



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TIPIFICACION MOLECULAR DEL GEN QUE  
CODIFICA PARA LA PROTEINA M (*emm*) EN  
CEPAS DE *Streptococcus pyogenes* DE ORIGEN  
CLINICO.

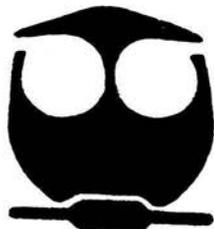
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

---

**Jurado Asignado:**

<b>Presidente</b>	<b>Profesores</b> <b>MA. DEL CARMEN CORTES DECUIR</b>
<b>Vocal</b>	<b>MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS</b>
<b>Secretario</b>	<b>LUIS MANUEL PEREA MEJIA</b>
<b>1er Suplente</b>	<b>ANTONIO CASTILLO DURAN</b>
<b>2do Suplente</b>	<b>JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA</b>

**Sitio donde se desarrolló 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 Mejia**  
**Asesor**



---

**Francisco Javier Figueroa Martínez**  
**Sustentante.**

---

Este trabajo se realizó con apoyo del programa PAPIIT de la DGAPA,

proyectos clave

IN213401

IN218103

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo intelectual.

NOMBRE: Figueroa Martínez

Francisco Javier

FECHA: 29 Nov - 2004

FIRMA: [Firma]

---

**"Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas."**

**Albert Einstein.**

---

Dedicado a:

- Dios, nos has llevado al límite, pero nunca nos dejas caer. Sé que estas con nosotros y que así será siempre.
- Mi madre, todo lo que hemos logrado es gracias a tu esfuerzo por sacarnos adelante, te agradezco por tu incondicional apoyo, tu gran amor y espero poder retribuirte todo eso. Muchas gracias.
- Adriana, has sido nuestro sostén en los momentos más difíciles, sin tu apoyo no habiéramos salido adelante, esto también es un logro tuyo.
- José y Maria Luisa, gracias por soportarme cuando pasé por malos momentos y me convierto en alguien muy desagradable. Esto es una muestra de que se puede lograr todo lo que se desea y estoy seguro de que ustedes también pueden, ánimo.
- Edher, eres como nuestro hermanito menor, así que este trabajo también va dedicado a ti.
- Itzhel, eres una persona muy importante para mí, gracias por tu amor, por tu apoyo, por darme el empujoncito que me hacia falta algunas veces, por soportar mis malos ratos, por estar junto a mí en las buenas y en las malas y sobre todo por el tiempo que hemos compartido.

---

Agradecimientos:

- Luis Manuel Perea Mejía, muchas gracias por tu apoyo, por la formación que me diste, por tu gran paciencia conmigo y por el tiempo que dedicaste a la asesoría y revisión de este trabajo.
- Alma Inzunza, agradezco tus consejos para la realización de cada experimento realizado, gracias por el tiempo que invertiste en la revisión de esta tesis y por tus comentarios al respecto.
- A mis amigos de la Jardinera, Chore, Maggy, Oliver, Susan, Paty, Héctor, Gaby, Francisco, Claudia, Shimizu, gracias a ustedes la Facultad de Química se convierte en algo más que sólo la escuela, y terminamos sintiéndonos en casa. Ustedes hacen la vida mas divertida, gracias por su amistad.
- A mi Abuelita Modesta y a mis tías, les agradezco que participaran en los primeros años de mi educación, proporcionándome las herramientas y valores para convivir con los demás, y que siempre se han mantenido al pendiente de lo que pasa en mi vida.
- A la Familia García Torres, que me han recibido en su casa en muchas ocasiones, han soportado las incomodidades que esto les ha ocasionado y me han dado apoyo moral.

**TABLA DE CONTENIDO.**

TABLA DE CONTENIDO.....	VII
Abreviaturas.....	X
1. RESUMEN DEL PROYECTO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. OBJETIVO GENERAL: .....	4
2.1.1 Objetivos Específicos: .....	4
3. INTRODUCCIÓN.....	6
3.1. GENERALIDADES.....	6
3.2. CLASIFICACIÓN.....	7
3.2.1. Tipo de Hemólisis. ....	8
3.2.2. Morfología Colonial.....	9
3.2.3. Especificidad Serológica (Clasificación de Lancefield).....	9
3.2.4. Pruebas Bioquímicas.....	10
3.3. ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO A. ....	11
3.3.1. Importancia del estudio de los Estreptococos del grupo A. ....	12
3.3.2. Infecciones supurativas y secuelas no supurativas características de los Estreptococos del grupo A.....	13
3.3.3. Factores de virulencia de los Estreptococos del grupo A. ....	17
3.4. LA PROTEÍNA M DE <i>Streptococcus pyogenes</i> . ....	20
3.5. ANTECEDENTES EN LA TIPIFICACIÓN DE <i>Streptococcus pyogenes</i> . ....	28
3.5.1. Tipificación Serológica.....	28
3.5.2. Tipificación del Factor de Opacidad.....	29

3.5.3. Tipificación de la proteína T.....	30
3.5.4. Tipificación de la proteína M mediante REA.....	30
3.5.5. Ribotipificación de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	31
3.5.6. Tipificación rápida mediante oligonucleótidos no radioactivos .....	32
3.5.7. Tipificación mediante RAPD.....	32
3.5.8. Tipificación por <i>Vir typing</i> .....	33
3.5.9. Tipificación mediante secuenciación de los alelos del gen <i>emm</i> .....	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	36
4.2. IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO A.....	37
4.3. EXTRACCIÓN DEL DNA .....	38
4.3.1. Método de Fenol-Cloroformo Modificado.....	38
4.3.2. Extracción de DNA utilizando un método comercial .....	40
4.3.3. Evaluación de la calidad del DNA aislado. ....	41
4.4. AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>emm</i> .....	41
4.5. AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>sof</i> .....	43
4.6. CLASIFICACIÓN PRELIMINAR DE LAS CEPAS.....	43
4.7. DIGESTIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN <i>emm</i> .....	44
4.7.1. Digestión con <i>Ddel</i> .....	44
4.7.2. Doble Digestión con <i>HincII</i> y <i>HaeIII</i> .....	45
4.8. CLASIFICACIÓN DE LOS RFLP's.....	45
4.9. SECUENCIACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.....	46
4.10. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA Y COMPARACIÓN CON LAS CEPAS DE REFERENCIA.....	47

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
5.1. AISLAMIENTO DEL DNA.....	48
5.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>emm</i> .....	50
5.3. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL GEN <i>emm</i> CON <i>Ddel</i> . ....	53
5.4. SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS ALELOS DEL GEN <i>emm</i> . .....	55
5.5. ANÁLISIS DE DOBLE RESTRICCIÓN DEL GEN <i>emm</i> CON <i>HincII</i> y <i>HaeIII</i> . .....	57
5.5.1. Doble restricción de cepas M4 ( <i>emm4</i> ). ....	59
5.5.3. Doble restricción de cepas M68-1 ( <i>emm68-1</i> ). ....	61
5.5.4. Doble restricción de cepas M1( <i>emm1</i> ). ....	62
5.6. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA TIPIFICACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS DE <i>Streptococcus pyogenes</i> . ....	63
5.7. RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN.....	67
5.7.1. Frecuencia de serotipos M. ....	67
5.7.2. Resultados considerando el origen Clínico de la Muestra. ....	71
5.7.3. Resultados en relación a las entidades clínicas de donde provienen los aislamientos de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	74
5.7.4. Distribución de Serotipos M en la población de la Ciudad de México y el desarrollo de vacunas contra <i>Streptococcus pyogenes</i> . ....	76
6.-CONCLUSIONES.....	80
7. BIBLIOGRAFÍA.....	82

---

**ABREVIATURAS**

<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>μL</b>	Microlitros
<b>AE</b>	Buffer de Elusión.
<b>AW1</b>	Buffer de Lavado 1.
<b>AW2</b>	Buffer de Lavado 2.
<b>BHI</b>	: Infusión Cerebro y Corazón, Medio de cultivo
<b>C.V.</b>	Coeficiente de Variación
<b>C3</b>	Proteína que participa en la vía del complemento.
<b>C3b</b>	Uno de los péptidos resultantes de la escisión de C3 en la vía del complemento.
<b>C5a</b>	Factor quimiotáctico derivado del complemento.
<b>CAMP</b>	Christie, Atkins, Munch-Peterson
<b>CD44</b>	Glicoproteína de membrana celular, presente en la superficie de células epiteliales.
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetracético
<b>EGA</b>	Estreptococos del Grupo A
<b><i>emm</i></b>	Gen que codifica para la proteína M de <i>Streptococcus pyogenes</i> .

---

<b>enn</b>	Genes que codifican para proteínas de unión a IgA.
<b>Fc</b>	Fracción cristizable de las inmunoglobulinas.
<b>FcrA</b>	Gen que codifica para receptores de la fracción Fc de IgG.
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A.
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G.
<b>INC</b>	Instituto Nacional de Cardiología.
<b>INER</b>	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
<b>INP</b>	Instituto Nacional de Pediatría.
<b>ISSSTE</b>	Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado.
<b>LPSTGE</b>	Secuencia de aminoácidos adyacente a la región hidrofóbica altamente conservada en las proteínas de superficie de bacterias gram positivas, compuesta de Leucina, Prolina, Serina, Treonina, Glicina y Glutamato.
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>mM</b>	Milimolar
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PYR</b>	Enzima Pirrolidonil Aminopeptidasa.
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>RADP</b>	Amplificación Aleatoria de Polimorfismos en el DNA.
<b>REA</b>	Análisis de Restricción con Endonucleasas.
<b>RFLP</b>	Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción

---

<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de Sodio; detergente.
<b><i>sic</i></b>	Gen que codifica para la Proteína Estreptocóccica Inhibidora del Complemento
<b>SIC</b>	Proteína Estreptocóccica Inhibidora del Complemento.
<b><i>sof</i></b>	Gen que codifica para la proteína conocida como Factor de Opacidad del Suero.
<b>SOF</b>	Proteína estreptocóccica capaz de degradar las proteínas presentes en el suero humano.
<b>TAE</b>	Buffer de Tris-Ácido Acético-EDTA
<b>TBE</b>	Buffer de Tris-Boratos-EDTA
<b>TE</b>	Buffer compuesto de Tris y EDTA
<b>TRIS</b>	Hidroximetilaminometano
<b>UV</b>	Luz ultravioleta

## 1. RESUMEN DEL PROYECTO

*Streptococcus pyogenes* (Estreptococo beta hemolítico del grupo A) es considerado como un importante patógeno para el humano asociado a una diversidad de cuadros clínicos, entre los que se encuentran: faringitis, fiebre escarlatina, impétigo, bacteremias, enfermedades invasivas graves como la fascitis necrotizante o el síndrome del choque tóxico estreptocócico, así como de secuelas no supurativas como la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda post-estreptocócica (Cunningham M. 2000; Alberti S. 2003; Bisno A.L. 2003)

La proteína M se localiza en la superficie de la bacteria y junto con las exotoxinas estreptocócicas representan los principales factores de virulencia del Estreptococo del grupo A (EGA). La caracterización de la bacteria se basa en la identificación del serotipo M (proteína M), ya sea que se realice por técnicas serológicas o moleculares (Facklam R. 1999; Cunningham M. 2000). En este último caso se incluye la determinación parcial del gen *emm* el cual codifica para la síntesis de esta proteína (Beall B. 1996).

Actualmente, la tipificación de *S. pyogenes* se realiza con base en la variación antigénica del extremo amino terminal de la proteína M. La producción y mantenimiento de sueros de referencia para la tipificación de *S. pyogenes* ha sido sustituido en los laboratorios de referencia por el análisis de la secuencia de 147 pares de bases correspondiente a la región del gen *emm* que codifica para la porción amino terminal de la proteína M (Beall B. 1996; Facklam R. 1999; Cunningham M. 2000).

El objetivo del proyecto es implementar estrategias que permitan la tipificación molecular cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Una alternativa molecular para la caracterización de este importante agente patógeno nos permite no sólo identificar los serotipos M más frecuentes, sino que también es una herramienta capaz de identificar nuevos tipos M entre cepas que serológicamente se clasificarían como no tipificables. A nivel epidemiológico, la determinación de los serotipos M de EGA involucrados en infecciones estreptocócicas en México contribuirá al conocimiento de la patogénesis de esta bacteria.

