

00524  
136

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Prevalencia de genes asociados a la virulencia en  
cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

**Leafar Alfonso Pérez Romano**

México D.F.

2003



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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>	<b>Prof. RAUL GARZA VELASCO</b>
<b>Vocal</b>	<b>Prof. MIREYA RODRIGUEZ PENAGOS</b>
<b>Secretario</b>	<b>Prof. LUIS MANUEL PEREA MEJIA</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>Prof. MA. DE LOS ANGELES GRANADOS SILVESTRE</b>
<b>2º. Suplente</b>	<b>Prof. LUIS TONATIHUT SANCHEZ LINARES</b>

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM y forma parte del proyecto "Desarrollo e implementación de estrategias para la tipificación y caracterización molecular de genes asociados a la virulencia en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico" financiado por el PAPIIT con clave IN213401.

**ASESOR**



**Luis Manuel Perea Mejia**

**SUSTENTANTE**



**Leafar Alfonso Pérez Romano**

A Dios

Gracias por darme la fuerza y la fe necesaria para vivir, por ayudarme a tomar las decisiones del corazón, por iluminarme a cada momento de mi vida y jamás abandonarme ... Gracias Padre.

A mis padres

Por siempre guiarme y ayudarme a salir adelante en los momentos más difíciles de mi vida, por su paciencia y dedicación durante toda mi educación, por su forma sabia de orientarme por el camino del bien, porque sin ellos no hubiera sido posible alcanzar este logro. Por todo su amor ...Gracias mamá Gracias papá.

A mi familia

Gracias por mantenerse cercanos a mi y por siempre estar atentos de mi vida, por toda la paciencia que han tenido .. muchas gracias.

A mis amigos

Gracias. por su confianza, su cariño y su paciencia.

C

Para el amor de mi vida

Karla

Gracias...

por haberle dado sentido a mi vida,

por enseñarme a sentir,

por ser mi motivación más grande,

por haber gozado todos mis éxitos

y por haber sufrido todos mis fracasos...

a ti, amor mío, te dedico este logro. Gracias por apoyarme siempre.  
Gracias por tu amor siempre incondicional. Gracias por existir...

P.T.L.E.

Leafar.

D

**“Prevalencia de genes asociados a la  
virulencia en cepas de *Streptococcus  
pyogenes* de origen clínico”**

P R E S E N T A

Leafar Alfonso Pérez Romano  
# Cuenta 99552248  
Químico Farmacéutico Biólogo  
Gen 1999-2003

E

## Índice

Abreviaturas	v
Lista de tablas, figuras y fotografías	vii
Resumen	1
Introducción	2
1. Planteamiento del Problema	2
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Particulares	3
3. Hipótesis	4
I. MARCO TEÓRICO	5
1. Generalidades de <i>Streptococcus sp</i>	5
1.1. Clasificación	5
1.1.1. Tipo de hemólisis	6
1.1.2. Clasificación serológica de Lancefield	6
1.1.3. Pruebas bioquímicas	7
1.1.3.1. Fundamento de las pruebas bioquímicas	7
2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	8
2.1. Principales infecciones	8
2.2. Características morfológicas	9
2.3. Estructura	9

2.3.1. Cápsula	9
2.3.2. Pared celular	10
2.3.3. Carbohidrato "C"	10
2.4. Proteínas superficiales	10
2.5. Proteínas extracelulares	11
3. Factores de virulencia	11
3.1. Proteína M	12
3.1.1. Estructura	12
3.1.2. Superfamilia de genes <i>emm</i>	13
3.1.3. Mecanismo de virulencia	14
3.1.4. Clases de proteína M	14
3.2. Exotoxinas pirogénicas	15
3.2.1. SpeA	16
3.2.2. SpeB	17
3.2.3. SpeC	18
3.2.4. Otras exotoxinas pirogénicas	18
3.3. Proteína Estreptocócica Inhibidora de Complemento (SIC)	19
3.4. Factor de Opacidad del Suero (SOF)	20
3.5. Proteína F	20
II. PARTE EXPERIMENTAL	
1. Cepas clínicas de <i>S. pyogenes</i>	22
2. Material y equipo	24

3. Reactivos y medios de cultivo	25
4. Metodología	26
4.1. Preparación de caldo Todd-Hewitt	26
4.2. Preparación de buffer de lisis enzimática	26
4.3. Extracción del DNA	27
4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	28
4.5. Electroforesis	30
4.6. Revelado de la Electroforesis	31
4.7. Foto Digital	31
5. Resultados y Discusión	32
5.1. Análisis de los productos de la PCR para cada gen	32
5.2. Análisis de la frecuencia de los genes asociados a la virulencia de <i>S. pyogenes</i>	34
5.2.1. Análisis de la presencia del gen <i>speA</i>	35
5.2.1.1. Prevalencia del gen <i>speA</i> en aislamientos clínicos de <i>S. pyogenes</i> serotipo M1	37
5.2.2. Análisis de la presencia del gen <i>speC</i>	39
5.2.3. Análisis de la presencia del gen <i>sic</i>	40
5.2.4. Análisis de la presencia del gen <i>sof</i>	41
5.2.5. Análisis de la presencia del gen <i>prtF</i>	42
5.3. Análisis de los genes de virulencia compartidos entre las cepas de <i>S. pyogenes</i>	44
5.4. Patrones en la frecuencia de los 5 genes de virulencia investigados para cada serotipo encontrado en las cepas clínicas.	47

5.5. Análisis de la prevalencia de serotipos M por hospitales	50
5.6. Relación de serotipos M de <i>S. pyogenes</i> con el origen clínico de las cepas (faringeas y no faringeas)	54
5.7. Análisis de las frecuencias de serotipos dependiendo del origen de la cepa	57
5.8. Relación entre los hospitales con el origen clínico de las cepas de <i>S. pyogenes</i> .	58
<b>Conclusiones</b>	<b>60</b>
<b>Referencias</b>	<b>62</b>

## Abreviaturas

**BHI** Caldo de infusión cerebro corazón

**CAMP** Christie, Atkins, Munch-Peterson.

**CMN** Centro Medico Nacional

**CSCV** Centro de Salud Castro Villagrana

**CSM** Centro de Salud Morelia

**dNTP's** desoxinucleotidos trifosfatados

**EGA** Estreptococo de Grupo A

**HGC** Hospital Gonzalo Castañeda

**HGM** Hospital Gabriel Mancera

**HLM** Hospital López Mateos

**HMS** Hospital Medica Sur

**IL-1, 3, 6** Interleucina 1, 3, 6

**IMSS** Instituto Mexicano del Seguro Social

**INC** Instituto Nacional de Cardiología

**INER** Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

**INF- $\gamma$**  Interferon gama

**INP** Instituto Nacional de Pediatría

**ISSSTE** Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los

Trabajadores del Estado

**MHC-II** Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II

**pb** pares de bases

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PM** Peso Molecular

**PYR** pirrolidonil aminopeptidasa

**S/T** Sin Tipificar

**Sfb-I** Proteína de unión a fibronectina I

**Sfb-II** Proteína de unión a fibronectina II

**SIC** Proteína estreptococcica inhibidora del complemento

**SOF** Factor de opacidad del suero

**SpeA** Exotoxina pirogénica A

**SpeB** Exotoxina pirogénica B

**SpeC** Exotoxina pirogénica C

**TBE** Amortiguador de Tris-EDTA

**TCR** Receptor de células T

**T-H** Todd-Hewitt

**TNF- $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral alfa

**TNF- $\beta$**  Factor de necrosis tumoral beta

**UV** Ultravioleta

## Lista de tablas, figuras y fotografías

<b>Tabla 1.</b> Número de cepas obtenidas por hospital en la Ciudad de México.	22
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>S. pyogenes</i> utilizadas en el estudio mostradas por alelos del gen <i>emm</i> , su correspondiente serotipo M y el porcentaje que ocupa cada uno.	23
<b>Fig.1.</b> Diagrama de extracción del DNA de cepas de <i>S. pyogenes</i>	27
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para la PCR por muestra.	28
<b>Fig. 2.</b> Diagrama de temperaturas utilizadas para la PCR.	29
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de los primers utilizados para efectuar la PCR de los 5 genes de virulencia estudiados para <i>S. pyogenes</i> .	30
<b>Foto 1.</b> Gel de agarosa (1.5%), los carriles 1-35 muestran el tamaño de los productos de la PCR para los genes <i>speA</i> y <i>speC</i> ; PM es el marcador de peso molecular de 100 pb.	32
<b>Foto 2.</b> Gel de agarosa (1.5%); los carriles 1-36 muestran el tamaño de los productos de la PCR para los genes <i>sic</i> y <i>sof</i> ; PM es el marcador de peso molecular de 100 pb.	33
<b>Foto 3.</b> Gel agarosa (2.5%); carriles 1-32 muestran la variabilidad de los productos de la PCR para el gen <i>prtF</i> . PM es marcador de peso molecular de 100 pb.	34
<b>Tabla 5.</b> Frecuencia de genes detectados por la PCR en las cepas clínicas de <i>S. pyogenes</i> .	35
<b>Tabla 6.</b> Distribución de los genes <i>speA</i> , <i>speC</i> , <i>sic</i> , <i>sof</i> y <i>prtF</i> en 15 serotipos de <i>S. pyogenes</i> de origen clínico.	36
<b>Tabla 7.</b> Relación entre el origen de las cepas del serotipo M1 de <i>S. pyogenes</i> y el gen <i>speA</i> .	37

<b>Tabla 8.</b> Relación de cepas de <i>S. pyogenes</i> que presentaron más de un gen de virulencia.	44
<b>Fig. 3</b> Representación de la combinación de genes de virulencia <i>speC</i> , <i>sof</i> y <i>prtF</i> en la población total de cepas tipificadas	46
<b>Tabla 9.</b> Patrones de genotipos propuestos para <i>speA</i> , <i>speC</i> , <i>sic</i> , <i>sof</i> y <i>prtF</i> en los serotipos estudiados de <i>S. pyogenes</i>	48
<b>Tabla 10.</b> Distribución de los serotipo M de <i>S. pyogenes</i> de acuerdo a las instituciones donde se aislaron	51
<b>Tabla 11.</b> Prevalencia de los serotipos M de <i>S. pyogenes</i> en relación al origen clínico de las cepas.	56
<b>Tabla 12.</b> Distribución de las cepas de <i>S. pyogenes</i> de acuerdo a su origen clínico	59

## Resumen

En este estudio se utilizaron 248 cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes*, 207 provenían de pacientes con faringitis y 41 de cuadros no faríngeos, ambas se obtuvieron de diversos hospitales de la Ciudad de México. Las cepas fueron identificadas previamente como Estreptococo (Beta Hemolítico) del Grupo A por técnicas microbiológicas y pruebas de coaglutinación comerciales. El DNA genómico fue extraído utilizando un Kit comercial de la marca QIAGEN, el cual se basa en lisis de la bacteria con proteinasa K y una serie de amortiguadores que promueven la unión selectiva del DNA a una membrana de sílica gel. Este DNA genómico fue sometido a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el objeto de detectar la presencia de los genes *speA* (exotoxina pirogénica A), *speC* (exotoxina pirogénica C), *sic* (proteína estreptococcica inhibidora del complemento), *sof* (lipoproteínasa) y *prtF* (proteína F asociada a adhesión e inclusión celular). Posteriormente el producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa para observar el resultado de la amplificación. Al término de la electroforesis se tomó una fotografía digital del gel y se creó una base de datos con los resultados obtenidos, entre los que destacan las frecuencias de los 5 genes: *speA* 12.9%, *speC* 72.9%, *sic* 19.3%, *sof* 63.3% y *prtF* 58%.

