



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES  
ASOCIADOS A LA VIRULENCIA EN CEPAS CLÍNICAS  
DE *Streptococcus pyogenes* DEL SEROTIPO M1.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A ,

**RAÚL MEJÍA ESPINOSA**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MÉXICO, D.F.

2007

M. 97130



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

## JURADO ASIGNADO

<b>Presidente</b>	PROFRA. MARÍA DEL CARMEN CORTÉS DECUIR.
<b>Vocal</b>	PROFR. RAÚL GARZA VELASCO.
<b>Secretario</b>	PROFR. LUIS MANUEL PEREA MEJÍA.
<b>1er. Suplente</b>	PROFRA. REBECCA E. FRANCO Y BOURLAND.
<b>2do. Suplente</b>	PROFR. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ.

## SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio de Epidemiología Molecular, Tercer Piso, Torre de Investigación. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.



---

M. en C. Luis Manuel Perea Mejía.  
Asesor



---

M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel.  
Supervisor Técnico



---

Raúl Mejía Espinosa.  
Sustentante

---

Este trabajo forma parte del proyecto "Análisis molecular de los genes asociados a la virulencia de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico y una colección de referencia" financiado por el PAPIIT de la DGAPA con clave IN218103-3

---

*No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente;  
No os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas  
que pasan sobre las naciones.*

*Vivid en la serena paz de los laboratorios y de las bibliotecas.  
Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? Y después, a  
medida que vayáis progresando: ¿Qué he hecho por mi patria?  
Hasta que llegue el día en que podáis tener la íntima satisfacción de  
pensar que habéis contribuido de alguna manera  
al progreso y el bienestar de la humanidad.*

Louis Pasteur

---

Dedicado a *mi Mamá*

Sabiendo que no existirá una forma de agradecer toda una vida de sacrificios y esfuerzos, quiero que sientas que el objetivo logrado también es tuyo y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue tu incondicional apoyo.

Te amo

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A **Luis Manuel Perea**, por todo su apoyo; por su infinita paciencia; por no sólo compartir, sino además, contagiar su pasión por el conocimiento y la investigación; por la confianza depositada en mi persona; por todas las oportunidades que me brindó para completar mi formación profesional; por todo el tiempo que dedicó a la asesoría y revisión de este trabajo y por su invaluable amistad.

A **Alma E. Inzunza**, por todo el conocimiento que me transmitió; por la gran disposición y la excelente actitud que tuvo siempre al asesorarme en los experimentos que se realizaron para este trabajo; por el tiempo que empleó en su revisión y por su invaluable amistad.

A **Nancy, Rosa y Wendy**, no se hasta donde hubiera podido caer si no hubiese tomado su mano. Gracias por hacerme ver que la amistad no sólo es algo tangible, sino que además... se come. **Nancy**, gracias por ser mi cómplice, por estar siempre para mí; tú eres la personificación de la frase "mejor amigo". Tu nombre debería estar junto al mío en la portada.

---

A **Blanca, Josefina, David, Paola, Paty, Arturo, Tere, Cecilia, Mónica, Adriana, Gerardo, Pablo, Fidel, María, Maya, Wendy, Brenda** y **Carla** por permitirme emprender esta gran aventura con ustedes; por cada momento que compartieron conmigo y por hacer de la Facultad de Química un sitio lleno de magia y de "la dona" mi lugar favorito. Todos sus nombres han quedado escritos en la historia de mi vida y grabados en mi corazón.

A **Laura Ongay** y **Guadalupe Codiz** del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por la realización de las secuencias y a **Mónica Tobías** del Hospital General Gonzalo Castañeda del ISSSTE, por la colaboración con el material biológico.

---

**ÍNDICE**

ABREVIATURAS .....	XIII
1. ANTECEDENTES.....	1
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. Objetivo General.....	5
2.1.1. Objetivos Específicos.....	5
3. INTRODUCCIÓN.....	6
3.1. Generalidades de los Estreptococos .....	6
3.1.1. Clasificación de los Estreptococos.....	8
3.1.1.1. Morfología Colonial .....	8
3.1.1.2. Tipo de Hemólisis .....	9
3.1.1.3. Especificidad Serológica.....	10
3.1.1.4. Reacciones Bioquímicas.....	11
3.2. Estreptococos del Grupo A (EGA) o <i>Streptococcus pyogenes</i> ...	12
3.2.1. Estructura Antigénica .....	12
3.2.2. Factores de Virulencia .....	14
3.2.2.1. La cápsula .....	14
3.2.2.2. La proteína M.....	15
3.2.2.3. Las proteínas semejantes a M .....	16
3.2.2.4. La proteína F .....	16
3.2.2.5. Las estreptolisinas O y S.....	17

---

3.2.2.6. La estreptocinasa .....	17
3.2.2.7. La desoxirribonucleasa (DNasa) .....	18
3.2.2.8. La C5a peptidasa .....	18
3.2.2.9. Exotoxinas pirogénicas .....	19
3.2.2.10. La proteína estreptocócica inhibitoria de la lisis mediada por el complemento (SIC) .....	20
3.2.3. Patogenicidad y Principales Enfermedades .....	21
3.2.3.1. Enfermedades Supurativas .....	21
3.2.3.1.1. Faringitis .....	22
3.2.3.1.2. Impétigo .....	22
3.2.3.1.3. Celulitis .....	23
3.2.3.1.4. Fascitis necrotizante .....	23
3.2.3.1.5. Fiebre escarlatina .....	24
3.2.3.1.6. Erisipela .....	24
3.2.3.1.7. Síndrome del choque tóxico estreptocócico .....	25
3.2.3.2. Enfermedades no Supurativas .....	26
3.2.3.2.1. Fiebre reumática aguda .....	26
3.2.3.2.2. Glomerulonefritis aguda postestreptocócica .....	28
3.3. <i>Streptococcus pyogenes</i> del serotipo M1 .....	30
3.3.1. Genes asociados a la virulencia de <i>Streptococcus pyogenes</i> del serotipo M1 .....	30

---

---

3.3.1.1. Genes que se encuentran bajo el control del regulón Mga de virulencia .....	33
3.3.1.1.1. Gen <i>emm</i> .....	33
3.3.1.1.2. Gen <i>sic</i> .....	33
3.3.1.2. Genes de origen extracromosomal .....	38
3.3.1.2.1. Gen <i>speA</i> .....	38
3.3.1.2.2. Gen <i>speC</i> .....	40
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
4.1. Material Biológico .....	42
4.2. Identificación de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	43
4.3. Caracterización y Tipificación por <i>emm</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	45
4.3.1. Extracción de ADN .....	46
4.3.1.1. Evaluación del ADN extraído .....	47
4.3.2. Amplificación del gen <i>emm</i> .....	47
4.3.3. Determinación del genotipo <i>sic</i> , <i>sof</i> , <i>speA</i> y <i>speC</i> .....	50
4.3.3.1. Clasificación preliminar de las cepas .....	52
4.3.4. Digestión enzimática del producto de PCR del gen <i>emm</i> ..	52
4.3.5. Identificación de las cepas M1 .....	53
4.4. Caracterización molecular y subtipificación de las cepas M1 ( <i>emm1</i> ) .....	54
4.4.1. Amplificación de los genes <i>emm1</i> , <i>sic</i> , <i>speA</i> y <i>speC</i> .....	54

---

---

4.4.2.Purificación de los productos de la PCR de los genes <i>emm1</i> , <i>sic</i> , <i>speA</i> y <i>speC</i> .....	54
4.4.3.Secuenciación de los productos de la PCR de los genes <i>emm1</i> , <i>sic</i> , <i>speA</i> y <i>speC</i> .....	56
4.4.4.Análisis de las secuencias .....	57
4.4.4.1. Gen <i>emm1</i> .....	58
4.4.4.2. Gen <i>sic</i> .....	58
4.4.4.3. Genes <i>speA</i> y <i>speC</i> .....	59
4.4.5.Amplificación del gen <i>IS1562</i> .....	60
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	61
5.1. Tipificación por <i>emm</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	61
5.1.1.Aislamiento del ADN.....	61
5.1.2.Amplificación del gen <i>emm</i> .....	62
5.1.3.Determinación del genotipo <i>sic</i> , <i>sof</i> , <i>speA</i> y <i>speC</i> .....	64
5.1.4.Identificación de las cepas M1 ( <i>emm1</i> ) de <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> .....	66
5.2. Caracterización Molecular y Subtipificación de las cepas M1 ...	68
5.2.1.Prevalencia de los genes <i>speA</i> y <i>speC</i> en las cepas M1 de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	69
5.2.2.Incidencia de <i>IS1562</i> en cepas M1 de <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> .....	71

---

5.2.3. Secuenciación de los productos de la PCR de los genes <i>emm1</i> , <i>sic</i> , <i>speA</i> y <i>speC</i> .....	72
5.2.4. Análisis de las Secuencias.....	76
5.2.4.1. Gen <i>emm1</i> .....	77
5.2.4.2. Genes <i>speA</i> y <i>speC</i> .....	79
5.2.4.3. Gen <i>sic</i> .....	81
5.2.5. Análisis de la cepa M1 <i>sic</i> (-).....	84
6. CONCLUSIONES .....	90
7. APÉNDICE.....	92
8. BIBLIOGRAFÍA.....	94

**ABREVIATURAS**

°C	Grado Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
A	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AE	Buffer de Elusión
AL	Buffer de Lisis
ALT	Ácido Lipoteicoico
ASO	Anti-estreptolisina O
AW1	Buffer de lavado 1
AW2	Buffer de lavado 2
C	Citosina
CAMP	Factor de Christie, Atkins, Munch-Peterson
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
Da	Daltons
DEF - 1	Defensinas alfa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP's	Deoxinucleósidos Trifosfatados.

DRs	Secuencia directa repetida
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGA	Estreptococo del Grupo A
FNT – $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
G	Guanina
GNAP	Glomerulonefritis Aguda Post Estreptocócica
hBD	Defensinas beta humanas
IL – 1	Interleucina 1
IL – 6	Interleucina 6
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
INP	Instituto Nacional de Pediatría
INT – $\gamma$	Interferón gamma
IS	Secuencia de Inserción
ISSSTE	Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado
MAC	Complejo de Ataque a la Membrana
Mga	Regulador Múltiple de genes del estreptococo del grupo A
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
mL	Mililitro

mM	Milimolar
NIAID NIH	Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas que pertenece a los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos
ng	nanogramo
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular, Marcador de Peso Molecular
PTSAgs	Familia de las Toxinas Pirogénicas Superantigénicas
PYR	Enzima Pirrolidonil Aminopeptidasa
R1 – R3	Serie de secuencias de repetición en "tandem"
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundo
SCTE	Síndrome del Choque Tóxico Estreptocócico
SIC	Proteína estreptocócica inhibitoria de la lisis mediada por el complemento
SLPI	Proteinasa inhibitoria secretada por leucocitos
SMEZ	Toxina Mitogénica Estreptocócica Z
SPEA	Exotoxina Pirogénica Estreptocócica A
SPEB	Exotoxina Pirogénica Estreptocócica B

SPEC	Exotoxina Pirogénica Estreptocócica C
SPEF	Factor Mitogénico
SPEs	Exotoxinas Pirogénicas Estreptocócicas
Ss	Secuencia Señal
SSA	Superantígeno Estreptocócico
SSR	Región de Repeticiones Cortas
T	Timina
T. amb	Temperatura Ambiente
TBE	Buffer de Tris-Boratos-EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Luz Ultravioleta

## 1. ANTECEDENTES

Antes de la introducción de los antibióticos, resultaban comunes las infecciones severas causadas por el Estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo A de Lancefield (*Streptococcus pyogenes*), asimismo, antes de la segunda guerra mundial se asociaba frecuentemente a este microorganismo con las altas tasas de mortalidad en padecimientos post-parto y en pacientes con quemaduras; sin embargo con el advenimiento de la penicilina el Estreptococo del grupo A de Lancefield fue virtualmente eliminado como patógeno dada su alta susceptibilidad al antibiótico; así en las siguientes cuatro décadas, el mundo industrializado fue testigo de la cada vez menor incidencia de las enfermedades causadas por esta bacteria, a tal grado que, para la década de los 70's, varios países europeos afirmaban que las enfermedades severas causadas por *Streptococcus pyogenes* ya habían sido erradicadas, y que enfermedades específicas, como la fiebre escarlatina ya era parte de la historia, pues había sido abolida. De hecho en muchos países fue abandonado el tratamiento profiláctico con penicilina incluso en reclutas en activo del ejército<sup>(10, 11)</sup>.

Sin embargo, a partir de la segunda mitad de la década de los 80's no sólo se observó un resurgimiento de cuadros clínicos severos causados

---

por *Streptococcus pyogenes* como fascitis necrotizante, sepsis, meningitis e infecciones en la piel (erisipela, impétigo y otras formas de pioderma), que en ese entonces ya no representaban un problema grave de salud pública, sino que al parecer la virulencia de las cepas involucradas en estos casos, parecía ser mayor a la comúnmente observada<sup>(9, 37, 45)</sup>. Todo lo anterior, junto con el reconocimiento del Síndrome del Choque Tóxico Estreptocócico como una patología debida a una toxiinfección estreptocócica y el resurgimiento de enfermedades autoinmunes tales como la glomerulonefritis y la fiebre reumática aguda como secuelas a infecciones estreptocócicas representando un problema global de salud pública,<sup>(37)</sup> generó un gran interés por la investigación en torno a este microorganismo con la apremiante necesidad de conocer mejor la epidemiología, patogénesis, tratamiento y prevención de los cuadros clínicos que ocasiona<sup>(11, 44)</sup>.

De este minucioso estudio de *Streptococcus pyogenes* resultaron importantes hallazgos. En primer lugar, tras la serotipificación por M (proteína M), se encontró que, aún cuando varios serotipos M (M1, M3, M5, M6 y M18) son capaces de provocar cuadros clínicos severos, el serotipo M1 predominaba dentro de las cepas involucradas en los episodios invasivos, presentando además una elevada incidencia en aislamientos de cuadros faríngeos no complicados e incluso en

---

portadores sanos<sup>(9, 10, 44)</sup>. Lo anterior y el hecho de que la tipificación serológica por M arrojará cada vez más cepas no tipificables, así como la dificultad de la producción y mantenimiento de los sueros anti-M derivó en la necesidad de emplear otro tipo de técnicas que permitieran una mejor caracterización de las cepas y pudiera ayudarnos a entender a nivel molecular el cambio epidemiológico observado.

Fue considerada entonces, la implementación de técnicas moleculares que permitieran el estudio de componentes celulares y productos extracelulares de la bacteria, que estuvieran directamente involucradas en la patogénesis de las enfermedades ocasionadas por *Streptococcus pyogenes*. Así, se han desarrollado varios métodos de tipificación molecular, entre los que se encuentran la tipificación *Vir*, que sin embargo, no mostró la capacidad de diferenciar entre algunos serotipos M y el uso de oligonucleótidos marcados radioactivamente en dot blotting; el cual presenta como principal desventaja, la realización de una prueba para cada serotipo M que se deseaba cubrir; por lo que comenzaron a desarrollarse técnicas de subtipificación molecular, como ribotipificación, electroforesis de campos pulsados, y más recientemente el análisis de secuencia multilocus (MLST), que salvo específicas limitaciones permiten hacer diferenciación genética entre cepas con el mismo tipo M.

A pesar de todo, el actual "estándar de oro" de las técnicas moleculares de tipificación, se basa en la secuenciación del gen *emm*, específicamente de la porción que codifica para la región hipervariable, del extremo amino terminal de la proteína M, que comprende alrededor de 160 pb y es el responsable del tipo M específico, por lo cual correlaciona ampliamente con la tipificación serológica de M<sup>(2, 56)</sup>.

Otro hallazgo importante es la reciente identificación de la proteína estreptocócica que inhibe la lisis mediada por el complemento (proteína SIC) producida únicamente por los serotipos M1 y M57, la cual es codificada por el gen *sic*, que en las cepas M1, se encuentra ubicado dentro del regulón de virulencia *mga* de *Streptococcus pyogenes*<sup>(1)</sup> junto a una secuencia de inserción denominada *IS1562*, que codifica para una transposasa<sup>(4)</sup> y entre los genes *emm1* y *scpA*, que codifican para la proteína M1 y para la C5a peptidasa respectivamente. El elevado grado de polimorfismo del gen *sic*, se describió por primera vez en cepas mexicanas<sup>(42)</sup>, y análisis más extensos sobre la abundancia en la variación de este gen y la proteína SIC han mostrado la existencia de más de 300 variantes alélicas, convirtiéndolo en un excelente marcador epidemiológico de las cepas M1, cuya prevalencia en aislamientos clínicos ya sea de origen faríngeo o de episodios invasivos, se ha incrementado notablemente en los últimos años<sup>(23, 25, 44, 52)</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

- ✦ Caracterizar molecularmente los genes *emm*, *sic*, *speA* y *speC* asociados a la virulencia de cepas de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1 provenientes de aislamientos clínicos en hospitales de la Ciudad de México.

#### **2.1.1 Objetivos Específicos**

- ✦ Identificar las variantes alélicas de los genes *emm*, *sic*, *speA* y *speC* de cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1 (*emm1*).
- ✦ Implementar una estrategia que permita una subtipificación de las cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1 (*emm1*) mediante el análisis de la secuencia nucleotídica de los genes *sic* y *emm1*.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Generalidades de los Estreptococos

Los Estreptococos fueron descritos por primera vez en 1879 por Louis Pasteur como una "cadena de cuentas" en una muestra vista al microscopio proveniente de una paciente que murió por sepsis puerperal; denominados genéricamente como *Streptococcus* por Rosenbach en 1884 y finalmente como *Streptococcus haemolyticus* en 1903 por Schottmüller; actualmente el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática describe a los estreptococos como un género de bacterias formado por cocos grampositivos de forma esférica u ovalada con un diámetro de 1 a 2  $\mu\text{m}$ , anaerobios facultativos, catalasa negativos, capsulados en su mayoría, no esporulados y no móviles. Dado que su división celular ocurre en una sola dirección y tienden a quedarse unidos por puentes de pared celular en lugar de separarse, por lo general, se disponen en pares o en cadena; la longitud de la cadena depende en gran medida de si los organismos crecen en un medio líquido o sólido y la forma en que se maneja el material al hacer el frotis para su observación al microscopio<sup>(11,21)</sup>.

Los estreptococos figuran entre las bacterias nutricionalmente más exigentes, debido a que han perdido la capacidad de sintetizar muchos

---

de los nutrientes que necesitan y por este motivo, los medios adecuados para su aislamiento deben contener líquidos orgánicos como sangre o suero que favorezcan su crecimiento y desarrollo<sup>(21)</sup>.

Los estreptococos comprenden un grupo amplio y heterogéneo de bacterias; mientras algunos son saprofitos, otros forman parte de la flora habitual pudiendo comportarse como oportunistas produciendo una infección cuando disminuyen las defensas del individuo portador, y por último, otros son patógenos, los cuales pueden causar un amplio espectro de enfermedades desde agudas hasta crónicas<sup>(46)</sup>.

Históricamente, el interés médico se ha centrado en dos especies causantes de infecciones severas: *Streptococcus pyogenes* (grupo A) y *Streptococcus pneumoniae*, sin embargo existen otros estreptococos de importancia médica como *Streptococcus agalactiae* (grupo B) agente etiológico de enfermedades neonatales y los estreptococos del grupo *viridans*, los cuales se involucran en diversas patologías como la caries dental (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*), bacteremias, meningitis, neumonía, enfermedad periodontal (*Streptococcus mitis*), o infecciones supurativas (*Streptococcus milleri*)<sup>(21, 40, 46)</sup>.