En este estudio se usaron cepas provenientes de diversas entidades clínicas que fueron colectadas de algunos Hospitales de la Ciudad de México. Estas cepas se identificaron como Estreptococos Beta Hemolíticos del Grupo A por técnicas microbiológicas y el grupo de Lancefield fue confirmado mediante una prueba de coaglutinación comercial. El DNA genómico se extrajo utilizando dos métodos diferentes: una variante de la técnica de extracción fenol-cloroformo (la cual incluye tratamiento enzimático con mutanolisina y proteinasa K) y utilizando un kit comercial para extracción de DNA bacteriano.

Este DNA genómico fue sometido a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el objetivo de amplificar el segmento de DNA de interés y posteriormente el producto de la PCR fue cortado con enzimas de restricción. El corte se realizó sometiendo el producto amplificado del gen *emm* a la acción de la enzima *Ddel* y corriéndolo en un gel de agarosa para observar el patrón de restricción obtenido para cada cepa de Estreptococo. Las cepas que presentaron patrones de restricción iguales fueron agrupadas y a partir de ellas se

seleccionaron al menos dos muestras de cada patrón para ser secuenciadas y determinar el tipo M de cada grupo.

Las cepas que presentaron patrones de restricción semejantes al ser cortadas con la enzima *Ddel* y que pertenecen a diferentes tipos *emm* fueron identificadas sometiendo el producto de PCR del gen *emm* a una segunda reacción de doble restricción con las enzimas *HincII* y *HaeIII*, obteniendo patrones de restricción que nos permiten discernir a que tipo *emm* pertenece cada una de las cepas que presentan este patrón de restricción sin necesidad de secuenciar cada una de las cepas asociadas a un patrón en particular.

A partir de este análisis se identificaron 18 diferentes tipos M, 16 clasificados como tipos *emm* y dos clasificados como tipos *stg* aún cuando provienen de *Streptococos* del grupo A.

Los tipos de EGA más comúnmente encontrados fueron M12, M1, M75, M6, M4, M3 y M28. Estos serotipos se encontraron distribuidos uniformemente dentro de las cepas provenientes de aislamientos faríngeos, por otra parte, esta distribución cambió al considerar los aislamientos no faríngeos, en donde se observó una gran frecuencia del serotipo M1 como el agente etiológico más comúnmente aislado, seguido de los serotipos M6 y M2.

De igual manera, M1 fue el serotipo más ampliamente distribuido dentro de las instituciones participantes en el estudio, debido a que se encontró al menos una cepa M1 dentro de los aislamientos proporcionados por dichas instituciones.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL:

Realizar la tipificación molecular de las cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico obtenidas a lo largo de dos años en diferentes hospitales de la Ciudad de México.

#### 2.1.1 Objetivos Específicos:

- ◆ Implementar la estrategia a seguir para lograr la rápida y efectiva tipificación de *Streptococcus pyogenes* por medio de técnicas de biología molecular.
- ◆ Establecer los patrones de restricción (RFLP's) más comunes que resultan al cortar los productos de PCR del gen *emm* de las cepas en estudio con la enzima de restricción *Ddel*.
- ◆ Identificar los serotipos M más frecuentemente asociados a infecciones faríngeas y los asociados a infecciones no faríngeas.

- ◆ Reportar la frecuencia con la que se encuentran cada uno de los tipos *emm* en la muestra en estudio.
- ◆ Comparar la distribución de serotipos M encontrados en la muestra de estudio con los estudios epidemiológicos reportados en la literatura.
- ◆ Estimar, con base a la frecuencia de los serotipos M, la utilidad de la vacunas recombinantes para la prevención de enfermedades asociadas a *Streptococcus pyogenes* en la población en estudio.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. GENERALIDADES

El género *Streptococcus* comprende un grupo heterólogo de bacterias Gram positivas que son descritas por el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática como bacterias anaerobias facultativas, ovoides o esféricas menores a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, Gram positivas, catalasa negativas (Ruoff L. 1999) además, son microorganismos no móviles, no esporulados y en su mayoría presentan cápsulas evidentes. La agrupación en cadenas largas características de los estreptococos (exceptuando a *Streptococcus pneumoniae*, agrupados en diplococos) sólo se observa en preparaciones que provienen de muestras biológicas o de cultivos líquidos. Las especies principales del género son: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis* y *Streptococcus faecalis*, aunque estos dos últimos han sido transferidos desde 1986 al género *Enterococcus*. Los estreptococos se pueden encontrar de manera habitual como parásitos de humanos y de otros animales como caballos, cerdos y vacas. En el huésped pueden colonizar superficies mucosas de la boca y la faringe, aunque en condiciones especiales también pueden colonizar la piel, músculos y tejido cardíaco (Ruoff L. 1999). Mientras que algunas cepas de estreptococos tienen una relación de comensalismo con el huésped, algunas otras son patógenos virulentos y pueden causar un amplio

espectro de enfermedades desde agudas hasta crónicas. Entre las principales enfermedades humanas atribuidas a los estreptococos se encuentran la faringitis, la escarlatina, la fiebre reumática, glomerulonefritis y neumonía por neumococo (Perea-Mejía 2003).

Los estreptococos figuran entre las bacterias nutricionalmente más exigentes y por este motivo, los medios adecuados para su aislamiento deben contener líquidos orgánicos (por ejemplo, sangre o suero) que enriquezcan los sustratos disponibles (Garza R. 1996).

La nomenclatura para los estreptococos de interés médico está basada en la identificación y tipificación serológica de componentes de la pared celular más que en la identificación de la especie. Durante varias décadas, el interés se ha centrado en dos especies causantes de infecciones severas (*Streptococcus pyogenes*) 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 viridians, los cuales pueden involucrarse en diversas patologías como la caries dental (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*), bacteremias, meningitis, neumonía, enfermedad periodontal (*Streptococcus mitis*), o infecciones supurativas en niños y adultos (*Streptococcus. milleri*) (Perea-Mejía 2003).

#### 3.2. CLASIFICACIÓN.

Los estreptococos pueden clasificarse de acuerdo a los siguientes criterios:

- ◆ Tipo de Hemólisis en placas de agar sangre.
- ◆ Morfología Colonial.

- ◆ Especificidad serológica
- ◆ Reacciones bioquímicas.

### 3.2.1. Tipo de Hemólisis.

Una de las características 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 de la sangre de carnero está dada por dos estreptolisinas (hemolisinas): la estreptolisina "S" (activa en presencia de O<sub>2</sub> y no inmunogénica) y la estreptolisina "O" (inactiva en presencia de O<sub>2</sub> e inmunogénica). En esta clasificación se establece la denominación de beta hemólisis cuando se observa una lisis completa de los eritrocitos alrededor de la colonia bacteriana, producida por cepas de bacterias que producen ambos tipos de estreptolisinas, mientras que se denomina hemólisis de tipo alfa a una hemólisis parcial o verde (asociada con la reducción de la hemoglobina de los eritrocitos) característica de cepas que sólo producen la estreptolisina "S". Las colonias en las que no se aprecia hemólisis se denominan "gamma hemolíticas"(Garza R. 1996; Perea-Mejía 2003).

Los estreptococos del grupo A son casi siempre beta hemolíticos, mientras que los del grupo B pueden ser alfa, beta o gamma hemolíticos. Muchas cepas de *Streptococcus pneumoniae* son alfa hemolíticas, pero pueden causar beta hemólisis durante la incubación anaerobia. La mayoría de los estreptococos orales y enterococos no presentan hemólisis(Perea-Mejía 2003).

#### **3.2.2. Morfología Colonial.**

Las colonias estreptocócicas varían en color del gris al blanquecino y usualmente son brillantes. Los estreptococos piogénicos beta-hemolíticos de los grupos A, C y G forman colonias relativamente grandes (> 0.5 mm de diámetro después de 24 horas de incubación) comparados con las pequeñas colonias que forman cepas beta hemolíticas. Las cepas de *Streptococcus pyogenes* ocasionalmente forman colonias mucoides.

Los cultivos de estreptococos beta-hemolíticos formadores de pequeñas colonias producen además un olor parecido al del caramelo. Las colonias de estreptococos del grupo B tienden a ser grandes y presentan una zona menos pronunciada de beta-hemólisis que otras cepas beta-hemolíticas. Algunas cepas del grupo B son no hemolíticas.

Colonias alfa-hemolíticas con depresión en el centro de la colonia son características del neumococo, mientras que las colonias de estreptococos viridians tienen una apariencia de domo. Los neumococos pueden producir una apariencia colonial mucoide. Algunas cepas del grupo viridians, como *Streptococcus bovis*, forman colonias grisáceas no hemolíticas (Ruoff L. 1999).

#### **3.2.3. Especificidad Serológica (Clasificación de Lancefield).**

El sistema desarrollado por Rebeca Lancefield para la identificación serológica de los estreptococos está basado en las diferencias inmunológicas en los polisacáridos presentes en la pared celular de la bacteria (grupos A, B, C y G) ó en los ácidos lipoteiticos (grupo D).

El carbohidrato de grupo A está compuesto por N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosamina unido a un esqueleto polimérico de ramnosa (Cunningham M. 2000).

Actualmente se cuenta con al menos 18 grupos de Lancefield (del grupo A al V), y con reactivos comerciales para la serotipificación de los principales grupos de interés clínico, es decir, para los grupos A, B, C, D y G (Perea-Mejía 2003).

#### 3.2.4. Pruebas Bioquímicas.

Los estreptococos pueden clasificarse por especie mediante el uso de pruebas bioquímicas. Una vez identificado el tipo de hemólisis, las siguientes pruebas nos ayudan a identificar la especie:

- ◆ Prueba de PYR. Determina la actividad de la enzima pirrolidoniil aminopeptidasa, enzima producida por *Streptococcus pyogenes*, pero no por otro estreptococo beta-hemolítico (Ruoff L. 1999).
- ◆ Susceptibilidad a Bacitracina 0.04 U. Sólo los Estreptococos del Grupo A son incapaces de desarrollarse a esta concentración del antibiótico (Garza R. 1996).
- ◆ Sensibilidad a la Optoquina. Muy útil para la identificación de *Streptococcus pneumoniae*, pues en presencia de esta quinina el microorganismo no se desarrolla (Garza R. 1996).
- ◆ Prueba de CAMP. La mayoría de los estreptococos del grupo B producen una proteína extracelular (factor CAMP) que actúa sinérgicamente con la beta-hemolisina de *Staphylococcus aureus* agudizando la zona de hemólisis producida por esta enzima. Esta prueba es muy útil para identificar a *Streptococcus Agalactiae* (Ruoff L. 1999).

- ♦ Solubilidad en Bilis. Sólo *Streptococcus pneumoniae* presenta una ectoenzima autolítica (L-alanina-muramilamidasas) 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 cultivos líquidos puros de este microorganismo (Garza R. 1996).
- ♦ Hidrólisis de Hipurato. Esta prueba se emplea para diferenciar a los estreptococos del grupo B (*Streptococcus agalactiae*) los cuales son los únicos del género que producen la enzima hipuricasa (Garza R. 1996).

#### 3.3. ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO A.

*Streptococcus pyogenes* (Estreptococos del grupo A) es un importante agente patógeno para los humanos gracias al desarrollo de mecanismos complejos de virulencia para evitar la defensa del huésped. Es causante de infecciones con un amplio grado de severidad que pueden ir desde una faringitis moderada o infecciones en la piel hasta enfermedades invasivas, como la fascitis necrotizante, shock tóxico estreptocócico y miositis. Los Estreptococos del grupo A son también responsables de secuelas no supurativas posteriores a una infección estreptocócica, como la fiebre reumática aguda, la glomerulonefritis aguda y la artritis reactiva (Ruoff L. 1999; Cunningham M. 2000; Alberti S. 2003).

La clasificación serológica de Lancefield distingue a los Estreptococos del grupo A de los otros estreptococos beta-hemolíticos basado en el carbohidrato C de la pared celular, sin embargo, los estreptococos del grupo A también pueden clasificarse serológicamente mediante otro importante determinante antigénico: la proteína M, localizada en forma de fibrillas en la pared celular de la bacteria y que

ha sido identificada como el principal factor de virulencia del estreptococo. Hasta la fecha y gracias a los avances de la biología molecular han sido documentados un total de 124 genes que codifican para diferentes proteínas M (Facklam R. 2002).

