra área geográfica se encuentra en el límite superior del detectado en el resto del país, pero no se ha observado incremento a lo largo del periodo estudiado.

**Palabras clave.** *Streptococcus agalactiae*, resistencia, macrólidos, fenotipo M, fenotipo MLS<sub>B</sub>.

## Phenotypes and mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides in *Streptococcus agalactiae* isolates with clinical significance in an eight-year period (2002-2010)

### ABSTRACT

**Introduction.** *Streptococcus agalactiae* is the most prevalent agent of invasive disease in the newborn (sepsis, pneumonia, and meningitis), as well as an important cause of puerperal fever, urinary tract infection and surgical site infection. The aim of our study was to know the evolution of macrolide and lincosamide resistance in this microorganism.

**Methods.** Resistance phenotypes were established according to the erythromycin-clindamycin induction test: M (efflux pump) or MLS<sub>B</sub> (methylase). Genetic mechanisms were detected by PCR for the following genes: *ermB*, *ermA*, *ermTR*, and *mefA/E*. Molecular typing was based on chromosomal DNA macrorestriction and detection of fragments using pulsed-field gel electrophoresis.

**Results.** During 8 years, 300 isolates of *S. agalactiae* were recovered. Seventy-eight (26%) were resistant to macrolides, and seventy (23%) were resistant to lincosamides. Constitutive MLS<sub>B</sub> was observed in 21% of the isolates (all but one carrying the *ermB* gene), with a erythromycin MIC<sub>90</sub>  $\geq$  256 mg/L. Inducible MLS<sub>B</sub> was observed in 2.3% of the isolates (all carrying the *ermTR* gene), with a MIC<sub>90</sub> of 6 mg/L. M phenotype was observed in 2.7% of the isolates (all carrying the *mefA/E* gene), with a MIC<sub>90</sub> of 6 mg/L. Molecular typing revealed the presence of two major clones (A and B) comprising 56.6% of the isolates. Most of the isolates (90.5%) belonging to clon A carried the *ermB* gene.

**Conclusions.** Macrolide resistance in our area is similar to that observed in the rest of Spain, but there has been no increase in the incidence rate along the study period.

**Key words.** *Streptococcus agalactiae*, resistance, macrolides, M phenotype, MLS<sub>B</sub> phenotype.

Correspondencia:  
Fernando Artilles Campelo  
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario  
de Gran Canaria Dr. Negrín. Barranco de la Balle-  
na, s/n. 35010 Las Palmas de Gran Canaria.  
Tfno.: 928 449523  
E-mail: fartcam@gobiernodecanarias.org

## INTRODUCCIÓN

*Streptococcus agalactiae* o estreptococo beta hemolítico del grupo B (EGB) es el agente etiológico más prevalente de enfermedad invasiva en el recién nacido (sepsis, neumonía y meningitis), seguida de una diversidad de infecciones especialmente en mujeres con fiebre puerperal, infecciones del tracto urinario e infecciones postquirúrgicas<sup>1</sup>. Desde el punto de vista de la prevención de la infección perinatal por EGB, se ha implantado la detección de embarazadas colonizadas entre las semanas 35–37 de gestación<sup>2</sup>. El tratamiento y profilaxis habitual de las infecciones por EGB es la penicilina y derivados, pero en pacientes alérgicos el tratamiento alternativo son los macrólidos. En mujeres embarazadas se ha descrito hasta un 12% de pacientes colonizadas por EGB que manifiestan alergia a la penicilina. En estudios previos se ha documentado resistencia a eritromicina y clindamicina en torno al 37% y 17%, respectivamente, de las cepas de EGB<sup>3</sup>. La resistencia a macrólidos está codificada fundamentalmente por tres genes: *ermB*, *ermTR* y *mefA/E*. Los dos primeros codifican una metilasa de ARNr 23S que altera la unión a la diana del antibiótico y se expresa como resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS<sub>B</sub>), de manera constitutiva (MLS<sub>Bc</sub>) o inducible (MLS<sub>Bi</sub>). Los genes *mefA/E* codifican una bomba de expulsión que expresa resistencia de bajo nivel a eritromicina y sensibilidad a lincosamidas (fenotipo M). Debido a que estos genes son transportados por plásmidos y/o transposones, la transmisión puede ser tanto de manera vertical como horizontal, por lo que es necesario el estudio continuo de la evolución de la resistencia del EGB a los macrólidos<sup>4</sup>.