### **3.1.1 Clasificación de los Estreptococos**

Los estreptococos son clasificados con base a su morfología colonial, tipo de hemólisis, reacciones bioquímicas y de manera definitiva por su especificidad serológica<sup>(40, 46)</sup>.

#### **3.1.1.1 Morfología Colonial**

Las colonias de estreptococos tienen un diámetro entre 0.5 y 1 mm después de 24 horas de incubación a 37°C. La mayoría de las especies no presentan pigmentación y por lo general son brillantes y translúcidas, de tal forma que las colonias van del blanco al gris, las cuales según la generalidad de autores semejan pequeñas gotas de rocío, excepto por algunas cepas de *Streptococcus agalactiae*, las cuales pueden ser amarillas, naranjas o rojas y presentar  $\alpha$  o  $\beta$  hemólisis<sup>(19,21)</sup>.

Las colonias de *Streptococcus pyogenes*, son  $\beta$ -hemolíticas, convexas, ligeramente mucoides y en algunos casos pueden ser umbonadas, mientras que las colonias de *Streptococcus pneumoniae* son por lo general  $\alpha$ -hemolíticas con una ligera depresión en el centro y de apariencia mucóide, finalmente las colonias de los estreptococos del grupo Viridans son  $\alpha$ -hemolíticas, convexas y por lo general no son mucoides.

### 3.1.1.2 Tipo de Hemólisis

Una de las características más relevantes utilizada para la identificación de los estreptococos, está basada en la hemólisis observada alrededor de la colonia cuando éstos se cultivan y crecen en placas de agar sangre; la hemólisis es debida a la acción de una o las dos hemolisinas que producen los estreptococos, denominadas estreptolisina S y estreptolisina O, que causan la lisis de los eritrocitos que se encuentran en el medio de cultivo<sup>(40, 54)</sup>.

Esta clasificación fue propuesta por Brown en 1919 y establece que en función de su comportamiento en las placas de agar sangre, los estreptococos pueden clasificarse como:

- A. Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos o Hemolíticos: cuando producen hemólisis total debido a la lisis de los eritrocitos alrededor de la colonia.
- B. Estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos o *viridans*: cuando producen hemólisis parcial o "verde" alrededor de la colonia y que es asociada a la reducción de la hemoglobina eritrocitaria.
- C. Estreptococos  $\gamma$ -hemolíticos o no hemolíticos: cuando no producen hemólisis.

Los estreptococos del grupo A son casi siempre  $\beta$ -hemolíticos; los de los grupos B, C, F y G pueden ser  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ -hemolíticos y la mayoría de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* son  $\alpha$ -hemolíticas, pero pueden causar  $\beta$ -hemólisis durante la incubación anaeróbica. Las características hemolíticas son utilizadas como tamiz para la identificación presuntiva de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*.

### **3.1.1.3 Especificidad serológica**

La principal clasificación de estas bacterias, particularmente aquellas de importancia médica, se basa en la presencia de antígenos que se encuentran en la pared celular. La primera clasificación serológica para el género *Streptococcus* fue propuesta en 1933 por Rebecca C. Lancefield, la cual divide a los Estreptococos en grupos, que en la actualidad van de la A a la V, formando 18 grupos de acuerdo a las diferencias antigénicas del carbohidrato C extraído de la pared celular de la bacteria<sup>(54)</sup>.

Además del carbohidrato que se utilizó para clasificar a los estreptococos en grupos, existen otros antígenos presentes en cada grupo. La caracterización de estos antígenos permite la subdivisión de cada grupo de organismos en tipos. La sustancia tipo específica puede ser carbohidratos (diferentes al carbohidrato C) o bien proteínas de la

---

pared celular<sup>(54)</sup>.

#### **3.1.1.4 Reacciones bioquímicas**

Mediante el uso de pruebas bioquímicas, se evidencian características metabólicas con lo que es posible clasificar a los estreptococos por especie. En los laboratorios clínicos y los de investigación, de forma rutinaria se emplean las siguientes:

- a. Susceptibilidad a bacitracina 0.04U. Sólo *Streptococcus pyogenes* es incapaz de desarrollar a esta concentración del antibiótico.
- b. Prueba de PYR. En la cual se determina la actividad de la enzima pirrolidonil aminopeptidasa, enzima producida por *Streptococcus pyogenes*, pero no por otro estreptococo  $\beta$  - hemolítico.
- c. Sensibilidad a la optoquina. Útil para la identificación de *Streptococcus pneumoniae*, pues en presencia de esta quinina el microorganismo no desarrolla.
- d. Solubilidad en bilis. Sólo *Streptococcus pneumoniae* presenta una ectoenzima autolítica (L-alanina muramilamidasa) que se activa en presencia de soluciones de sales biliares al 10%, causando la destrucción de las células neumocócicas, y la pérdida de turbidez de los cultivos líquidos puros de este microorganismo.
- e. Prueba de CAMP. Sólo *Streptococcus agalactiae* produce una

proteína extracelular (factor CAMP) que actúa sinérgicamente con la  $\beta$  - hemolisina de *Staphylococcus aureus* agudizando la zona de hemólisis producida por esta enzima.

- f. Hidrólisis de hipurato. En la cual se determina la actividad de la enzima hipuricaza producida sólo por *Streptococcus agalactiae* entre los estreptococos.

### **3.2 Estreptococos del Grupo A (EGA) o *Streptococcus pyogenes***

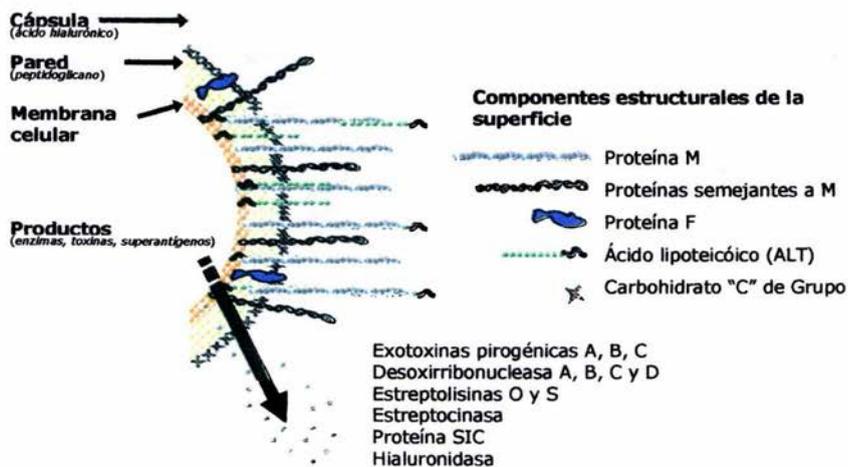
*Streptococcus pyogenes* (Estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo A) es considerado un importante patógeno para el humano ya que es frecuentemente asociado a una diversidad de cuadros clínicos que van desde simples cuadros faríngeos hasta enfermedades sistémicas severas como la fascitis necrotizante o el síndrome de choque tóxico; siendo también responsable de secuelas no supurativas posteriores a una infección estreptocócica como la fiebre reumática aguda y la glomerulonefritis aguda.

#### **3.2.1 Estructura Antigénica**

La superficie celular de *Streptococcus pyogenes* es muy compleja y químicamente diversa (figura 3.1). La pared celular está compuesta de unidades de repetición de N-acetilglucosamina y ácido N-

---

acetilmurámico, que componen el peptidoglicano; ácido lipoteicoico (ALT); el carbohidrato C de grupo (N-acetil- $\beta$ -D-Glucosamina unido a ramnosa) y una variedad de proteínas de superficie, que incluyen a la proteína M; proteínas semejantes a M; las proteínas T y R; y la proteína F, además posee una cápsula de ácido hialurónico<sup>(40, 50)</sup>.



**Figura 3.1** Representación de la superficie celular de *Streptococcus pyogenes* y sus productos extracelulares

Como determinantes antigénicos superficiales de relevancia se consideran el carbohidrato C, que permite su identificación definitiva y su clasificación serológica; la proteína M, cuya antigenicidad sirvió para realizar un esquema de serotipificación basado en esta proteína; las proteínas T y R, las cuales se han convertido en marcadores epidemiológicos y la estreptolisina O, una exotoxina que causa la lisis de

los eritrocitos y algunas células blancas, que debido a sus características inmunogénicas permiten la determinación de anticuerpos anti-estreptolisina O que constituye un marcador diagnóstico importante en las infecciones estreptocócicas<sup>(40)</sup>.

### **3.2.2 Factores de Virulencia**

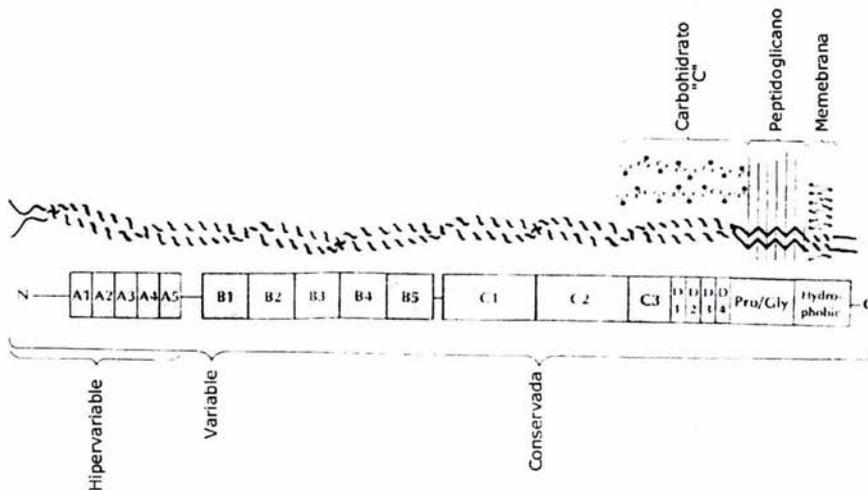
Como resultado de un proceso adaptativo *Streptococcus pyogenes* ha desarrollado numerosos y complejos mecanismos que le permiten evadir las defensas del hospedero y poder sobrevivir y reproducirse, generando una gran variedad de factores de virulencia que ocasionan un amplio espectro de enfermedades.

#### **3.2.2.1 La cápsula**

La cápsula de *Streptococcus pyogenes* está formada por un polímero de ácido hialurónico que contiene unidades de repetición de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, no es inmunogénica debido a que es químicamente semejante al tejido conectivo de las células musculares de mamíferos, lo que resulta en un mimetismo molecular que protege a la bacteria de la respuesta inmune del hospedero al no ser reconocido como antígeno extraño y favorece su adhesión a las células epiteliales; además la cápsula protege al estreptococo contra la opsonización y consecuente fagocitosis por neutrófilos o macrófagos<sup>(40, 50)</sup>.

### 3.2.2.2 La proteína M

Representa la principal proteína localizada en la superficie celular de la bacteria y es considerado tradicionalmente como el principal factor de virulencia de *Streptococcus pyogenes*. Mientras que la región carboxilo terminal está anclada a la membrana, la región amino terminal se extiende hacia la superficie, en forma de un dímero  $\alpha$ -helicoidal, dando la apariencia de fibrillas. La proteína M está formada por cuatro unidades de repetición (A-D), de las cuales la unidad A, localizada en la región amino terminal, es la más importante debido a que en ella reside la especificidad serológica por el alto grado de variabilidad que presenta (figura 3.2). Actualmente, con el avance de la tecnología molecular, se han identificado más de 200 variantes de esta proteína<sup>(40)</sup>.



**Figura 3.2** Representación esquemática de la proteína M de *S. pyogenes*<sup>(17)</sup>.

La proteína M protege a la bacteria de la fagocitosis mediante su unión al fibrinógeno y a la proteína reguladora del complemento conocida como factor H, favoreciendo la degradación del factor C3b del complemento<sup>(16)</sup>.

Debido a que la proteína M es altamente inmunogénica, es posible la formación de anticuerpos anti-M específicos para cada tipo M, los cuales son capaces de neutralizar la actividad antifagocítica de la proteína M, brindando protección al hospedero al promover la erradicación de la bacteria, aunque se ha documentado que en algunas ocasiones estos anticuerpos pueden reaccionar contra algunos tejidos del hospedero<sup>(9)</sup>.

### **3.2.2.3 Las proteínas semejantes a M**

Actualmente son reconocidas como miembros de una superfamilia de proteínas con capacidad de unirse a inmunoglobulinas o tener actividad antifagocítica, además pueden unirse al inhibidor de proteasas  $\alpha$ -2-microglobulina, lo que puede proteger a *Streptococcus pyogenes* de la actividad de proteasas fagocitarias<sup>(40)</sup>.

### **3.2.2.4 La proteína F**

Es el ligando para la fibronectina, que se localiza en la matriz extracelular, por lo que puede ser la principal adhesina que participa en

---

la adhesión hacia células epiteliales de la faringe y piel<sup>(40)</sup>.

### **3.2.2.5 Las estreptolisinas O y S**

Son hemolisinas secretadas por *Streptococcus pyogenes*; lisan eritrocitos, plaquetas y leucocitos y son las responsables de la hemólisis observada en placas de agar sangre.

La estreptolisina O es capaz de suprimir la quimiotaxis y la movilidad de los leucocitos; además es inmunogénica, y la determinación de la antiestreptolisina O (ASO), brinda una herramienta importante para determinar una infección estreptocócica reciente, lo que representa una ayuda propicia en el diagnóstico de las complicaciones tardías de las infecciones por estreptococos como fiebre reumática y glomerulonefritis aguda<sup>(54)</sup>. La estreptolisina S es un polipéptido pequeño, no inmunogénico, que además de causar  $\beta$ -hemólisis, es capaz de inhibir la quimiotaxis y la fagocitosis, así como ejercer un efecto citotóxico de ciertos tipos de células eucarióticas<sup>(20, 54)</sup>.

### **3.2.2.6 La estreptocinasa**

Forma parte de la familia de proteínas secretadas por *Streptococcus pyogenes* que se unen al plasminógeno, promoviendo la degradación de los coágulos al convertirlo en plasmina<sup>(40)</sup>.

Algunos tipos de estreptocinasa se han asociado con la patogénesis de la glomerulonefritis post-estreptocócica que es mediada por la formación de complejos inmunes de reacciones de hipersensibilidad de tipo III<sup>(9)</sup>.

### **3.2.2.7 La desoxirribonucleasa (DNasa)**

Son enzimas secretadas por *Streptococcus pyogenes*; se han identificado cuatro variantes inmunogénicas de las desoxirribonucleasas (de la A a la D), estas no son enzimas citolíticas, pero pueden despolimerizar DNA libre presente en el pus, reduciendo la viscosidad del material en el absceso y facilitando su diseminación. Los anticuerpos contra DNasa B representan un marcador importante de infecciones cutáneas y casos de glomerulonefritis aguda causadas por *Streptococcus pyogenes*<sup>(40)</sup>.

### **3.2.2.8 La C5a peptidasa**

Es una enzima proteolítica que se encuentra en la superficie de los estreptococos de los grupos A, B, y G. Representa una potente serinproteasa que degrada el sitio de unión a los polimorfonucleares del componente C5a, que es un factor quimiotáctico del complemento. Este evento genera una inhibición en el reclutamiento de células fagocíticas al sitio de infección<sup>(9)</sup>.

### 3.2.2.9 Exotoxinas pirogénicas

Las exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (SPEs), forman parte de la gran familia de las toxinas pirogénicas superantigénicas (PTSAgs) que principalmente producen cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, y que deben su nombre a su distintiva habilidad de producir fiebre<sup>(32)</sup>.

Tres exotoxinas pirogénicas de estreptococo, la A, B y C (SPEA-C) han sido ampliamente estudiadas y reconocidas como importantes factores de virulencia por su participación como pirógenos, incremento del choque endotóxico y efectos en el sistema inmune. Las exotoxinas son inmunológicamente distintas y reconocidas como potentes superantígenos que estimulan de manera directa e inespecífica alrededor del 20% de los linfocitos T originando la liberación excesiva de citocinas inflamatorias como las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), el interferón- $\gamma$  (INT- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ). Las SPEA y C son codificadas genéticamente por un bacteriófago lisogénico, mientras que la SPEB se encuentra dentro del genoma de la bacteria<sup>(40)</sup>.

Otras exotoxinas pirogénicas de *Streptococcus pyogenes* incluyen el factor mitogénico (SPEF), el superantígeno estreptocócico (SSA), la toxina mitogénica estreptocócica Z (SMEZ) y los superantígenos

---

estreptocócicos G, H y J (SPEG, SPEH y SPEJ) recientemente identificados en el genoma del serotipo M1<sup>(9)</sup>.

### **3.2.2.10 La proteína estreptocócica inhibitoria de la lisis mediada por el complemento (SIC)**

En 1996, Akesson y colaboradores identificaron un gen que sólo estaba presente en cepas de *Streptococcus pyogenes* de los serotipos M1 y M57. La proteína codificada por este gen presenta la capacidad de interferir con la actividad lítica del complemento, por lo que le denominó proteína estreptocócica inhibitoria de la lisis mediada por el complemento (proteína SIC, por sus siglas en inglés), y *sic* al gen que la codifica<sup>(1)</sup>.

SIC, se une al factor C5b67 e impide la inserción de éste a la membrana bloqueando la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), con lo que se evita la lisis y la subsecuente muerte de la bacteria<sup>(15)</sup>. Además, recientemente se han descrito y documentado otras actividades de SIC contra otros componentes del sistema inmune innato en las mucosas del hospedero<sup>(23)</sup>, como son los péptidos antibacterianos tales como la lisozima, la proteínasa inhibitoria secretada por leucocitos (SLPI)<sup>(14)</sup>, la catelicidina LL-37 e incluso las  $\alpha$ -defensinas (DEF-1)<sup>(18)</sup> y las  $\beta$ -defensinas (hBD-1, -2 y -3)<sup>(13)</sup>, asimismo se ha demostrado la

actividad de SIC en la inhibición de la fagocitosis por polimorfonucleares<sup>(55)</sup>; actividades que sin duda marcan a SIC como un importante factor de virulencia, que al encontrarse presente en las cepas M1 de *Streptococcus pyogenes*, consideradas especialmente patógenas, lo conviertan en un factor determinante en la persistencia y diseminación de la bacteria.

### **3.2.3 Patogenicidad y Principales Enfermedades**

*Streptococcus pyogenes* es capaz de causar un amplio espectro de enfermedades, el cual comprende desde cuadros faríngeos no complicados hasta enfermedades sistémicas que comprometen la vida del paciente; asimismo es responsable de complicaciones tardías debidas principalmente a procesos de carácter inmunológico. Este amplio espectro de enfermedades se divide en dos grupos: Las enfermedades supurativas y las no supurativas.

#### **3.2.3.1 Enfermedades supurativas**

Dentro de las enfermedades supurativas se encuentran tanto cuadros inespecíficos, que son infecciones agudas de tipo piógeno; como cuadros específicos, que presentan a *Streptococcus pyogenes* como agente etiológico característico o exclusivo. Tanto en los cuadros específicos como en los inespecíficos podemos encontrar enfermedades

superficiales o no invasivas, enfermedades invasivas y enfermedades mediadas por toxinas.

#### **3.2.3.1.1 Faringitis**

La faringitis es un cuadro inespecífico superficial que se desarrolla entre uno y tres días después del contacto con *Streptococcus pyogenes* originando fiebre, malestar, dolor de faringe y cefalea. La parte posterior de la faringe puede estar eritrematosa y presentar exudados purulentos, también puede observarse infartación de ganglios cervicales. La diferenciación clínica entre la faringitis estreptocócica y la viral resulta en ocasiones difícil de realizar, el diagnóstico específico es realizado mediante el cultivo bacteriológico (exudado faríngeo). Una faringitis no tratada adecuadamente puede complicarse por diseminación de *Streptococcus pyogenes* a otras regiones del tracto respiratorio tanto superior como inferior, resultando en infecciones del oído medio (otitis media), senos paranasales (sinusitis) o pulmones (pulmonía)<sup>(9, 10)</sup>.