Debido a que 213 cepas ya se tenían tipificadas con base a sus diferentes serotipos M, fue posible asociar los resultados obtenidos a los serotipos más virulentos de *S. pyogenes*.

## Introducción

### 1. Planteamiento del Problema

La importancia de este estudio radica en la necesidad de contar con información suficiente sobre la epidemiología de *S. pyogenes* en la Ciudad de México (Cd. de México), ya que éste es un agente causal de diversas enfermedades que van desde las locales, tales como la faringitis, hasta las invasivas como la fiebre escarlatina.

Es importante determinar la prevalencia de los serotipos de *S. pyogenes* en la Cd. de México, así como la frecuencia de los genes asociados a su virulencia, ya que existen muy pocos estudios sobre ello en dicha ciudad, aún cuando este tipo de aspectos son altamente estudiados en otras partes del mundo.

Esta información permitirá entender la relación que existe entre los diferentes serotipos de *S. pyogenes* y el tipo de enfermedad que producen, así como la distribución de dichos serotipos en diferentes hospitales de la Cd. de México.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Determinar la prevalencia de los genes *speA*, *speC*, *sic*, *sof* y *prtF* en cepas clínicas de *S. pyogenes* aisladas en diferentes hospitales de la Cd. de México y relacionarla con los serotipos estudiados de *S. pyogenes*.

### 2.2 Objetivos Particulares

- Aislar el DNA de 248 cepas clínicas de *S. pyogenes*, utilizando un kit de purificación que permita una mayor estabilidad del DNA para establecer un banco de DNAs de la bacteria.
- Establecer las condiciones óptimas de amplificación de los genes *speA*, *speC*, *sic*, *sof* y *prtF* mediante la técnica de la PCR.
- Realizar la búsqueda de los genes *speA*, *speC*, *sic*, *sof* y *prtF* en las cepas clínicas de *S. pyogenes*.

- Establecer la asociación entre la frecuencia de los genes *speA*, *speC*, *sic*, *sof* y *prtF* con los serotipos de *S. pyogenes* prevalentes en la Cd. de México.
- Determinar los serotipos de *S. pyogenes* asociados a faringitis y a enfermedades no faringéas en la Cd. de México.
- Determinar la distribución de los serotipos prevalentes de *S. pyogenes* en diferentes entidades de salud de la Cd. de México.

### 3. Hipótesis

Si la presencia de los genes de virulencia (*speA*, *speC*, *sic*, *sof* y *prtF*) de *Streptococcus pyogenes* están determinados por su serotipo, entonces el conocer el genotipo de cada uno de los serotipos nos permitirá asociarlos con su prevalencia y de forma indirecta con el origen clínico del aislamiento.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1. Generalidades sobre *Streptococcus sp*

Los estreptococos son bacterias esféricas Gram positivas que por lo general forman pares en cadenas durante su crecimiento. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza, algunos son miembros de la flora normal humana y otros ocasionan fiebre reumática, glomerulonefritis, síndrome del choque tóxico estreptocócico y otros padecimientos. Elaboran varias sustancias extracelulares y enzimas que son necesarias para su supervivencia, provocando destrucción de células hospederas, evadiendo la respuesta inmune ó inactivando a los antibióticos <sup>(17)</sup>.

#### 1.1 Clasificación

Durante muchos años la clasificación de los estreptococos se ha basado en tres diferentes características: 1) morfología de la colonia y reacciones hemolíticas en agar-sangre; 2) especificidad serológica debida a componentes presentes en la pared celular (clasificación de Lancefield) <sup>(19)</sup> y la cápsula; y 3) reacciones bioquímicas y resistencia a factores químicos y físicos<sup>(17)</sup>.

### 1.1.1 Tipo de hemólisis

Los estreptococos pueden presentar tres tipos de hemólisis debido a la capacidad que tienen de producir enzimas que degradan algunos componentes sanguíneos. El primero de ellos es la hemólisis incompleta, conocida como alfa ( $\alpha$ ), se manifiesta con un halo muy pequeño de color verdoso alrededor de la colonia en placas de agar-sangre y es peculiar en *Streptococcus pneumoniae* y en el grupo Viridans. El segundo es la hemólisis completa, conocida como beta ( $\beta$ ), en la cual el halo es de mayor tamaño y transparente, tal como lo evidencian las colonias de *Streptococcus pyogenes*. Por último, existen estreptococos que no pueden lisar eritrocitos, por lo que se les denomina no hemolíticos, tales como *S. bovis*<sup>(22)</sup>.

### 1.1.2 Clasificación serológica de Lancefield

La clasificación serológica de Lancefield agrupa a los estreptococos en 18 grupos y está basada en las diferencias en la composición de los carbohidratos denominados de grupo, los cuales se encuentran anclados en la pared celular y representan el 10% del peso seco de la célula. Los más importantes son para el grupo A, ramnosa-N-acetilglucosamina, el del grupo B, ramnosa-glucosamina, el del grupo C, ramnosa-N-acetilgalactosamina, el del grupo D, ácido glicerol teicoico y el del grupo F, glucopiranosil-N-

acetilgalactosamina. Debido a su alta inmunogenicidad, es fácil detectarlos con sueros específicos<sup>(17)</sup>.

### 1.1.3 Pruebas bioquímicas

Este tipo de herramientas permite identificar a algunos grupos de estreptococos; por ejemplo, *S. pyogenes* (Grupo A) es el único sensible a 0.04U de bacitracina; los del grupo B dan positiva la prueba de CAMP; los de grupo C se pueden diferenciar mediante fermentación de azúcares y los de grupo D con la prueba de PYR, esta prueba también es útil para identificar *S. pyogenes*<sup>(22)</sup>.

*S. pneumoniae* es alfa-hemolítico y no puede ser clasificado por serología porque no cuenta con el carbohidrato de grupo necesario; para detectar su presencia se utilizan discos de optoquina, ya que son sensibles a ella<sup>(22)</sup>.

#### 1.1.3.1 Fundamento de las pruebas bioquímicas

**Prueba de PYR:** Esta prueba determina la actividad de la enzima pirrolidoniol aminopeptidasa (PYR) producida por *S. pyogenes* y por

*Enterococcus*. La morfología y el tamaño de la colonia se utiliza para diferenciar estas bacterias<sup>(22)</sup>.

**Prueba de CAMP:** Los estreptococos de grupo B producen una proteína extracelular difusible (factor CAMP), la cual sinergiza la acción de la lisina producida por *S. aureus* que lisa los eritrocitos<sup>(22)</sup>.

## 2. *Streptococcus pyogenes*

### 2.1 Principales infecciones

En el presente estudio se trabajó únicamente con estreptococos del grupo A (EGA), cuyo representante es *Streptococcus pyogenes*, éste es el principal estreptococo patógeno para el humano y se asocia a: 1) invasión local, produciendo faringitis estreptococcica, sinusitis, otitis, artritis, pioderma estreptococcico, impétigo, erisipela y celulitis; 2) invasión sistémica, causando fascitis necrolizante, bacteremia, fiebre escarlatina, y síndrome del choque tóxico estreptococcico; y 3) trastornos inmunitarios posteriores a la infección, generando fiebre reumática y glomerulonefritis aguda<sup>(21)</sup>.

## 2.2 Características morfológicas

*S. pyogenes* es una bacteria esférica, aunque en algunos cultivos viejos se pueden observar formas ovoides; su diámetro es de 0.5  $\mu\text{m}$  y se agrupa en cadenas, si bien en muestras biológicas se les puede encontrar en pares, cabe señalar que en cultivos líquidos las cadenas son más largas. Sus colonias son grandes ( $> 0.5 \text{ mm}$ ) y éstas pueden ser mucoides o no mucoides<sup>(22)</sup>.

## 2.3 Estructura

### 2.3.1 Cápsula

La pared celular de *S. pyogenes* está recubierta por una cápsula de ácido hialurónico, que contiene moléculas repetidas de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. Ésta no es inmunogénica y evita la fagocitosis de las bacterias al actuar como una barrera física entre las proteínas opsonizantes del complemento que se han unido a la superficie bacteriana y la superficie de las células fagocíticas. La cantidad de cápsula que puede producir *S. pyogenes* varía en cada cepa, por lo que algunas colonias se ven mucoides y otras no<sup>(21)</sup>.

### 2.3.2 Pared celular

La pared celular de *S. pyogenes* está formada principalmente por 4 componentes: proteínas, polisacáridos, peptidoglicano y ácido lipoteicoico<sup>(21)</sup>.

### 2.3.3 Carbohidrato "C"

El carbohidrato "C" de *S. pyogenes* es un polímero de ramnosa con N-acetilglucosamina, que corresponde al azúcar inmunodominante. Se encuentra unido al peptidoglicano a través de grupos fosfato que contienen como compuesto orgánico principal al glicerol ó al ramnosil-glicerol<sup>(18)</sup>.

### 2.4 Proteínas superficiales

*S. pyogenes* también se caracteriza por la presencia de proteínas superficiales como las de la familia de proteínas M, las cuales promueven su adherencia y le ayudan a evitar la fagocitosis, y las proteínas de unión a fibronectina, como la proteína F, la cual le permite adherirse, colonizar e invadir las células epiteliales humanas bajo diferentes condiciones ambientales<sup>(6)</sup>.

La proteína T es específica de grupo y llega a fungir como marcador epidemiológico en las cepas que no expresan la proteína M. Hasta la fecha no se ha dilucidado el papel de esta proteína en la virulencia de *S. pyogenes*<sup>(21)</sup>.

## 2.5 Productos extracelulares

Los productos extracelulares de *S. pyogenes* son: 1) exotoxinas pirogénicas, las cuales interaccionan con el sistema inmune del hospedero (induciendo la formación de citocinas), desempeñándose como superantígenos; 2) estreptolisinas O y S, las cuales lisan leucocitos, plaquetas y eritrocitos, ocasionando la liberación de enzimas lisosomales; la estreptolisina S no es inmunogénica, en cambio la estreptolisina O induce la formación de anticuerpos; 3) C5a peptidasa, la cual degrada al componente C5a del complemento; y 4) DNAasa, que hidroliza el DNA libre de la célula<sup>(11)</sup>.

## 3. Factores de virulencia

En general, la virulencia de los estreptococos del grupo A está determinada por la capacidad de las bacterias para adherirse a la superficie de las células epiteliales, evitar la opsonización y la fagocitosis, y liberar una variedad de toxinas y de enzimas. La adherencia a las células del huésped,

está mediada por más de 10 antígenos bacterianos, siendo los más importantes el ácido lipoteicoico, la proteína M y la proteína F. En el modelo de adherencia para *S. pyogenes*, la fase inicial es una interacción débil entre el ácido lipoteicoico y la región amino terminal de la fibronectina localizada en la matriz extracelular de las células epiteliales. La fase posterior implica a la proteína M, la proteína F y a otras adhesinas que interaccionan con receptores específicos de las células del huésped <sup>(28)</sup>.