El objetivo de nuestro estudio fue conocer los mecanismos de resistencia a macrólidos, tanto fenotípicos como genotípicos, presentes en *S. agalactiae* procedentes de muestras clínicas, y su evolución a lo largo de ocho años, así como la posible clonalidad entre cepas con el mismo mecanismo de resistencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Aislados.** Durante un periodo aproximado de ocho años (desde agosto de 2002 hasta marzo de 2010) se aislaron 300 cepas de EGB con significación clínica (una por paciente), excluyendo las obtenidas a partir de muestras de orina y de frotis vaginales y/o rectales de mujeres embarazadas. Las muestras se obtuvieron en el Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín y en el Hospital Universitario Materno Infantil, y se procesaron en el Servicio de Microbiología del Hospital Dr. Negrín.

**Identificación.** La identificación se realizó por métodos bioquímicos y serológicos convencionales, a partir de colonias con morfología característica y beta-hemólisis en agar sangre, según el esquema de Ruoff et al<sup>5</sup>. En casos dudosos se realizó la prueba CAMP y en todos los aislados se demostró la presencia de antígeno capsular de tipo B (Phadebact, Boule).

**Pruebas de susceptibilidad antibiótica.** Se realizó antibiograma por técnica de microdilución en caldo utilizando un sistema automatizado (Vitek 2, bioMérieux). Para la interpre-

tación se siguieron los criterios del CLSI<sup>6</sup>. En caso de resistencia a eritromicina, se midió la CMI mediante E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia). El mismo método se empleó para la determinación de la CMI de penicilina.

**Determinación de fenotipos de resistencia a macrólidos.** Se realizó mediante el test de inducción con discos de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) separados 20 mm entre sí, en medio de Müller-Hinton con sangre. Se determinaron cuatro fenotipos posibles de acuerdo con los resultados del test: a) fenotipo S (eritromicina y clindamicina sensibles), b) fenotipo M (eritromicina resistente y clindamicina sensible sin achatamiento del halo de inhibición de la clindamicina), c) fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible (MLS<sub>Bi</sub>: eritromicina resistente y clindamicina sensible con achatamiento del halo de inhibición de la clindamicina), y d) fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (MLS<sub>Bc</sub>: eritromicina y clindamicina resistentes)<sup>7</sup>.

**Determinación de genotipos de resistencia a macrólidos.** Se realizó la detección de ADN específico por técnica de PCR para los genes que codifican producción de metilasa (*ermA*, *ermB*, *ermC* y *ermA* subvariante *ermTR*) y bomba de expulsión (*mefA/E*). Los iniciadores empleados y las condiciones de procesamiento establecidas para la PCR se han descrito previamente<sup>4,7-10</sup>.

**Tipado molecular.** Se realizó mediante procedimientos convencionales publicados previamente<sup>10</sup>. El ADN cromosómico fue digerido con el enzima de restricción *SmaI*. La detección de los fragmentos se llevó a cabo por electroforesis en campo pulsado (ECP) en un equipo CHEF-DRII (Bio-Rad, Hercules, California) durante 22 horas, con pulsos lineales de 5 s a 35 s, 6 V/cm, ángulo de reorientación de 120° y 14°C de temperatura. Los geles de agarosa al 1% se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron mediante transiluminación UV. Las imágenes fueron digitalizadas mediante el programa Quantity One (Bio-Rad, Hercules, California), convertidas a formato TIFF y analizadas usando un software específico (Fingerprinting, versión 3.0; Bio-Rad, Hercules, California). A los dendrogramas resultantes se les aplicaron los métodos UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y el coeficiente de Dice. La interpretación de los fragmentos de restricción se realizó de acuerdo con los criterios establecidos por los CDC<sup>11</sup>. Perfiles electroforéticos con homología mayor o igual al 80% se consideraron relacionados epidemiológicamente.