#### **3.2.3.1.2 Impétigo**

También denominado pioderma estreptocócico, representa una infección confinada a la superficie de la piel y afecta principalmente la cara y las extremidades. La infección comienza cuando la bacteria se introduce al tejido subcutáneo en una zona de la piel lastimada, donde se desarrollan

vesículas que se llenan de pus (pústulas), que al reventarse forman una costra delgada de color ámbar que cura sin dejar cicatriz. Los nódulos regionales se inflaman pero no se presentan signos sistémicos. El impétigo es un cuadro inespecífico ya que puede ser ocasionado por estreptococos de los grupos C y G y se encuentra comúnmente mezclado con *Staphylococcus aureus*<sup>(9, 50)</sup>.

#### **3.2.3.1.3 Celulitis**

En la celulitis se involucran tejidos subcutáneos profundos por lo que no se observa diferencia entre la zona de la piel infectada y la sana. La inflamación local y los signos sistémicos son observados. La celulitis representa un cuadro inespecífico, debido a que varias son las bacterias que pueden ocasionarlo, por ello resulta necesaria la identificación del agente etiológico<sup>(40)</sup>.

#### **3.2.3.1.4 Fascitis Necrotizante**

Es una infección que ocurre en el tejido subcutáneo profundo la cual es caracterizada por una destrucción masiva del músculo y grasa a lo largo de los planos faciales. El microorganismo es introducido al tejido a través de la piel lesionada por cortaduras menores, traumas, quemaduras o cirugías. Comienza con una evidencia de celulitis, que se convierte en una gangrena con síntomas sistémicos. La toxicidad

---

sistémica, la falla multiorgánica y la muerte son característicos de la enfermedad, por lo que una terapia apropiada es requerida para prevenirla. En la fascitis además del empleo de antibióticos se requiere de un tratamiento agresivo que implica la eliminación quirúrgica del tejido infectado. Este padecimiento se ha asociado a tipos M específicos, entre los que destacan M1, M3 y M18<sup>(40)</sup>.

#### **3.2.3.1.5 Fiebre Escarlatina**

La fiebre escarlatina es uno de los cuadros específicos causados por *Streptococcus pyogenes* y representa una complicación de la faringitis estreptocócica, ocasionada por la liberación al torrente sanguíneo de las exotoxinas pirogénicas A (principalmente) y C. Los primeros síntomas aparecen entre uno y dos días después de iniciadas las manifestaciones clínicas de la faringitis, comenzando por una erupción cutánea ("rash") en el cuello, tórax y extremidades. En los primeros días la lengua presenta un aspecto amarillento que es sustituido entre el cuarto y quinto día por una intensa coloración roja y descamación de la piel<sup>(9)</sup>.

#### **3.2.3.1.6 Erisipela**

La erisipela es una infección aguda en la piel manifestada por dolor e inflamación local (eritema) en cara, piel cabelluda y extremidades que comprende lesiones tipo dermatitis, de bordes rosa y rojo, acompañada

---

de inflamación de nódulos linfoides y signos sistémicos. Ocurre comúnmente en niños y personas mayores y es precedida por infecciones faríngeas o cutáneas. La erisipela es uno de los cuadros específicos producidos por *Streptococcus pyogenes*, aunque se han reportado casos donde se involucran estreptococos de los grupos B, C y G<sup>(40)</sup>.

### **3.2.3.1.7 Síndrome del Choque tóxico estreptocócico**

Descrito por primera vez en 1987, es un cuadro poco específico, muy parecido al ocasionado por *Staphylococcus aureus* y representa una enfermedad mediada por toxinas. Este síndrome generalmente inicia con dolor e inflamación de tejido blando en el sitio de la infección aunado a signos sistémicos no específicos como fiebre, escalofríos, náuseas, vómito y diarrea. Posteriormente el dolor se intensifica y la enfermedad progresa a choque por hipotensión y falla multiorgánica, es común el desarrollo de bacteremia y de fascitis necrotizante. Los serotipos M relacionados epidemiológicamente a éste trastorno son M1, M3, M11 y M28<sup>(10,40)</sup>.

En contraste con el síndrome ocasionado por *Staphylococcus aureus*, el cual puede asociarse incluso a heridas superficiales, el SCTE es asociado usualmente a infecciones severas ya sean localizadas o sistémicas.

*Streptococcus pyogenes* es aislado en más del 50% de los casos de SCTE a diferencia de *Staphylococcus aureus* que sólo se aísla en un 15%. La descamación de la piel es menos común en la convalecencia del SCTE que en el cuadro ocasionado por *Staphylococcus aureus*; finalmente la mortalidad es cinco veces mayor en el SCTE que en el síndrome provocado por el estafilococo<sup>(10, 37)</sup>.

### **3.2.3.2 Enfermedades no supurativas**

Dos complicaciones serias de las infecciones causadas por *Streptococcus pyogenes* son la fiebre reumática, que compromete a las articulaciones y al corazón; y la glomerulonefritis en la que se involucra a los riñones. Estas complicaciones se denominan secuelas tardías no supurativas cuyos síntomas no inician sino hasta varias semanas después de la aparente recuperación de las infecciones estreptocócicas agudas. Asimismo, durante el curso de estas complicaciones, no es posible aislar a los estreptococos del paciente y ambas complicaciones se deben a mecanismos de tipo inmunológico<sup>(54)</sup>.

#### **3.2.3.2.1 Fiebre reumática aguda**

Aunque la sintomatología varía dependiendo de la severidad de la enfermedad, puede manifestarse como una inflamación de las articulaciones (artritis), corazón (carditis), sistema nerviosos central

---

(corea de Sydenham), piel (eritema marginal) y/o nódulos subcutáneos, las cuales conforman las manifestaciones clínicas importantes dentro de los criterios de Jones establecidos para el diagnóstico de la fiebre reumática; pudiendo presentarse también fiebre, artralgia, aumento de la velocidad globular, elevación en la proteína C reactiva y un intervalo P-R prolongado en el electrocardiograma<sup>(9, 29)</sup>.

La enfermedad tiene naturaleza autoinmune relacionada con la producción de anticuerpos autorreactivos y células T que muestran una reactividad cruzada entre los componentes de *Streptococcus pyogenes* y tejidos del hospedero como las articulaciones y válvulas cardíacas. La enfermedad se complica si no es tratada debido a la seria afectación cardíaca que puede derivar en miocarditis o estenosis valvular obligando al reemplazo quirúrgico de las válvulas afectadas para evitar la muerte<sup>(48,54)</sup>.

La enfermedad es asociada a diferentes serotipos de *Streptococcus pyogenes*, como M3, M5 y M18, sin embargo el serotipo M1 ha cobrado importancia en brotes epidémicos alrededor del mundo. La fiebre reumática se relaciona con faringitis estreptocócica y no a infecciones en piel, aunque una tercera parte de los pacientes son asintomáticos antes de desarrollar la enfermedad. Es más común en escolares y ocurre

principalmente durante otoño e invierno y se requiere hacer un diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas y autoinmunes<sup>(9)</sup>. Los individuos que se han recuperado de fiebre reumática son particularmente vulnerables a una recurrencia de la misma entidad es caso de adquirir una infección por *Streptococcus pyogenes*; por lo que es necesario un tratamiento profiláctico con dosis bajas de antibióticos por tiempo prolongado con objeto de evitar dichas infecciones<sup>(48, 54)</sup>.

#### **3.2.3.2.2 Glomerulonefritis aguda postestreptocócica**

La glomerulonefritis es una inflamación del glomérulo, el cual, junto con el túbulo renal conforman la unidad anatómo-funcional del riñón, y se manifiesta por edema de la cara y extremidades, hipertensión, y anormalidades en el sedimento urinario como hematuria y proteinuria. La Glomerulonefritis Aguda Postestreptocócica (GNAP) se presenta de una a cuatro semanas después de una infección por *Streptococcus pyogenes* y generalmente ocurre en niños, adultos jóvenes y personas mayores de 40 años; el sexo masculino es afectado dos veces más que el femenino y la recurrencia es baja probablemente por la respuesta inmune de tipo específica que caracteriza la enfermedad. En climas ecuatoriales la GNAP se asocia a infecciones de piel que tienen elevada

prevalencia en verano, mientras que en climas fríos se asocia a infecciones faríngeas<sup>(9)</sup>.

La GNAP produce deterioro de la función renal, la severidad varía desde la forma asintomática (detectada sólo por uroanálisis) a una falla renal aguda, aunque la mayoría de los pacientes recuperan la totalidad de la función renal en un periodo no mayor a tres meses<sup>(9, 40)</sup>.

La nefritogenicidad de *Streptococcus pyogenes* se encuentra relacionada con el tipo de proteína M de la bacteria. Los serotipos M predominantes asociados a la GNAP relacionada con infecciones de la piel son los tipos M2, M42, M49, M56, M57 y M60, mientras que los tipos M1, M4, M12 y M25 se asocian a GNAP relacionada con cuadros faríngeos<sup>(9)</sup>.

La GNAP es una enfermedad de tipo autoinmune, para la cual se han propuesto diversos mecanismos de patogenicidad, como la formación de complejos inmunes que se depositan en el glomérulo; productos estreptocócicos con efectos nefritogénicos, que alteran el tejido glomerular y la formación de anticuerpos con reactividad cruzada entre los antígenos estreptocócicos y el glomérulo, los cuales pueden desencadenar la activación del complemento sérico<sup>(9, 40)</sup>.

### **3.3 *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1**

La importancia del serotipo M1 radica en la elevada incidencia de éste en aislamientos clínicos y su asociación con enfermedades invasivas graves como la fascitis necrotizante y el síndrome del choque tóxico estreptocócico así como a secuelas no supurativas postinfección como la glomerulonefritis aguda y la fiebre reumática.

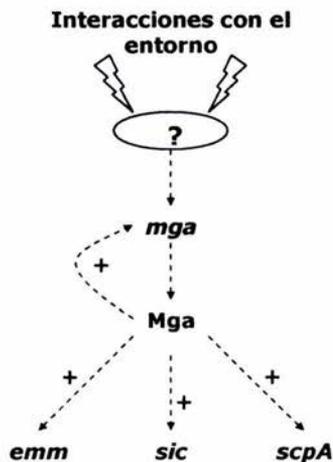
#### **3.3.1 Genes asociados a la virulencia de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1**

La capacidad de adaptación de *Streptococcus pyogenes*, dada por la habilidad de colonizar, desarrollar y persistir en diversos tejidos de su hospedero (humano) sugiere que la expresión de sus factores de virulencia se encuentra controlada por reguladores sensibles a los cambios en el entorno de la bacteria. Hasta ahora, dentro de los sistemas reguladores de la expresión génica de factores de virulencia que han sido estudiados con detalle, se ha demostrado que el Regulador **M**últiple de **g**enes del estreptococo del grupo **A** (Mga) juega un papel determinante en la colonización, persistencia y diseminación de la bacteria<sup>(28, 33)</sup>.

El Mga es un activador transcripcional que a pesar de encontrarse en todas las cepas de *Streptococcus pyogenes*, presenta diferencias en su

---

composición entre los diferentes serotipos de la bacteria y es el encargado de regular la expresión de algunas moléculas de superficie y productos extracelulares que son esenciales en la colonización de tejidos y evasión del sistema inmune del hospedero, como invasinas, adhesinas e incluso algunas toxinas. Además de autorregularse (figura 3.3), el Mga (*mga*) regula los genes que codifican para la proteína M (*emm*), la C5a peptidasa (*scpA*), las proteínas semejantes a M (*enn*, *sph*), así como el factor de opacidad del suero (*sof*), y la proteína estreptocócica que inhibe la lisis mediada por el complemento (*sic*) cuando éstos se encuentran presentes<sup>(12, 28, 33)</sup>.

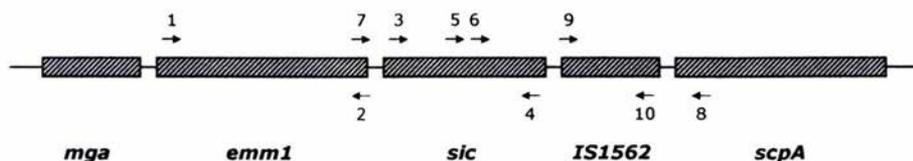


**Figura 3.3** Esquema del modelo de regulación positiva de los genes bajo el control del regulón Mga y su autorregulación.

La máxima expresión del regulón Mga ocurre durante la fase

exponencial del desarrollo, lo que sugiere que los productos regulados por el Mga son requeridos durante la fase rápida de crecimiento asociada con la colonización de nuevos tejidos. Además, el regulón Mga es activado en respuesta a elevados niveles de CO<sub>2</sub>, incremento en la temperatura y limitación de hierro en el medio<sup>(28)</sup>.

Varios han sido los trabajos en los que se ha descrito la composición del regulón Mga de las cepas M1 de *Streptococcus pyogenes* (figura 3.4); una peculiaridad de éste es la presencia de la secuencia de inserción *IS1562*, que codifica para una transposasa, y que se ubica justo entre los genes *sic* y *scpA*. Las Secuencias de Inserción (IS) son facilitadores de la transferencia horizontal de genes o de rearrreglos cromosómicos, por lo que pudiese ser que esta secuencia fuese un elemento cromosómico móvil capaz de acarrear genes responsables del incremento de la virulencia de este serotipo en particular<sup>(4)</sup>.



**Figura 3.4** Composición esquemática del regulón Mga de una cepa de *Streptococcus pyogenes* tipo M1. La localización y el sentido de los primers utilizados en la PCR se indica con las flechas. 1:*emm1a*, 2:*emm1b*, 3:*sic1*, 4:*sic2*, 5:*sic3*, 6:*sic4*, 7:*p6c*, 8:*SBR*, 9:*IS1562F*, 10:*IS1562R*.

### **3.3.1.1 Genes que se encuentran dentro del regulón Mga de virulencia**

#### **3.3.1.1.1 Gen *emm1***

El gen *emm1* que se localiza dentro del regulón Mga justo después del gen *mga* y es el encargado de codificar la proteína M del serotipo M1 (figura 3.4); comprende alrededor de 1200 pb, y pueden identificarse al menos 2 regiones diferentes, la ampliamente conservada entre todos los serotipos M y la región hipervariable, que es la que codifica para la porción amino terminal de la proteína M1 y que brinda las propiedades antigénicas específicas para el serotipo (figura 3.2). La variabilidad de este gen ha sido estudiada con anterioridad<sup>(5, 25, 37)</sup> contándose hasta el momento con 37 alelos que resultan en 37 variantes de la proteína M1 (figura 3.5).

#### **3.3.1.1.2 Gen *sic***

En 1996 se encontró el gen *sic* en cepas de los serotipos M1 y M57 describiéndose por primera vez a partir de una cepa M1, dicho gen, se localizaba dentro del regulón Mga de virulencia en la región comprendida entre los genes *sph* (proteína H, considerada como una de las proteínas semejantes a M) y *scpA* (C5a peptidasa)<sup>(1)</sup>. Dos años más tarde se publicó la evidencia de que junto al gen *sic*,

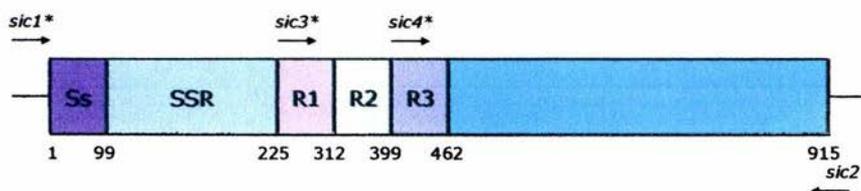
---



justo antes del gen *scpA* existía la secuencia de inserción *IS1562* la cual codifica para una transposasa<sup>(4)</sup>; éste mismo estudio reportó que flanqueando la región que codifica para *IS1562* y *sic* existen una serie de secuencias directas repetidas (DRs) las cuales se asocian comúnmente a procesos de recombinación genéticos; ambos hallazgos fortalecen la teoría de que el gen *sic* fue adquirido por el EGA mediante algún proceso de transferencia horizontal de material genético, logrando estabilizarse y permanecer como un gen constitutivo en el serotipo M1.

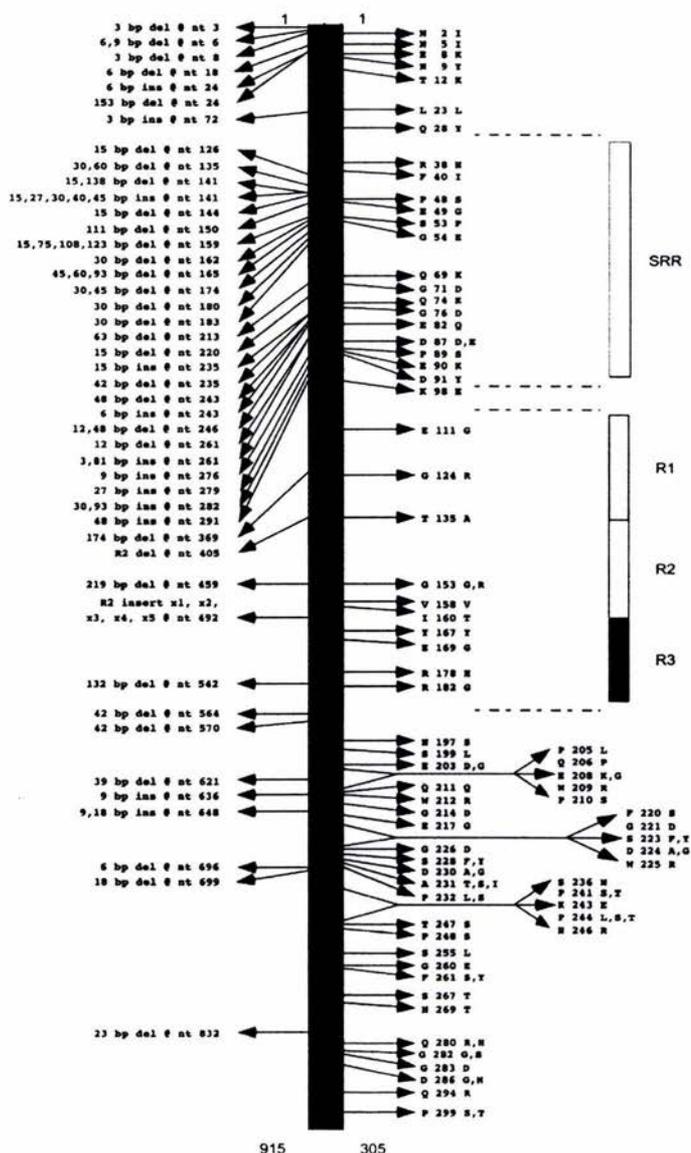
Estudios posteriores revelaron que a diferencia de las cepas M1, en las cepas del serotipo M57 el gen *sic* se encontraba fuera del regulón Mga, y no se encontraba junto a la secuencia *IS1562* o alguna secuencia de inserción similar, por lo que se denominó a éste como gen cercanamente relacionado a *sic* (*crs*)<sup>(22)</sup>. Asimismo, se describió la existencia de un gen parecido a *sic* en cepas de los serotipos M12 y M55 el cual, a pesar de localizarse dentro del regulón Mga, entre los genes *emm* y *IS1562*, presentaba gran diferencia con el gen *sic* descrito para M1 en la región que codifica para la porción amino terminal de la proteína SIC, por lo que fue denominado como gen distantemente relacionado a *sic* (*drs*)<sup>(8, 22)</sup>, de tal forma que cuando se habla del gen *sic* se refiere exclusivamente al que se encuentra en las cepas del serotipo M1.