### 3.1 Proteína M

#### 3.1.1 Estructura

Uno de los principales factores de virulencia de *S. pyogenes* es la proteína M, la cual tiene la apariencia de prolongaciones semejantes a pelos de la pared celular; esta proteína presenta una forma de bobina enrollada que separa los dominios funcionales, esta estructura permite gran número de cambios en las secuencias, en tanto mantiene la función; por ello, los determinantes antigénicos de la proteína M pueden cambiar con facilidad<sup>(17)</sup>.

El extremo carboxilo de la proteína M está anclado a la membrana citoplasmática y está muy conservado entre los estreptococos del grupo A. El extremo amino, que se extiende a través de la pared de la célula hasta la

superficie celular, es el responsable de la variedad antigénica observada entre los 124 serotipos de la proteína M<sup>(11)</sup>.

### 3.1.2 Superfamilia de genes *emm*

Además de la proteína M, algunas cepas de *S. pyogenes* presentan otras proteínas superficiales parecidas a M. Los genes que codifican para éstas, muestran una identidad del 70% con el extremo 5' del gen *emm*, por lo que se les denomina la superfamilia de genes *emm*. Por lo menos 20 genes han sido identificados en este grupo. La identidad entre estos genes corresponde a tres dominios distintos en la molécula de la proteína M: 1) el dominio H, el cual sirve para anclar la proteína a la membrana, 2) el dominio asociado al peptidoglicano y 3) el dominio asociado a la pared celular. Estos dominios son altamente conservados entre todos los productos de los genes de la superfamilia *emm* en comparación con otras regiones de las moléculas expuestas en la superficie. Estas proteínas parecidas a M pueden tener propiedades funcionales de unión a inmunoglobulinas o ayudar a la antifagocitosis<sup>(8)</sup>.

### 3.1.3 Mecanismo de virulencia

Las principales funciones de virulencia de la proteína M consisten en facilitar la adherencia de *S. pyogenes* e inhibir la opsonización y la fagocitosis. Esto se sabe por estudios en los que la ausencia de proteína M permite una rápida fagocitosis del estreptococo. Se ha demostrado que al introducirse el gen *emm* a cepas de estreptococos que no lo contenían, se aumenta de forma notoria la resistencia a la fagocitosis<sup>(6)</sup>. Esto sucede cuando una  $\beta$ -globulina sérica, (conocida como factor H), se une en la región conservada de la proteína M, éste factor, que regula la vía alternativa del complemento, puede eliminar el componente C3b, con lo que se previene la fagocitosis<sup>(21)</sup>.

### 3.1.4 Clases de proteína M

Las moléculas que conforman la proteína M se han dividido en dos clases: I y II. Esta división está basada en la reacción con anticuerpos contra la región intermedia de la proteína M; la de clase I presentan un epítopo expuesto, mientras que la de clase II carece de este epítopo, por lo tanto, no reaccionan con estos anticuerpos. Aunado a esto, los serotipos que contienen la proteína M clase I son factor de opacidad negativos (SOF -), mientras que los de clase II son SOF (+)<sup>(6)</sup>. Este factor de opacidad se explicará más adelante.

Al parecer, la proteína M desempeña una función importante en la patogenia de la fiebre reumática, ya que los dominios antigénicos conservados de la proteína M clase I inducen la formación de anticuerpos que dan reacción cruzada con el músculo cardíaco humano<sup>(17)</sup>. Otras estructuras de la bacteria como la N-ácetil glucosamina, las proteínas de 67kDa y la proteína semejante a actina han sido también relacionadas con cruces antígenicos<sup>(11)</sup>.

### 3.2 Exotoxinas pirogénicas

Varios mecanismos de virulencia de *S. pyogenes* parecen estar asociados a la patogénesis del síndrome del choque tóxico estreptococcico, a la invasión de tejido suave y piel y/o a la fascitis necrozante. Estos factores de virulencia son las exotoxinas pirogénicas ó toxinas eritrogénicas; su peso molecular (PM) es bajo, (generalmente menor de 30,000 Da), son termoestables y relativamente resistentes a la degradación proteolítica<sup>(11)</sup>. Actúan como superantígenos, es decir, son mitogénicas para linfocitos T, aunque sin ser procesadas por las células presentadoras de antígenos, lo que genera una sobreproducción de linfocitos T. En resumen, éstas exotoxinas se unen a las cadenas  $\beta$  del receptor de células T (TCR) después de que su otro extremo lo ha hecho a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) expresadas en los linfocitos B, monocitos y células dendríticas; ello incrementa la proliferación de los linfocitos

T, y por ende, la liberación de grandes cantidades de citocinas inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), TNF- $\beta$ , interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-6 y el interferón gamma (INF- $\gamma$ ); de esa manera las exotoxinas de *S. pyogenes* son responsables de las más severas manifestaciones del síndrome del choque tóxico estreptococcico y de la fiebre escarlatina<sup>(6)</sup>.

Las exotoxinas pirogénicas de *S. pyogenes* han sido asociadas a una gran diversidad de actividades biológicas: reacciones eritematosas de la piel, pirogenicidad, mitogenicidad, citotoxicidad, cardiotoxicidad y alteración de la barrera cerebral, entre otras. Los genes que codifican para las toxinas A y C se localizan en elementos genéticos móviles, por lo que es importante determinar su frecuencia en las cepas que afectan a una determinada zona geográfica<sup>(33)</sup>.

### 3.2.1 Exotoxina pirogénica A (SpeA)

En 1984, Jonhson et. al. descubrieron que el gen *speA*, que codifica para la exotoxina SpeA, se encuentra en el bacteriófago T12 y, en 1997, McShan et al<sup>(20)</sup>, demostraron que dicho bacteriófago se inserta en el gen del RNA<sub>i</sub> para serina del genoma de *S. pyogenes*. La SpeA es producida por *S. pyogenes* en cantidades muy variadas, que van desde 1  $\mu\text{g/mL}$  hasta 3  $\mu\text{g/mL}$ ; la razón de esta variabilidad aún es desconocida. Para que la SpeA origine la fascitis necrozante requiere de la colaboración de la SpeB (cistein-proteasa) y

de hemolisinas; al margen de ello, muestra capacidad para formar complejos con endotoxinas las cuales resultan letales para los linfocitos T, lo que podría explicar la desaparición de las células del sistema inmune en pacientes que han sufrido de choque tóxico estreptococcico <sup>(11)</sup>.

### 3.2.2 Exotoxina pirogénica B (SpeB)

Esta exotoxina es codificada por el gen *speB*, el cual es constitutivo de *S. pyogenes*, tiene actividad proteolítica, por lo que es capaz de degradar la vitronectina, la fibronectina y al precursor de la IL-1. Se le considera como factor de virulencia, ya que los ratones inoculados intraperitonealmente con cepas SpeB (-) no resultan tan afectados como los infectados con clonas SpeB (+). Además, estudios recientes han revelado que mutantes de *S. pyogenes* carentes de SpeB son incapaces de dañar el tejido y producir infección invasiva. La toxina SpeB también corresponde a un superantígeno, ya que estimula la proliferación de linfocitos T <sup>(11)</sup>.

### 3.2.3 Exotoxina pirogénica C (SpeC)

En comparación con la SpeA y la SpeB, el conocimiento que se tiene sobre la SpeC es mucho menor; ésta es de baja inmunogenicidad, por lo que

llega a tardar hasta dos años, con inoculaciones periódicas, para que un animal de laboratorio monte una respuesta inmune contra ella. Además, es producida en muy bajas cantidades, es menos estable que la SpeA y la SpeB, y su purificación es difícil debido a su fuerte unión al ácido hialurónico. El gen de la SpeC reside en un bacteriófago lisogénico, tal como ocurre con el de la SpeA<sup>(11)</sup>.

La SpeC también está epidemiológicamente asociada al desarrollo de enfermedades invasivas estreptococcicas, tales como el choque tóxico estreptococcico. Se ha demostrado que las cepas de *S. pyogenes* M18 implicadas en fiebre reumática la producen, aunque su papel en esta enfermedad aún no esta determinado <sup>(11)</sup>.

#### 3.2.4 Otras exotoxinas pirogénicas

Se han identificado otras exotoxinas pirogénicas denominadas SpeG, SpeH, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, SSA, SMEZ, y SMEZ-2<sup>(31)</sup>. Esta última es un potente modulador de la respuesta de linfocitos T contra *S. pyogenes*. En la fiebre reumática aguda producida por cepas M18 se han encontrado SpeH y SpeL.<sup>(7)</sup>

### 3.3 Proteína estreptococcica inhibidora de complemento (SIC)

El gen *sic* codifica para una proteína extracelular de 31 kDa, secretada en grandes cantidades (5 mg/L aprox.). Esta proteína es capaz de inhibir al complemento, bloqueando el sitio de inserción del complejo C5b67 en la membrana<sup>(9)</sup>; la presencia de esta proteína contribuye a la persistencia bacteriana en las vías respiratorias altas de los mamíferos<sup>(15)</sup>. Este gen fue descrito en 1996 por Akesson et. al.<sup>(11)</sup> quienes solamente lo encontraron en los serotipos M1 y M57. La secuencia del gen *sic* en M1 se tomó como referencia. En 1997 Perea et. al.<sup>(28)</sup> encontraron un alto polimorfismo de este gen en cepas mexicanas del serotipo M1, reportándose actualmente hasta 300 alelos de *sic*<sup>(16, 28)</sup>. Todos los estudios relacionados se han efectuado con cepas de *S. pyogenes* M1, ya que este serotipo siempre contiene el gen *sic* en su genoma. Al parecer, aparte de la inhibición del complemento, puede tener otras funciones patogénicas como inhibición de la lisozima<sup>(9)</sup> e inhibición de péptidos antibacterianos<sup>(12)</sup>. La presencia del serotipo M1 está asociada con cuadros invasivos de *S. pyogenes*<sup>(8)</sup>.

### 3.4 Factor de opacidad del suero (SOF)

El gen *sof* codifica para una lipoproteinasa capaz de degradar ciertas proteínas presentes en el suero humano, por lo que se le denomina Factor de

Opacidad del Suero (SOF). Esta proteína también recibe el nombre de SfbII, ya que se puede unir a la fibronectina, lo que representaría un factor de virulencia adicional para las cepas que lo expresan<sup>(25)</sup>: aproximadamente el 50% de los serotipos de M son *sof* positivos, incluidos el M 2, 4, 8, 13, 22, 49, 59, 62 y 76; en cambio, los serotipos M 1, 3, 5, 6, 12, 14, 18, 19, 24, 55, 57 y 80 normalmente son *sof* (-), por lo que la detección del gen *sof* ayuda a la tipificación de *S. pyogenes* <sup>(4)</sup>.

### 3.5 Proteína F

*S. pyogenes*, así como otras bacterias tiene la capacidad de unirse a la fibronectina; ésta es una glicoproteína multifuncional que tiene varios dominios a los que se unen compuestos tales como la colágena, la fibrina, la heparina y la actina. La fibronectina se encuentran a lo largo de todo el cuerpo humano, especialmente en la piel, que es donde podría iniciarse la infección. Uno de los factores que se ha visto favorece la unión de *S. pyogenes* a dicha fibronectina es la proteína F también llamada Sfb I (Streptococcal fibronectin binding I). El gen que codifica para esta proteína se le denomina *prtF* <sup>(25)</sup>.