## RESULTADOS

Se aislaron 300 cepas de *S. agalactiae*, con predominio en los siguientes tipos de muestras: sangre (48,3%), exudados de herida (20,3%) y colecciones purulentas (9,7%) (tabla 1). Un total de 78 cepas (26%) fueron resistentes a macrólidos, de las cuales todas fueron resistentes a eritromicina (26%) y 70 fueron resistentes también a lincosamidas (23,3%). De las 78 cepas resistentes, 63 (21%) presentaron fenotipo MLS<sub>Bc</sub>, todas portadoras del gen *ermB* y con CMI<sub>90</sub> para eritromicina ≥ 256 mg/L. Siete cepas (2,3%) presentaron fenotipo MLS<sub>Bi</sub>, todas portadoras del gen *ermTR*, CMI = 3–24 mg/L (CMI<sub>90</sub> = 6 mg/L). Por último, con fenotipo M se detectaron 8 cepas

**Tabla 1** Distribución de los aislamientos de *Streptococcus agalactiae* y resistencia a macrólidos por localización anatómica.

Tipo de muestra	N	S (N, %)	R (N, %)	M	MLS <sub>Bc</sub>	MLS <sub>Bi</sub>
Sangre	145	117 (80,7)	28 (19,3)	3	22	3
Exudado de herida	61	45 (75,0)	16 (25,0)	2	12	3
Absceso	27	18 (62,1)	9 (37,9)	0	8	1
Secreción respiratoria	24	19 (76,0)	5 (24,0)	0	5	0
Inserción de catéter	9	4 (44,5)	5 (55,5)	0	5	0
LCR	7	6 (85,7)	1 (14,3)	0	1	0
Líquido articular	7	5 (71,4)	2 (28,6)	0	2	0
Biopsia	2	1 (50,0)	1 (50,0)	1	0	0
Otros	18	7 (43,8)	11 (56,2)	2	8	0
Total	300	222 (74,0)	78 (26,0)	81	632	73

<sup>1</sup>Cuatro cepas con el gen *mefE* y cuatro con el gen *mefA*,

<sup>2</sup>Portadoras del gen *ermB*,

<sup>3</sup>Portadoras del gen *ermTR*, Una cepa presentó dos genes de resistencia simultáneos: gen *mefA* y gen *ermB*

N: número de cepas; LCR: líquido cefalorraquídeo; S: cepas sensibles; R: cepas resistentes; M: fenotipo M; MLS<sub>Bc</sub>: fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo; MLS<sub>Bi</sub>: fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible.

(2,7%), cuatro de ellas con el gen *mefA* y cuatro con el gen *mefE*; en todas, excepto una, la CMI fue de 4–12 mg/L (CMI<sub>90</sub> = 6 mg/L). Cuatro cepas (1,3%) de *S. agalactiae* fueron resistentes a telitromicina, todas fueron MLS<sub>Bc</sub>, portadoras del gen *ermB* y con CMI  $\geq$  256 mg/L. Dos cepas sensibles a macrólidos fueron resistentes a ciprofloxacino (0,7%).

Se efectuó estudio de identidad clonal por ECP en 53 representativas del período 2002–2008, el 67,9% del total. Se identificaron 28 clones. El 56,6% de las cepas estaban agrupadas: clon A (21 cepas) clon B (5 cepas), clon C (2 cepas) y clon D (2 cepas). Las restantes cepas (23/53; 43,4%) constituyeron clones no relacionados epidemiológicamente (figura 1). El 90,5% de las cepas pertenecientes al clon A (19/21) portaban el gen *ermB*.