El gen *sic* tiene una longitud de 915 pb y presenta cierto grado de organización, pues es posible identificar una secuencia señal (Ss), una región de repeticiones cortas (SSR) y una serie de repeticiones en "tandem" (R1, R2 y R3)<sup>(1)</sup> (figura 3.6).



**Figura 3.6** Representación esquemática del gen *sic*. Ss: secuencia señal; SSR: Región de repeticiones cortas; R1-R3: Repeticiones en "tandem". La localización de los primers que se utilizaron para su amplificación y secuenciación se indican con flechas.

En un estudio realizado a partir cepas mexicanas se evidenció el elevado polimorfismo de *sic*<sup>(42)</sup> y estudios más extensos confirmaron el gran número de mutaciones de que es susceptible<sup>(24, 25, 26, 30, 34, 38, 44, 47, 52)</sup>. Esta variedad de mutaciones, desde las puntuales hasta las inserciones o deleciones de varios pares de bases que pueden presentarse en toda la extensión del gen (figura 3.7), ya sea de forma individual o mediante la combinación de dos o más de ellas, lo que da como resultado un incontable número de variantes alélicas, de las que hasta el momento se han descrito más de 300 diferentes para este gen, convirtiéndolo en un importante marcador epidemiológico para las cepas del tipo M1.



**Figura 3.7** Recopilación de las mutaciones identificadas para el gen *sic*. A la derecha mutaciones que implican inserciones y deleciones; y a la izquierda las sustituciones nucleotídicas que derivan en cambio del aminoácido en la proteína<sup>(44)</sup>.

### **3.3.1.2 Genes de origen extracromosomal**

Aunque los eventos moleculares involucrados en la aparición de patógenos con exacerbada virulencia no han sido entendidos por completo, se sabe que las bacterias se adaptan o evolucionan lentamente mediante la acumulación de mutaciones, recombinaciones o rearrreglos o rápidamente por la adquisición de nuevo material genético a través de mecanismos de transmisión horizontal<sup>(49)</sup>.

La transducción por fagos, es uno de los procesos más comunes que se ven involucrados en la transmisión de resistencia a antibióticos, producción de toxinas y en general factores que brindan capacidad evasiva y/o adaptativa con un consecuente incremento en la virulencia<sup>(49)</sup>.

En *Streptococcus pyogenes*, claros ejemplos de este fenómeno son las exotoxinas pirogénicas A y C, que fueron adquiridas por la bacteria a través de bacteriófagos.

#### **3.3.1.2.1 Gen *speA***

El gen que codifica para la toxina pirogénica A proviene del bacteriófago T12, que en su estado lisogénico se integra al genoma *Streptococcus pyogenes* en el gen que codifica para una serin-tRNA<sup>(32)</sup>. El gen *speA* no

---

se encuentra bajo regulación, y su expresión es independiente de la fase de desarrollo en la que se encuentre la bacteria<sup>(33)</sup>.

El gen *speA* comprende alrededor de 800 pb y se ha reportado la existencia de seis alelos para este gen (figura 3.8), cuatro de los cuales (*speA1*, *speA2*, *speA3* y *speA6*) difieren sólo por una sustitución nucleotídica que deriva en un cambio en el aminoácido en la proteína y otros dos (*speA4* y *speA5*) que al ser traducidos difieren en 26 y 25 aminoácidos del alelo *speA1*<sup>(6, 32, 39)</sup>.

	307	316	328	343	347	361 362	370	375	378	438	442 444	497	544 546	561	616
Alelo	G-A (N-D)	G-A (V-I)	G-A (G-S)	C-T (H-Y)	T-A (L-H)	G-A A-G (E-R)	G-A (E-K)	G-A	T-A (S-R)	G-T (K-N)	G-C C-T (V-L)	A-G (N-S)	T-C T-C (Y-H)	G-C (K-N)	C-T (P-S)
<i>speA1</i>															
<i>speA2</i>															
<i>speA3</i>															
<i>speA4</i>															
<i>speA5</i>															
<i>speA6</i>															

**Figura 3.8** Parte de las mutaciones descritas para el gen *speA* y que generan la variación alélica del mismo. En la parte superior se indica la posición, la sustitución nucleotídica que se presenta y entre paréntesis el cambio de aminoácido que se genera. Los alelos *speA4* y *speA5* presentan otras 43 mutaciones con respecto al alelo *speA1* entre las posiciones 30 a 297 y 622 a 719 que no se muestran en la figura.

Estudios realizados en Estados Unidos y varios países europeos revelan que todas las cepas del serotipo M1 recuperadas antes de 1988 contenían el alelo *speA1*, lo que sugiere que este alelo representa el antecesor del alelo *speA2* que es característico de los aislamientos M1 obtenidos después de 1988<sup>(32, 49, 53)</sup>.

### **3.3.1.2.2 Gen *speC***

El gen que codifica para la exotoxina pirogénica C, se encuentra también dentro de un bacteriófago que en estado lisogénico se encuentra integrado al genoma de *Streptococcus pyogenes*<sup>(32)</sup>. Aunque tampoco parece existir regulación de la transcripción del gen *speC*, su máxima expresión ocurre al final de la fase exponencial, lo que sugiere que *speC* es producida una vez que el tejido ha sido invadido<sup>(33)</sup>.

Cinco alelos han sido descritos para *speC* (*speC1* – *speC5*) (figura 3.9), sin embargo poco es lo que se ha investigado acerca de la distribución alélica de este gen entre los diferentes serotipos M de *Streptococcus pyogenes*<sup>(6, 41)</sup>; de hecho aún cuando se ha realizado todo tipo de investigación en torno al serotipo M1, no existen datos ni de la prevalencia del gen ni de alguna asociación entre el serotipo y algún alelo en particular, a diferencia de *speA*. Lo anterior debido quizá a la baja prevalencia que tiene este gen dentro de dicho serotipo o bien a la

---

baja estabilidad y a la poca inmunogenicidad del producto del gen<sup>(57)</sup>.

	147	158	360	438	453
Alelo	T-C	G-A (D-N)	T-C	A-G	A-G
<i>speC1</i>					
<i>speC2</i>					
<i>speC3</i>					
<i>speC4</i>					
<i>speC5</i>					

**Figura 3.9** Mutaciones que generan la variación alélica del gen *speC*. En la parte superior se indica la posición, la sustitución nucleotídica que se presenta y entre paréntesis el cambio de aminoácido que se genera. A diferencia de *speA*, la mayoría de las mutaciones de *speC* son sinónimas o silenciosas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico.

Se analizaron 101 cepas de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1 (*emm1*) aisladas de cuadros clínicos faríngeos y no faríngeos en diferentes hospitales de la Ciudad de México en el periodo comprendido entre los años 2001 y 2006. La distribución por hospital de las cepas M1 caracterizadas se muestra en la tabla 4.1.

Hospital	Aislamientos M1
Hospital General Dr. Gonzalo Castañeda, ISSSTE	38
Instituto Nacional de Pediatría (INP)	19
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE)	10
Hospital Médica Sur	8
Hospital Regional Adolfo López Mateos, ISSSTE	5
Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS	4
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)	4
OTROS	13
<b>TOTAL</b>	<b>101</b>

**Tabla 4.1** Distribución por hospital de las cepas analizadas de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1.

Las cepas de referencia utilizadas fueron proporcionadas por el CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades) con sede en Atlanta Georgia, E.U. La colección está compuesta por 201 cepas y representa todos los tipos M descritos y documentados hasta el 2001 por dicho órgano.

#### **4.2 Identificación de *Streptococcus pyogenes*.**

Los criterios para la identificación de *Streptococcus pyogenes* que se emplean en el laboratorio son la determinación de la  $\beta$ -hemólisis característica en agar sangre, la susceptibilidad a bacitracina y la presencia del carbohidrato C antigénico de Lancefield específico para la especie (ramnosa unida a N-acetilglucosamina). Por ello rutinariamente, todas las cepas que se reciben en el laboratorio y de las cuales se ha confirmado su pureza mediante el análisis de la morfología colonial, son resembradas en placas de agar sangre de carnero al 5%, se les coloca un disco de 0.04 U de bacitracina TIPIBACT A<sup>®</sup> (BIO-RAD<sup>®</sup>) y se incuban por 24 horas a 37°C en atmósfera enriquecida de CO<sub>2</sub> (microaerofilia). Una vez transcurrido este tiempo, se espera encontrar colonias aisladas rodeadas por un halo de hemólisis completa y una inhibición del desarrollo alrededor del disco de bacitracina (figura 4.1).

La determinación del grupo de Lancefield se realiza mediante una

---

---

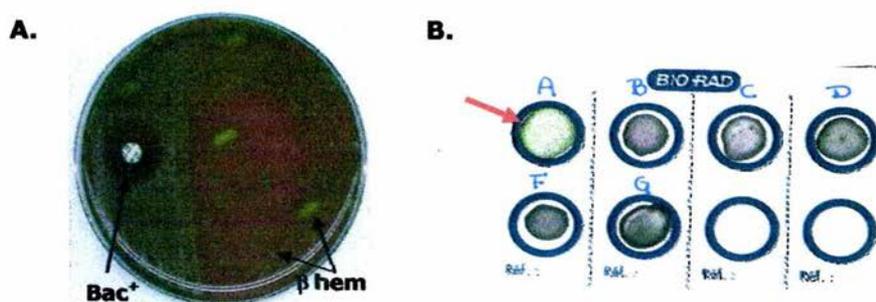
prueba de coagulación en látex con el kit comercial Pastorex<sup>®</sup> Strep (BIO-RAD<sup>®</sup>), siguiendo las indicaciones del proveedor, que se describen a continuación:

1. Adicionar 100  $\mu$ L de solución de enzima de extracción a un tubo eppendorf de 0.2 mL.
2. Tomar de 2 a 3 colonias aisladas de un cultivo fresco y disociarlas en la solución de enzima, procurando obtener una turbidez evidente.
3. Incubar de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.
4. Homogenizar por agitación con vórtex cada uno de los antiseros (suspensiones de partículas de látex recubiertas de los anticuerpos específicos de cada grupo, A, B, C, D, F y G)
5. Depositar una gota de cada antisuero en cada uno de los círculos de la tarjeta de aglutinación.
6. Con ayuda de una pipeta poner una gota de extracto en cada uno de los círculos de la tarjeta de aglutinación, procurando no tocar la gota de antisuero que fue colocada en el paso anterior
7. Utilizando un palillo para cada círculo, homogenizar el contenido de cada círculo.
8. Agitar la tarjeta con un movimiento orbital durante un minuto.

Una reacción positiva se manifiesta por la aparición de aglutinados rojos

---

sobre un fondo verde en un plazo máximo de un minuto. Para considerar a la cepa analizada como *Streptococcus pyogenes*, es necesario observar la  $\beta$ -hemólisis en las placas de agar sangre, un halo de inhibición alrededor del disco de bacitracina y haber obtenido una prueba de aglutinación evidente y única para el carbohidrato que caracteriza al estreptococo del grupo A con el kit empleado (figura 4.1).



**Figura 4.1** Criterios empleados en la identificación de *Streptococcus pyogenes*.

**A.** Prueba de susceptibilidad a bacitracina positiva ( $Bac^+$ ) y desarrollo de  $\beta$ -hemólisis ( $\beta$  hem) **B.** Determinación del grupo de Lancefield mediante una prueba de coagulación en látex (la flecha roja indica la prueba positiva para el grupo A manifestada por la presencia de aglutinados rojos en una solución verde).

### 4.3 Caracterización y Tipificación por *emm* de *Streptococcus pyogenes*.

Cuando se tiene plenamente identificadas las cepas se procede con la caracterización y tipificación de las mismas. Las técnicas para la

tipificación por *emm* de las cepas de *Streptococcus pyogenes* empleadas en el presente trabajo representan parte del trabajo rutinario del laboratorio.

#### **4.3.1 Extracción de ADN.**

La extracción del ADN se realizó empleando el kit comercial DNeasy<sup>®</sup> Tissue (QIAGEN<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del proveedor, según la siguiente metodología:

1. Preparar el buffer de lisis enzimática agregando lisozima (Research Organics<sup>®</sup>) a una concentración final de 20 mg/mL.
2. En un tubo eppendorf agregar 180  $\mu$ L de buffer de lisis enzimática recién preparado y obtener una suspensión bacteriana de un cultivo de 24 horas de aproximadamente  $2 \times 10^9$  UFC/mL.
3. Incubar a 37°C durante al menos 30 minutos.
4. Adicionar al tubo 25  $\mu$ L de proteinasa K (>20 U/mg) y 200  $\mu$ L de buffer AL.
5. Incubar a 70°C durante 30 minutos.
6. Agregar a la mezcla 200  $\mu$ L de etanol absoluto frío y agitar vigorosamente con el vórtex.
7. Pasar todo el contenido del tubo a la columna de extracción colocada sobre un tubo de colecta y centrifugar a 8000 rpm por un minuto. Eliminar el líquido del tubo de colecta

8. Transferir la columna de extracción a un tubo de colecta nuevo y agregar a la columna 500  $\mu$ L de buffer AW1. Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto. Eliminar el líquido del tubo de colecta.
9. Transferir la columna de extracción a otro tubo de colecta nuevo y agregar a la columna 500  $\mu$ L de buffer AW2. Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos. Eliminar el líquido del tubo de colecta.
10. Transferir la columna de extracción a un tubo eppendorf nuevo y estéril y agregar a la columna 200  $\mu$ L de buffer AE. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto para eluir el ADN.
11. Repetir la elusión del paso 10.

#### **4.3.1.1 Evaluación del ADN extraído.**

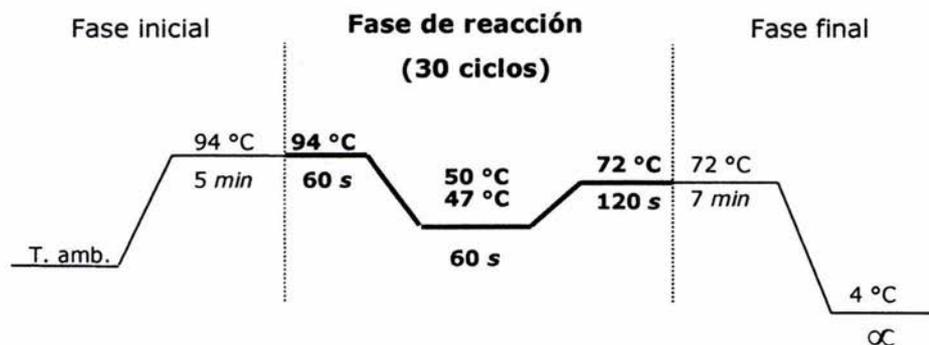
Para evaluar la calidad y la cantidad de ADN extraído se realizó una electroforesis, 5  $\mu$ L de cada muestra de ADN se cargaron en un gel de agarosa al 0.8% (Research Organics®), con 0.5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio (Research Organics®), sumergido en buffer 1X de Tris-Boratos-EDTA (TBE). El gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta MacroVue UVis-20 (Hoefer®) para visualizar las bandas de ADN.

#### **4.3.2 Amplificación del gen *emm*.**

La amplificación del gen *emm* se realizó a partir del ADN extraído de cada cepa mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por

sus siglas en inglés) que consta de 30 ciclos de reacción, cada uno de los cuales está formado por tres etapas: desnaturalización, alineamiento y elongación. Dicha reacción se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®).

La etapa de desnaturalización, consiste en abrir de la doble cadena del ADN se realizó a 94°C por un minuto; para la etapa de alineamiento, se desciende la temperatura a 50°C por un minuto permitiendo que los primers o iniciadores reconozcan su secuencia complementaria en el ADN y finalmente en la etapa de elongación se incrementa la temperatura a 72°C por dos minutos para que la enzima polimerasa sintetice el ADN. Una vez que se han completado 30 ciclos de reacción, la temperatura disminuye a 4°C para detener la reacción (figura 4.2).



**Figura 4.2** Diagrama de temperaturas empleadas en la PCR

La mezcla de reacción para la amplificación del gen *emm* debía ser un

volumen suficiente, pues el producto que se obtuvo fue sometido a corrimiento electroforético y a digestión enzimática, por lo que se empleó un volumen de reacción de 50  $\mu\text{L}$ ; la composición de reactivos que se utilizaron por tubo (muestra) se detalla en la tabla 4.2.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	
	A	B
Agua Ultrapura	19.43	33.8
Deoxinucleosidos Trifosfatados (dNTP's) (Applied Biosystems®) Solución 10mM de cada dNTP	5.0	8.0
Buffer para PCR con $\text{MgCl}_2$ 1.5mM (Roche®)	3.0	5.0
Primer "Forward" 10mM	0.6	1.0
Primer "Reverse" 10mM	0.6	1.0
Adyuvante: DMSO (Pharmacia Biotec®) o Glicerol (Stratagen®)	0.2	-
ADN de la muestra	1.0	1.0
Taq DNA-Polimerasa 5U/ $\mu\text{L}$ (Roche®)	0.17	0.2

**Tabla 4.2** Composición de la mezcla de reacción para la PCR. **A.** Para las reacciones con volumen final de 30  $\mu\text{L}$ . **B.** Para las reacciones con volumen final de 50  $\mu\text{L}$ .

La secuencia nucleotídica de los primers utilizados para la amplificación del gen *emm* se muestra en el apéndice I.

Para observar los productos de la PCR, se realizó un corrimiento electroforético de las muestras junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®) en un gel de agarosa (Research Organics®) al 1.5% en buffer de TBE 1X. Al gel se agregó bromuro de etidio (Research Organics®) como revelador, para observar las bandas de ADN resultantes cuando se hace incidir sobre el gel luz ultravioleta en un transiluminador.

El tamaño del producto de la PCR para este gen varía de 800 a 1600 pb; para determinarlo, se tomó una fotografía digital del gel, la cual se analizó con el software Kodak® 1D 3.5v con el que se determinó el peso molecular de cada una de las bandas presentes en el gel.

#### **4.3.3 Determinación del genotipo *sic*, *sof*, *speA* y *speC*.**

Con la finalidad de caracterizar a *Streptococcus pyogenes* se exploraron los genes *sic* (que codifica para la proteína estreptocócica que inhibe el complemento); *sof* (que codifica para el factor de opacidad del suero) y *speA* y *speC*, (que codifican para las exotoxinas pirogénicas A y C respectivamente) ya que la presencia o ausencia de estos genes puede estar relacionada con el tipo M de la cepa y que se asocian a la virulencia de esta bacteria<sup>(9, 43)</sup>.

Dado que en esta prueba sólo interesa establecer la presencia o ausencia estos genes, el producto que se obtuvo de la reacción fue de un volumen de mezcla de reacción menor (30  $\mu$ L) y en el caso de *sic* y *sof*, se amplificaron juntos en una misma PCR, pues se cuenta con una técnica estandarizada para ello<sup>(43)</sup>.

Las condiciones de amplificación utilizadas fueron similares a las empleadas para amplificar el gen *emm*. Las diferencias radicarón en la variación de la temperatura de alineamiento, la cual fue de 47°C y la adición de adyuvantes a la mezcla de reacción de la PCR, como Dimetil Sulfóxido (DMSO) y glicerol que permitió una amplificación exitosa y un mayor rendimiento. La composición general de las mezclas de reacción empleadas para determinación del genotipo *sic*, *sof*, *speA* y *speC* se describe en la tabla 4.2 y la secuencia de los primers usados para cada gen pueden consultarse en el apéndice I.