Se ha visto que la proteína F interviene en la adherencia e invasión a las células epiteliales, un proceso en el que también están involucrados la proteína M y otros antígenos bacterianos. Se considera que la internalización

en la célula es importante tanto para el mantenimiento de las infecciones persistentes (ej. la faringitis estreptococcica recurrente) como para la invasión de los tejidos profundos<sup>(21)</sup>.

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Cepas clínicas de *S. pyogenes*

Las 248 cepas clínicas se obtuvieron de diferentes entidades de salud, Tabla 1 y los diferentes serotipos, así como el número de cepas de cada uno se muestran en la Tabla 2.

Hospital	# de cepas
Centro Médico Nacional S. XXI, IMSS (CMN)	16
Hospital Gabriel Mancera, IMSS (HGM)	16
Hospital Gonzalo Castañeda, ISSSTE (HGC)	75
Hospital López Mateos, ISSSTE (HLM)	19
Instituto Nacional de Cardiología (INC)	6
Instituto Nacional de Pediatría (INP)	51
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)	10
Centro de Salud Morelia (CSM)	11
Centro de Salud Castro Villagrana (CSCV)	7
Hospital Médica Sur (HMS)	37
Total	248

Tabla 1. Número de cepas obtenidas por hospital en la Ciudad de México.

Alelo	Serotipo	# Cepas	(%)	Alelo	Serotipo	# Cepas	(%)
<i>emm1</i>	M1	46	21.5	<i>emm41</i>	M41	1	0.4
<i>emm2</i>	M2	14	6.5	<i>emm49</i>	M49	2	0.9
<i>emm3</i>	M3	13	6.1	<i>emm59</i>	M59	1	0.4
<i>emm4</i>	M4	22	10.3	<i>emm75</i>	M75	32	15.0
<i>emm6</i>	M6	20	9.3	<i>emm77</i>	M77	3	1.4
<i>emm11</i>	M11	2	0.9	<i>emm89</i>	M89	3	1.4
<i>emm12</i>	M12	40	18.7	Sub-Total		213	100
<i>emm22</i>	M22	5	2.3	Sin Tipificar (S / T)		35	
<i>emm28</i>	M28	9	4.2	Total		248	

Tabla 2. Cepas de *S. pyogenes* utilizadas en el estudio mostradas por alelos del gen *emm*, su correspondiente serotipo M y el porcentaje que ocupa cada uno.

La tipificación de las cepas de *S. pyogenes* fue establecida previamente con base al análisis de la secuencia del alelo del gen *emm*<sup>(10)</sup>.

Debido a la relación que existe entre el alelo del gen *emm* con el tipo serológico de la proteína M<sup>(3, 32)</sup> y siendo actualmente la forma en la que las cepas de *S. pyogenes* son tipificadas se conviene, para una mejor comprensión del texto, referirse a los alelos *emm* como serotipos M.

## **2. Material y equipo**

- **Cámaras de electroforesis Sub-cell GT BioRad, Wide mini-sub® cell GT Bio-Rad y Bromma 2013 Miniphor LKB**
- **Fuentes de Poder Power Pac 300 Bio-Rad y BRL Model 4000 Life Technologies Inc**
- **Incubador para tubos Multi-Block Heater Lab-Line**
- **Horno de Microondas Panasonic**
- **Vórtex Genie 2 Scientific Industries**
- **Balanzas digitales E-400 Ohaus® y Explorer Ohaus®**
- **Lámpara de luz UV Macro Vue Uvis-20 Hoefer**
- **Termociclador GeneAmp® PCR System 9700 PE Applied Biosystems**
- **Cámara digital Kodak DC290 Zoom**
- **Software Kodak 1D 3.5 v**
- **Computadoras Compaq Presario 2284, Compaq Deskpro 4000 y Toshiba Satellite 1803**
- **Material General**
  - Micropipetas Labsystems y Gilson 1, 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µL**
  - Puntas desechables 10, 200, 300 y 1000 µL**
  - Tubos eppendorf 0.2, 1.5 mL**
  - Cajas Petri desechables, Guantes desechables, Probetas, Matrices, Espátulas, parafilm**

### 3. Reactivos y medios de cultivo

- BHI Bioxon
- Blood Agar Base Difco
- Sangre desfibrinada de carnero
- Bacto™ Tood-Hewitt Broth Difco
- Glicerol JT Baker
- Kit de coagulación Pastorex Strep Bio-Rad
- Agua ultrapura estéril
- Kit de Extracción DNeasy® Tissue Kit (250) QIAGEN INC
- Amortiguador de corrida TBE 1X, Agarosa Invitrogen y Life Technologies
- Colorante de corrida 6X, marcador de peso molecular 100 pb Fermentas
- Bromuro de etidio Sigma
- Taq polimerasa 1000 U (5U /  $\mu$ L) Altaenzymes
- Taq polimerasa 250 U (5U /  $\mu$ L) Invitrogen
- $MgCl_2$  50 mM Altaenzymes e Invitrogen
- Taq Rxn Buffer 10X Altaenzymes e Invitrogen
- Primer speA1 y speA2 Biosynthesis 20 ODU [100  $\mu$ M]
- Primer speC1 y speC2 Biosynthesis 20 ODU [100  $\mu$ M]
- Primer sic1 y sic2 Biosynthesis 20 ODU [100  $\mu$ M]
- Primer sof1 y sof2 Biosynthesis 20 ODU [100  $\mu$ M]
- Primer prtF1 y prtF2 Biosynthesis 20 ODU [100  $\mu$ M]

#### 4. Metodología

Las cepas estudiadas se sembraron en placas de agar sangre de carnero para verificar la pureza y a partir de las colonias obtenidas se realizaron pruebas de sensibilidad a 0.04 U de bacitracina y pruebas de coaglutinación para comprobar que realmente se tratara de cultivos de *S. pyogenes*. Las cepas se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en BHI / glicerol (15%).

##### 4.1 Crecimiento de cepas de *S. pyogenes*.

Se utilizó caldo Todd-Hewitt (T-H) para crecer las cepas, incubándolas por 24 h. a  $37^{\circ}\text{C}$ . A partir de este cultivo se realizó la extracción del DNA.

##### 4.2 Preparación de buffer de lisis enzimática

Se adicionaron 4 mg de lisozima a 200  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, obteniéndose una concentración final de 20 mg/mL. Este medio se prepara justo antes de realizar la extracción del DNA lo que asegura la eficiencia de la enzima.

### 4.3 Extracción de DNA

Se usó un kit de extracción de DNA de la marca QIAGEN<sup>(30)</sup>, el cual se basa en la lisis bacteriana con proteinasa K y una mezcla de amortiguadores que aumentan la afinidad del DNA bacteriano por una membrana de sílica gel que permite separar el DNA del resto de los componentes celulares. El DNA obtenido es muy estable, se obtiene en cantidades y pureza suficientes para la PCR. La técnica de extracción se describe en el diagrama 1.

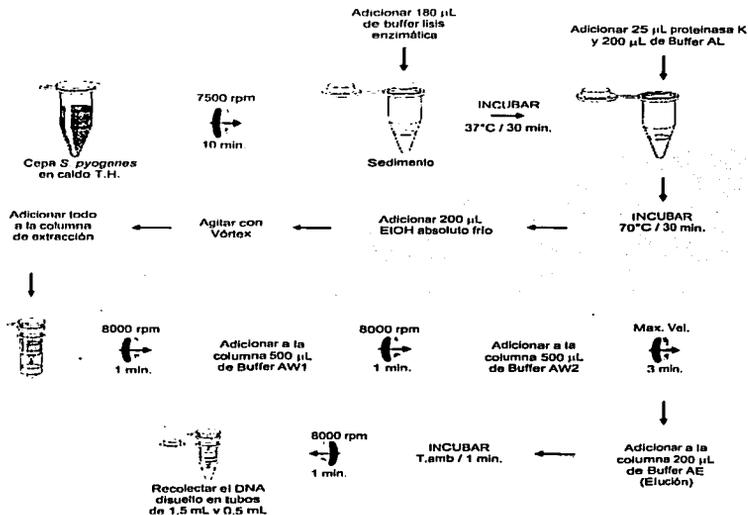


Fig.1. Diagrama de extracción del DNA de cepas de *S. pyogenes*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se trabajó con un volumen final de 30  $\mu\text{L}$  (Tabla 3). Una vez preparados los tubos se colocaron en el termociclador.

Reactivo	Volumen
H <sub>2</sub> O ultrapura	20.15 $\mu\text{L}$
dNTP s (1.25 mM)	5 $\mu\text{L}$
Amortiguador.	3 $\mu\text{L}$
Primer 1	0.6 $\mu\text{L}$
Primer 2	0.6 $\mu\text{L}$
Taq polimerasa	0.15 $\mu\text{L}$
DNA	0.5 $\mu\text{L}$
Total	30 $\mu\text{L}$

Tabla 3. Mezcla de reacción para la PCR por muestra.

La técnica de la PCR consta de tres etapas, cada una con diferente temperatura; en la 1ª etapa sube hasta 94°C / 50 seg. para desnaturalizar el DNA; en la 2ª etapa, la "temperatura de alineamiento" varía dependiendo del primer que se utilice, encontrándose comúnmente entre 30 y 60°C / 50 seg.

momento en que el primer se alinea con la secuencia de DNA deseada; y en la 3ª etapa se incrementa a 72°C / 90 seg., temperatura óptima para que la enzima polimerasa termorresistente replique el segmento de DNA por amplificar<sup>(27)</sup>.

Estas 3 etapas corresponden a un ciclo de reacción que se repite secuencialmente 30 veces; al término se logra obtener un incremento de 10<sup>8</sup> veces la secuencia molde inicial<sup>(27)</sup>(Fig. 1).

La temperatura de alineamiento usada para los genes *speA*, *speC*, *sic* y *sof*, fue de 50°C y para el gen *prtF* 60°C.

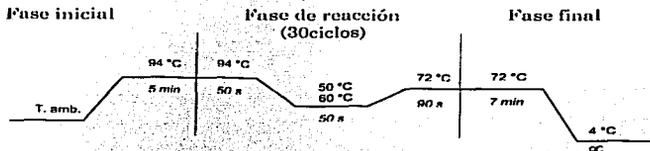


Fig. 2 Diagrama de temperaturas utilizadas para la PCR. En la fase inicial el termociclador incrementa la temperatura a 94°C durante 5 min. lo que asegura que todo el DNA se desnaturalice antes de iniciar la fase de reacción (amplificación). Después de 30 ciclos de reacción, la temperatura se mantiene a 72°C durante 7 min. para garantizar que la polimerasa termine la síntesis de todos los fragmentos de DNA.

La secuencia de los primers utilizados en este estudio se muestra en la Tabla 4.