## DISCUSIÓN

La disminución de la incidencia de infecciones perinatales por *S. agalactiae* está relacionada con la prevención de la infección perinatal, mediante el uso de profilaxis antibiótica intraparto en mujeres embarazadas colonizadas por este microorganismo<sup>12,13</sup>. La tasa de colonización por *S. agalactiae* en embarazadas en España oscila entre un 10% y un 18,5%<sup>14</sup>. El tratamiento de elección para eliminar la colonización materna y el riesgo de infección en el recién nacido es la amoxicilina, pero en mujeres alérgicas a penicilinas se recomiendan la eritromicina y la clindamicina y, como alternativa, los glucopéptidos. Se calcula que un 10–12% de las embarazadas refieren alergia a la penicilina<sup>15</sup>.

Las tasas de resistencia a macrólidos en EGB parecen incrementarse de manera ininterrumpida desde la década de los 90, por lo que es importante realizar una vigilancia estrecha de su evolución. En España, Marimón *et al* encontraron una tasa

de resistencia a macrólidos de un 11% para cepas de los años 2003–2004<sup>16</sup>. En nuestra serie, a lo largo de los 7 años completos estudiados (2003 a 2009), no hemos encontrado un incremento progresivo anual de la tasa de resistencia a macrólidos en las cepas aisladas. Sin embargo, para todo el periodo investigado la tasa fue más alta que la descrita por otros autores nacionales. El fenotipo predominante fue el MLS<sub>B</sub>, presente en el 89,7% de las cepas resistentes. Ambas circunstancias, resistencia global y tipo de mecanismo genético, limitaría el uso de macrólidos y lincosamidas en nuestra área en patologías donde EGB presente un papel prevalente. Este patrón de resistencia es bastante homogéneo en diversas series europeas y americanas; sin embargo, en cuanto a la frecuencia de resistencias, se constata una variación relativa entre un 8% y un 38%<sup>17–21</sup>.

Encontramos una correlación total entre fenotipo y genotipo: MLS<sub>Bc</sub> – *ermB*, MLS<sub>Bi</sub> – *ermTR*, y M – *mefA/E*, excepto en un caso que presentaba fenotipo MLS<sub>Bc</sub> con el gen *ermTR*. Esta situación varía en otras series referido al grupo MLS<sub>B</sub> – genes *erm*, como en el caso de De La Cruz *et al*.<sup>22</sup>, que describen un porcentaje de discrepancias entre fenotipo y genotipo del 14%.

Las cepas resistentes a macrólidos por metilasa presentaron una alta relación clonal, hecho que ya ha sido observado por otros autores. En concreto, se relacionan determinados pulstipos con el serotipo V y la resistencia a macrólidos mediada por el gen *ermB*<sup>20,23,24</sup>. A diferencia de lo que sucede con las cepas de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* resistentes a macrólidos por el gen *ermB*, es interesante destacar que en nuestra serie el 98,7% de las cepas de *S. agalactiae* resistentes a macrólidos fueron sensibles a telitromicina. Betriu *et al*. demostraron la buena actividad de telitromicina en todas las cepas resistentes a eritromicina estudiadas en el año 2001<sup>19</sup>. Sin embargo, González *et al*. encontraron un 20,4% de cepas resistentes a