Para observar el resultado de la PCR, todas las muestras se sometieron a una electroforesis bajo las mismas condiciones descritas para el gen *emm*. Los pesos moleculares de los productos de PCR esperados fueron de entre 900 y 1200 pb para *sic*; alrededor de 800 pb para *sof*; 800 pb para *speA* y 600 pb para *speC*. Debido a que estos genes no son constitutivos, para considerar válidos los resultados obtenidos en cada

PCR, se emplean controles de reacción tanto positivos como negativos.

#### 4.3.3.1 Clasificación preliminar de las cepas.

Para facilitar el proceso de tipificación se formaron dos grupos, el grupo con genotipo *sof* positivo y el grupo con genotipo negativo; cada grupo se ordenó en forma creciente con respecto al tamaño molecular del producto de amplificación del gen *emm* y se procedió a realizar la digestión enzimática.

#### 4.3.4 Digestión enzimática del producto de la PCR del gen *emm*.

La digestión enzimática se realizó empleando la enzima de restricción *DdeI* (Invitrogen®), que corta el ADN cuando reconoce la secuencia 5'-C↓TNAG-3' (donde N puede ser cualquiera de los cuatro nucleótidos comunes). La composición de la mezcla de reacción que se empleó se describe en la tabla 4.3.

Reactivo	Volumen (μL)
Enzima <i>DdeI</i>	0.2
Buffer REACT® 3 (Invitrogen®)	4.0
Amplificado del gen <i>emm</i>	35.8

**Tabla 4.3** Composición de la mezcla de reacción empleada para la restricción enzimática del producto de la PCR del gen *emm*.

Los tubos de reacción, se incubaron a 37°C por al menos 2 horas. Para observar el resultado de la digestión enzimática, se realizó un corrimiento electroforético de las muestras en gel de agarosa 1000 (Invitrogen®) al 2.5%, en el que se cargó todo el contenido de cada tubo (40 µL) en cada pozo, respetando el orden de la clasificación preliminar y usando un marcador de peso molecular de 50 pb (Fermentas®); posteriormente se analizó el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) resultante tomando para ello una fotografía digital del gel, y obteniendo el peso molecular de las bandas generadas en cada carril.

#### **4.3.5 Identificación de las cepas M1 (*emm1*).**

Para identificar las cepas M1 (*emm1*), protagonistas de este trabajo, se consideraron varios parámetros; primero, las cepas M1 se encuentran dentro del grupo con genotipo *sof* negativo<sup>(9)</sup> y además poseen genotipo *sic* positivo<sup>(43)</sup>; segundo, el peso molecular del producto de la PCR del gen *emm1* (proteína M1) es de aproximadamente 1200 pb<sup>(16)</sup> y finalmente el que nos define el tipo M, el análisis del RFLP resultante de la digestión enzimática, el cual presenta un patrón característico de 6 bandas bien definidas de 270, 200, 180, 145, 55 y 30 pb. y que corresponde con el obtenido para la cepa M1 de referencia, la cual fue sometida a la misma metodología de tipificación, confirmando el

serotipo y patrón de RFLP mediante el análisis de su secuencia<sup>(16)</sup>.

#### **4.4 Caracterización molecular y Subtipificación de las cepas M1 (*emm1*).**

Una vez que se identificaron las cepas M1 (*emm1*), se procedió con su caracterización y subtipificación molecular, analizando las secuencias nucleotídicas de los genes *emm1*, *sic*, *speA* y *speC*.

##### **4.4.1 Amplificación de los genes *emm1*, *sic*, *speA* y *speC*.**

Fue necesario obtener los productos de amplificación de cada gen para llevar a cabo la reacción de secuenciación, por lo que se procedió a amplificarlos mediante la PCR bajo las condiciones descritas con anterioridad empleando un volumen final de reacción de 50  $\mu$ L (tabla 4.2) y el resultado se observó mediante una electroforésis.

##### **4.4.2 Purificación de los productos de la PCR de los genes *emm1*, *sic*, *speA* y *speC*.**

Con la finalidad de facilitar el proceso de secuenciación, y obtener una secuencia fidedigna, se eliminaron del producto de PCR todas las impurezas remanentes del proceso de amplificación, como restos de desorribonucleótidos y otros reactivos que se emplean en la PCR, así como, amplificados inespecíficos o incompletos del gen, mediante el uso

---

---

del kit comercial Microcon<sup>®</sup> de Millipore<sup>®</sup>, que consiste en columnas que contienen una membrana que impide el paso de moléculas grandes de ADN (por arriba de 100,000 Da). La metodología de purificación se describe a continuación:

1. Colocar cada columna sobre un tubo de colecta y agregar 370  $\mu\text{L}$  de agua estéril desionizada, sin tocar la membrana de la columna
2. Agregar el producto de PCR a la columna incorporarlo suavemente con una micropipeta.
3. Centrifugar a 2500 rpm durante 14 minutos. Eliminar el filtrado.
4. Transferir la columna a un tubo nuevo de colecta y agregar a la columna 390  $\mu\text{L}$  de agua estéril desionizada evitando tocar la membrana de la columna.
5. Centrifugar a 2500 rpm durante 14 minutos y eliminar el filtrado.
6. Invertir cuidadosamente las columnas en un nuevo tubo de colecta y centrifugar a 10000 rpm durante 3 minutos.
7. El líquido colectado es el producto purificado. Puede agregarse agua ultrapura estéril para obtener un volumen final aproximado de 30  $\mu\text{L}$ .

La evaluación del proceso de purificación se realizó mediante una electroforésis de los productos de la PCR purificados utilizando el marcador de peso molecular Low DNA Mass (Invitrogene<sup>®</sup>) con el cual,

es posible calcular el peso molecular y la cantidad aproximada de ADN de cada banda.

#### **4.4.3 Secuenciación de los productos de la PCR de los genes *emm1*, *sic*, *speA*, *speC*.**

Los productos de la PCR purificados, fueron enviados al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, donde se secuenciaron en un equipo automatizado ABI-3100 de Applied Biosystems®.

Las muestras fueron secuenciadas empleando los primers especificados en la tabla 4.4. Las secuencias nucleotídicas de ellos se pueden consultar en el apéndice I.

<b>Gen</b>	<b>Primer(s)</b>
<i>emm</i>	<i>emm1A</i>
<i>sic</i>	<i>sic1</i> , <i>sic3*</i> y <i>sic4*</i>
<i>speA</i>	<i>speA1</i>
<i>speC</i>	<i>speC1</i>

**Tabla 4.4** Primers empleados en las reacciones de secuenciación. (\*) Se emplearon para secuenciar la totalidad del gen *sic*.

El resultado de las secuencias se obtuvo mediante un electroferograma de la reacción de secuenciación (figura 5.10) así como la secuencia

nucleotídica en un archivo electrónico (figura 5.11).

#### **4.4.4 Análisis de las secuencias.**

Cada secuencia electrónica se compara con su respectivo electroferograma, con la finalidad de resolver y editar ambigüedades que pudiesen presentarse en la secuencia electrónica, empleando para ello el software EditSeq<sup>®</sup> (DNASTAR<sup>®</sup> Madison Wis).

La primera estrategia que se empleó fue comparar las secuencias entre sí, buscando similitudes y/o diferencias entre ellas. Lo anterior se hizo empleando el software MegAlign<sup>®</sup> (DNASTAR<sup>®</sup> Madison Wis), que permite bajo dos diferentes algoritmos (Clustal V y Clustal W), un alineamiento de las secuencias, presentando el resultado con un código de colores en el que cada color corresponde a un porcentaje de similitud u homología entre las secuencias; además en este paso fue posible identificar mutaciones en los genes, desde simples sustituciones nucleotídicas, hasta inserciones o deleciones de varios pares de bases (fig 5.11).

Los grupos de secuencias homólogas, se compararon con las secuencias publicadas en el GenBank y en artículos especializados, logrando una subtipificación al establecer el alelo correspondiente para cada grupo.

#### **4.4.4.1 Gen *emm1***

El análisis de la secuencia del gen *emm1* comprendió toda la región variable de alrededor de 330 pares de bases. Este análisis se realizó comparando la secuencia de 110 aminoácidos resultantes de la traducción de la secuencia nucleotídica del gen *emm1*; cada uno de los grupos obtenidos en los alineamientos del gen *emm1*, fue traducido y comparado con la secuencia de aminoácidos de los 37 alelos reportados para la proteína M1<sup>(24, 26, 37)</sup> para así poder asignar el alelo correspondiente a cada grupo.

#### **4.4.4.2 Gen *sic***

Debido a que este gen presenta polimorfismo en prácticamente toda su extensión, se secuenció en dos e incluso tres partes, empleando para ello primers internos (figura 3.6), obteniendo dos o tres secuencias para cada muestra. Para tener la secuencia completa del gen se traslaparon las secuencias mencionadas empleando los programas EditSeq<sup>®</sup> y MegAlign<sup>®</sup> (DNASTar<sup>®</sup> Madison Wis).

Las secuencias completas del se alinearon y compararon, tomando como referencia la primera secuencia descrita para este gen de la cepa AP1<sup>(1)</sup> y que se encuentra publicada en el GenBank<sup>®</sup> con el número de acceso X92968. Con base a las diferencias y/o similitudes con la secuencia de

referencia, se formaron grupos de secuencias homólogas denominados arbitrariamente con las letras del alfabeto.

La secuencia nucleotídica de cada uno de los grupos obtenidos experimentalmente fue comparada con las secuencias que se encuentran publicadas para este gen en el GenBank® con números de acceso del *AF232306* al *AF232601*, con lo que fue posible la asignación del alelo de *sic* correspondiente a cada grupo.

Cuando la secuencia del gen *sic* no coincidió con alguna de las publicadas en el Gen Bank® se solicitó la colaboración del grupo de investigación de Nancy P. Hoe (NIAID NIH, Montana, E.U.) para la asignación del alelo correspondiente.

#### **4.4.4.3 Genes *speA* y *speC***

Las secuencias nucleotídicas de los genes *speA* y *speC*, de las cepas clínicas fueron alineadas entre sí y con las diferentes secuencias de los alelos reportados para cada gen con el software MegAlign® (DNASTar®), la asignación del alelo correspondiente se realizó a través de la comparación entre las secuencias clínicas y las publicadas para estos genes en la literatura (figuras 3.8 y 3.9)<sup>(6, 27, 39)</sup>.

#### **4.4.5 Amplificación de la Secuencia de Inserción *IS1562*.**

Debido a que en las cepas M1 la secuencia de inserción *IS1562* se encuentra dentro del regulón Mga junto al gen *sic*<sup>(4, 22)</sup> y que es posible que ambos genes formen parte de un transposón compuesto, esta IS se exploró en un porcentaje representativo de las cepas M1 mediante la PCR empleando los primers *IS1562F* y *IS1562R* diseñados con base a estudios previos<sup>(4)</sup> y cuya secuencia puede consultarse en el apéndice I.

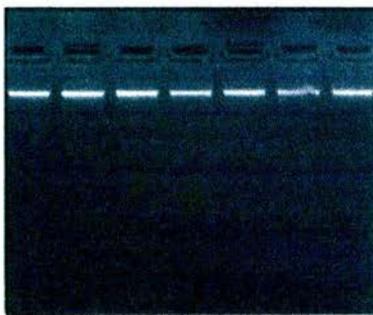
Las condiciones empleadas para la amplificación de la IS son las indicadas para las reacciones con volumen de 30  $\mu$ L (tabla 4.2). El resultado se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, según lo descrito con anterioridad.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Tipificación por *emm* de *Streptococcus pyogenes*.

#### 5.1.1 Aislamiento del ADN.

La técnica de extracción del ADN utilizando el Kit DNeasy<sup>®</sup> ha demostrado alta eficiencia en la obtención de ADN con muy buen rendimiento y en muy buenas condiciones; la integridad y pureza del ADN extraído se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa, una fotografía digital del mismo se presenta en la figura 5.2.



**Figura 5.2** Corrimiento electroforético del ADN extraído de las cepas clínicas con el kit DNeasy<sup>®</sup> Tissue de QIAGEN<sup>®</sup>. Se cargaron 5  $\mu$ L de ADN en cada pozo. Obsérvese que no se presentan impurezas evidentes.

Otra de las ventajas que se ha observado al emplear el kit de QIAGEN<sup>®</sup>

es la estabilidad que brinda al ADN, pues es posible conservarlo en congelación (a -72°C) por varios años, lo que ha permitido al laboratorio contar con una colección de ADN desde hace 5 años.

### **5.1.2 Amplificación del gen *emm*.**

El producto de la PCR del gen *emm* presentó variaciones en el tamaño molecular, las cuales se evidenciaron al realizar el corrimiento electroforético (figura 5.3). Esta variación entre 800 y 1600 pb, está relacionada con las diferencias en el número y tamaño de los bloques de repetición de la porción del gen que codifica para la región A de la proteína M, y se ha reportado que estas diferencias están en función del tipo de proteína M que codifique el gen.

Dado que en *Streptococcus pyogenes* el gen *emm* es constitutivo, un resultado negativo en la amplificación del mismo, no representa su ausencia dentro del genoma, sino que es atribuible a deficiencias en el proceso de amplificación, particularmente en la etapa de alineamiento, que está relacionada con la temperatura óptima a la cual se favorece el alineamiento de los primers. Cuando no se logró la amplificación del gen *emm*, o se obtuvo un bajo rendimiento, se emplearon estrategias de optimización de la PCR que incluyeron la disminución de la temperatura de alineamiento, la cual se redujo hasta 35°C dando resultados

satisfactorios, con un buen rendimiento y ausencia de amplificadores inespecíficos; o mediante el empleo de adyuvantes como DMSO al 5% v/v o un exceso de  $MgCl_2$ . El empleo de cualquiera de estas estrategias o la combinación de ellas permitió la adecuada amplificación del gen *emm* para su posterior digestión enzimática.



**Figura 5.3** Electroforesis de los productos de la PCR del gen *emm*. En el carril PM se cargaron 4  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogene®) y en los carriles 1 al 17 se cargaron 5  $\mu$ L de los productos de la amplificación del gen *emm* de las cepas clínicas. Nótese la variación en el tamaño molecular de los productos.

Los problemas de amplificación y el bajo rendimiento de la reacción de la PCR pudieron ser consecuencia de la poca afinidad de los primers utilizados con alguno de los varios alelos que presentan los más de 120 serotipos descritos o alguna deficiencia en la mezcla de la reacción.

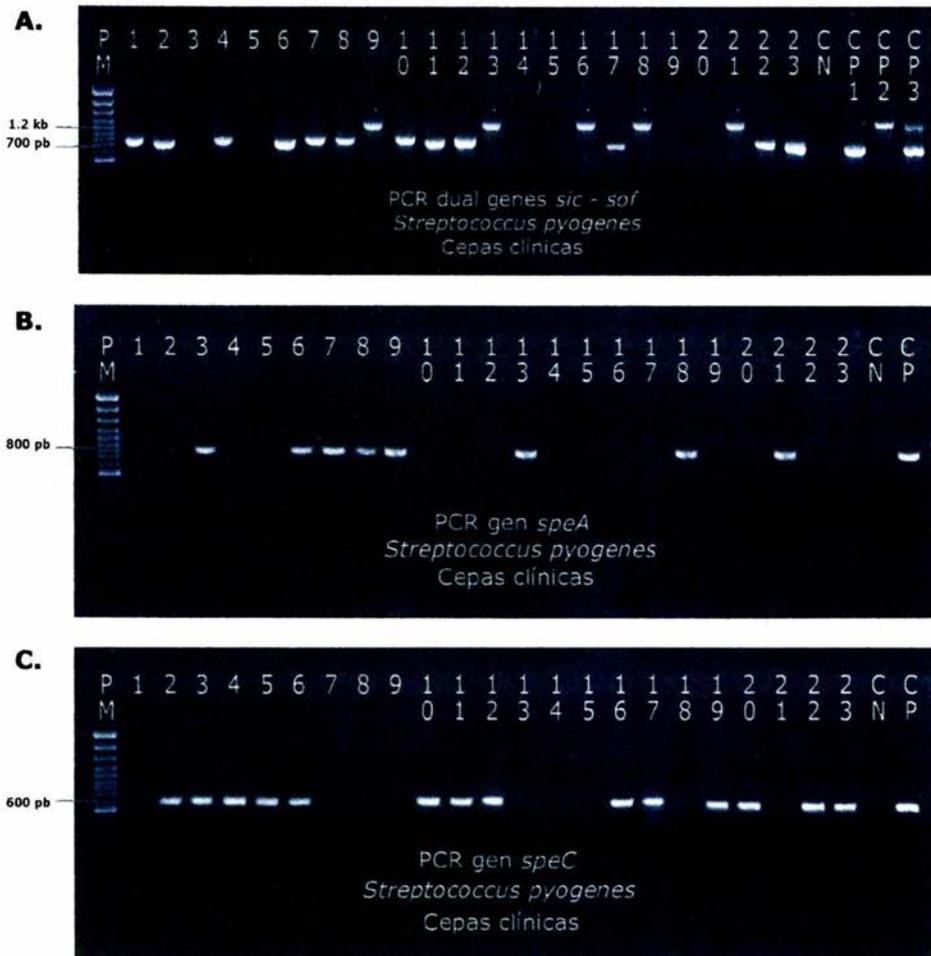
### **5.1.3 Determinación del genotipo *sic*, *sof*, *speA* y *speC*.**

A todas las cepas de *Streptococcus pyogenes* se les determinó la prevalencia de los genes *sic*, *sof*, *speA* y *speC* mediante la PCR. El resultado se observa mediante el análisis digital de la fotografía del gel de electroforesis obtenido para cada reacción (figura 5.4).

Se ha reportado que el gen *sic* se encuentra restringido a los serotipos M1 y M57<sup>(1)</sup>, sin embargo, la incidencia del serotipo M57 es muy baja, de hecho dentro de las más de 600 cepas que se han tipificado en el laboratorio, no se ha encontrado ninguna de dicho serotipo, de tal forma que la amplificación de este gen ha resultado ser un indicador del serotipo M1. El análisis de la prevalencia del gen *sof*, permite una clasificación sistemática de las cepas cuya utilidad se observa en los geles resultantes del corrimiento electroforético, pues observamos que varias muestras que presentan el mismo patrón de corte quedan juntas en un mismo gel (figura 5.5), lo que facilita en gran medida la identificación del tipo M (*emm*)<sup>(16)</sup>.