Gen	Secuencia	Referencia
<i>speA</i>	5' -ATGGAAAACAA'TAAAAAAGTAT'TG-3'	23
	5' -TTACTTGGTGT'TAGGTAGCT'TC-3'	
<i>speC</i>	5' -ACCTATCAT'CAAAGTGACTATAAGAAAGAC-3'	6
	5' -CCCTTCA'TT'TGGT'GAGTCAAATAAGTCTA'TTGA-3'	
<i>sic</i>	5' -TAAGGAGAGGT'CACAAACTA-3'	28
	5' -TTACG'TT'GCT'GATGGT'G'TAT-3'	
<i>sof</i>	5' -GTATAAAC'TTAGAAAGTTATCTGTAGG -3'	4
	5' -GGCCATAACA'TCGGCACCTTCGTCAATT -3	
<i>prtF</i>	5' -GGGGGGTACCT'TTTCAGGAAATATGGTTGAGACA -3'	24
	5' -GGGGGGAAGC'TTTCGCCGTTTCACTGAAACCACTCA -3'	

Tabla 4. Secuencias de los primers utilizados para efectuar la PCR de los 5 genes de virulencia estudiados para *S. pyogenes*.

#### 4.5 Electroforesis

Para identificar los productos de la amplificación se realizaron electroforesis en agarosa. La concentración del gel para los genes *speA*, *speC*, *sic* y *sof* fue de 1.5 % (p/v); se pesaron 3 g de agarosa y se les adicionó 200 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. En cuanto al gen *prtF*, se necesitó una concentración de 2.5% (p/v), ya que el tamaño de los productos de

amplificación es pequeño (200-600 pb). La disolución de la agarosa se efectuó en un horno de microondas y cuando la temperatura era de aproximadamente 45°C, se adicionaron 9  $\mu$ L de bromuro de etidio (0.5 mg/mL), procediéndose a mezclarlos. Antes de que solidificara por completo la agarosa se vació en un molde del tamaño de gel requerido y se dejó solidificar. Una vez solidificado, el gel se introdujo a la cámara de electroforesis llenada previamente con amortiguador TBE 1X. Antes de cargar los productos de la PCR en el gel, estos se mezclaron con un colorante de corrida para saber cuando detener la electroforesis. El voltaje que se usó fue de 100 V.

#### 4.6 Revelado de la electroforesis

El bromuro de etidio se intercala entre el DNA y se hace visible al entrar en contacto con luz UV; por ello, para revelar el resultado de la electroforesis, el gel se colocó sobre una lámpara UV.

#### 4.7 Foto digital

Por último, se tomó una foto del gel con cámara digital, la imagen se almacenó en la computadora para su análisis posterior.

## 5 Resultados y discusión

### 5.1 Análisis de los productos de la PCR para cada gen.

Las cepas de *S. pyogenes* que presentaron el gen que codifica para la exotoxina progénica A (*speA*), se obtuvo un producto de amplificación con un peso molecular de aproximadamente 700 pb; mientras que las cepas que presentaron el gen *speC*, el producto de la PCR fue de aproximadamente 550 pb (Foto 1).

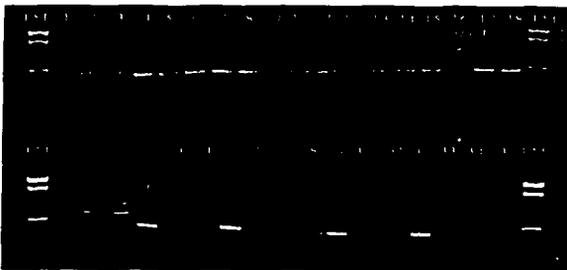


Foto 1. Gel de agarosa (1.5 %), los carriles 1-35 muestran el tamaño de los productos de la PCR para los genes *speA* y *speC*; PM es el marcador de peso molecular de 100 pb.

En cuanto a las cepas de *S. pyogenes* que contenían el gen *sic* mostraron un producto de amplificación cercano a 900 pb; por lo que respecta al producto de la PCR para el gen *sof*, su peso aproximado es de 600 pb (Foto 2).

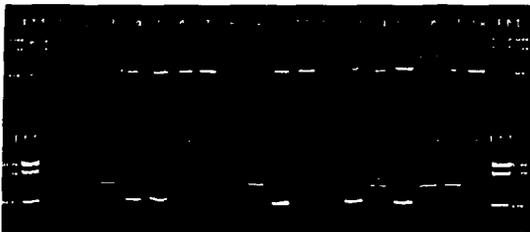


Foto 2. Gel de agarosa (1.5%); los carriles 1-36 muestran el tamaño de los productos de la PCR para los genes *sic* y *sof*; PM es el marcador de peso molecular de 100 pb.

Por último, en relación con el gen *prtF* se determinó que el peso molecular del producto amplificado varía desde 200 hasta 600 pb; algunas cepas presentaron un producto de la PCR de 100 pb para este gen (Foto 3).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

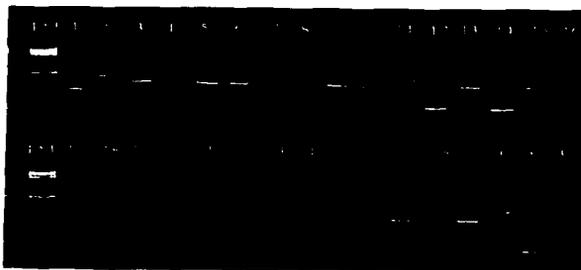


Foto 3. Gel de agarosa (2.5%); carriles 1-32 muestran la variabilidad de los productos de la PCR para el gen *ptiF*. PM es marcador de peso molecular de 100 pb.

## 5.2 Análisis de la frecuencia de los genes asociados a la virulencia de *S. pyogenes*.

Después de determinar la presencia de los genes *speA*, *speC*, *sic*, *sof*, y *ptiF* para las 248 cepas encontramos los siguientes porcentajes:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Genes identificados	# de Cepas positivas	Porcentaje
<i>speA</i>	32	12.9
<i>speC</i>	181	72.9
<i>sic</i>	48	19.3
<i>sof</i>	157	63.3
<i>prtF</i>	144	58

Tabla 5. Frecuencia de genes detectados por la PCR en las cepas clínicas de *S. pyogenes*.

#### 5.2.1 Análisis de la presencia del gen *speA*

El gen *speA*, que codifica para la exotoxina pirogénica SpeA fue detectado en 32 de las 248 cepas analizadas, representando el 12.9 % (Tabla 5). Este gen fue identificado en cepas que pertenecen a los serotipos M1, M2, M3, M4 y M28 representando un tercio de los serotipos analizados (Tabla 6). De las cepas positivas para *speA*, cerca del 85 % correspondieron a aislamientos de *S. pyogenes* de los serotipos M1 y M3 (21 y 6 respectivamente); sin embargo, considerando el tamaño de la población total de M1 y M3 notamos que la presencia de este gen fue menor al 50% [M1 (21/46) y M3 (6/13)]. La presencia de dicho gen en estos serotipos da idea de

Serotipo M (No. cepas)	<i>SpeA</i>	(%)	<i>speC</i>	(%)	<i>sic</i>	(%)	<i>sof</i>	(%)	<i>prtF</i>	(%)	
<i>emm1</i>	(46)	21	(46)	6	(13)	44	(96)	1	(2)		
<i>emm2</i>	(14)	1	(7)	12	(86)			14	(100)	1 (7)	
<i>emm3</i>	(13)	6	(46)	13	(100)			1	(8)		
<i>emm4</i>	(22)	1	(4)	20	(91)			22	(100)	21 (95)	
<i>emm6</i>	(20)			19	(95)			1	(5)	19 (95)	
<i>emm11</i>	(2)			2	(100)			2	(100)	2 (100)	
<i>emm12</i>	(40)			38	(95)			39	(98)	24 (60)	
<i>emr122</i>	(5)			1	(20)			5	(100)	5 (100)	
<i>emm28</i>	(9)	1	(11)	7	(78)			9	(100)	9 (100)	
<i>emm41</i>	(1)			1	(100)					1 (100)	
<i>emm49</i>	(2)			1	(50)			2	(100)		
<i>emm59</i>	(1)							1	(100)	1 (100)	
<i>emm75</i>	(32)			32	(100)			32	(100)	32 (100)	
<i>emm77</i>	(3)			3	(100)			3	(100)	3 (100)	
<i>emm89</i>	(3)			3	(100)			3	(100)	2 (67)	
<i>S / T</i>	(35)	2		23		4		22		24	
<b>Total ( 248 )</b>		<b>32</b>	<b>(12)</b>	<b>181</b>	<b>(72)</b>	<b>48</b>	<b>(19)</b>	<b>158</b>	<b>(63)</b>	<b>144</b>	<b>(58)</b>

Tabla 6. Distribución de los genes *speA*, *speC*, *sic*, *sof* y *prtF* en 15 serotipos de *S. pyogenes* de origen clínico.

la capacidad de virulencia con respecto a las demás clonas, por lo menos en lo que respecta a la producción de la exotoxina pirogénica SpeA.

Sólo un aislamiento de los serotipos M2, M4 y M28 mostró la presencia del gen *speA*, representando en conjunto 10% de prevalencia de dicho gen. El 5% restante corresponde a dos cepas que se encuentran en proceso de tipificación; las cuales podrían pertenecer a los serotipos M1 o M3.

#### 5.2.1.1 Prevalencia del gen *speA* en aislamientos clínicos de *S. pyogenes* serotipo M1.

Debido a que el serotipo M1 presentó el mayor número de cepas con el gen *speA*, se realizó un análisis comparativo del origen de las cepas con la presencia de este gen Tabla 7. Todas las cepas M3 analizadas provienen de pacientes con faringitis.

Serotipo (# cepas)	Aislamientos Faringeos	<i>speA</i> (+)	%	Aislamientos No Faringeos	<i>speA</i> (+)	%
M1 (16)	34	13	38	12	8	67

Tabla 7. Relación entre el origen de las cepas del serotipo M1 de *S. pyogenes* y el gen *speA*.

En los aislamientos de *S. pyogenes* pertenecientes al serotipo M1 la presencia del gen *speA* fue observada tanto en cepas faringneas (38%) como en cepas no faringneas (67%). La presencia de este gen en cepas provenientes de cuadros faringneos refleja la importancia epidemiológica del serotipo M1. La oportuna eliminación de estas cepas en la comunidad puede contribuir a disminuir el desarrollo de procesos invasivos desencadenados por este serotipo, ya que se ha visto tiene la capacidad de iniciar infecciones faringneas y continuar con cuadros invasivos<sup>(8)</sup>.

La prevalencia del gen *speA* detectada en los aislamientos no faringneos indica el papel que puede jugar dicho serotipo en la patogénesis de esta bacteria.

Aparentemente, la frecuencia del gen *speA* entre los diferentes serotipos M de *S. pyogenes* puede variar de acuerdo al origen de las cepas. En un estudio realizado en los Estados Unidos (con 63 cepas provenientes de faringitis y de cuadros invasivos), se demostró que aparte del serotipo M28, las cepas faringneas pertenecientes a los serotipos M12, M77 y M89 presentaron el gen *speA*, mientras que para las cepas invasivas el gen *speA* fue detectado en los serotipos M1, M2, M3, M4, M6, M59 y M75 <sup>(13)</sup>. Estos datos difieren considerablemente con resultados reportados previamente en cepas Mexicanas, ya que en 1997, un estudio con 54 cepas de niños con faringitis reveló la presencia del gen *speA* únicamente en los serotipos M1, M3 y M6<sup>(28)</sup>.

esto último concuerda con nuestros resultados, a pesar de que ninguna cepa del tipo M6 presentó el gen *speA*.