#### **3.3.1. Importancia del estudio de los Estreptococos del grupo A.**

A pesar de que los Estreptococos del grupo A son muy sensibles a la penicilina, se ha registrado un inexplicable resurgimiento de las infecciones causadas por este microorganismo a partir de mediados de la década de los años 80 (Cunningham M. 2000). Una de las primeras manifestaciones de este resurgimiento fue un brote de fiebre reumática que afectó a cerca de 200 niños durante un periodo de 5 años. Desde mediados de los años 80 hasta la década de los años 90 se registraron ocho brotes de fiebre reumática en los Estados Unidos a pesar de que en la década anterior se había reportado un muy claro declive de esta enfermedad. Los principales serotipos M de *Streptococcus pyogenes* asociados a los nuevos brotes fueron los serotipos 1, 3, 5, 6 y 18 (Cunningham M. 2000). Este incremento de enfermedades causadas por Estreptococos del grupo A no sólo se ha observado en países occidentales, pues este fenómeno se ha reportado en los años recientes en países asiáticos como en Hong Kong (Ho P.L. 2003).

A finales de la década de los años 80 se reportaron en Europa y Estados Unidos casos de síndrome de shock tóxico por estreptococos, bacteremias, además de severas infecciones en la piel y en tejidos blandos debido a estreptococos invasivos. Este tipo de enfermedades invasivas presentan alta morbilidad y mortalidad, pueden además ser relacionadas a ciertos serotipos de proteína M.

Aunque se han aislado estreptococos pertenecientes a diferentes serotipos M como causantes de enfermedades invasivas, el serotipo M1 es el más predominante (Cunningham M. 2000).

Actualmente, la faringitis causada por estreptococos del grupo A es una de las infecciones bacterianas más comunes en niños en edad escolar, infecciones estreptocócicas invasivas afectan a cientos de niños y adultos cada año, terminando frecuentemente en la muerte del paciente. Un punto importante a considerar es que mientras en países desarrollados los casos de fiebre reumática aguda están en decremento, en países en vías de desarrollo se ha observado un incremento en el padecimiento de esta enfermedad (Hu M. 2002).

El resurgimiento de infecciones severas causadas por *Streptococcus pyogenes* y sus secuelas no supurativas es un importante motivo para incrementar el conocimiento y la vigilancia de los estreptococos del grupo A en la comunidad. Por otra parte, estudios epidemiológicos cambios a lo largo del tiempo en los serotipos predominantes dentro de una misma población (Kaplan E.L. 2001), por lo que este comportamiento debe ser vigilado en las diferentes poblaciones para conocer la dinámica epidemiológica de los Estreptococos del grupo A.

#### **3.3.2. Infecciones supurativas y secuelas no supurativas características de los Estreptococos del grupo A.**

Los estreptococos del grupo A producen una variedad de infecciones piogénicas que involucran las membranas mucosas, amígdalas, piel y tejidos profundos; tales como:

- ◆ Faringitis. La colonización del tracto respiratorio superior y la faringitis aguda pueden diseminarse a otras partes del tracto respiratorio, dando lugar a otitis, sinusitis, neumonía e inclusive una bacteremia (**Perea-Mejía 2003**). La faringitis y su asociación con fiebre reumática ocurren principalmente durante el otoño y el invierno. Ciertos serotipos M que no producen factor de opacidad, como el M1, M3, M5, M6, M14, M18, M19 y M24 de *Streptococcus pyogenes*, han sido asociados con la infección de faringe y con fiebre reumática (**Cunningham M. 2000**).
- ◆ Piodermas. También conocido como impétigo, y representa una infección confinada a la superficie de la piel que afecta principalmente a cara, brazos y piernas. Los piodermas ocurren durante los meses del verano y se han asociado con la producción de glomerulonefritis aguda. Cepas de *Streptococcus pyogenes* productoras del factor de opacidad como M2, M49, M57, M59, M60 y M61 han sido asociadas a pioderma y glomerulonefritis aguda (**Cunningham M. 2000**).
- ◆ Fiebre Escarlatina. Representa una complicación de la faringitis estreptocócica, ocasionada por cepas de Estreptococos del grupo A que poseen genes que codifican para la producción de las exotoxinas pirogénicas A, B y C. Estas exotoxinas son responsables del rash (puntos rojos en la piel), la lengua de fresa, y la descamación de la piel observada en la fiebre escarlatina (**Perea-Mejía 2003**).
- ◆ Erisipela. Existen cepas de estreptococos que penetran en la piel a través de lesiones en la misma, produciendo erisipela o celulitis. La erisipela se

manifiesta por dolor e inflamación local en piel, cara, cuero cabelludo y extremidades, con lesiones superficiales de tipo dermatitis con bordes rojos o rosas, acompañadas de inflamación de nódulos linfoides y signos sistémicos de infección como escalofríos, fiebre y leucocitosis.

- ◆ Celulitis. La celulitis puede ocurrir a partir de quemaduras o heridas infectadas por el microorganismo e involucra tejidos subcutáneos profundos. En el caso de la celulitis no hay diferencia entre la zona de la piel infectada y la sana, aunque se observan signos de inflamación y de infección sistémica. Ambas enfermedades, erisipela y celulitis pueden ser causadas por estreptococos del grupo A, B, C y G (**Cunningham M. 2000; Perea-Mejía 2003**).
- ◆ Fascitis Necrotizante. Es una infección que ocurre en el tejido subcutáneo profundo en la cual hay una destrucción masiva del músculo y grasa a lo largo de los planos faciales. En este caso, la bacteria se introduce al tejido subcutáneo a través de lesiones en la piel, se observa entonces evidencia de celulitis y posteriormente se convierte en una gangrena con síntomas sistémicos. Esta enfermedad puede terminar en falla multiorgánica y en la muerte a causa de las toxinas liberadas por estreptococo que la causó (**Cunningham M. 2000**).
- ◆ Síndrome del shock tóxico estreptocócico. Fue descrito en 1989 como una enfermedad causada por estreptococos del grupo A que era muy similar al síndrome del shock tóxico causado por *Staphylococcus aureus* y que es caracterizado por hipotensión y falla multiorgánica, toxicidad sistémica,

dolor local severo, rápida necrosis de los tejidos subcutáneos y de la piel produciendo gangrena. La fascitis necrotizante y la bacteremia muchas veces acompañan al síndrome del shock tóxico estreptocócico lo cual constituye una diferencia con el shock tóxico ocasionado por el estafilococo (Cunningham M. 2000). Los serotipos de estreptococos del grupo A que han sido asociados a enfermedades invasivas son M1, M3, M11, M12 y M28, siendo M1 y M3 los más comunes, aunque en México se han reportado también a tipos M6, M75, M18 y M22, entre otras, como cepas de EGA asociadas a esta enfermedad (Espinosa L.E. 2003).

Los estreptococos del grupo A ocasionan secuelas no supurativas como las siguientes:

- ◆ Glomerulonefritis Aguda Posestreptocócica. La glomerulonefritis aguda ocasionada por EGA, se caracteriza por una inflamación del glomérulo renal con edema, hipertensión, hematuria y proteinuria (Perea-Mejía 2003). La glomerulonefritis aguda posestreptocócica se asocia con piodermas e infecciones de la garganta. Los serotipos M que predominantemente han sido asociados con impétigo, infecciones en la piel y glomerulonefritis aguda son M2, M49, M42, M56, M57 y M60, mientras que los serotipos M1, M4, M12 y M25 son asociados con infecciones de la faringe y glomerulonefritis (Cunningham M. 2000).
- ◆ Fiebre Reumática. Es una secuela tardía de la faringitis ocasionada por EGA. La enfermedad se manifiesta por inflamación de las articulaciones (artritis), corazón (carditis), sistema nervioso central (corea), piel y nódulos subcutáneos. La enfermedad es de naturaleza autoinmune y los efectos

observados son en parte por la producción de anticuerpos y células T que muestran reactividad cruzada con los componentes del estreptococo del grupo A y los tejidos del huésped. Ciertos serotipos M que no producen factor de opacidad, como el M1, M3, M5, M6, M14, M18, M19 y M24 han sido asociados con Fiebre Reumática (Cunningham M. 2000). Se ha reportado que la fiebre reumática es la mayor causa de que niños de edad escolar adquieran enfermedades del corazón, sobre todo en países en vías de desarrollo (Stollerman G. 1997).

#### 3.3.3. Factores de virulencia de los Estreptococos del grupo A.

*Streptococcus pyogenes* posee la capacidad de producir varios factores de virulencia, entre los principales se encuentran:

- ◆ Cápsula de Ácido Hialurónico. La cápsula, compuesta por un polímero de ácido hialurónico que contiene unidades de repetición de ácido glucorónico y N-acetilglucosamina, confiere a los estreptococos del grupo A resistencia a la fagocitosis por lo que la opsonización por C3 no siempre conduce a la fagocitosis y a la muerte de la bacteria. Además, la cápsula puede ser un importante factor de adherencia en la faringe debido a su capacidad de unirse a las células epiteliales. Se ha demostrado que cepas mutantes de EGA que no son capaces de sintetizar la cápsula muestran una importante disminución en su capacidad de virulencia y colonización de tejidos en modelos animales (Cunningham M. 2000).
- ◆ Proteína M. Representa la principal proteína localizada en la superficie de la bacteria y es el principal factor de virulencia del estreptococo (Cunningham

M. 2000) con más de 124 serotipos M distintos identificados (**Facklam R. 2002**). La proteína M inhibe la fagocitosis mediante su unión a la proteína reguladora del complemento conocida como factor H y al fibrinógeno, además de favorecer la degradación del factor del complemento C3b (**Perea-Mejía 2003**). La proteína M es altamente inmunogénica (**Brand E. 2000; Hu M. 2002**), por lo que la formación de anticuerpos anti-M brinda protección al organismo hospedero promoviendo la fagocitosis y muerte de la bacteria. Sin embargo, en algunas ocasiones estos anticuerpos también pueden reaccionar contra los tejidos del hospedero (**Fischetti V. 1991; Cunningham M. 2000**). Posteriormente hablaremos con más detalle de la proteína M.

- ◆ Proteínas semejantes a M (**Whatmore A. 1995**). Existen genes relacionados con el gen que codifica para la proteína M (*emm*) que son llamados superfamilia de genes M e incluyen proteínas de unión a inmunoglobulinas, proteínas semejantes a M y proteínas M (**Cunningham M. 2000**). Estas proteínas pueden poseer la capacidad de unión con inmunoglobulinas (en la región Fc), actividad antifagocitaria o pueden unirse al inhibidor de proteasas alfa 2 microglobulina (**Perea-Mejía 2003**). Se ha sugerido que las proteínas que enlazan inmunoglobulinas tienen un papel importante en las secuelas que se presentan posteriores a una infección estreptocócica (**Cunningham M. 2000**).
- ◆ Proteínas que enlazan Plasminógeno. Bacterias como los estreptococos del grupo A pueden enlazar plasminógeno a receptores proteicos presentes en su superficie. Esta estrategia puede mejorar la invasión bacteriana o el

movimiento de la misma a través de barreras biológicas (**Cunningham M. 2000**). Entre las proteínas que tienen la capacidad de enlazar plasminógeno se encuentran:

1. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. No es la principal proteína que puede unir plasminógeno, sin embargo se ha propuesto que la unión de esta proteína a fibronectina juega un papel importante en la adherencia y colonización del estreptococo al epitelio faríngeo.
  2. Enolasa. Es el ligando primario para establecer el enlace con el plasminógeno.
  3. Estreptocinasa. Es una proteína secretada por los EGA que puede unir plasminógeno. Promueve la degradación de coágulos al convertir el plasminógeno en plasmina, lo cual podría contribuir a la virulencia de los estreptococos y a la invasión de tejidos.
- ◆ Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas. Son responsables de muchas de las manifestaciones o síntomas de la fiebre escarlatina y del síndrome del shock tóxico, además de su efecto sobre el sistema inmune como superantígenos. La respuesta inflamatoria disparada por ellas puede conducir a respuestas de tipo autoinmune (**Cunningham M. 2000**).
  - ◆ C5a peptidasa. Es una endopeptidasa que se encuentra en la superficie del estreptococo. Rompe el factor quimiotáctico derivado del complemento C5a en su sitio de unión con los polimorfonucleares, inhibiendo el reclutamiento de células fagocíticas al sitio de infección (**Cunningham M. 2000; Perea-Mejía 2003**). La C5a peptidasa estimula la producción de anticuerpos

específicos contra esta proteína estreptocócica, y ha sido considerada para la elaboración de vacunas (Cunningham M. 2000).