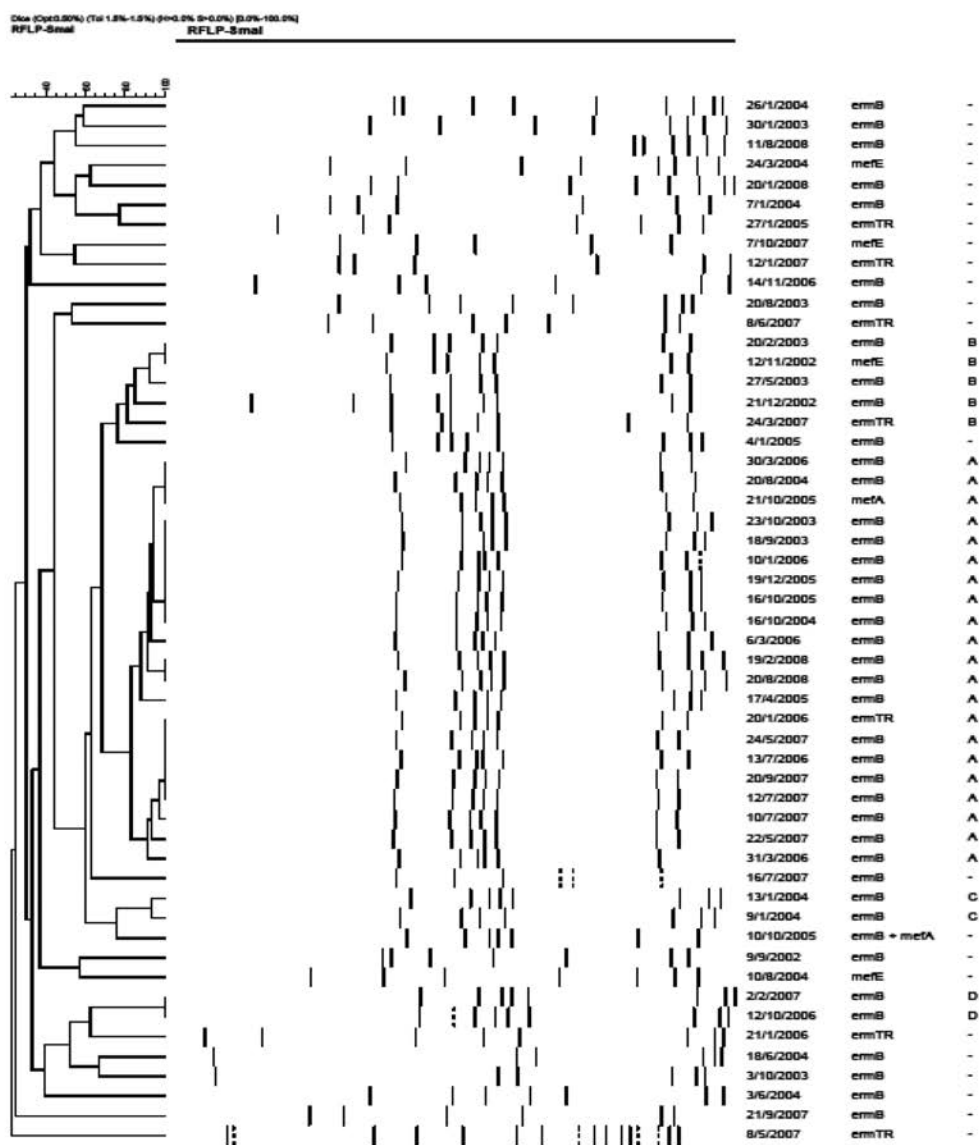


Figura 1

Electroforesis en campo pulsado (RFLP) de 54 cepas de *Streptococcus agalactiae*.

telitromicina en cepas portadoras del gen *ermB*<sup>14</sup>.

Como conclusión, nuestra área geográfica presenta actualmente una tasa de resistencia a macrólidos en *S. agalactiae* discretamente elevada (26%). El mecanismo de resistencia predominante es la producción de metilasa, mayoritariamente por el gen *ermB*. La mayoría de las cepas son sensibles a telitromicina y ciprofloxacino. Parece haber cierta distribución clonal, ya que el 67,9% estaban agrupadas en cuatro clones. Nos parece importante hacer estudios periódicos del estado de resistencia a macrólidos en *S. agalactiae* para detectar cambios en la evolución de la misma.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la inestimable colaboración de los técnicos especialistas de laboratorio Laura Cardona Reyes e Inmaculada Zorio Reyes,

## BIBLIOGRAFÍA

1. Edwards MS, Baker CJ, *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Filadelfia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010; 2655-66.