### 5.2.2 Análisis de la presencia del gen *speC*

Como se observa en la tabla 5, el 72.9 % de las cepas analizadas presentan el gen *speC*. Si excluimos del análisis de este gen a las cepas correspondientes al serotipo M1, donde se observa un fenómeno de exclusión con el gen *speA*, podríamos decir que más del 90% de las cepas analizadas presentan el gen *speC*, lo que nos indica su alta prevalencia entre los diferentes serotipos de *S. pyogenes*; con excepción de la cepa del serotipo M59, todos los demás serotipos encontrados en este estudio presentan mayoritariamente este gen (Tabla 6).

En las cepas pertenecientes al serotipo M22 este gen solo se detectó en un 20% (1/5). De forma similar, en el serotipo M49 se detectó en un 50% (1/2). Esto nos demuestra que la presencia de *speC* puede variar aún en el mismo serotipo (Tabla 6).

Después del análisis anterior podemos decir que en el presente estudio el 93% de los serotipos (14/15) estudiados tienen el gen que codifica para la exotoxina pirogénica SpeC.

El patrón de exclusión para las cepas M1, antes mencionado, se hizo evidente porque el 46% de las cepas (21/46) fueron *speA* positivas, el 13% (6/46) *speC* positivas y el 41% restante (19/46) no tuvo en su genoma ninguno de los dos genes, por lo que M1 contiene la información genética para la producción de solo una exotoxina pirogénica, ya sea *SpeA* o *SpeC*.

En las cepas del serotipo M3 observamos que, a diferencia de M1, el 46% de las cepas (6/13) presentan los dos genes (*speA* y *speC*), por lo que el incremento en la virulencia de M3 podría estar asociado a la presencia de ambas exotoxinas. Los resultados obtenidos para M3 son similares a los reportados en estudios realizados en Estados Unidos, donde se observó que los serotipos M1 y M3 contenían ambos genes <sup>(33)</sup>.

Esto nos indica que los mecanismos de virulencia entre M1 y M3 son diferentes, se sabe que los serotipos son genéticamente distintos y la función de muchos de estos elementos genéticos esta siendo estudiada para entender los diferentes niveles de virulencia de cada serotipo <sup>(2, 5)</sup>.

### 5.2.3 Análisis de la presencia del gen *s/c*.

El gen que codifica para la proteína estreptococcica inhibidora del complemento (*S/C*) fue identificado en 48 aislamientos, todos

correspondientes al serotipo M1. Este gen ha sido descrito en los serotipos M1 y M57<sup>(14,29)</sup> y de acuerdo a la tabla 1, el porcentaje detectado del gen *sic* en el presente estudio fue de cerca del 19 % de la población total analizada, era de esperarse que la frecuencia de este gen fuera la misma a la del serotipo M1, sin embargo en dos cepas no fue detectado, podemos suponer que debido al gran número de variantes alélicas descritas actualmente para el gen *sic* (> de 300), los primers utilizados no fueron capaces de unirse al gen por lo que este no se amplificó. Se propone confirmar esta teoría utilizando primers que se localicen fuera del gen *sic* a manera de poder secuenciar estas regiones para caracterizar las variantes alélicas del gen para estas cepas M1.

Cuatro cepas identificadas como *sic* positivas se encuentran en proceso de tipificación<sup>(10)</sup>, suponemos que serán identificadas como M1, debido a que la prevalencia del serotipo M57 en cepas clínicas es muy baja.

La determinación del gen *sic* por la técnica de la PCR puede servir para identificar de manera inmediata cepas del serotipo M1 de *S. pyogenes*.

#### 5.2.4 Análisis de la presencia del gen *sof*

El gen que codifica para una lipoproteínasa sérica (*sof*) ha sido reportado entre el 40 % y el 60 % de los serotipos de *S. pyogenes* <sup>(4)</sup>. Este gen

fue detectado en el 63.3% de las cepas estudiadas (Tabla 5). Las cuales correspondieron al 73% de los serotipos analizados(11/15), por lo que podemos deducir que en la población mexicana predominan los serotipos de *S. pyogenes* *sof* positivos (Tabla 6).

Los serotipos encontrados en este estudio que han sido reportados previamente como *sof* positivos son: M2, M4, M11, M12, M22, M28, M49, M59, M75, M77 y M89 y como negativos para este gen: M1, M3, M6 y M41, con lo que observamos que no existe discrepancia entre lo reportado en la literatura y lo encontrado en cepas mexicanas, excepto para tres aislamientos de los serotipos M1, M3 y M6 (Tabla 6), en los que después de repetir la PCR bajo diferentes condiciones el genotipo *sof* positivo se mantuvo, esto genera la necesidad de secuenciar el gen amplificado en estas cepas y corroborar su presencia en el genoma. El hallazgo del gen *sof* en cepas tradicionalmente identificadas como *sof* (-) podría resultar de importancia en el conocimiento de los mecanismos de virulencia de *S. pyogenes*.

#### 5.2.5 Análisis de la presencia del gen *prtF*

El gen *prtF* que codifica para una proteína asociada a la adherencia de la bacteria a la fibronectina se detectó en el 60% de los aislamientos estudiados. Aunque el gen *prtF* es constitutivo, al igual que el gen *sof*, no

todos los serotipos de *S. pyogenes* cuentan con él, reportándose su presencia en cerca del 50 % de los serotipos de *S. pyogenes* <sup>(24)</sup>. Los serotipos que presentaron el gen *prtF* son: M4, M6, M11, M12, M22, M28, M41, M59, M75, M77 y M89, mientras que los serotipos M1, M2, M3 y M49 fueron negativos; El genotipo de *prtF* concuerda con lo reportado anteriormente para estos serotipos <sup>(24)</sup>. Además, observamos que de acuerdo a los serotipos estudiados el 73 % (11/15) son *prtF* positivos y el 27 % (4/15) son negativos. La detección de este gen en conjunto a los antes descritos pueden servir en la tipificación de los diferentes serotipos de *S. pyogenes*. La mayoría de los aislamientos de *S. pyogenes* en este estudio corresponden a serotipos identificados como *prtF* positivos.

Con el gen *prtF* encontramos algo muy similar al gen *sof*, ya que en los serotipos denominados positivos encontramos del 95 al 100 % de presencia del gen y en los negativos porcentajes por debajo de 7%, lo que facilita bastante la clasificación de los serotipos en *prtF* positivos y *prtF* negativos.

Después de analizar la relación entre los serotipos y su genotipo en lo referente a la virulencia, notamos que los serotipos M1 y M3 no contiene en su genoma los genes *sof* y *prtF*; podemos suponer entonces que estos factores de virulencia, importantes para la adherencia, no le son útiles a dichos serotipo y muy probablemente su ausencia en el genoma les otorgue una ventaja que permite la invasión de tejidos más profundos.

### 5.3 Análisis de los genes de virulencia compartidos entre las cepas de *S. pyogenes*

Se realizó un análisis para determinar las cepas de *S. pyogenes* que comparten genes asociados a la virulencia que fueron detectados en este estudio. La tabla 8 muestra las combinaciones encontradas entre los 5 genes analizados y el número de cepas que presentaron dicha combinación.

Gen (No. cepa)	<i>speC</i>	<i>sic</i>	<i>sof</i>	<i>prtF</i>
<i>speA</i> (32)	8	19	4	2
<i>speC</i> (181)	■	9	136	126
<i>sic</i> (48)	■	■	3	1
<i>sof</i> (157)	■	■	■	120
<i>prtF</i> (144)	■	■	■	■

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Relación de cepas de *S. pyogenes* que presentaron más de un gen de virulencia.

De las 32 cepas clínicas donde el gen *speA* fue detectado solo en 8 el gen *speC* estuvo presente, de estas 6 aislamientos fueron M3, uno M4 y otro no tipificado aún. Estos datos concuerdan con estudios donde se reporta a M3 como uno de los serotipos capaces de presentar ambas toxinas<sup>(4)</sup>. Adicionalmente en este estudio encontramos una cepa M4 que también

presenta ambas exotoxinas, si recordamos que este gen es adquirido por un bacteriófago, entonces es posible suponer que cualquier serotipo que contenga el receptor adecuado será capaz de contener los genes para ambas exotoxinas. Es probable que la cepa que no ha sido tipificada corresponda a M3, ya que el genotipo que presenta corresponde al observado para este serotipo (*speC*<sup>+</sup>, *sof*<sup>-</sup> y *prtF*<sup>-</sup>).

De igual forma, en la tabla 8 también observamos que 19 cepas compartieron los genes *speA* y *sic*, este último, como sabemos hasta ahora está relacionado al serotipo M1, es por ello que la combinación de estos genes solo la presenta este serotipo.

En este estudio 4 cepas de diferentes serotipos presentaron los genes *speA* y *sof*: M2, M4, M28 y una sin tipificar. Aunque la presencia de *speA* en estos serotipos no es común, este puede presentarse en serotipos de *S. pyogenes* identificados como *sof*<sup>+</sup> (15). Adicionalmente las cepas M4 y M28 también presentan el gen *prtF* (Tabla 6 y 9).

En la tabla 8 podemos ver que de las cepas que presentan el gen *speC* 9 de ellas compartieron el gen *sic*, siendo por lo tanto M1.

Además del gen *speC*, 136 cepas también contenían el gen *sof* (54%), indicando una relación entre los serotipos *sof* positivos con la presencia del

gen de la exotoxina *SpeC*. La combinación de cepas en las que se detectó *speC* y *prtF* fue del 50% (126/248) y aquellas cepas donde se encontraron los genes *sof* y *prtF* fueron 120 (48%).

Por último, en 105 (41%) aislamientos se encontró la presencia de los tres genes, *speC*, *sof* y *prtF*. (Fig. 3)

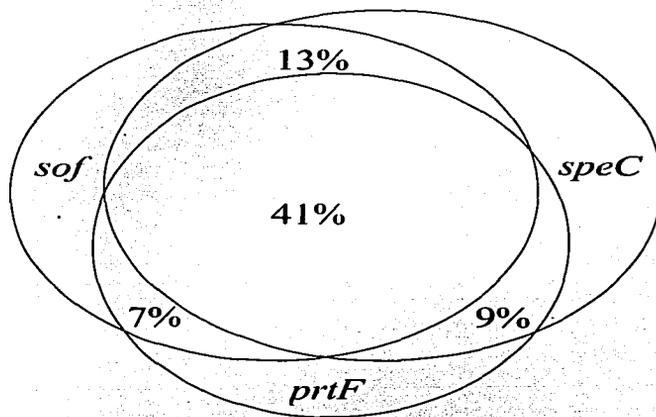


Fig. 3 Representación de la combinación de genes de virulencia *speC*, *sof* y *prtF* en la población total de cepas tipificadas

El gen *sic* fue detectado solo en M1, este serotipo es *sof* negativo, lo esperado era no encontrar cepas que compartieran estos dos genes, sin embargo se encontraron 3 cepas de las cuales una está tipificada como M1 y dos están por tipificarse, es importante continuar las investigaciones en estas cepas realizando la secuenciación del gen *sof*, ya que este hallazgo podría aportar al conocimiento de *S. pyogenes*. De igual manera el serotipo M1 se ha visto que es *prtF* negativo, pero contamos con una cepa que comparte los genes *sic* y *prtF*; esta cepa no ha sido tipificada aún.