- ◆ Proteína estreptocócica inhibitoria de la lisis mediada por el complemento (SIC). El gen *sic* que codifica para la proteína inhibidora de la lisis mediada por el complemento (SIC) es muy polimórfico y sólo se ha determinado presente en los serotipos M1 y M57 (Akesson P. 1996.). SIC bloquea al complejo de ataque a la membrana del complemento y contribuye a la virulencia de los estreptococos del grupo A mediante la inhibición de péptidos antibacterianos (Frick I. 2003).
- ◆ Estreptolisinas O y S. Son capaces de lisar eritrocitos, plaquetas y leucocitos. La estreptolisina S no es inmunogénica y estimula la liberación del contenido lisosomal del fagocito una vez ingerida la bacteria, por lo que el fagocito muere. La estreptolisina O es inmunogénica, causa lisis de los leucocitos provocando su muerte (Seppälä H. 1994).
- ◆ Desoxirribonucleasas. Despolimerizan el DNA libre en el pus, reduciendo así la viscosidad del medio en el absceso y por tanto, facilitando la diseminación de la bacteria (Seppälä H. 1994).

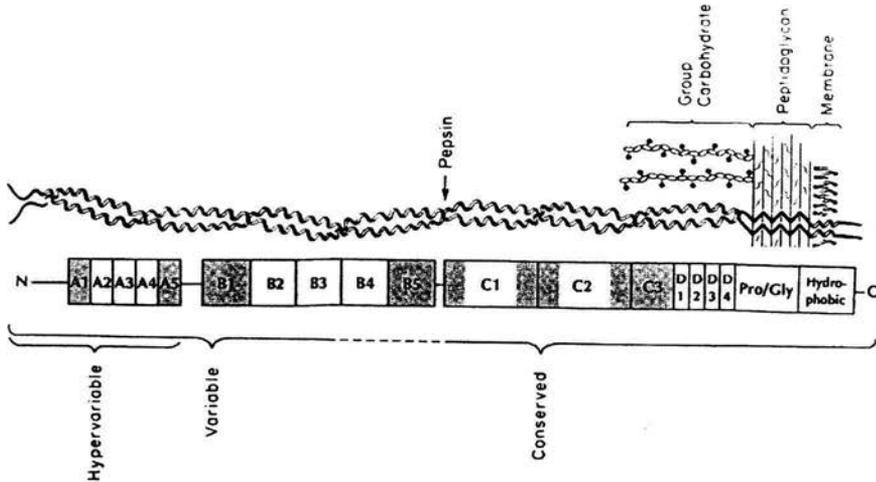
#### 3.4. LA PROTEÍNA M DE *Streptococcus pyogenes*.

La proteína M es la principal proteína localizada en la superficie del estreptococo y es su principal factor de virulencia. Bajo el microscopio electrónico las proteínas M pueden observarse como pequeñas estructuras parecidas a cabellos o fibrillas que sobresalen sobre la célula bacteriana (Fischetti V. 1991; Cunningham M. 2000; Hu M. 2002; Perea-Mejía 2003). La proteína M ha sido ampliamente estudiada

desde su descubrimiento (**Fischetti V.** 1991; **Cunningham M.** 2000). Los primeros estudios sobre la estructura de la proteína M la mostraban como una proteína única, pero ahora se sabe que su estructura es compartida por muchas moléculas de superficie de otras bacterias (**Fischetti V.** 1991).

La proteína M fue descubierta hace aproximadamente 60 años por Rebecca Lancefield del Instituto Rockefeller, y su importancia se puso de manifiesto al observar que al colocar los estreptococos en una gota de sangre humana, las bacterias que tenían la proteína M en su superficie podían evitar ser fagocitadas, mientras que los fagocitos atacaban sin ningún problema a las bacterias carentes de esta proteína ([www.rockefeller.edu/vaf](http://www.rockefeller.edu/vaf)). Sin embargo, el sistema desarrollado por los estreptococos del grupo A basado en la proteína M para eludir las defensas del hospedero puede ser anulado si el hospedero es capaz de desarrollar anticuerpos específicos contra esta proteína de superficie, y en consecuencia, neutralizar la capacidad protectora de la proteína M facilitando su fagocitosis y destrucción (**Fischetti V.** 1991). Sin embargo, la proteína M presenta una gran variación antigénica, ya que existen más de 124 variedades de esta proteína (**Facklam R.** 2002), y los anticuerpos desarrollados contra un serotipo no ofrece protección contra los demás (**Fischetti V.** 1991), aún así, es importante conocer las características de la proteína M pues ello nos conduce a usarla como una candidata para el desarrollo de vacunas para el control de infecciones ocasionadas por estreptococos (**Fischetti V.** 1991; **Brand E.** 2000; **Hu M.** 2002). En 1986 Fischetti logró clonar el gen que codifica para la proteína M (M6) y a partir de aquí se logró identificar la secuencia de aminoácidos que conforman una molécula de proteína M6 y con ello avanzar en el conocimiento de su estructura:

Aproximadamente el 80% de la molécula de M6 está constituida por arriba de cuatro regiones distintas, cada una de las cuales está formada por secuencias repetitivas de aminoácidos, designadas arbitrariamente con las letras A hasta la D (Figura 1).



**Figura 1.** Diagrama esquemático de la proteína M de *Streptococcus pyogenes* (Fischetti V. 2000).

La región próxima a la parte amino terminal y la más lejana de la superficie celular se le llama región A. Esta región tiene cinco bloques o segmentos de repetición con catorce aminoácidos cada uno, los tres bloques centrales son idénticos, mientras que los bloques de los extremos difieren levemente. La región B tiene también cinco bloques de repetición, pero cada uno está constituido por 25 aminoácidos. La región C consiste de dos y medio bloques repetitivos de 42 aminoácidos cada uno, mientras que la región D está compuesta de cuatro

repeticiones parciales de 7 aminoácidos. Adyacente a la región D se encuentra una región no repetitiva abundante en glicina y prolina distribuidos en un patrón aproximadamente regular; se cree que esta región se encuentra dentro de pared celular unida a los peptidoglicanos y que su función es estabilizar la posición de la proteína M en la pared celular. Enseguida se encuentra la región carboxilo terminal, en la cual se encuentran alrededor de 20 aminoácidos hidrofóbicos que se insertan en la membrana y pasan a través de ella y por último se encuentra una secuencia de aproximadamente 6 aminoácidos cargados que tienen la función de un ancla manteniendo a la proteína M unida a la membrana celular conocidos como motivo LPSTGE (Fischetti V. 2000). En varios estudios, se ha reportado que existe un arreglo similar al descrito en otros serotipos M (Cunningham M. 2000).

Analizando las secuencias de aminoácidos de la proteína M de varias cepas de *Streptococcus pyogenes* de diferentes serotipos M, se ha encontrado que en la región carboxilo terminal poseen una identidad del 98%, mientras que en la región amino terminal, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas M se incrementa, consecuentemente, los bloques de repetición A y una corta región de 11 aminoácidos de la región N-terminal es única para cada molécula de proteína M (Fischetti V. 1991).

La proteína M se extiende a partir de la superficie celular formando dímeros, con ambas moléculas de M conformadas en alfa hélice enrolladas una alrededor de la otra en una estructura similar a la que tiene una cuerda, misma que presentan las proteínas tropomiosina, miosina y queratina (Cunningham M. 2000), todas proteínas que se encuentran en tejidos de mamíferos y con las cuales se ha

observado que la proteína M muestra arriba de 40% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Esta similitud puede ser la causa de que las infecciones por *Streptococcus pyogenes* puedan causar indirectamente daño cardíaco asociado a la fiebre reumática. La estructura de dímero alfa helicoidal se presenta como consecuencia de un patrón inusual de siete aminoácidos a lo largo de todas las regiones de repetición en las cuales el primer y el cuarto aminoácido son hidrofóbicos, por lo que al enrollarse una molécula de M alrededor de la otra, buscan cubrir estos aminoácidos. Este patrón no es perfecto, ni se ha encontrado en otras proteínas que presentan la misma estructura de un par de moléculas de alfa hélice enrolladas, sin embargo, parece ser que estas irregularidades proporcionan a la proteína M cierta flexibilidad y, más aún, estas irregularidades son diferentes entre las regiones repetitivas A, B y C, lo que sugiere que cada región podría tener una función diferente.

La estructura de la región amino terminal de todas las moléculas de proteínas M tienen un exceso de aminoácidos con carga negativa, lo que resulta en una carga negativa neta en esa región. Esto podría estar involucrado en la protección que la proteína M ofrece a la bacteria contra la fagocitosis, ya que las células de mamífero tienen también carga negativa neta, y las repulsiones electrostáticas impiden el contacto entre el estreptococo y el fagocito. Además, es en esta parte de la molécula donde se presenta la región hipervariable de la proteína M. Esta región es distintiva para cada serotipo M y consiste de una secuencia no helicoidal de 11 aminoácidos próxima a la región de bloques repetitivos A.

La región hipervariable juega un papel muy importante en la actividad biológica de la proteína M: sólo anticuerpos dirigidos específicamente contra esta área permiten a los fagocitos endocitar al estreptococo (**Fischetti V. 1991**).

El tamaño de las proteínas M varía entre diferentes serotipos y aún dentro de un mismo serotipo M y es dependiente del número y tamaño de las unidades o bloques de repetición dentro de las regiones de repetición A y B provocados por una delección de las secuencias de DNA dentro del gen *emm* y que tienen como consecuencia cambios en la secuencia de aminoácidos y por tanto diferentes tamaños de proteína M. Estos cambios en el tamaño de la proteína puede proveer a la bacteria de alguna ventaja selectiva ya que al cambiar de tamaño, también cambia el carácter antigénico de las moléculas de M, evitando que algunos anticuerpos puedan unirse a ellas y evadiendo su destrucción por el sistema inmune del hospedero (**Fischetti V. 1991**).

La proteína M puede además unir de manera específica a la proteína reguladora del complemento conocida como factor H, presente en el suero sanguíneo del hospedero, para bloquear la unión de C3b a su superficie celular protegiendo al estreptococo de ser eliminado (**Cunningham M. 2000**). Se cree también que el factor H limita la acción de anticuerpos dirigidos contra las regiones de repetición C y B por lo que estos anticuerpos no pueden ayudar a eliminar una infección estreptocócica. Sólo los anticuerpos generados contra la región hipervariable próximos al extremo aminoterminal están lo suficientemente lejos para disparar la destrucción de los estreptococos mediada por fagocitosis.

Se ha encontrado que existe cierta homología entre la proteína M de estreptococos del grupo A con las proteínas M de los grupos C y G. Las proteínas

M de cepas patógenas para humanos parecen ser estructural y funcionalmente similares (Cunningham M. 2000).

La inmunogenicidad de la proteína M genera en el hospedero anticuerpos específicos contra ella y proporciona protección contra infecciones estreptocócicas (Brand E. 2000; Hu M. 2002), pero sólo contra el serotipo específico con el que fue inmunizado el hospedero (Fischetti V. 1991; Cunningham M. 2000). Es importante mencionar que existe la posibilidad de que los mismos anticuerpos generados contra la proteína M en respuesta a una infección estreptocócica y que tienen la función de promover la fagocitosis y la muerte del estreptococo, puedan reaccionar también con tejidos del hospedero, dando lugar a reacciones autoinmunes (Perea-Mejía 2003).

Se ha intentado diseñar vacunas dirigidas a prevenir infecciones por estreptococos del grupo A basadas en complejas combinaciones de antígenos, incluyendo la combinación de componentes proteicos de M que son específicos para diferentes serotipos M (Brand E. 2000; Hu M. 2002). La especificidad de los anticuerpos dirigidos a M está en gran parte determinada por los epítomos localizados en los primeros 40 o 50 aminoácidos de la región amino terminal de la proteína y se ha demostrado que esa región provoca la producción de anticuerpos con una gran actividad protectora bactericida y una muy baja probabilidad de reacciones cruzadas con los tejidos del hospedero (Hu M. 2002).