2. Centers for Disease Control and Prevention, Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC, 2010. MMWR 2010; 59(No,RR:10):1-36.
3. Murdoch DR, Reller LB. Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated from patients with invasive disease: 10-year perspective. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:3623-4.
4. Ardanuy C, Tubau F, Liñares J, Domínguez MA, Pallarés R, Martín R, et al. Distribution of subclasses *mefA* and *mefE* of the *mefA* gene among clinical isolates of macrolide-resistant (M-phenotype) *Streptococcus pneumoniae*, viridans group streptococci, and *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:827-9.
5. Ruoff KL, Whaley RA, Beighton D. *Streptococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editores, Manual of Clinical Microbiology, Washington, D.C.: ASM Press, 2003; 405-22.
6. CLSI, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement, CLSI document M100-S20, Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
7. De Azavedo JCS, McGavin M, Duncan C, Low DE, McGeer A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B *Streptococcus* isolates from Ontario, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:3504-8.
8. 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.
9. Alberti 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.
10. 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.
11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33:2233-9.
12. Spanish Society of Obstetrics and Gynecology, Spanish Society of Neonatology, Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Spanish Society of Chemotherapy, and Spanish Society of Family and Community Medicine. Prevention of perinatal group B streptococcal disease, Spanish revised guidelines. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21:417-23.
13. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl J Med 2000; 342:15-20.
14. González JJ, Andreu A, and the Spanish Group for the Study of Perinatal Infection from the Spanish Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Multicenter study of the mechanisms of resistance and clonal relationships of *Streptococcus agalactiae* isolates resistant to macrolides, lincosamides, and ketolides in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:2525-7.
15. Figueira-Coelho J, Ramirez M, Salgado MJ, Melo-Cristino J. *Streptococcus agalactiae* in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and clonal analysis of macrolide-resistant isolates. Microb Drug Resist 2004; 10:31-6.
16. Marimón JM, Valiente A, Ercibengoa M, García-Arenzana JM, Pérez-Trallero E. Erythromycin resistance and genetic elements carrying macrolide efflux genes in *Streptococcus agalactiae*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:5069-74.
17. Bingen E, Doit C, Bidet P, Brahimi N, Deforche D. Telithromycin susceptibility and genomic diversity of macrolide-resistant serotype III group B streptococci isolated in perinatal infections. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:677-80.
18. 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
19. Betriu C, Culebras E, Gómez M, Rodríguez-Avial I, Sánchez BA, Ágreda MC, et al. Erythromycin and clindamycin resistance and telithromycin susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:1112-4.
20. Diekema DJ, Andrews JL, Huynh H, Rhomberg PR, Doktor SR, Beyer J, et al. Molecular epidemiology of macrolide resistance in neonatal bloodstream isolates of group B streptococci. J Clin Microbiol 2003; 41:2659-61.
21. Gygax SE, Schuyler JA, Kimmel LE, Trama JP, Mordechai E, Adelson ME. Erythromycin and clindamycin Resistance in group B streptococcal clinical isolates, Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:1875-7.
22. De la Cruz WP, Richardson JY, Broestler JM, Thornton JA, Danaher PJ. Rapid determination of macrolide and lincosamide resistance in group B streptococcus isolated from vaginal-rectal swabs. Infect Dis Obstet Gynecol 2007; 2007:46581.
23. Brzychczy-Wloch M, Gosiewski T, Bodaszewska M, Pabian W, Bulanda M, Kochan P, et al. Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance. J Med Microbiol 2010; 59:780-6.
24. Von Both U, Ruess M, Mueller U, Fluegge K, Sander A, Berner R. A serotype V clone is predominant among erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates in a southwestern region of Germany. J Clin Microbiol 2003; 41:2166-9.