#### 5.4 Patrones en la frecuencia de los 5 genes de virulencia investigados para cada serotipo encontrado en las cepas clínicas.

En base a los resultados obtenidos y los análisis realizados anteriormente sobre el genotipo de *speA*, *speC*, *sic*, *sof* y *prtF* y su relación con los diferentes serotipos de *S. pyogenes* encontrados, podemos suponer un patrón de frecuencia para cada serotipo el cual nos puede ayudar significativamente en la clasificación de cepas de *S. pyogenes* (Tabla 9).

Serotipo	# Cepas	(%)	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>sic</i>	<i>sof</i>	<i>prtF</i>
<i>M1</i>	46	22	+/-	+/-	+	-	-
<i>M2</i>	14	7	-	+	-	+	-
<i>M3</i>	13	6	+/-	+	-	-	-
<i>M4</i>	22	10.5	-	+	-	+	+
<i>M6</i>	20	9	-	+	-	-	+
<i>M11</i>	2	1	-	+	-	+	+
<i>M12</i>	40	18.5	-	+	-	+	+/-
<i>M22</i>	5	2	-	-	-	+	+
<i>M28</i>	9	4	-	+	-	+	+
<i>M41</i>	1	0.5	-	+	-	-	+
<i>M49</i>	2	1	-	+/-	-	+	-
<i>M59</i>	1	0.5	-	-	-	+	+
<i>M75</i>	32	15	-	+	-	+	+
<i>M77</i>	3	1.5	-	+	-	+	+
<i>M89</i>	3	1.5	-	+	-	+	+/-

Tabla 9. Patrones de genotipos propuestos para *speA*, *speC*, *sic*, *sof* y *prtF* en los serotipos estudiados de *S. pyogenes*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 9 se observó que algunos serotipos como el M1 y el M3 pueden tener variedad en la presencia del gen *speA*, así mismo, la presencia del gen *speC* puede ser variable en los serotipos M1 y M49. Para las muestras clínicas estudiadas el gen *sic* es exclusivo del serotipo M1.

Aunque el genotipo de *sof* esta reportado para la mayoría de los serotipos de *S. pyogenes*, algunas veces se pueden encontrar variaciones fenotípicas en el mismo serotipo<sup>(25)</sup>, esto podría explicarse a través de alguna mutación genética que impidiera la expresión del gen, lo que es común en el serotipo M12, el cual esta reportado genotípicamente como *sof*<sup>+</sup>, sin embargo fenotípicamente es clasificado como *sof*<sup>-</sup> (4).

El gen *prtF* lo encontramos variable en los serotipos M12 y M89.

Es importante aclarar que los resultados obtenidos en este estudio para la frecuencia de los genes *speA* y *speC* se obtuvo de cepas mexicanas, ya que la frecuencia de estos genes varía en las diferentes cepas de todo el mundo<sup>(13,33)</sup>.

Las presencia de los los genes *sic* y *sof* en los serotipos de *S. pyogenes* se han reportado previamente y ésta parece no variar con la localización geográfica de la cepa<sup>(4,19)</sup>. De igual forma para el gen *prtF* no se presenta variación entre los diferentes serotipos<sup>(24)</sup>, aunque en este estudio, los

serotipos M12 y M89 mostraron una variación que abre la puerta para estudios posteriores al respecto.

#### 5.5 Análisis de la prevalencia de serotipos M por hospitales.

Doscientas trece cepas clínicas de *S. pyogenes*, que ya habían sido tipificadas con base al análisis del gen *emm* (proteína M), fueron agrupadas en 15 serotipos diferentes (Tabla 2). Sin embargo, el análisis de la distribución de estos serotipos por hospitales y origen de la cepas no había sido realizado. La frecuencia de los diferentes serotipos por hospitales es muy variada (Tabla 10) Para las cepas aisladas en el Centro Médico Nacional (CMN) los serotipos prevalentes fueron M3 y M75, en 16 cepas donadas se observaron 7 serotipos diferentes que equivalen a cerca del 50 % de los serotipos reportados en este estudio.

En el Hospital Gabriel Mancera (HGM) encontramos predominantemente M75 y de 16 cepas donadas una distribución de casi el 30% de los serotipos.

Del Hospital Gonzalo Castañeda (HGC) del ISSSTE se obtuvo el mayor número de cepas del estudio (75), por ello aquí se encontraron 11

Serotipo M (No. cepas)	CMN	HGM	HGC	HLM	INC	INP	INER	CSM	CSCV	HMS
<i>emm1</i> (46)	2	1	6	5	3	12	4	1	4	8
<i>emm2</i> (14)			2			8				4
<i>emm3</i> (13)	5		2	1		1		1		3
<i>emm4</i> (22)	2	3	3	2		4		1	2	5
<i>emm6</i> (20)	1		7	1		2	2	4		3
<i>emm11</i> (2)						2				
<i>emm12</i> (40)		1	23	5		3	1	1		6
<i>emm22</i> (5)	1		2			1		1		
<i>emm28</i> (9)	1		8							
<i>emm41</i> (1)										1
<i>emm49</i> (2)					1	1				
<i>emm59</i> (1)						1				
<i>emm75</i> (32)	3	8	11	2	1	4	1			2
<i>emm77</i> (3)			1	1		1				
<i>emm89</i> (3)			2							1
<i>S/T</i> (43)	1	3	8	2	1	11	2	2	1	4
Total 256	16	16	75	19	6	51	10	11	7	37

Tabla 10. Distribución de los serotipo M de *S. pyogenes* de acuerdo a las instituciones donde se aislaron

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

serotipos de *S. pyogenes* (73%), predominando M12 y M75 con 23 y 11 cepas respectivamente

En el Hospital López Mateos (HLM) encontramos igual número de cepas M1 que de M12 (5 de cada uno) y los serotipos encontrados en 19 aislamientos comprenden una distribución del 50 %.

Del Instituto Nacional de Cardiología (INC) se analizaron seis cepas, en su mayoría M1, las cepas tipificadas en este instituto presentaron el 20 % de los serotipos. De forma parecida, en el INER predominó el serotipo M1 y en 10 cepas analizadas el porcentaje de diversidad de serotipos fue de 25%. Podemos notar la gran similitud en las cepas en ambos institutos.

Las 51 cepas obtenidas del Instituto Nacional de Pediatría mostraron un comportamiento diferente al de los otros dos institutos. En este se encontró la mayor variedad de serotipos M de *S. pyogenes* (12/15), correspondiente al 80%. Los serotipos prevalentes fueron, en primer lugar M1 con 12 cepas y en segundo M2 con 8 cepas.

En el Centro de Salud de Morelia (CSM) observamos una variedad en la distribución de serotipos (40%), que llama la atención ya que solo se donaron 11 cepas. El serotipo prevalente fue M6.

Del Centro de Salud Castro Villagrana (CSCV) se analizaron 7 cepas, las cuales pertenecen a 2 serotipos: el M1 y el M4.

En el Hospital Médica Sur (HMS) la distribución de serotipos fue del 60%, ya que de 37 cepas donadas encontramos 9 serotipos diferentes, entre los que destacan principalmente los serotipos M1 M2, M4 y M12, mostrando más homogeneidad en la cantidad de cepas para cada serotipo.

La comparación de la distribución de serotipos por hospitales se realizó entre aquellos en los que se contó con número de aislamientos similares; por ello podemos notar los siguiente:

- Mientras que para el INP los serotipos prevalentes fueron M1 y M2, en el HGC estos serotipos ocuparon el 5º y el 7º lugar respectivamente.
- En los tres institutos de salud el serotipo prevalente fue M1, a diferencia del resto de los hospitales.
- En el Centro de Salud Morelia se encontró mucho mayor variedad de serotipos de *S. pyogenes* en comparación con el Hospital Gabriel Mancera y con el INER y estos últimos presentaron un mayor número de cepas.

El serotipo M1 fue identificado en todas las entidades de salud con las que se trabajo (Tabla 10), lo cual nos confirma que en nuestra población

representa uno de los serotipos más prevalentes, destacando entre los 124 serotipos conocidos de *S. pyogenes*, de ahí su importancia epidemiológica <sup>(15)</sup>

Tomando en cuenta únicamente los datos de las cepas tipificadas, podemos decir que en nuestra población, además de M1, los serotipos M2, M3, M4, M6, M12 y M75 son más comunes y en la tabla 10 podemos notar que se aislan en la mayoría de los hospitales y representan, junto con M1, cerca del 90 % de la población total.

Dentro del 10% restante están algunos serotipos, como el M11, M41, M49 y M59, que están asociados con cuadros no faringeos (Tabla 11), por lo que son identificados principalmente en las cepas provenientes del INP y del INC.

Las cepas que aún no han sido tipificadas se encuentran distribuidas en los diferentes hospitales y de manera proporcional al número de cepas que cada hospital donó, por lo que no alterará la estadística de este estudio.

#### 5.6 Relación de serotipos M de *S. pyogenes* con el origen clínico de las cepas (faringeas y no faringeadas)

Aunque las cepas clínicas fueron tipificadas previamente por M, no se ha realizado un análisis de la prevalencia de los serotipos de acuerdo al origen clínico de las cepas.

En la tabla 11 los aislamientos de *S. pyogenes* fueron agrupados de acuerdo a su serotipo y origen clínico con la finalidad de comparar la prevalencia de los serotipos en enfermedades faringéas y no faringéas.

De acuerdo a esta clasificación los serotipos aislados mayoritariamente en cepas mexicanas de *S. pyogenes* provenientes de faringitis son M12 (21%), M1 (18%) y M75 (15%), como se puede observar en la Tabla 11. En la mayoría de los estudios epidemiológicos realizados se ha observado que el serotipo con mayor prevalencia es M1<sup>(8)</sup>, sin embargo, de acuerdo a este estudio, en México también el serotipo M12 y M75 presentan importancia epidemiológica como principales serotipos causales de faringitis.

En lo que respecta a las cepas provenientes de cuadros no faringéos observamos que el serotipo con mayor prevalencia en México es M1 (40%), lo que concuerda con los estudios epidemiológicos realizados en otras partes del mundo donde este serotipo es el más frecuente en enfermedades invasivas<sup>(8)</sup>.

Otros serotipos con menor frecuencia en cuadros no faringéos fueron M2 (13%), M6 (10%), M75 (10%) y M11 (7%), los cuales también han sido descritos en cuadros invasivos<sup>(8)</sup>.