Actualmente, se encuentra bajo investigación una vacuna multivalente diseñada mediante tecnología recombinante que utiliza epítomos de 26 serotipos M diferentes y un epítomo para la exotoxina *speA*, en esta investigación se ha demostrado que es factible el uso de una vacuna para generar protección una

amplia protección contra *Streptococos* del grupo A. Los serotipos incluidos en esta vacuna se seleccionaron con base en tres importantes criterios (Hu M. 2002):

1. Serotipos que frecuentemente son asociados con faringitis.
2. Serotipos caracterizados por ser invasivos.
3. Serotipos que son considerados reumatogénicos.

La formulación de estas vacunas requiere el conocimiento de cuáles son las cepas o serotipos de *estreptococos* que causan enfermedades en la comunidad, y es importante señalar que para el diseño de esta vacuna multivalente se consideraron los resultados epidemiológicos obtenidos a lo largo del tiempo en los Estados Unidos, que no necesariamente son los mismos para nuestro país.

Se ha calculado que la vacuna multivalente para 26 serotipos M que se está desarrollando, puede representar protección contra el 80% de los serotipos que se ha observado causan faringitis e infecciones invasivas en los Estados Unidos (Hu M. 2002), pero se desconoce el potencial profiláctico de la vacuna en otras partes del mundo, debido principalmente a la falta de conocimiento acerca de la distribución o prevalencia de serotipos M de *estreptococos* del grupo A en otros países, principalmente en países en vías de desarrollo (Espinosa L.E. 2003).

Actualmente, la información que existe de la distribución de serotipos M en México es un estudio de 54 muestras que comprenden 12 serotipos M diferentes, realizado en 1997 (Perea-Mejía 1997), de los cuales el 83% de los serotipos encontrados están incluidos en la vacuna multivalente. Mas recientemente (Espinosa L.E. 2003) se realizó un estudio similar de la distribución de serotipos M entre un grupo de 423 *estreptococos* del grupo A recolectados en México de 1991 a 2000 y en Durango de 1998 a 1999, en donde se encontró que la vacuna

sería de utilidad para prevenir el 86% de los casos analizados y que corresponde a 17 serotipos M distintos. Cabe señalar que aunque las cepas provienen de México, el estudio experimental se realizó en los Estados Unidos.

En el presente trabajo se pretende serotipificar a 313 cepas de *Streptococcus* del grupo A provenientes de diferentes hospitales de la Ciudad de México y que fueron aislados desde el año 2001 al 2003, con el fin de conocer la frecuencia con la que se presenta cada uno de los serotipos M en la muestra de estudio, verificar cuantos de estos están incluidos en las vacunas multivalentes desarrolladas actualmente y además, implementar y estandarizar en nuestro laboratorio las técnicas utilizadas actualmente para la tipificación de estreptococos del grupo A.

#### **3.5. ANTECEDENTES EN LA TIPIFICACIÓN DE *Streptococcus pyogenes*.**

A lo largo del tiempo, se han intentado diversos mecanismos para lograr la tipificación de la proteína M primero con pruebas serológicas y posteriormente utilizando los avances de la biología molecular, tipificando el gen *emm* y correlacionándolo con un serotipo M en particular.

##### **3.5.1. Tipificación Serológica.**

El sistema de tipificación de Lancefield es un típico sistema serológico de clasificación basado en las reacciones de antígeno- anticuerpo (Facklam R. 1999). Este método depende en gran medida de la preparación de antisueros tipo-específicos y la extracción de la proteína M de la superficie del estreptococo del grupo A.

Existen varios factores que hacen difícil la identificación del serotipo M mediante este método (Beall B. 1996):

- ◆ Existe la posibilidad de obtener resultados ambiguos.
- ◆ No permite el descubrimiento de nuevos serotipos M
- ◆ Es difícil obtener altos títulos de antisueros dirigidos a cepas con factor de opacidad positivo.
- ◆ Alto costo de preparar antisueros con altos títulos de anticuerpos para todos los serotipos conocidos.

Por la dificultad de preparación de antisueros específicos para un tipo M, se han desarrollado alternativas a este método:

#### **3.5.2. Tipificación del Factor de Opacidad.**

Aproximadamente la mitad de las cepas de estreptococos del grupo A producen una lipoproteína, el factor de opacidad, que produce opacidad en el suero de varios mamíferos (Rehder C.D. 1995). Las cepas de estreptococos que poseen el factor de opacidad son capaces de inducir la creación de anticuerpos específicos para esta enzima y pueden ser usados en la prueba de inhibición del factor de opacidad. Debido a que existe correlación entre la tipificación del factor de opacidad y el tipo M, algunos laboratorios usan la tipificación del factor de opacidad para predecir el tipo M de cepas de *Streptococcus pyogenes* en investigaciones epidemiológicas (Johnson D.R. 1993).

### 3.5.3. Tipificación de la proteína T.

La proteína T también está presente en la superficie de los estreptococos del grupo A y no se presenta en otros grupos de estreptococos. El ensayo para determinar la presencia de la proteína T se realiza por aglutinación. La tipificación de T es importante en la investigación de la epidemiología de los estreptococos del grupo A y ha servido para identificar cepas asociadas con brotes cuando la tipificación por M no ha sido posible. Debido a que ciertos tipos M y *emm* están asociados con ciertos tipos T, las pruebas para tipificar M o *emm* pueden ser mucho más cortas si se tiene el conocimiento del tipo T de la cepa (Johnson D.R. 1993; Cunningham M. 2000).

### 3.5.4. Tipificación de la proteína M mediante REA.

Se han intentado otros métodos para la tipificación de *Streptococcus pyogenes* de acuerdo a su tipo M utilizando la biología molecular. Uno de estos métodos, utilizado por Cleary y Kaplan en 1988, consiste en analizar lo que se le ha llamado la "huella digital" (fingerprints) del DNA de la bacteria (Cleary P. 1998).

Esta técnica, conocida también como REA (Restriction Endonuclease Analysis), consiste en extraer el DNA de la bacteria y cortarlo utilizando endonucleasas de restricción, como *HindIII*, *EcoRI*, *HaeIII* y *PvuII*. Los fragmentos obtenidos se corren en un gel de electroforesis obteniendo así la "huella digital" genómica de la bacteria estudiada. El perfil de restricción obtenido es conservado entre las cepas de un mismo tipo M, por lo que se consideró una herramienta útil para la identificación del tipo M de estreptococos del grupo A, útil sobre todo porque es insensible a variaciones fenotípicas que pudieran existir entre bacterias al

conservarse o crecer bajo diferentes condiciones. Es útil también para diferenciar subclases de estreptococos del grupo A dentro de un mismo tipo M (Cleary P. 1998).

En una evaluación que se realizó de este método de tipificación se encontró que no siempre es obvia la correlación entre el patrón de restricción observado y el tipo M de la cepa en estudio, y que la proporción de patrones idénticos dentro de un mismo tipo M varía considerablemente de un serotipo a otro. Aún más, a pesar de que el REA es capaz de diferenciar distintas clonas dentro de un mismo serotipo, algunas veces diferentes serotipos pueden tener patrones de restricción idénticos, por lo que con base en este estudio, no es posible predecir el tipo M de una cepa de estreptococo del grupo A (Seppälä H. 1994).

#### **3.5.5. Ribotipificación de *Streptococcus pyogenes*.**

La ribotipificación consiste en realizar un Southern blott en el cual se transfiere el DNA que se ha cortado con alguna endonucleasa de restricción a una membrana de nylon y posteriormente se hibrida con un plásmido marcado con una sección afín a los genes que codifican para el RNA ribosomal de la bacteria y se detecta la hibridación mediante digoxigenina. La ribotipificación es mucho más fácil de interpretar que el REA y también tiene el poder de identificar diferentes clonas dentro de un mismo tipo M, pero se encontraron idénticos ribotipos para diferentes tipos M. A este respecto, la ribotipificación es aún menos confiable que el REA (Seppälä H. 1994).

#### **3.5.6. Tipificación rápida mediante oligonucleótidos no radioactivos**

En 1994 Kaufhold propuso la tipificación rápida de estreptococos del grupo A usando oligonucleótidos no radioactivos alelo específicos para cada tipo M, por medio de dos técnicas modificadas: ensayos de hibridación por dot blot reverso y por line blot reverso. Ambos procedimientos involucran la amplificación del gen *emm* por medio del PCR, en donde la mezcla de reacción ya contiene digoxigenina. El producto de PCR marcado no radiactivamente con la digoxigenina se hibridiza a una membrana que lleva un arreglo de oligonucleótidos inmovilizados específicos para la región N-terminal de varios genes *emm* y de esta manera se permite el análisis simultáneo del polimorfismo genético en una sola reacción de hibridación (Kaufhold A. 1994). La desventaja de este método es que es necesario poseer los oligonucleótidos específicos para cada tipo M y que todos ellos unidos a la membrana en donde se realiza la hibridación deben ser específicos para una sola secuencia bajo las mismas condiciones de reacción (Seppälä H. 1994).

#### **3.5.7. Tipificación mediante RAPD.**

Otra metodología que se ha utilizado para tipificar *Streptococcus pyogenes* se conoce como Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). En esta técnica, el DNA genómico es amplificado con un sólo oligonucleótido de una secuencia de nucleótidos seleccionada arbitrariamente. La unión del oligonucleótido al DNA templado se favorece con una baja temperatura de alineamiento. Los múltiples productos de PCR se separan de acuerdo a su tamaño mediante un gel de

agarosa convencional y finalmente, el patrón de RAPD resultante de diferentes aislamientos puede ser comparado.

Utilizando esta metodología se obtienen mejores resultados para diferenciar entre aislamientos de estreptococos del grupo A con tipos M diferentes que los obtenidos con REA, pero no se puede diferenciar a todos los tipos M existentes. La desventaja de este método es que los patrones de RAPD obtenidos por un determinado oligonucleótido dependen en gran medida de las condiciones específicas de la reacción y de la concentración de los reactivos utilizados, esto implica que los resultados pueden variar si existe una pequeña modificación en la temperatura de alineamiento, en la concentración del oligonucleótido utilizado para la amplificación ó en la concentración de cloruro de magnesio, incluso se han encontrado diferencias en el patrón de RAPD cuando se utilizan diferentes termocicladores (Seppälä H. 1994).

#### **3.5.8. Tipificación por *Vir typing*.**

Por otra parte, se ha propuesto el uso de un método de tipificación conocido como *vir typing*, basado en la amplificación de grandes fragmentos de DNA mediante la técnica de la PCR, seguido por una digestión del producto resultante con endonucleasas de restricción. Posteriormente, se revela el patrón de corte resultante en un gel de electroforesis. Se propuso la aplicación de esta técnica utilizando el regulon *vir* de *Streptococcus pyogenes*, el cual consiste de uno o más de los siguientes genes estructuralmente relacionados: genes que codifican para el receptor de IgG por la fracción Fc (*FcrA*), para la proteína M (*emm*), para proteínas de unión a IgA (*enn*), genes que además están flanqueados por el gen

que codifica para la C5a peptidasa y el gen regulatorio llamado *virR* (*mry*). Para el desarrollo de esta técnica de tipificación se toma ventaja de la divergencia en secuencia y arquitectura del regulon *vir* entre los diferentes tipos de *Streptococcus pyogenes*, sin embargo, la técnica de RAPD tiene mayor poder discriminatorio (Gardiner D. 1995).

#### 3.5.9. Tipificación mediante secuenciación de los alelos del gen *emm*.

Se ha hablado anteriormente que muchos serotipos M pueden ser relacionados con un gen *emm* específico mediante hibridación con oligonucleótidos alelo específicos. Aunque esta tecnología es útil, es necesario contar con oligonucleótidos específicos para alelo de *emm* conocido, lo cual no permite la identificación de nuevos genes *emm* y puede ser tedioso para la identificación de genes *emm* de baja incidencia. Esta y otras limitaciones impulsaron a Beall (Beall B. 1996) a intentar un nuevo método basado en la variación presente en la región 5' de la mayoría de los genes *emm*.