No existe evidencia documentada de la relación entre la presencia de los genes *speA* y *speC* y el serotipo M de la bacteria, debido quizá a que estos genes son conferidos al EGA mediante fagos lisogénicos. Sin embargo, la producción de las exotoxinas pirogénicas es comúnmente

---



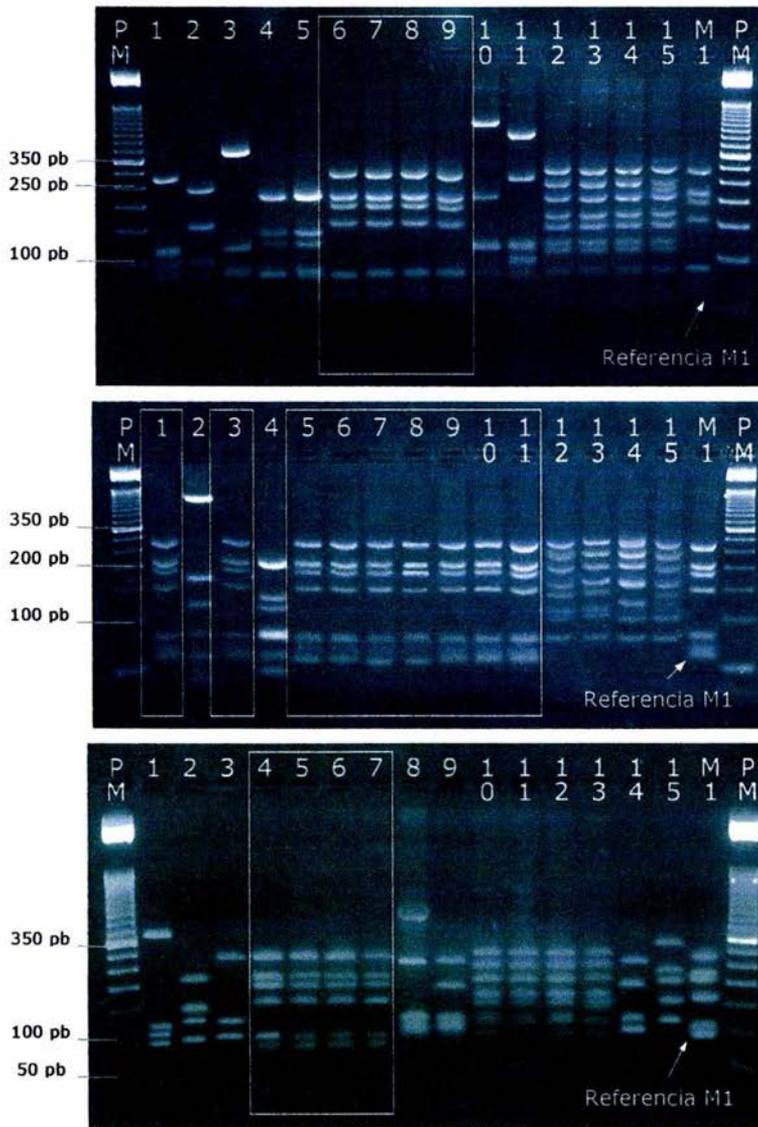
**Figura 5.4** Corrimientos electroforéticos de los productos de PCR. Para todos PM representa el Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Invitrogene®), los números 1-23 son muestras clínicas, CN es el control negativo y CP es el control positivo del gen correspondiente **A.** PCR dual genes *sic* y *sof*. CP1 es control positivo para *sof*, CP2 es control positivo para *sic* y CP3 es control positivo para ambos genes; nótese el patrón excluyente de estos genes. **B.** PCR gen *speA*. **C.** PCR gen *speC*. Obsérvese que la incidencia de *speA* es menor que la de *speC*.

asociada a cuadros clínicos severos y mediante el análisis realizado a las cepas clínicas recibidas en el laboratorio se han podido hacer hallazgos importantes, por ejemplo se ha observado que en algunos serotipos predomina uno de los dos genes, como el tipo M1 que presenta una marcada prevalencia del gen *speA*, mientras en los tipos M6 y M12 predomina el gen *speC*; o bien, ambos genes coexisten dentro del genoma de la bacteria, como en el caso de las cepas M3.

#### **5.1.4 Identificación de las cepas M1 (*emm1*) de *Streptococcus pyogenes*.**

Mediante el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y su comparación con las cepas de referencia, fue posible determinar las cepas que pertenecen al tipo M1 (*emm1*) (Figura 5.5) así como, la tipificación de todas las cepas que se sometieron a la digestión enzimática.

Como puede observarse en la figura 5.5, igual que la genotipificación por *sof* también resulta útil el conocimiento del genotipo *sic* y el tamaño molecular del amplificado del gen *emm*, ya que facilitan el proceso de tipificación obteniéndose varias muestras con el mismo patrón de corte.



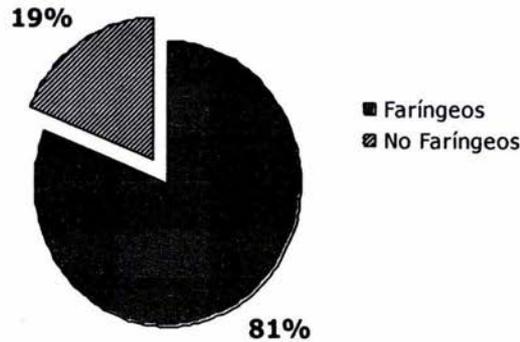
**Figura 5.5** Ejemplos de RFLP's de los productos de la PCR del gen *emm* cortados con la enzima *DdeI*. Los patrones de corte pertenecientes a las cepas M1 (*emm1*) se encuentran enmarcados y corresponden al observado para la cepa M1 de referencia; 1-15 son diferentes cepas probadas.

Los resultados obtenidos para la tipificación por M (*emm*) de las cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* respaldan la validez y eficiencia de la técnica de tipificación, ya que además de lograr una diferenciación entre los tipos M (tipo *emm*) se demuestra que esta técnica correlaciona con la clasificación serológica basada en las diferencias antigénicas de la proteína M, lo cual ya ha sido comprobado mediante la secuenciación de los productos de amplificación del gen *emm* en un trabajo previo<sup>(16)</sup>.

El serotipo M1 sigue encontrándose dentro de los más prevalentes; del total de cepas tipificadas en el presente trabajo el 19.6% resultó ser de este serotipo, siendo rebasado solo por el serotipo M12 por poco menos de un punto porcentual, el cual sin embargo no se ha visto involucrado en episodios invasivos, a diferencia del serotipo M1, que comúnmente se relaciona a cuadros clínicos de tipo invasivo<sup>(9, 24, 25)</sup>.

## **5.2 Caracterización Molecular y Subtipificación de las cepas M1 (*emm1*).**

De las 101 cepas estudiadas de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1, el 81% provienen de cuadros faríngeos y el 19% restante de cuadros no faríngeos (figura 5.6), que incluyen hemocultivos, secreciones y biopsias.



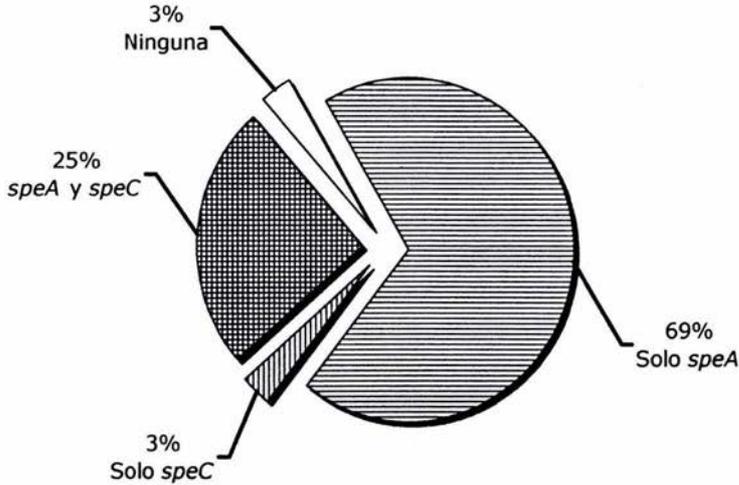
**Figura 5.6** Distribución de las cepas de *Streptococcus pyogenes* tipo M1 de acuerdo al origen clínico

Las cepas del tipo M1 provenientes de cuadros no faríngeos representaron el 42% de la totalidad de las cepas aisladas de sitios diferentes a la faringe que han sido enviadas para su tipificación al laboratorio, lo que nos habla de la fuerte asociación del serotipo M1 con estas entidades clínicas así como de la capacidad de colonización y la virulencia que presentan.

### **5.2.1 Prevalencia de los genes *speA* y *speC* en las cepas M1 de *Streptococcus pyogenes*.**

Mientras que en el 94% de las cepas estudiadas se detectó la presencia del gen *speA*, el gen *speC* se encontró sólo en el 28%, el 25% de las cepas presentó ambos genes y en el 3% de las mismas ninguno de

estos genes fue detectado (figura 5.7).



**Figura 5.7** Prevalencia de los genes *speA* y *speC* en las cepas de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1.

No se observó ninguna relación entre la presencia de alguno o ambos genes y el cuadro clínico del que fueron aisladas las cepas, pero se observa una predominancia del gen *speA* sobre el gen *speC* en este serotipo; además la presencia de *speC* se encuentra prácticamente ligada a la presencia de *speA*, pues es muy bajo el porcentaje de cepas que sólo presenta *speC* dentro de su genoma (3%).

La asociación del gen *speA* y el serotipo M1 es histórica, pues se encuentra documentada su elevada prevalencia en cepas recuperadas

de brotes de fiebre escarlatina desde la década de los 20's, siendo asociada la producción de SPEA a las manifestaciones clínicas de la enfermedad<sup>(49)</sup>. Sin embargo existen pocos datos acerca de *speC* y su relación con el serotipo M1, debido quizá a la baja incidencia de este gen en cepas con este serotipo<sup>(6,27)</sup> o a la dificultad que representa trabajar experimentalmente con el producto de este gen, por su baja producción, estabilidad y pobre inmunogenicidad<sup>(49)</sup>.

Las ausencia de los genes *speA* y *speC* en las cepas estudiadas (3%), podría estar indicando la participación de superantígenos como el factor mitogénico y el superantígeno estreptocócico en el proceso infeccioso, otros factores de virulencia o bien, la presencia de factores predisponentes del huésped.

### **5.2.2 Incidencia de *IS1562* en cepas M1 de *Streptococcus pyogenes*.**

En estudios previos<sup>(4, 22)</sup> se demostró que en las cepas M1, *IS1562* se encuentra localizada dentro del regulón Mga de virulencia, además se estableció la posibilidad de que este elemento móvil puede estar involucrado en el acarreo de genes al genoma de esta bacteria<sup>(4)</sup>; resultados preliminares de un trabajo que se encuentra en proceso muestran la presencia de la secuencia de inserción *IS1562* en otros

tipos M, lo que pone en evidencia la facilidad de diseminación de ésta dentro del EGA.

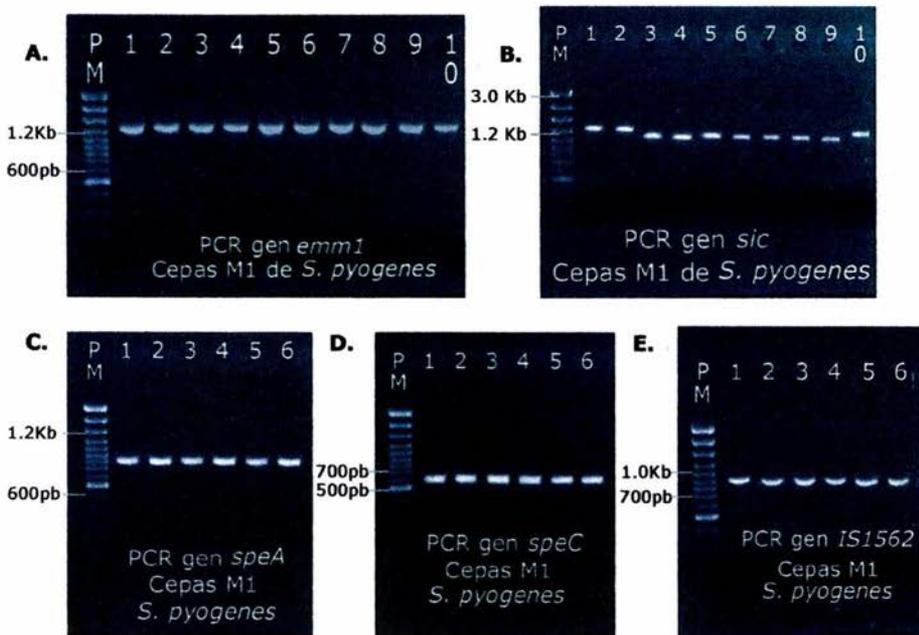
La presencia de *IS1562* en las cepas M1 analizadas fortalece la teoría de que esta secuencia junto con el gen *sic* pueden formar parte de un transposón compuesto, que de la misma forma en que se incorporó en las cepas M1, puede llegar a otros serotipos favoreciendo el intercambio de genes que se encuentran involucrados en la virulencia de la bacteria.

### **5.2.3 Secuenciación de los productos de la PCR de los genes *emm1*, *sic*, *speA* y *speC*.**

La caracterización molecular de las cepas de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1 incluyó también el análisis de la secuencia de los genes *emm*, *sic*, *speA* y *speC*. Para lo cual fue necesario amplificar nuevamente dichos genes, en la figura 5.8 se muestran los corrimientos electroforéticos de los productos de las PCR's de los genes que se estudiaron para las cepas del serotipo M1.

Como se esperaba, el tamaño molecular de los productos de amplificación de los genes *emm1*, *speA* y *speC* es conservado, ya que las mutaciones que generan la variación alélica no resultan en alteraciones representativas en el tamaño molecular de estos genes y

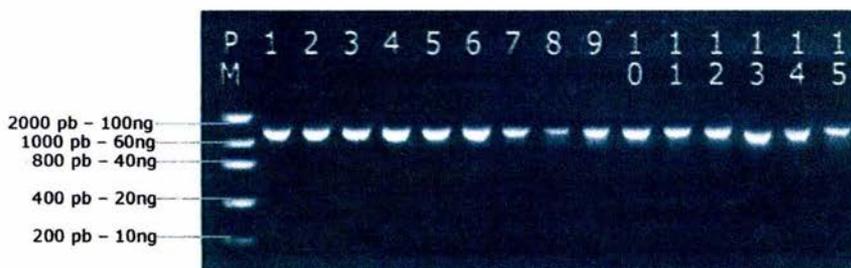
por consiguiente tampoco en el producto de amplificación. Sin embargo, se observó variación en el tamaño del gen *sic*, debido a la gran cantidad de mutaciones que presenta, como inserciones y deleciones que en conjunto alteran sustancialmente el tamaño molecular del gen y del producto de amplificación resultante, lo cual se manifiesta en el corrimiento electroforético (figura 5.8B).



**Figura 5.8** Ejemplos corrimientos electroforéticos de los productos de la PCR de los genes **A.** *emm1*, **B.** *sic*, **C.** *speA*, **D.** *speC* y **E.** *IS1562* de las cepas M1. PM es el Marcador de Peso Molecular de 100pb (Invitrogen®). Nótese que la homogeneidad en el tamaño molecular no se cumple para *sic*, debido a la gran variabilidad del mismo.

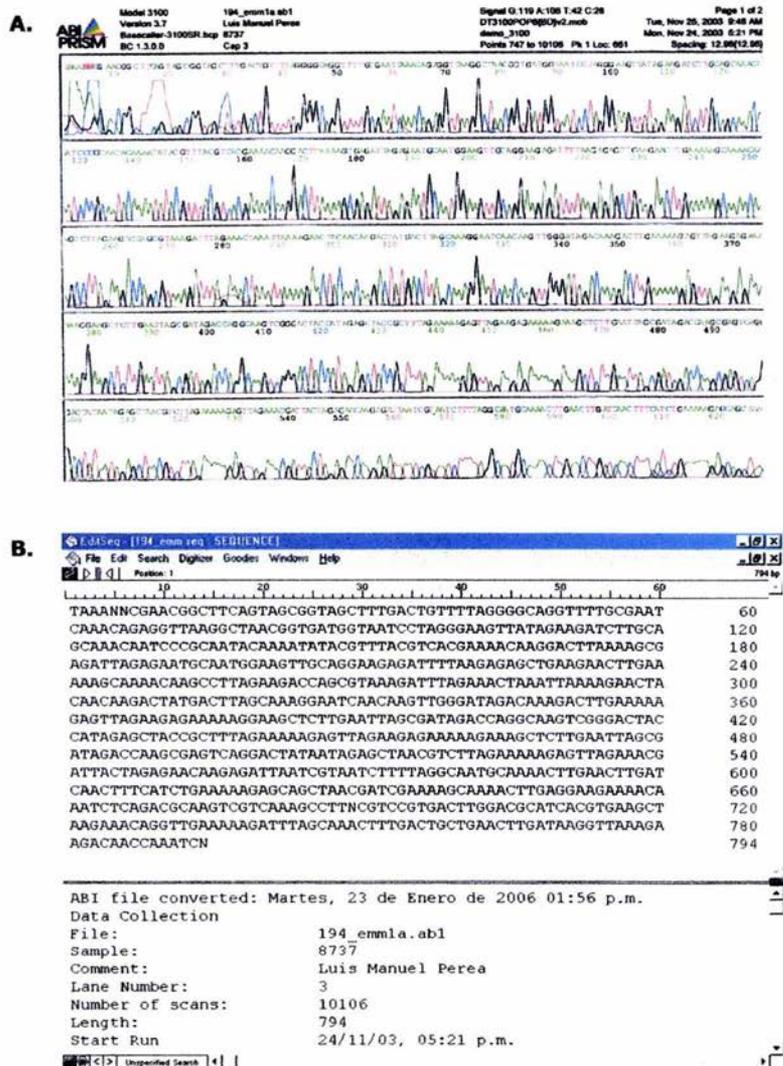
La obtención de una secuencia fidedigna y confiable representó parte fundamental de este trabajo, ya que con base al análisis de las mismas se caracterizan molecularmente y se subtipifican las cepas del tipo M1; por lo que para facilitar y optimizar el resultado del proceso de secuenciación los productos de la PCR fueron purificados antes de secuenciarse.

En el corrimiento electroforético (figura 5.9) puede observarse la pureza de los amplificados y además es posible determinar la cantidad de ADN amplificado en la muestra así como corroborar el tamaño molecular del mismo, datos indispensables para el proceso de secuenciación.



**Figura 5.9** Corrimiento electroforético de los productos de amplificación purificados del gen *emm1* (1-15); PM es el marcador de peso molecular Low DNA Mass (Invitrogene®)

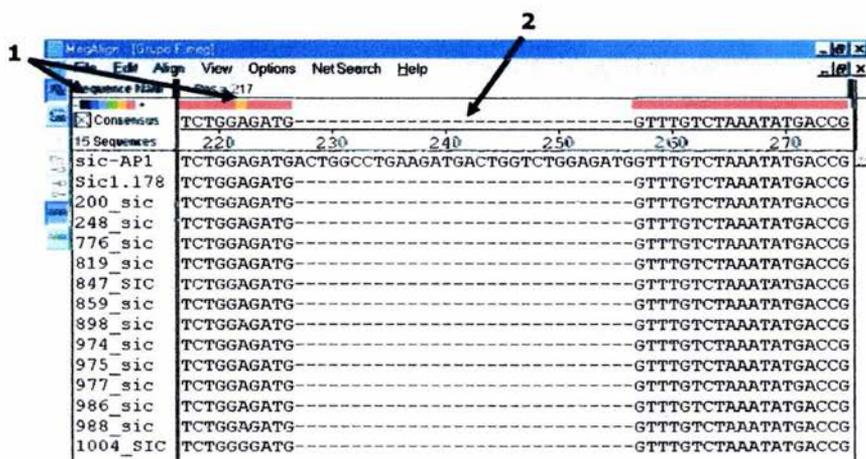
Como resultado del proceso de secuenciación se obtuvo un electroferograma y la secuencia electrónica correspondiente para cada muestra (figura 5.10).



**Figura 5.10 A.** Electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *emm1* con el primer *emm1A* **B.** Imagen del software EditSeq® (DNStar®) con el que es posible editar el archivo electrónico de la secuencia correspondiente al electroferograma mostrado en **A.**

## 5.2.4 Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias se realizó mediante el alineamiento de las mismas, primero entre si y después con alguna de referencia para cada gen con la finalidad de identificar o asignar el alelo correspondiente. En la figura 5.11 se observa una imagen del software MegAlign® (DNASTar®) con el que mediante diferentes algoritmos de alineamiento se identifican las mutaciones que generan la diversidad alélica de cada gen estudiado.