Serotipo (No. cepas)	Aislamientos		Aislamientos		Relación de % Faringeo / No faringeo
	Faringeos	%	No Faringeos	%	
<i>emm1 (16)</i>	34	18.6	12	40	74 / 26
<i>emm2 (14)</i>	10	5.5	4	13.4	71 / 29
<i>emm3 (13)</i>	13	7.1			100 / 0
<i>emm4 (22)</i>	21	11.5	1	3.3	95 / 5
<i>emm6 (20)</i>	17	9.3	3	10	85 / 15
<i>emm11 (2)</i>			2	6.7	0 / 100
<i>emm12 (40)</i>	39	21.3	1	3.3	98 / 2
<i>emm22 (5)</i>	5	2.7			100 / 0
<i>emm28 (9)</i>	9	4.9			100 / 0
<i>emm41 (1)</i>			1	3.3	0 / 100
<i>emm49 (2)</i>			2	6.7	0 / 100
<i>emm59 (1)</i>			1	3.3	0 / 100
<i>emm75 (32)</i>	29	15.9	3	10	91 / 9
<i>emm77 (3)</i>	3	1.6			100 / 0
<i>emm89 (3)</i>	3	1.6			100 / 0
<i>S / T (35)</i>	24		11		69 / 31
<b>Total (248)</b>	<b>207</b>		<b>41</b>		<b>83 / 17</b>

Tabla 11. Prevalencia de los serotipos M de *S. pyogenes* en relación al origen clínico de las cepas

### 5.7 Análisis de las frecuencias de serotipos dependiendo del origen de la cepa

Este análisis tiene por objeto definir los porcentajes de cada serotipo de *S. pyogenes* para las enfermedades faringéas y no faringéas. Los serotipos encontrados en faringitis comprendieron el 73% de los serotipos reportados (11/15), observando que los serotipos M3, M22, M28, M77 y M89 fueron identificados únicamente en este tipo de enfermedades.

Los serotipos aislados de cuadros no faringéos abarcaron cerca del 67% (10/15) y de los cuales 4 serotipos M11, M41, M49 y M59 se presentaron únicamente en aislamientos de enfermedades no faringéas (Tabla 11).

De acuerdo a los estudios de prevalencia reportados en la literatura, los serotipos M1, M3 y M6 están asociados a faringitis, mientras que M49 y M59 están asociados a cuadros de pioderma y glomerulonefritis aguda. Los serotipos M1, M3, M11, M12 y M28 pueden provocar cuadros invasivos como consecuencia de una faringitis<sup>(6)</sup>. Estas evidencias resaltan la importancia del control epidemiológico de *S. pyogenes* en cuadros como la faringitis estreptocócica. Aunque en este estudio M3 solo fue identificado en cepas faringéas.

## 5.8 Relación entre los hospitales con el origen clínico de las cepas de *S. pyogenes*

La distribución de los aislamientos de *S. pyogenes* con respecto a su origen clínico no es homogénea. La tabla 12 muestra las diferentes cepas clínicas que se estudiaron de acuerdo a su origen clínico.

En esta tabla podemos ver que la mayoría de las cepas provenientes de faringitis fueron aisladas de los hospitales del ISSSTE y del IMSS, mientras que las cepas provenientes de cuadros no faringeos fueron obtenidas principalmente de los 3 institutos de salud (88%), con ello podemos suponer que los laboratorios clínicos de instituciones como el IMSS e ISSSTE procesan más muestras clínicas provenientes de exudados faringeos que los institutos de salud. Esta diferencia puede estar dada por el tipo de paciente que manejan los institutos, donde las faringitis no son cuadros comúnmente atendidos.

Hospital (No. cepas)	Aislamientos Faringeos	(%)	Aislamientos No Faringeos	(%)
CMN (16)	15	94	1	6
HGM (16)	16	100		
HGC (75)	74	99	1	1
HLM (19)	19	100		
INC (6)			6	100
INP (51)	25	49	26	51
INER (10)	5	50	5	50
CSM (11)	11	100		
CSCV (7)	7	100		
HMS (37)	35	95	2	5

Tabla 12. Distribución de las cepas de *S. pyogenes* de acuerdo a su origen clínico

Este tipo de análisis permite realizar una vigilancia epidemiológica de los serotipos de *S. pyogenes* que se aíslan en los hospitales de la ciudad de México que colaboran en el proyecto. Además de conocer la prevalencia de los serotipos de *S. pyogenes* y su asociación con los cuadros clínicos de donde son aislados. La identificación de los genes asociados a la virulencia de la bacteria puede servir como marcadores epidemiológicos adicionales para el estudio de brotes intra y extrahospitalarios ocasionados por *Streptococcus pyogenes*.

## Conclusiones

- Los genes de virulencia de *S. pyogenes* más prevalentes en la población mexicana son *speC* (72%), *sof* (62%) y *prtF* (59%).
- La detección del gen *sic* por PCR es útil para la identificación de cepas de *S. pyogenes* del serotipo M1: siendo este el de mayor importancia clínica por su presencia en diversas enfermedades.
- La prevalencia del gen *speA* esta asociada a los serotipos M1 y M3. La frecuencia de este gen de virulencia en nuestra población es del 12%.
- La detección de los genes de virulencia permite determinar patrones de prevalencia para cada serotipo, lo que puede facilitar la tipificación de cepas de *S. pyogenes*.
- La distribución de serotipos de *S. pyogenes* en las entidades de salud de la Cd. de México no es homogénea.
- Los serotipos M1, M12 y M75 están asociados en más del 50% de las cepas de *S. pyogenes* provenientes de faringitis, mientras que para cuadros no faringeos los serotipos asociados son M1 y M2.

- Los serotipos de *S. pyogenes* M3, M22, M28, M77 y M89 fueron identificados exclusivamente en cepas provenientes de faringitis, mientras que los serotipos M11, M41, M49 y M59 en cepas provenientes de cuadros no faríngeos.
- El serotipo M1 de *S. pyogenes* es el más prevalente en la población mexicana.
- El uso de técnicas moleculares aplicadas a la identificación y caracterización de genes de virulencia de *S. pyogenes* permite establecer una vigilancia epidemiológica de las cepas aisladas en los hospitales de la Ciudad de México.

## Referencias

1. Akesson P, Sjolholm AG, Bjorck L. Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. J Biol Chem. 1996. 271(2):1081-8.
2. Banks DJ, Beres SB, Musser JM. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. Trends Microbiol. 2002;10(11):515-21.
3. Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. J Clin Microbiol. 1996 Apr;34(4):953-8.
4. Beall B, Gherardi G, Lovgren M, Facklam RR, Forwick BA, Tyrrell GJ. *emm* and *sof* gene sequence variation in relation to serological typing of opacity-factor-positive group A streptococci. Microbiology. 2000. 146:1195-209.
5. Beres SB, Sylva GL, Barbian KD, Lei B, Hoff JS, Mammarella ND, Liu MY, Smoot JC, Porcella SF, Parkins LD, Campbell DS, Smith TM, McCormick JK, Leung DY, Schlievert PM, Musser JM. Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(15):10078-83.
6. Bessen DE, Izzo MW, Florentino TR, Caringal RM, Hollingshead SK, Beall B. Genetic linkage of exotoxin alleles and emm gene markers for tissue tropism in group A streptococci. J Infect Dis. 1999 Mar;179(3):627-36.

7. Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis*. 2003. 3(4):191-200.
8. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2000. 13(3):470-511.
9. Fernie-King BA, Seilly DJ, Davies A, Lachmann PJ. Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect Immun*. 2002. 70(9):4908-16.
10. Figueroa F. Tipificación molecular del gen que codifica para la proteína M (*emm*) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Tesis Lic. Q.F.B. Facultad de Química. UNAM. México. (En proceso)
11. Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J. Gram-Positive Pathogens. ASM Press. 2000. Washington D.C.
12. Frick IM, Akesson P, Rasmussen M, Schmidtchen A, Bjorck L. SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J Biol Chem*. 2003. 278(19):16561-6
13. Haukness HA, Tanz RR, Thomson RB Jr, Pierry DK, Kaplan EL, Beall B, Johnson D, Hoe NP, Musser JM, Shulman ST. The heterogeneity of endemic community pediatric group a streptococcal pharyngeal isolates and their relationship to invasive isolates. *J Infect Dis*. 2002. 185(7):915-20.
14. Hoe NP, Ireland RM, DeLeo FR, Gowen BB, Dorward DW, Voyich JM, Liu M, Burns EH Jr, Culnan DM, Bretscher A, Musser JM Insight into the molecular basis of pathogen abundance: group A *Streptococcus* inhibitor of

- complement inhibits bacterial adherence and internalization into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99(11):7646-51.
15. Hoe NP, Kordari P, Cole R, Liu M, Palzkill T, Huang W, McLellan D, Adams GJ, Hu M, Vuopio-Varkila J, Cate TR, Pichichero ME, Edwards KM, Eskola J, Low DE, Musser JM. Human immune response to streptococcal inhibitor of complement, a serotype M1 group A *Streptococcus* extracellular protein involved in epidemics. *J Infect Dis*. 2000. 182(5):1425-36.
  16. Hoe NP, Vuopio-Varkila J, Vaara M, Grigsby D, De Lorenzo D, Fu YX, Dou SJ, Pan X, Nakashima K, Musser JM. Distribution of streptococcal inhibitor of complement variants in pharyngitis and invasive isolates in an epidemic of serotype M1 group A *Streptococcus* infection. *J Infect Dis*. 2001. 183(4):633-9.
  17. Jawetz, Melnik, Adelberg. *Microbiología médica*. 17ª edición. Ed. El Manual Moderno. 2002. México.
  18. Jones D. Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1978. 7:1-49.
  19. Lancefield R.C. A micro precipitin-technic for classifying hemolytic streptococci, and improve methods for producing antisera. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1938. 38:473-8.
  20. McShan WM, Ferretti JJ. Genetic diversity in temperate bacteriophages of *Streptococcus pyogenes*: identification of a second attachment site for phages carrying the erythrogenic toxin A gene. *J. Bacteriol*. 1997. 179:6509-11

21. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Microbiología médica. 4ª edición. Edit. Mosby. 2002. España
22. Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. Manual of clinical microbiology. 7th edition. ASM Press. 1999
23. Musser JM, Kapur V, Kanjilal S, Shah U, Musher DM, Barg NL, Johnston KH, Schlievert PM, Henrichsen J, Gerlach D, et al. Geographic and temporal distribution and molecular characterization of two highly pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes* expressing allelic variants of pyrogenic exotoxin A (Scarlet fever toxin). *J Infect Dis.* 1993. 167(2):337-46
24. Natanson S, Sela S, Moses AE, Musser JM, Caparon MG, Hanski E. Distribution of fibronectin-binding proteins among group A streptococci of different M types. *J Infect Dis.* 1995. 171(4):871-8.
25. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999. 63(1):174-229.
26. Ofek I, Doyle R. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall. 1994. New York.
27. Palomares JC, Torres MJ. Reacción en cadena de la polimerasa termorresistente. Aplicaciones en Microbiología. Universidad de Sevilla. 1992. España.
28. Perea-Mejía LM, Stockbauer KE, Pan X, Cravioto A, Musser JM. 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. *J Clin Microbiol.* 1997. 35(12):3220-4.
29. Perea-Mejia LM, Inzunza-Montiel AE, Cravioto A. Molecular characterization of group A *Streptococcus* strains isolated during a scarlet fever outbreak. *J Clin Microbiol.* 2002. 40(1):278-80.
30. QIAGEN. Product Guide. 2001
31. Salyers A, Whitt D. *Bacterial Pathogenesis. A molecular Approach.* 2<sup>nd</sup> edition. ASM Press. 2002. Washington D. C.
32. Whatmore AM, Kapur V, Sullivan DJ, Musser JM, Kehoe MA. Non-congruent relationships between variation in emm gene sequences and the population genetic structure of group A streptococci. *Mol Microbiol.* 1994 Nov;14(4):619-31.
33. Yu CE, Ferretti JJ. Frequency of the erythrogenic toxin B and C genes (*speB* and *speC*) among clinical isolates of group A streptococci. *Infect Immun.* 1991. 59(1):211-5.