El procedimiento mediante el cual se logra la tipificación de las cepas de *Streptococcus pyogenes* es mediante la amplificación de los alelos de *emm* utilizando un par de oligonucleótidos descritos en un trabajo anterior (Whatmore A. 1995) por PCR y sometieron los productos de amplificación a secuenciación automatizada (Beall B. 1996).

Esta es una técnica mucho más discriminatoria que todas las anteriores pues permite una rápida y directa deducción del tipo M a partir de la secuencia obtenida de más de 160 bases del extremo 5' del gen *emm*. Esta técnica es útil también

para distinguir diferencias entre cepas con un mismo tipo M serológico y para identificar nuevos serotipos M.

En el presente trabajo se utiliza esta última técnica para la tipificación de las cepas de *Streptococcus pyogenes*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

En el presente estudio trabajamos con 313 aislamientos de *Streptococcus*, la mayoría de ellos provenientes de pacientes con faringitis. Estos fueron obtenidos a lo largo de dos años (2001-2003) de pacientes que acudieron a las entidades de salud de la Ciudad de México que se enumeran en la tabla 1.

La siguiente tabla muestra los hospitales que participaron en el estudio y el número de aislamientos obtenidos de cada uno de ellos.

Hospital	No. de Aislamientos
ISSSTE Gonzalo Castañeda	124
Instituto Nacional de Pediatría (INP)	53
Hospital Médica Sur (Privado)	39
ISSSTE López Mateos	19
Hospital Gabriel Mancera	16
Instituto Nacional de Cardiología (INC)	13
Centro Médico Nacional, Hospital de Especialidades	10
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)	10
Varios	29
<b>Total de Aislamientos</b>	<b>313</b>

**Tabla 1.** Hospitales de la ciudad de México que proporcionaron las cepas clínicas de *Estreptococos* para su tipificación en este estudio.

Las cepas de referencia fueron proporcionadas por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention), y fueron sometidas a los mismos procedimientos y análisis que las muestras clínicas.

#### 4.2. IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO A.

Para identificar que las cepas de origen clínico recibidas son *Streptococcus pyogenes* es necesario confirmar tanto la hemólisis beta como la presencia del antígeno de superficie formado por N-acetilglucosamina y ramnosa característico de los estreptococos del grupo A. Para confirmar la hemólisis, las cepas se sembraron en placas de agar sangre de carnero y se incubaron por 24 horas a 37°C. Transcurridas el tiempo de incubación se observó el tipo de hemólisis que presentó cada cepa.

Dado que también los estreptococos del grupo B, C y G pueden manifestar hemólisis de tipo beta, es necesario confirmar el grupo de Lancefield al que pertenece el estreptococo. Esto se determina mediante pruebas de coagulación comercial para estreptococos (Kit Pastorex, Bio Rad). Estas pruebas comerciales identifican el antígeno de superficie que presenta cada aislamiento de estreptococos y por tanto se logra separar a *Streptococcus pyogenes* del resto de los Estreptococos.

Tanto las cepas clínicas recibidas, pertenecientes o no a los Estreptococos del grupo A, como las cepas de referencia, se conservaron en caldo BHI (Bioxon) con Glicerol al 15%, a una temperatura de 70°C bajo cero.

### 4.3. EXTRACCIÓN DEL DNA

La extracción de DNA se realizó mediante dos métodos. Ambos se inician sembrando la cepa de *Streptococcus pyogenes* en dos tubos eppendorf de 1.5 mL que contiene medio de cultivo Todd Hewitt y se incuban toda la noche a 37°C con agitación constante de 250 r.p.m. Los métodos se detallan a continuación:

#### 4.3.1. Método de Fenol-Cloroformo Modificado

1. Centrifugar uno de los cultivos a 14 000 r.p.m. por 5 minutos para obtener un pellet de bacterias y desechar el sobrenadante. Adicionar el otro cultivo bacteriano en el mismo tubo con el pellet y centrifugar nuevamente. Desechar el sobrenadante.
2. Adicionar al tubo con el paquete bacteriano 800  $\mu$ L de Buffer TE (pH 8) y resuspender ayudándose con una micropipeta.
3. Colocar el tubo en un termoblock a una temperatura constante a 65°C por 15 minutos.
4. Centrifugar a 15,000 r.p.m. durante dos minutos. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 800  $\mu$ L de Buffer TE (pH 8). Centrifugar y descartar el sobrenadante nuevamente.
5. Resuspender el pellet en 500  $\mu$ L de TE con 10  $\mu$ g/mL de Mutanolisina e incubar por 1 hora a 37°C
6. Adicionar 100  $\mu$ L de una solución de SDS al 10%, mezclar por inversión del tubo y calentar a 65°C por 20 minutos.

7. Centrifugar 10 minutos a 15,000 r.p.m. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
8. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de una solución de RNAsa y 10  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  cada una) e incubar a 37°C por una hora.
9. Adicionar 700  $\mu\text{L}$  de una mezcla 1:1 de Fenol-Cloroformo y mezclar por inversión del tubo.
10. Centrifugar 10 minutos a 12 000 r.p.m. y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
11. Adicionar nuevamente 700  $\mu\text{L}$  de la mezcla 1:1 de Fenol-Cloroformo, mezclar por inversión del tubo y centrifugar a 12,000 r.p.m. por 10 minutos.
12. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y adicionar 250  $\mu\text{L}$  de una solución 5M de Acetato de Amonio y 600  $\mu\text{L}$  de Etanol al 95%.
13. Incubar a 4°C durante toda la noche.
14. Centrifugar 30 minutos a 12,000 r.p.m.
15. Descartar el sobrenadante, el pellet debe ser visible.
16. Adicionar 1 mL de etanol al 95%, invertir el tubo para mezclar y centrifugar a 12000 r.p.m. por 5 minutos.
17. Descartar el sobrenadante, adicionar 1mL de etanol al 70% invertir el tubo para mezclar y centrifugar nuevamente.
18. Descartar el sobrenadante y centrifugar al vacío aproximadamente 20 minutos para secar el DNA.
19. Resuspender el pellet en 75 $\mu\text{L}$  de agua estéril.

##### 4.3.2. Extracción de DNA utilizando un método comercial

La extracción del DNA mediante el kit DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN) se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor, que se detallan a continuación:

1. Centrifugar uno de los cultivos a 14,000 r.p.m. por 5 minutos para obtener un pellet de bacterias y desechar el sobrenadante. Adicionar el otro cultivo bacteriano en el mismo tubo con el pellet y centrifugar nuevamente. Desechar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180  $\mu$ L de buffer de lisis adicionando, momentos antes de usar, lisozima a una concentración de 20mg/mL.
3. Incubar a 37°C al menos por 30 minutos.
4. Se adicionan 25  $\mu$ L de Proteinasa K (20mg/mL) y 200  $\mu$ L del Buffer A1. Mezclar en el Vortex.
5. Incubar a 70°C por 30 minutos.
6. Adicionar a la muestra 200  $\mu$ L de etanol (96-100%) y mezclar muy bien con ayuda del Vortex.
7. Tomar la mezcla del paso 6 con una pipeta y transferirla a una columna de extracción del DNA colocada sobre un tubo de colecta de 2 mL. Centrifugar a 8,000 r.p.m. por 1 minuto. Descartar el líquido del tubo de colecta.
8. Colocar la columna de extracción en un nuevo tubo de colecta, y adicionar 500  $\mu$ L del buffer AW1. Centrifugar a 8,000 r.p.m. por un minuto. Descartar el líquido del tubo de colecta.
9. Adicionar a la columna de extracción 500  $\mu$ L del buffer AW2 y centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos. Descartar el líquido del tubo de colecta.

10. Colocar la columna de extracción de DNA en un tubo nuevo de 1.5 mL. Adicionar 200  $\mu$ L de buffer de elusión AE directamente sobre la membrana de la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar a 8,000 r.p.m. para eluir.
11. Repetir el paso de elusión descrito en el punto 10.

#### 4.3.3. Evaluación de la calidad del DNA aislado.

En ambos tipos de extracción se evalúa la calidad del DNA extraído mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 1% en buffer de Tris-Boratos-EDTA (TBE), utilizando bromuro de etidio para poder observar las bandas del DNA cromosomal bajo la luz UV.

#### 4.4. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *emm*.

La amplificación del gen *emm* se logra mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Cada ciclo de la reacción consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión.

La etapa de desnaturalización se realizó a 94°C durante 60 segundos, el alineamiento se llevó a cabo a 55°C durante 60 segundos y finalmente las condiciones para la etapa de extensión fueron a 72°C durante 120 segundos. Con el objetivo de obtener la cantidad de producto de PCR necesario para el corte con enzimas de restricción, la reacción se realiza durante 30 ciclos.

Antes del comienzo del primer ciclo, hay una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos. Al final de los 30 ciclos, el procedimiento continúa con una

etapa de extensión a 72°C durante 7 minutos y finalmente se disminuye la temperatura a 4°C para detener la reacción.

La mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen *emm* fue:

AGUA	25.7 $\mu$ L
Buffer 10 X para PCR con MgCl <sub>2</sub> 15 mM (Applied Biosystems)	5 $\mu$ L
Desoxirribonucleótidos (dNTP's) (Applied Biosystems)	8 $\mu$ L de una solución 10 mM de cada desoxirribonucleótido.
Primer 1 A (Biosynthesis)	5 $\mu$ L de un stock 2 mM
Primer 1 B (Biosynthesis)	5 $\mu$ L de un stock 2 mM
DNA de la muestra	1.16 $\mu$ L
Taq Polimerasa 5 U/ $\mu$ L (Applied Biosystems)	0.15 $\mu$ L

El Volumen final de la mezcla de reacción es de 50 $\mu$ L.

La secuencia de los primers (**Whatmore A.** 1994; **Beall B.** 1996) utilizados para amplificar el gen *emm* se muestran a continuación:

1A: 5'-GGG AAT TCT ATT SGC TTA GAA AAT TAA-3'

1B: 5'-GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT-3'

El primer "1A" es un primer degenerado, en el cual S es equivalente a C o G. El tamaño del producto de PCR es variable y va desde aproximadamente 700 hasta 1600 b.p.

Cabe mencionar que en algunos casos no se logró la amplificación del gen a 55°C. En estos casos la amplificación del gen es posible si se disminuye la

temperatura de alineamiento hasta 50°C, se incrementa la concentración de MgCl<sub>2</sub> hasta 2.5 mM o se agrega DMSO al 5% v/v.

La amplificación se visualizó mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1.5% en buffer de TBE 1X. Se agregó bromuro de etidio 0.5 mg/mL (Sigma) a la agarosa para observar las bandas resultantes en una cámara de luz UV.

#### 4.5. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *sof*.

La determinación del genotipo *sof* (Factor de Opacidad) no forma parte de este trabajo, sin embargo, dado que la ausencia o presencia de este gen ha sido asociada con determinados tipos M (Johnson D.R. 1993; Rehder C.D. 1995; Cunningham M. 2000) y de que ya conocíamos el genotipo *sof* para todas las cepas clínicas estudiadas (Pérez-Romano 2003), consideramos que podríamos usar el dato como un criterio para realizar una clasificación preliminar con base a esta característica, así, este tamizaje ayudó a la identificación del tipo M de las cepas en estudio. Las condiciones a las que se amplificó el gen *sof*, la secuencia de nucleótidos de los primers utilizados y los componentes de la mezcla de reacción ya han sido reportadas (Pérez-Romano 2003).

#### 4.6. CLASIFICACIÓN PRELIMINAR DE LAS CEPAS.

Una vez que se amplificaron el gen *emm* y el gen *sof*, procedimos a hacer una clasificación gruesa de las cepas con el objetivo de facilitar su tipificación, bajo la premisa de que cepas de un mismo tipo M presentarán el mismo resultado para *sof* y un peso molecular del producto de PCR del gen *emm* similar.

Para su clasificación primero se consideró el resultado del PCR para el gen *sof* y con base a esto las muestras se separaron como cepas *sof* positivas cuando se demostró la presencia del gen o *sof* negativas cuando no es así. El segundo criterio que se utilizó fue el tamaño molecular del producto de PCR resultante de la amplificación del gen *emm*. Para determinar el peso molecular se colocan las muestras en un gel de electroforesis, y en dos de los pozos del gel se agregan 3µL de marcador molecular de 100 pb (Invitrogen). Al observar el resultado del PCR en la cámara de luz UV se toma una fotografía digital que después se analiza mediante el Software Kodak 1D 3.5v para determinar el tamaño molecular de las muestras en cada uno de los carriles del gel.