**Figura 5.11** Imagen del software MegAlign® (DNASTar®) mediante el cual es posible observar el grado de homología entre las secuencias. **1.** Código de colores que representa el grado de homología entre las secuencias alineadas, donde rojo es el 100% y negro el 0%. **2.** Identificación de una deleción después del alineamiento de secuencias del gen *sic* junto con la secuencia SIC-AP1 empleada como referencia.

**5.2.4.1 Gen *emm1*.**

Siete alelos del gen *emm1* fueron identificados en las 101 cepas del tipo M1 de *Streptococcus pyogenes* estudiadas. El alelo *emm1.0* fue el más abundante con cerca del 90% de los aislamientos, los alelos *emm1.5* y *emm1.24* fueron reconocidos con un aislamiento cada uno.

Cuatro nuevos alelos (no reportados con anterioridad) fueron identificados en un total de nueve aislamientos (figura 5.12). A los cuatro nuevos alelos se les asignaron los números *emm1.38*, *emm1.39*, *emm1.40* y *emm1.41*, respetando la continuidad en la numeración de los alelos reportados previamente en la literatura<sup>(24, 25, 37)</sup> (figura 3.5).

Alelo	30	41	99	No. Cepas
<i>emm1.0</i>	V I E D L A A N N P	N I	D L E T K L K E L	90
<i>emm1.5</i>	. . . <b>G</b> . . . . .	. .	. . . . .	1
<i>emm1.24</i>	. <b>V</b> . . . . .	. .	. . . . .	1
<i>emm1.38*</i>	. . . . .	. <b>M</b> . . . . .	. . . . .	3
<i>emm1.39*</i>	. . . . . - - <b>D</b> . . . . .	. . . . .	. . . . .	1
<i>emm1.40*</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . . <b>Q</b> . . . . .	4
<i>emm1.41*</i>	. . . . .	. . . . .	<b>G</b> . . . . .	1

**Figura 5.12** Alineamiento parcial de la porción N-terminal de la secuencia de aminoácidos inferida de los alelos identificados para el gen *emm1*. [\*] Representan los alelos no reportados con anterioridad. Se encuentran sombreadas las mutaciones que generaron los alelos encontrados que difieren del *emm1.0*.

Para los alelos *emm1.38*, *emm1.40* y *emm1.41* se detectaron sustituciones de un nucleótido que resultan en el cambio de un aminoácido al traducir a la proteína M1; en la posición 41 (I→M) para *emm1.38*; en la posición 98 (E→Q) para *emm1.40* y en la posición 91 (D→G) para *emm1.41*; mientras que para *emm1.39* se detectó una delección de 6 pb que resulta en la pérdida de 2 aminoácidos en la posición 30 y una sustitución de un nucleótido que genera un cambio en el aminoácido de la posición 32 (N→D) de la proteína M1 (figura 5.12).

La delección identificada para el alelo *emm1.39* es interesante, pues este tipo de mutaciones se observan con baja frecuencia en este gen (figura 3.5), ya que 31 de los 37 alelos reportados fueron generados por sustituciones nucleotídicas que producen el cambio de un solo aminoácido; otros 2 alelos se generaron por sustituciones nucleotídicas no contiguas que derivan en el cambio de más de un aminoácido; y sólo 4 alelos son los que se generan por mutaciones que involucran inserciones o deleciones de varios pares de bases (figura 3.5). Además las sustituciones nucleotídicas que se presentan en los alelos *emm1.40* y *emm1.41* se encuentran en una región donde se reportan pocas mutaciones para este gen, en particular el alelo *emm1.40* que se identificó en 4 aislamientos (figura 5.12).

A pesar de las más de 30 variantes alélicas reportadas para la proteína M1, el alelo *emm1.0* siempre resulta ser predominante<sup>(25, 37)</sup>, lo que coincide con los resultados de este trabajo; por lo que pareciese que dicho alelo representa el antecesor común a partir del cual se generan el resto de las variantes; por otro lado el reconocimiento de cuatro alelos no reportados con anterioridad indica la posibilidad de contar con alelos restringidos geográficamente, que se generaron a partir del antecesor común de acuerdo a la interacción con el hospedero. Un análisis más extenso de aislamientos de este serotipo en nuestra población puede confirmarnos esta teoría.

Todos los nuevos alelos encontrados para el gen *emm1* provienen de muestras de origen faríngeo por lo que es importante mantener una vigilancia sobre su origen y la diseminación de los mismos.

#### **5.2.4.2 Genes *speA* y *speC*.**

Todos los aislamientos analizados para *speA* mostraron la presencia del alelo *speA2*, que es consistente con lo reportado en la literatura<sup>(6, 39)</sup> y con las evidencias que sustentan un cambio evolutivo del gen de las cepas M1 de *Streptococcus pyogenes* manifestado por el cambio del alelo *speA1* a *speA2* en la década de los setenta<sup>(49)</sup>.

Numerosas investigaciones, han demostrado asociación entre la presencia de la exotoxina pirogénica A y el síndrome del choque tóxico estreptocócico<sup>(36, 51)</sup>, incluso se ha relacionado la presencia de los alelos *speA2* y *speA3* con los cuadros clínicos más severos<sup>(31, 39)</sup>; por lo que la presencia exclusiva del alelo *speA2* dentro de las cepas M1 sugiere que dicho superantígeno contribuye a una mayor virulencia del serotipo.

Para el gen *speC* se encontraron los alelos *speC1*, *speC2* y *speC4* en las cepas analizadas, la distribución de los mismos se muestra en la tabla 5.1. A pesar de los amplios y diversos estudios epidemiológicos realizados para M1, son pocos los datos que muestran la distribución alélica de *speC* dentro del serotipo<sup>(27)</sup>, siendo este trabajo el primero que pone en evidencia la presencia de varios alelos del gen *speC*.

<b>Gen</b>	<b>Alelo</b>	<b>Prevalencia (%)</b>
<i>speA</i>	<i>speA2</i>	100
<i>speC</i>	<i>speC1</i>	33
	<i>speC2</i>	17
	<i>speC4</i>	50

**Tabla 5.1** Distribución alélica de *speA* y *speC* en cepas de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1

### 5.2.4.3 Gen *sic*.

La hipervariabilidad reportada para el gen *sic* se confirmó al encontrar 26 alelos diferentes en las 101 cepas M1 analizadas; cada una de estas variantes alélicas difieren una de otra en cuando menos un nucleótido y codifican para al menos 25 proteínas SIC diferentes.

El polimorfismo se observó en prácticamente toda la extensión del gen, presentando las mutaciones más evidentes en las porciones que codifican para las regiones central y amino terminal de la proteína (figura 5.13). A este hecho pueden atribuirse los reportes que hay en la literatura de funciones específicas para cada región de la proteína, por ejemplo, se sabe que la región central es la responsable de la inhibición del complemento y que la región amino terminal inhibe péptidos antibacterianos del sistema inmune innato<sup>(7)</sup>. De tal forma que resulta posible que cada región se seleccione de forma independiente de acuerdo a la interacción que tiene con el hospedero.

Dentro de las variantes alélicas encontradas los alelos *sic1.13* y *sic1.36* representan casi el 50% de los aislamientos; los alelos *sic1.02* y *1.178* alcanzan en conjunto el 20%, además se identificaron los alelos *sic1.94*, *sic1.105*, *sic1.129*, *sic1.170*, *sic1.282* y *sic1.296* en un total de 10 aislamientos (figura 5.13), sin embargo los restantes 16 alelos que se

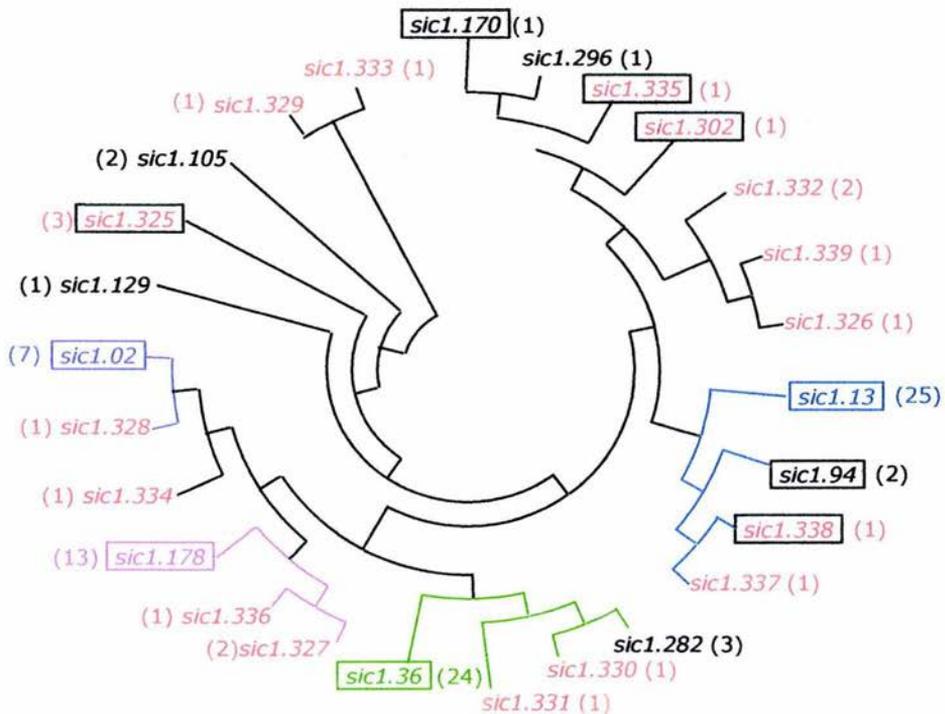
	126	135	141	141	162	220	226	243	261	261	368	405	474	479	492	506	564	587	608	643	650	654	671	689	691	694	704	721	740	745	No. de aislamientos	Alelo de <i>sic</i> (GenBank)
	Delección de 15 pb	Delección de 30 pb	Inserto de 30 pb	Inserto de 15 pb	Delección de 30 pb	C - A K - Q	Inserto de 4 pb	Delección de 30 pb	Delección de 12 pb	T - A	Inserto de 12 pb	Delección de 87 pb	A - G	T - C T - I	Inserto de 87 pb	A - G G - E	Delección de 42 pb	C - T L - P	A - G	Inserto de 9 pb	A - G G - E	T - C S - F	A - C K - D	A - G G - D	G - A T - A	C - T S - P	C - A Q - P	C - A T - P	C - G S - T	C - T OCH - Q		
A																														25	<i>sic1.13</i>	
B																															24	<i>sic1.36</i>
C																															1	<i>sic1.302</i>
D																													*	2	<i>sic1.327</i>	
E																											*			1	<i>sic1.328</i>	
F															4X															2	<i>sic1.332</i>	
G																														1	<i>sic1.129</i>	
H																	*													1	<i>sic1.338</i>	
I																			*											1	<i>sic1.339</i>	
J																														3	<i>sic1.282</i>	
K	*																													1	<i>sic1.334</i>	
L																														13	<i>sic1.178</i>	
M																														2	<i>sic1.94</i>	
N			*																											1	<i>sic1.331</i>	
Ñ											*																			1	<i>sic1.335</i>	
O																														7	<i>sic1.02</i>	
P																							*							3	<i>sic1.325</i>	
Q																		*												2	<i>sic1.326</i>	
R																							*							1	<i>sic1.336</i>	
S																							*							1	<i>sic1.337</i>	
T																								*						1	<i>sic1.329</i>	
U					*																				*					1	<i>sic1.333</i>	
V							*																		*					1	<i>sic1.330</i>	
W																														1	<i>sic1.17</i>	
X																														1	<i>sic1.296</i>	
Y																														2	<i>sic1.105</i>	

**Figura 5.13.** Variación del gen *sic* observada en las cepas de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1 estudiadas. Las áreas sombreadas indican la presencia de la mutación; cada color representa una región diferente del gen (de acuerdo a la figura 3.6); en la parte superior de la tabla se indica la posición y el tipo de mutación que se presenta. Los números en rojo corresponden a los nuevos alelos encontrados para este gen y los asteriscos (\*) denotan la mutación que los generaron.

encontraron para *sic* no se están dentro de los casi 300 reportados para este gen en el GenBank®. El elevado porcentaje de alelos nuevos, refuerza la posibilidad de contar con alelos restringidos geográficamente a la Ciudad de México.

Asimismo, la elevada prevalencia de alelos *sic1.02*, *sic1.13*, *sic1.36* y *sic1.178*, reportada aquí y en estudios previos desarrollados en varios países<sup>(26, 30, 52)</sup>, marca a estos alelos como ancestros comunes a partir de los cuales se generan nuevas variantes alélicas en diferentes poblaciones mediante un proceso evolutivo de selección natural (figura 5.14), de acuerdo a la interacción que puede existir entre la bacteria y el hospedero a nivel molecular en las mucosas.

Las cepas aisladas de cuadros no faríngeos se encuentran distribuidas entre los diferentes alelos identificados para el gen *sic* (figura 5.14), por lo que no fue posible asociar la presencia de algún alelo como el causante de cuadros faríngeos o no faríngeos, pudiendo decirse que todas las cepas de *Streptococcus pyogenes* tipo M1 son potencialmente causantes de cualquier patología.



**Figura 5.14.** Dendrograma circular (construido con el software MEGA® Ver 3.1) que muestra la distancia filogenética entre los alelos del gen *sic* identificados en las cepas de M1 analizadas. Entre paréntesis se indica el número de aislamientos para cada alelo. Los alelos enmarcados representan las variantes en las que se ubican aislamientos no faríngeos; en rojo se presentan las nuevas variantes identificadas y las líneas en color denotan los alelos con mayor incidencia así como las variantes más cercanas que derivan evolutivamente de los mismos.

### 5.2.5 Análisis de la cepa M1 *sic*(-).

En este estudio, la cepa con el número 153 fue tipificada como M1 (*emm1*) tras haber analizado el RFLP de la digestión enzimática del gen

*emm*, sin embargo no presentó producto de amplificación para el gen *sic*; inicialmente se pensó que se debía a problemas con las condiciones de la PCR, dado que no existe evidencia de una cepa de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1 que no posea este gen.

Entonces se emplearon diversas estrategias para optimizar la amplificación, pero no se obtuvo un resultado positivo, lo que sugirió que la hipervariabilidad observada en el gen resultó en una mutación en la secuencia que reconocen los primers empleados (*sic1* y *sic2*), que al no lograr alinearse correctamente durante la PCR se ve impedida la amplificación del gen.

Para comprobar esta teoría, se sustituyó el primer *sic1* por los primers *sic3* y *sic4* (figura 3.6), en dos diferentes PCR's combinándolos con el primer *sic2*, pero con ninguna de las dos combinaciones amplificó el gen *sic* para la cepa 153 y si para los controles empleados (figura 5.15 A); por lo que se pensó que posiblemente la secuencia que reconoce el primer *sic2* fue la que mutó imposibilitando la amplificación del gen.

En otro experimento, se intentó amplificar la región comprendida entre los genes *emm1* y *scpA*, que en las cepas M1, es donde se localizan la secuencia de inserción *IS1562* y el gen *sic*<sup>(1)</sup>, empleando para ello el

primer *p6c* localizado al final del gen *emm1* y el primer *SBR* localizado al principio del gen *scpA*<sup>(22)</sup> (figura 3.4) y cuya secuencia se presenta en el apéndice I.

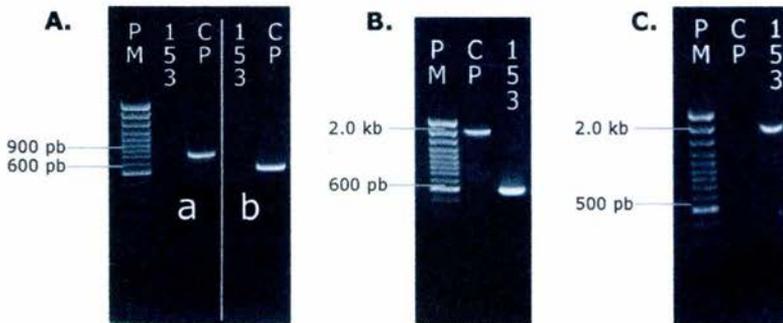
El resultado obtenido fue un producto de amplificación de alrededor de 500 pb para la cepa 153 y de alrededor de 2500 pb para la cepa control M1 (figura 5.15 B). La diferencia en el tamaño molecular de los productos amplificados sugirió que para la cepa 153 no existía ningún gen en el espacio comprendido entre los genes *emm1* y *scpA*, situación que aunque no se ha reportado para cepas M1 resulta común en otros serotipos M de *Streptococcus pyogenes*.

Paralelamente se realizó otra PCR empleando los primers *emm1a* y *SBR* para amplificar nuevamente el gen *emm1* y la región intergénica entre este último y el gen *scpA* (figura 3.4).

Como resultado corroboramos que los genes *IS1562* y *sic* no se encuentran presentes en la cepa 153 pues para esta se obtuvo un amplificado de alrededor de 2000 pb, que comprende la longitud del gen *emm1* más la secuencia intergénica y nula amplificación para la cepa M1 control (figura 5.15 C), ya que en las condiciones bajo las cuales se realiza la PCR no fue posible amplificar segmentos de ADN de elevado

---

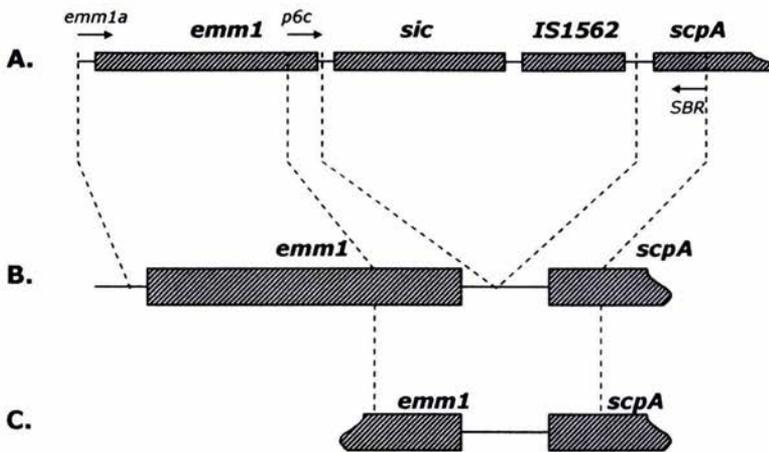
tamaño molecular (de cerca de 4500 pb). Estos resultados proporcionaron más evidencias de que la cepa 153 carecía del gen *sic*.



**Figura 5.15** Corrimiento electroforético de los productos de la PCR para la cepa 153 y control positivo M1 (CP) **A.** Productos amplificados empleando el primer *sic2* en combinación con el primer *sic3* (**a**) y *sic4* (**b**) **B.** Productos amplificados con los primers *p6c* y *SBR*. **C.** Producto amplificado empleando los primers *emm1a* y *SBR*.

Para confirmar los resultados obtenidos se secuenciaron los productos de PCR obtenidos para la cepa 153; las secuencias obtenidas se compararon entre si y con una secuencia de referencia M1.

Tras analizar las secuencias, se hizo evidente la carencia del gen *sic* y de la secuencia de inserción *IS1562* de la cepa 153 (figura 5.16).



**Figura 5.16** Comparación esquemática de los amplificadores obtenidos para la cepa 153 **A.** Representación parcial del MGA de una cepa M1 tipo. **B.** Representación del producto de la PCR de la cepa 153 que se amplificó y se secuenció con los primers *emm1a* y *SBR*. **C.** Representación del producto de la PCR de la cepa 153 que se amplificó y se secuenció con los primers *p6c* y *SBR*. Obsérvese como tanto en **B** como en **C** faltan la región que corresponde a los genes *IS1562* y *sic*.