#### **4.7. DIGESTIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN *emm*.**

Una vez conocido el peso molecular del gen *emm* y el genotipo *sof*, se cortó el producto de PCR del gen *emm*. En cada ensayo cortamos 18 cepas con el mismo genotipo *sof* y con tamaños moleculares cercanos, con el objetivo de que las muestras fueran lo más parecidas posibles y por tanto obtuviéramos varios patrones de restricción iguales en el mismo gel.

##### **4.7.1. Digestión con *Ddel*.**

Para la digestión utilizamos la enzima *Ddel* (Invitrogen), una enzima de restricción que corta al DNA cuando reconoce la secuencia de nucleótidos C/TNAG ( N = A, C, G ó T). La mezcla para la reacción de restricción fue de 40 µL: 35.8 µL del producto de PCR que se desea digerir, 4 µL de buffer de reacción (reactivo III,

Invitrogen) y 0.2  $\mu\text{L}$  de la enzima *Ddel* de 10 U/ $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche.

El patrón de corte resultante (RFLP) se visualizó mediante un gel de agarosa (agarosa 1000 Invitrogen) al 3.5% con bromuro de etidio, en buffer de corrida de TAE 1X, usando el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen).

#### 4.7.2. Doble Digestión con *HincII* y *HaeIII*

Durante el análisis de los resultados observamos que diferentes serotipos M mostraron un patrón de corte similar al ser digeridos con la enzima *Ddel* (véase resultados). Con el fin de lograr la discriminación entre diferentes serotipos M con el mismo RFLP producto de la digestión con *Ddel*, se realizó una doble digestión de los productos de PCR del gen *emm* de las cepas que presentaron un patrón de restricción común a varios serotipos M. Las enzimas utilizadas fueron *HincII* (secuencia de corte: GTY/RAC, Y = C ó T, R = A ó G) y *HaeIII* (Secuencia de Corte GG/CC). Ambas enzimas se encuentran a una concentración de 10 U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen). La mezcla para la reacción de restricción fue de 40  $\mu\text{L}$ : 35.6  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 4  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción y 0.2  $\mu\text{L}$  de cada una de las enzimas. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche, y posteriormente se observó el resultado de la doble digestión.

#### 4.8. CLASIFICACIÓN DE LOS RFLP's.

Una vez realizado el gel de electroforesis para observar los RFLP's resultantes de las digestiones ya sea con *Ddel* o con *HincII* y *HaeIII*, se tomó una fotografía

digital para analizarla mediante el Software Kodak 1D 3.5v. Este programa determina el tamaño molecular de cada uno de los fragmentos de DNA obtenidos en la reacción de restricción.

Posteriormente se clasificaron los RFLP's de acuerdo al patrón obtenido, bajo la premisa de que las muestras que pertenecían a un mismo tipo M, mostraran el mismo RFLP. Una vez que se agruparon todas las cepas dentro de un patrón determinado, se escogen al azar al menos dos cepas clínicas de cada patrón de corte para secuenciar.

#### **4.9. SECUENCIACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.**

Para secuenciar las cepas seleccionadas se realizó una nueva amplificación del gen *emm* de estas cepas y se observó en el gel que el producto de PCR fuera suficiente para la reacción de secuenciación y que no hubiese amplificaciones inespecíficas o contaminaciones de otros fragmentos de DNA.

Posteriormente el producto de PCR se purificó utilizando una columna comercial (Microcon® 100). El proceso de purificación utilizado es una filtración a través de una membrana que impide el paso de fragmentos grandes de DNA, seguido de dos etapas de lavado de DNA con agua desionizada estéril.

Una vez purificado el producto de PCR, nuevamente se observó en un gel de electroforesis de agarosa (Invitrogen) al 1.5% en TBE 1X para determinar la concentración de cada una de las muestras que se van a secuenciar. Para determinar la concentración de cada muestra se utilizó el marcador molecular Low Mass (Gibco BRL). Al terminar el proceso de electroforesis, se tomó una fotografía digital del gel y mediante el Software Kodak 1D 3.5 se determinó la concentración

del DNA en cada carril comparando la intensidad de las bandas que presentó cada muestra con las bandas del marcador molecular.

Finalmente, las muestras se enviaron a secuenciar en un secuenciador automatizado (Perkin-Elmer), utilizando el primer *emm* 1A como iniciador.

#### 4.10. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA Y COMPARACIÓN CON LAS CEPAS DE REFERENCIA.

Una vez realizada la secuenciación se analizó el cromatograma y la secuencia en formato electrónico. El análisis de la secuencia implica la comparación de la secuencia electrónica con el cromatograma para resolver ambigüedades que puedan aparecer en la secuencia. Posteriormente se usó el software EDITSEQ (DNASTAR, Madison Wis) para editar la secuencia original tomando solamente alrededor de 160 bases de la región hipervariable del gen *emm* y que es la que nos sirvió para determinar el alelo *emm* de que se trata y relacionarlo con su correspondiente tipo M.

Finalmente, la secuencia editada se compara mediante el Software MEGALING (DNASTAR, Madison Wis.) con las secuencias de todos los alelos de *emm* conocidos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

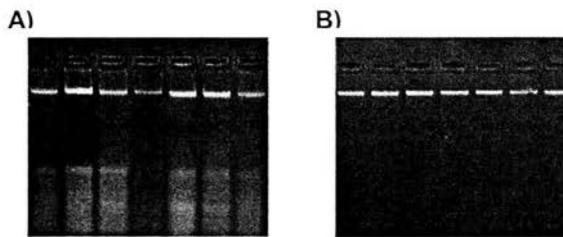
### 5.1. AISLAMIENTO DEL DNA.

El aislamiento de un DNA lo más puro e íntegro posible es un punto importante en la realización de este trabajo, ya que a partir de él se realizó todo el estudio. Como se mencionó en la sección anterior, el aislamiento del DNA se realizó utilizando dos métodos diferentes.

Los primeros aislamientos de DNA se realizaron utilizando el método de fenol-cloroformo. A partir de este DNA se logró la amplificación del gen *emm* de alrededor de 190 muestras, pero con el resto de las muestras se presentaron algunos problemas, principalmente fallas en la amplificación o una baja concentración del producto de PCR, insuficiente para realizar el análisis de restricción, por lo que procedimos a utilizar el kit de extracción de DNA Dneasy® Tissue Kit (250) de Qiagen. Con el DNA obtenido mediante este último método, se logró la amplificación del gen *emm* de la mayoría de las cepas (254 muestras) y con un mejor rendimiento de la reacción de PCR. Este resultado podría ser consecuencia de una mejor calidad del DNA cuando se extrae utilizando el kit comercial.

Para comparar la integridad de las muestras de DNA obtenidas por ambos métodos se realizó el gel de electroforesis que se muestra en la figura 2, en donde se colocaron muestras de DNA extraídas por ambos métodos. En cada pozo del gel se cargaron cinco microlitros de muestra.

Como se puede observar en la figura 2, la integridad y pureza del DNA obtenido mediante el kit de Qiagen es superior a la observada en las muestras aisladas con el método de fenol-cloroformo, pues en este último caso se observa un barrido a lo largo de todo el carril en que fueron colocadas las muestras de DNA, probablemente debido a que hay cierto grado de degradación del DNA y algunas impurezas, como RNA por ejemplo.

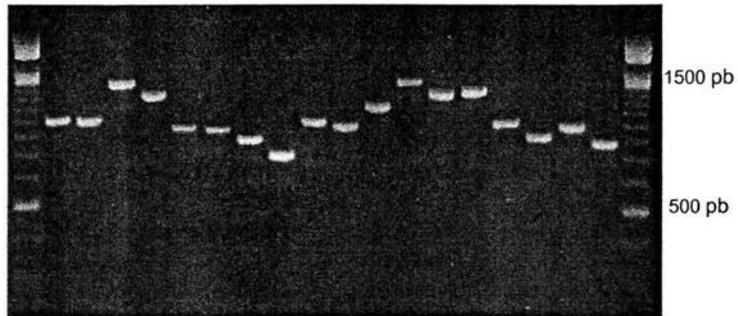


**Figura 2.** Comparación del DNA Extraído de cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico: A) Utilizando el método de fenol cloroformo y B) mediante el kit comercial de Quiagen.

Una ventaja más del aislamiento de DNA utilizando el método comercial es que éste se puede conservar durante un mayor período de tiempo, por lo que se realizó el aislamiento de DNA de todas las cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico proporcionadas para nuestro estudio utilizando este método de extracción. La finalidad de esto es contar con una reserva de DNA en buenas condiciones que permita el estudio del gen *emm*, así como de los genes que codifican para otros factores de virulencia del Estreptococo en proyectos posteriores

## 5.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *emm*.

Los productos de PCR del gen *emm* varían en tamaño desde alrededor de 800 hasta casi 1600 pares de bases (figura 3, tabla 2). Estas variaciones están relacionadas a diferencias en el número y tamaño de bloques de repetición de la región A en la proteína M, pues está reportado que esta región difiere según el tipo M de que se trate y en consecuencia también difiere el tamaño del segmento del gen que codifica para esta región (Fischetti V. 1991; Cunningham M. 2000).



**Figura 3.** Diferentes tamaños moleculares resultantes de la amplificación del gen *emm* de *S. pyogenes* mediante la técnica de PCR. En el primer y último carril se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

En la mayoría de las cepas se logró la amplificación del gen *emm* utilizando las condiciones iniciales de amplificación. Sin embargo, en algunos casos el producto de PCR resultó insuficiente para realizar la reacción de restricción; por este motivo, fue necesario emplear estrategias que favorecen el rendimiento del producto de PCR. Entre estas estrategias se pueden enumerar las siguientes:

- ♦ Disminución de la temperatura de alineamiento de 55 hasta los 50°C.

- ◆ Incremento en la concentración final de  $MgCl_2$  en la reacción de 1.5 mM hasta 2.5 mM
- ◆ Adición de DMSO al 5% v/v a la mezcla de reacción.

Tipo M	Peso Promedio	C.V.	sof
M1	1162.62 pb	49.76 pb	N
M2	817.58 pb	76.11 pb	P
M3	1522.06 pb	79.45 pb	N
M4	866.12 pb	69.07 pb	P
M6	1094.65 pb	71.24 pb	N
M11	933.20 pb	24.25 pb	P
M12	1463.70 pb	134.89 pb	P
M22	899.91 pb	65.44pb	P
M28	866.90 pb	62.30 pb	P
M41-2	865.20 pb		N
M49-1	940.30 pb	26.50 pb	P
M59	892.56 pb	58.06 pb	P
M68-1	811.50 pb		P
M75	930.38 pb	87.14pb	P
M77	852.70 pb	26.58 pb	P
M89	810.22 pb	53.81 pb	P
STG 485	853.15 pb		N
STG 6	1119.30 pb	26.02 pb	N

**Tabla 2.** Pesos moleculares de los productos de PCR del gen *emm* y genotipo *sof* de los diferentes serotipos M encontrados en nuestro estudio.

Gracias a estas estrategias se logró la amplificación del gen *emm* en cantidades suficientes para realizar el análisis de restricción de la mayoría de las cepas de *Streptococcus pyogenes* con las que se tuvieron problemas utilizando las condiciones estandarizadas de reacción.

Los problemas de amplificación y el bajo rendimiento de la reacción de PCR obtenido para algunas cepas pudieron ser consecuencias de diferencias de afinidad de los primers utilizados con los diferentes alelos del gen *emm* ó de diferencias en la calidad de DNA templado que se utiliza en cada caso, pues aún cuando se extrajo DNA de todas las muestras utilizando el kit comercial, observamos que en algunos casos los problemas de amplificación se resolvieron al extraer el DNA nuevamente.

Una vez amplificado el gen *emm* y determinado el tamaño molecular, se utilizó este dato como un método de tamizaje grueso, para agrupar cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico con un producto de PCR de tamaño similar, donde se esperaba que una parte de estas cepas tuviera el mismo alelo del gen *emm* y por tanto pertenecieran a un mismo tipo M.