Esta es la primera evidencia que se tiene de una cepa de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1 que carece del gen *sic*. Este hallazgo puede fortalecer las evidencias que sugieren que la adquisición de este gen se ha dado como un proceso evolutivo de la bacteria a través de algún mecanismo de transferencia horizontal de material genético o de rearrreglos genéticos.

Dado que la secuencia de inserción *IS1562*, tampoco se encuentra presente y de que este tipo de secuencias se relacionan con elementos genéticos móviles como los transposones, es posible especular que el gen *sic* y la secuencia de inserción *IS1562* forman parte de un transposón compuesto que en algún momento se insertó en el genoma de las cepas M1, posteriormente se debieron generar procesos de recombinación que lo estabilizaron dejándolo como un gen constitutivo, lo que aportó a este serotipo de *Streptococcus pyogenes* herramientas adicionales para su persistencia y diseminación.

## 6. CONCLUSIONES

- En las 101 cepas analizadas se identificaron siete alelos para el gen *emm1*, cuatro de los cuales no se habían reportado con anterioridad.
- El alelo *emm1.0* representa el más comúnmente encontrado con cerca del 90% de los aislamientos.
- El gen *speA* se encontró en el 94% de las cepas estudiadas, y en todas ellas se identificó al alelo *speA2*, el cual está estrechamente asociado al tipo M1 y según la literatura se relaciona con episodios invasivos.
- Aún cuando la incidencia del gen *speC* es menor al 30%, es posible encontrar más de un alelo de dicho gen en las cepas del tipo M1 de *Streptococcus pyogenes*; por ello resultaría interesante analizar el significado de esta variación en un estudio más extenso del gen y el serotipo implicado.
- Se confirmó el elevado polimorfismo del gen *sic* al identificarse 26 alelos, 16 de los cuales (20%) son nuevos para el gen.
- La gran cantidad de alelos nuevos encontrados para el gen *sic* establece la posibilidad de contar con alelos restringidos geográficamente.

- El elevado polimorfismo observado en el gen *sic* permite una subtipificación objetiva y rápida de los aislamientos M1 de *Streptococcus pyogenes*.
- No se observa correlación entre las variantes alélicas encontradas y el tipo de aislamiento del cual provienen, confirmandose que la infecciones faríngeas pueden ser el origen de cuadros más graves ocasionados por *Streptococcus pyogenes*.
- Se detectó una cepa de *Streptococcus pyogenes* M1 que carece del gen *sic* y de la secuencia de inserción *IS1562*. El análisis de su secuencia revela la posibilidad de que el gen *sic*, junto con la secuencia de inserción *IS1562* formen parte de un transposón que, mediante un proceso evolutivo, se haya integrado al genoma de las cepas de *Streptococcus pyogenes* tipo M1.
- La caracterización molecular de cepas M1 de *Streptococcus pyogenes* puede ayudar a establecer una vigilancia sobre la incidencia y severidad de las infecciones causadas por esta bacteria.

## 7. APÉNDICES

I. Secuencia nucleotídica de los primers empleados para la amplificación y secuenciación de los genes que se estudiaron para las cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* tipo M1.

Gen	Primer	Secuencia	Ref.
<i>emm</i>	<i>emm1A*</i>	5'-GGAATTCTATTSGCTTAGAAAATTAA-3'	2,56
	<i>emm1B</i>	5'-GCAAGTTCCTCAGCTTGTTT-3'	
	<i>p6c</i>	5'-CTTACTGTTATGGCAACAGCTGG-3'	22
	<i>SBR</i>	5'-AGACATGAGCTCAATGGCAAGTTT-3'	
<i>sic</i>	<i>sic1</i>	5'-TAAGGAGAGGCTACAACTA-3'	42
	<i>sic2</i>	5'-TTACGTTGCTGATGGTGTAT-3'	
	<i>sic3</i>	5'-GATGAGACAGAAGATAAAAC-3'	
	<i>sic4</i>	5'-CATATTCCTAACCTGAGAA-3'	
<i>sof</i>	<i>sof1</i>	5'-GTATAAACTTAGAAAGTTATCTGTAGG-3'	3
	<i>sof2</i>	5'-GGCCATAACATCGGCACCTTCGTCAATT-3'	
<i>speA</i>	<i>speA1</i>	5'-ATGGAAAACAATAAAAAAGTATTG-3'	35,39
	<i>speA2</i>	5'-TTACTTGGTGTTAGGTAGCTTC-3'	
<i>speC</i>	<i>speC1</i>	5'-ACCTATCATCAAAGTGACTCTAAGAAAGAC-3'	6
	<i>speC2</i>	5'-CCCTTCATTTGGTGAGTCAAATAAGTCTATTTGA-3'	
<i>IS1562</i>	<i>IS1562F</i>	5'-TAGTCTTTCCAAATATGCCGTGTG-3'	4
	<i>IS1562R</i>	5'-TATGACCTAGTAGAAGACACCT-3'	

(\*) El primer *emm1A* es un primer degenerado, (S es un 50% de C y 50 % de G).

## II. Aminoácidos esenciales y sus abreviaturas.

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviatura</b>	
	<b>Tres letras</b>	<b>Una letra</b>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	P
Prolina	Pro	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Akesson, P.,** Sjöholm, A. G. and Björck, L. (1996). **Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function.** Journal of Biological Chemistry; 271:1081-1088.
  2. **Beall, B.,** Facklam, R. and Thompson T. (1996). **Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci.** Journal of Clinical Microbiology; 34:953-958.
  3. **Beall, B.,** Gherardi, G., Lovgren, M., Facklam, R. R., Forwick, B. A. and Tyrrell, G. J. (2000). ***emm* and *sof* gene sequence variation in relation to serological typing of opacity-factor-positive group A streptococci.** Journal of Medical Microbiology; 146:1195-1209.
  4. **Berge, A.,** Rasmussen, M. and Björk, L. (1998). **Identification of an insertion sequence located in a region encoding virulence factors of *Streptococcus pyogenes*.** Infection and Immunity; 66:3449-3453.
  5. **Bessen, D. E.** and Hollingshead S. K. (1994). **Allelic polymorphism of *emm* loci provides evidence for horizontal gene spread in group A streptococci.** Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America; 91:3280-3284.
  6. **Bessen, D. E.,** Izzo, M. W., Fiorentino, T. R., Caringal, R. M., Hollingshead, S. K. and Beall, B. (1999). **Genetic linkage of exotoxin alleles and *emm* gene markers for tissue tropism in Group A Streptococci.** Journal of Infectious Diseases; 179:627-636.
  7. **Binks, M. J.,** Fernie-King, B. A., Seilly, D., Lachmann, P. J. and Sriprakash, K. S. (2005). **Attribution of the various inhibitory**
-

- actions of the streptococcal inhibitor of complement (SIC) to regions within the molecule.** Journal of Biological Chemistry; 280:20120-20125.
- 8. Brandt, C. M.,** Haase, G., Spelleberg, B., Holland, R. and Lütticken, R. (2003). ***drs* (distantly related *sic*) Gene polymorphisms among *emm12*-type *Streptococcus pyogenes* isolates.** Journal of Clinical Microbiology; 41:1794-1797.
- 9. Cunningham, M. W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections.** Clinical of Microbiology Reviews; 13:470-511.
- 10. Curtis, N. (1996). Invasive group A streptococcal infection.** Current Opinion in Journal of Infectious Diseases; 9:191-202.
- 11. Efstratiou, A. (2000). Group A streptococci in the 1990s.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 45:3-12.
- 12. Federle, M. J.,** McIver, K. S. and Scott, J. R. (1999). **A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *Streptococcus*.** Journal of Bacteriology; 181:3649-3657.
- 13. Fernie-King, B. A.,** Seilly, D. and Lachmann, P. J. (2004). **The interactions of streptococcal inhibitor of complement (SIC) and its proteolytic fragments with the human beta defensin.** Immunology; 111:444-452.
- 14. Fernie-King, B. A.,** Seilly, D. Davies, A., and Lachmann, P. J. (2002). **Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme.** Infection and Immunity; 70: 4908-4916.
- 15. Fernie-King, B. A.,** Seilly, D. J., Willers, C., Würzner, R., Davies, A. and Lachmann, P. J. (2001). **Streptococcal inhibitor of**
-

- 
- complement (SIC) inhibits the membrane attack complex by preventing uptake of C567 onto cell membranes.** *Immunology*; 103:390-398.
- 16. Figueroa-Martínez, F. J. (2004). Tipificación Molecular del gen que codifica para la proteína M (*emm*) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico.** Tesis de licenciatura QFB, México, Facultad de Química, UNAM.
- 17. Fischetti, V. A. (2000). Surface proteins on gram-positive bacteria.** In **Fischetti, V. A.,** Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A. and Rood, J. I. (Ed.) **Gram-positive pathogens.** American Society for Microbiology Press; 11-24.
- 18. Frick, I. M., Akesson, P., Rasmussen, M., Schmidtchen, A. and Björck, L. (2003). SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides.** *Journal of Biological Chemistry*; 278:16561-16566.
- 19. Garza-Velasco, R. (2000). Bacteriología, Manual de prácticas.** Facultad de Química, UNAM; 23-40.
- 20. Ginsburg, I. (1999). Is streptolysin S of a group A streptococci a virulence factor?.** *Acta Patologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*; 107:1051-1059.
- 21. Hardie, J. M. (1986). Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL.** In Sneath, P. H. A., Mair N. S., Sharp, M. E., and Holt, J. G. (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol. 2, Williams & Wilkins Co; 1043-1071.
- 22. Hartas, J. and Sriprakash, K. S. (1999). *Streptococcus pyogenes* strains containing *emm12* and *emm55* possess a novel gen coding for distantly related SIC protein.** *Microbial Pathogenesis*; 26:25-33.
-

- 
23. **Hoe, N. P.**, Kordari, P., Cole, R., Liu, M., Palzkill, T., Huang, W., McLellan, D., Adams, G. J., Hu, M., Vuopio-Varkila, J., Cate, T. R., Pichichero, M. E., Edwards, K. M., Eskola, J., Low, D. E. and Musser, J. M. (2000). **Human immune response to streptococcal inhibitor of complement, a serotype M1 group A *Streptococcus* extracellular protein involved in epidemics.** *Journal of Infectious Diseases*; 182:1425-1436.
24. **Hoe, N. P.**, Vuopio-Varkila, J., Vaara, M., Grigsby, D., De Lorenzo, D., Fu, Y., Dou, S., Pan, X., Nakashima, K. and Musser, J. M. (2001). **Distribution of streptococcal inhibitor of complement variants in pharyngitis and invasive isolates in an epidemic of serotype M1 group A *Streptococcus* infection.** *Journal of infectious Diseases*; 183:633-639.
25. **Hoe, P. N.**, Nakashima, K., Grigsby, D., Pan, X., Dou, S., Naidich, S., García, M., Khan, E., Bergmire-Sweat, D. and Musser, J. M. (1999). **Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains.** *Emerging Infectious Diseases*; 5:254-263.
26. **Hoe, P. N.**, Nakashima, K., Lukomski, S., Grigsby, D., Liu, M., Kordari, P., Dou, S., Pan, X., Vuopio-Varkila, J., Salmelina, S., McGeer, A., Low, D. E., Schwartz, B., Schuchat, A., Naidich, S., De Lorenzo, D., Fu, Y. and Musser J. M. (1999). **Rapid selection of complement-inhibiting protein variants in group A *Streptococcus* epidemic waves.** *Nature America*; 5:924-929.
27. **Kapur, V.**, Nelson, K., Schlievert, P. M., Selander, R. K. and Musser, J. M. (1992). **Molecular population genetic evidence of horizontal spread of two alleles of the pyrogenic exotoxin C gene (*speC*) among pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes*.** *Infection and Immunity*; 60:3513-3517.
-

28. Kreikemeyer, B., McIver, K. S. and Podbielski, A. (2003). **Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions.** Trends in Microbiology; 11:224-232.
29. Mackie, S. L. and Keat, A. (2004). **Poststreptococcal reactive arthritis: what is it and how do we know?.** Rheumatology; 43:949-954.
30. Matsumoto, M., Hoe, N. P., Liu, M., Beres, S. B., Sylva, G. L., Brandt, C. M., Haase, G. and Musser, J. M. (2003). **Intrahost sequence variation in the streptococcal inhibitor of complement gene in patients with human pharyngitis.** Journal of Infectious Diseases; 187:604-612.
31. Matsumoto, M., Murai, T., Ichiyama, S., Saito, M., Arakawa, Y., Ohta, M., Ooe, K. (1997). **Prevalence of the *speA2* and *speA3* alleles in *Streptococcus pyogenes* isolated from TSLs patients in Japan.** Microbiology Letters; 150:233-237.
32. McCormick, J. K and Schlievert, P. M. (2000). **Toxins and superantigens of group A Streptococci.** In Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A. and Rood, J. I. (Ed.) **Gram-positive pathogens.** American Society for Microbiology Press; 43-52.
33. McIver, K. S. and Scott, J. R. (1997). **Role of *mga* in growth phase regulation of virulence genes of the group A *Streptococcus*.** Journal of Bacteriology; 179:5178-5187.
34. Murase, T., Kameoka, Y., Suzuki, R. and Yamai, S. (2000). **Variation in *sic* gene encoding complement-inhibiting protein of *Streptococcus pyogenes* serotype M1 isolates in Japan.** Current of Microbiology; 41:106-108.
-

35. **Musser, J. M.,** Kapur, V., Kanjila, S., Shah, U., Musher, D. M., Barg, N. L., Johnson, K. H., Schlievert, P. M., Henrichsen, J., Gerlach, D., Rakita, R. M., Tanna, A., Cookson, B. D. and Huang, C. J. (1993). **Geographic and temporal distribution and molecular characterization of two highly pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes* expressing allelic variants of pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin).** Journal of Infectious Diseases; 167:337-346.
36. **Musser, J. M.,** Kapur, V., Szeto, J., Pan, X., Swanson, D. S., Martin, D. R. (1995). **Genetic diversity and relationships among *Streptococcus pyogenes* strains expressing serotype M1 protein: recent intercontinental spread of subclone causing episodes of invasive disease.** Infection and Immunity; 63:994-1003.
37. **Musser, J. M.** and Krause, R. M. (1998). **The revival of group A streptococcal diseases, with a commentary on staphylococcal toxic shock syndrome.** In Krause, R. M., Emerging Infections. Academic Press; 185-218.
38. **Mylvaganam, H.,** Bjorvatn, B. and Osland, A. (2001). **Polymorphism of the virulence regulon and allelic variations of the *sic* gene among the *emm1* isolates of group A *Streptococcus* from western Norway.** Microbial pathogenesis; 30:71-79.
39. **Nelson, K.,** Schlievert, P. M., Selander, R. K. and Musser J. M. (1991). **Characterization and clonal distribution of four alleles of the *speA* gene encoding pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin) in *Streptococcus pyogenes*.** Journal of Experimental Medicine; 174:1271-1274.
-

40. **Perea-Mejía, L. M. (2003). Streptococcus.** En Tay-Zavala, J, Gutiérrez-Quiroz, M., López-Martínez, R., Manjarrez-Zavala, M. A. y Molina-López, J. (Ed.) **Microbiología y Parasitología Médicas**, 3a. Edición, Mendez Editores; 74-85.
41. **Perea-Mejía, L. M.,** Figueroa, F., Pérez-Romano, L., Inzunza-Montiel, A. E., Dávila, R., Garza, R., Cravioto, A. **(2006). Prevalence of M-types and streptococcal pyrogenic exotoxin A and C genes in group A streptococcal isolates from uncomplicated pharyngitis in Mexico City.** International Congress Series; 1289:38-41.
42. **Perea-Mejía, L. M.,** Stockbauer, K. E., Pan, X., Cravioto, A. and Musser J. M. **(1997). Characterization of group A Streptococcus strains recovered from Mexican children with pharyngitis by automated DNA sequencing of virulence-related genes: Unexpectedly large variation in the gene (sic) encoding a complement-inhibiting protein.** Journal of Clinical Microbiology; 35:3220-3224.
43. **Pérez-Romano, L. A. (2003). Prevalencia de los genes asociados a la virulencia en cepas de Streptococcus pyogenes de origen clínico.** Tesis de Licenciatura QFB, México, Facultad de Química, UNAM.
44. **Reid, S. D.,** Hoe, N. P., Smoot, L. M. and Musser J. M. **(2001). Group A Streptococcus: allelic variation, populaton genetics and host-pathogen interactions.** Journal of Clinical Investigation; 107:393-399.
45. **Robinson J. H. and Kehoe, M. A. (1992). Group A streptococcal M proteins: virulence factors and protective antigens.** Immunology Today; 13:362-367.
-

46. Ruoff, K. L., Whiley, R. A., and D. Beighton. (1999). ***Streptococcus***. In Murray, P. Batom, E. Pfaller, M., Tenover, F. and Tenover, R. (Ed.) **Manual of Clinical Microbiology**. 7th Edition. American Society for Microbiology Press; 283-296.
47. Stockbauer, K. E., Grigsby, D., Pan, X., Fu, Y., Perea-Mejía, L. M., Cravioto, A. and Musser, J. M. (1998). **Hypervariability generated by natural selection in an extracellular complement-inhibiting protein of serotype M1 strains of group A *Streptococcus***. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America; 95:3128-3133.
48. Stollerman, G. H. (2001). **Rheumatic fever in the 21st century**. Journal of Clinical Infectious Diseases; 33:806-814.
49. Sumbly, P., Porcella, S. F., Madrigal, A. G., Barbian, K. D., Virtaneva, K., Ricklefs, S. M., Sturdevant, D. E., Graham, M. R., Vuopio-Varkila, J., Hoe, N. P. and Musser, J. M. (2005). **Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype M1 group A *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events**. Journal of Infectious Diseases; 192:771-782.
50. Todar, K. (2002). **Textbook of Bacteriology**. Madison Ed; 654-681.
51. Tyler, S. D., Johnson, W. M., Huang, J. C., Ashton, F. E. Wang, G., Low, D. E. (1992). **Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991**. Journal of Clinical Microbiology; 30:3127-3131.
52. Tyrrell, G. J., Lovgren, M., Forwick, B., Hoe, N. P., Musser, J. M. and Talbot, J. A. (2002). **M types of Group A streptococcal isolates submitted to the National Centre for *Streptococcus***
-

- (Canada) from 1993 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*; 40:4466-4471.
53. **Van Den Bussche, R. A.,** Lyon, J. D. and Bohach, G. A. (1993). **Molecular evolution of the Staphylococcal and Streptococcal pyrogenic toxin gene family.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 2:281-292.
54. **Volk, W. A. (1996).** *Microbiología Básica*, 7a Edición. Harla; 458-474.
55. **Voyich, J. M.,** Musser, J. M. and DeLeo, F. R. (2004). ***Streptococcus pyogenes* and human neutrophils: a paradigm for evasion of innate host defense by bacterial pathogens.** *Microbes and Infection*; 6:1117-1123.
56. **Whatmore, A. M.,** Kapur, V., Sullivan, D. J., Musser, J. M. and Kehoe, M. A. (1994). **Non-congruent relationships between variation in *emm* gene sequences and the population genetic structure of group A streptococci.** *Molecular Microbiology*; 14:619-631.
57. **Yamaoka, J.,** Nakamura, E., Takeda, Y., Imamura, S. and Minato, N. (1998). **Mutational analysis of superantigen activity responsible for the induction of skin erythema by streptococcal pyrogenic exotoxin C.** *Infection and Immunity*; 66:5020-5026.

No. Cta. 09710663-2

Tel. 5753 3125

raulmejia81@hotmail.com