Adicionalmente, para el agrupamiento preliminar de cada una de las cepas en estudio, se consideró el resultado del análisis del gen *sof*, determinado en un trabajo previo (Pérez-Romano 2003), dado que la ausencia o presencia del gen que codifica para el factor de opacidad ha sido relacionada con determinados serotipos de la proteína M (Johnson D.R. 1993; Rehder C.D. 1995; Cunningham M. 2000).

De acuerdo con esto, las cepas de las que se obtuvo un producto de PCR del mismo tamaño, pero que presentaron un genotipo *sof* distinto se subdividieron, y

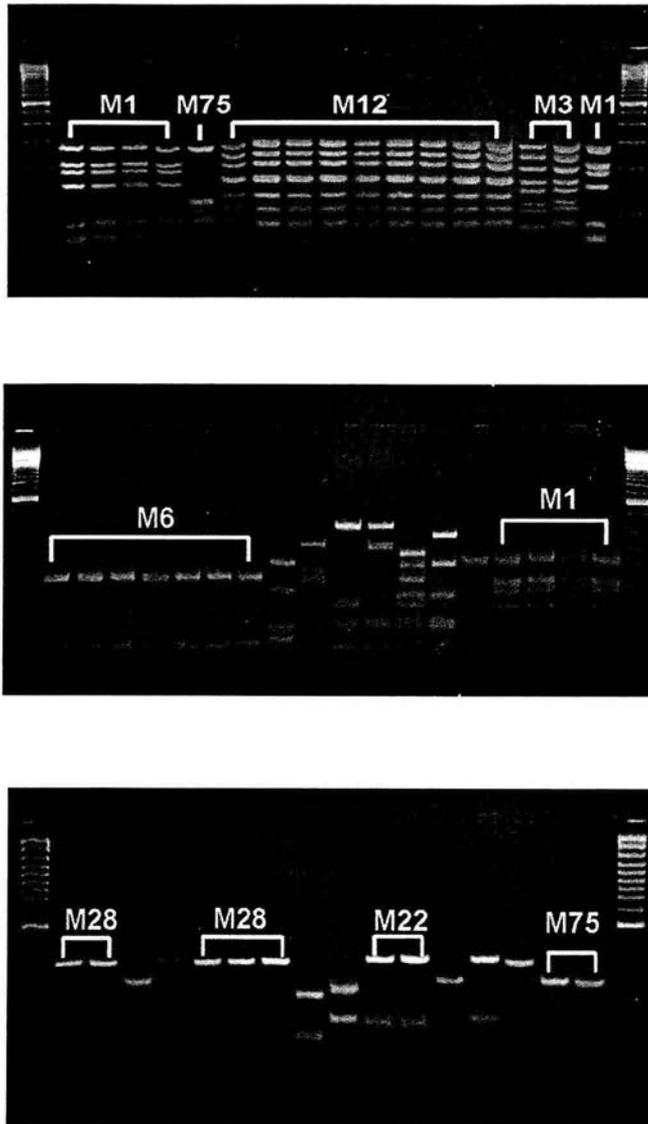
pertenecieron a distintos serotipos M, por lo que nuestra estrategia facilitó la identificación de las cepas de *Streptococcus pyogenes*. El genotipo *sof* de los serotipos M encontrados en nuestro estudio se muestran en la tabla 2.

### 5.3. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL GEN *emm* CON *Ddel*.

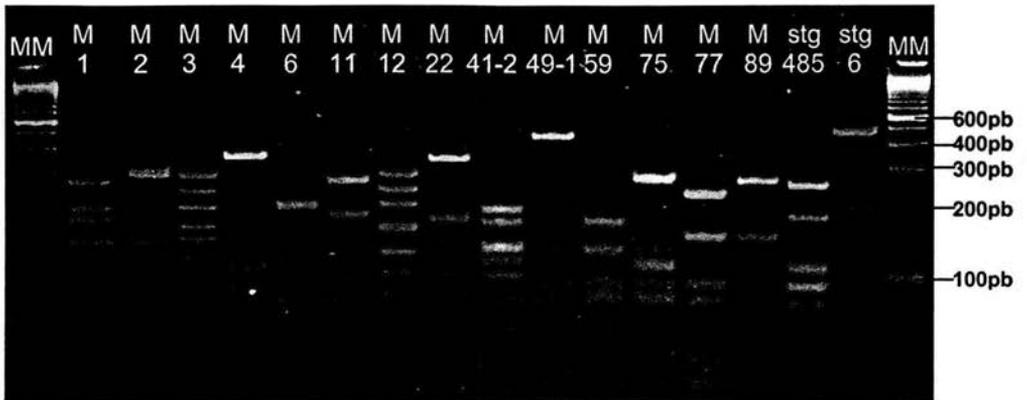
El agrupamiento preliminar de las cepas de Estreptococos del grupo A permitió realizar la reacción de restricción con la enzima *Ddel* de forma sistemática y obtener en un mismo gel varias muestras que presentan el mismo patrón de restricción. En la figura 4 se muestran algunos geles en donde fue evidente la funcionalidad de esta estrategia, pues en cada uno de ellos se pueden observar varias muestras con el mismo patrón de restricción.

Analizando todos los geles de electroforesis realizados, a simple vista y mediante el análisis del tamaño molecular de cada una de las bandas obtenidas después de la digestión con *Ddel*, se clasificaron los RFLP's de acuerdo al patrón obtenido y bajo la premisa de que las muestras que pertenecen a un mismo tipo M presentarán el mismo patrón de corte.

A partir de esta clasificación llegamos a la conclusión que dentro de las cepas en estudio existían al menos 16 patrones de restricción diferentes y por tanto, al menos 16 serotipos M diferentes. En la figura 5 se muestran los patrones de restricción encontrados utilizando la enzima *Ddel* y el serotipo M al que pertenece cada patrón. El serotipo M se obtuvo por secuenciación automatizada. En el primer y último carril se muestran marcadores moleculares, cada una de las bandas corresponde a 100pb.



**Figura 4.** Ejemplos de los patrones de restricción resultantes de la digestión del gen emm con la enzima de restricción *DdeI*. La clasificación preliminar de los productos de PCR facilita la comparación de patrones de restricción.



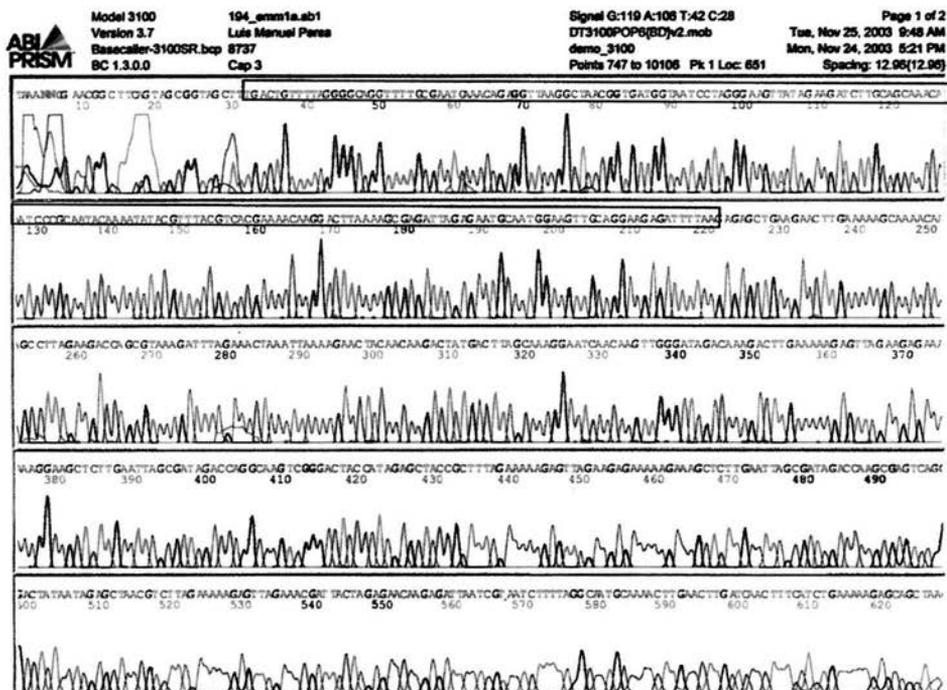
**Figura 5.** RFLP's encontrados a partir de la digestión de los productos de PCR del gen *emm* con la enzima *DdeI*.

#### 5.4. SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS ALELOS DEL GEN *emm*.

Posteriormente se seleccionaron al menos un par de cepas de cada uno de los patrones de restricción con el objetivo de secuenciar el producto de PCR e identificar el alelo de *emm* al que pertenecen. La purificación y secuenciación de los productos de PCR ya han sido descritas en la sección de Materiales y Métodos. La secuencia de nucleótidos del gen *emm* para cada uno de los patrones de restricción se proporcionó en formato electrónico y en forma de un cromatograma impreso como el presentado en la figura 6. En él se resalta la región de 160 nucleótidos utilizados para determinar el alelo de *emm* al que pertenece la muestra secuenciada.

Antes de identificar el alelo de *emm* al que pertenece cada una de las secuencias fue necesario cotejar la secuencia en formato electrónico contra la secuencia

impresa en el cromatograma, para resolver ambigüedades o diferencias entre ellas.



**Figura 6.** Cromatograma obtenido de la secuenciación de una cepa de *Streptococcus pyogenes* identificada posteriormente como M1. En el recuadro se muestra la sección del gen *emm* utilizada para la identificación del serotipo M.

El alelo de *emm* al que pertenece cada una de las muestras en estudio se identificó comparando la secuencia obtenida experimentalmente contra las secuencias de la misma región del gen de los diferentes tipos M conocidos. Cuando la homología entre ellas es de arriba del 95 % se considera que se trata del mismo alelo de *emm* (Facklam R. 1999; Espinosa L.E. 2003). En todos los

casos estudiados la homología entre la secuencia experimental y la secuencia reportada fue del 100%.

Debido la correspondencia que existe entre los alelos del gen *emm* y la expresión antigénica de determinada proteína M, a partir de este momento nos referiremos a los alelos del gen *emm* como serotipos M. De esta forma, podemos decir que en nuestro estudio se encontraron 16 serotipos M diferentes y dos serotipos clasificados como Stg (tabla 2), aún cuando se trató de cepas identificadas como *Streptococos* del grupo A.

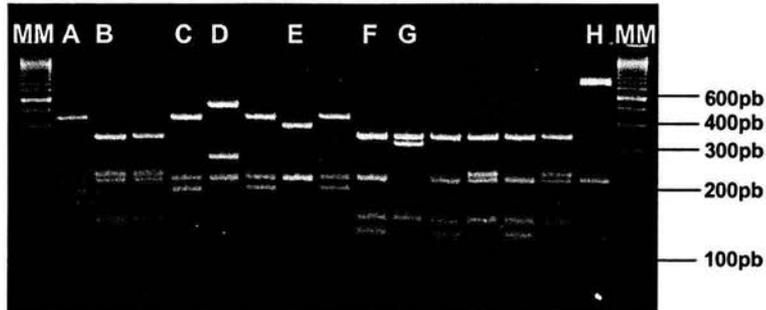
### 5.5. ANÁLISIS DE DOBLE RESTRICCIÓN DEL GEN *emm* CON *HincII* y *HaeIII*.

El análisis de los tipos M de las cepas de *Streptococcus pyogenes* obtenidos por secuenciación nos permitió observar algo interesante: existen cepas de *Streptococos* del grupo A de las cuales se obtienen patrones de restricción muy similares, pero que no pertenecen al mismo serotipo M. Los serotipos que presentan el mismo patrón de restricción fueron M4, M28 y M68-1, y el patrón de restricción compartido esta etiquetado como M4 en la figura 5.

Ante este resultado, procedimos a agrupar todas las cepas que presentan el patrón de restricción de M4, amplificar nuevamente el gen *emm* y a realizar una doble digestión utilizando ahora las enzimas de restricción *HincII* y *HaeIII*.

El objetivo de realizar la doble restricción fue buscar patrones de restricción característicos para serotipos M4, M28 y M68-1, de tal manera que fuese posible distinguirlos sin la necesidad de secuenciar el producto de PCR de cada cepa que presente este patrón de restricción con la enzima *Ddel*.

El resultado de este experimento se muestra en la figura 7; los patrones señalados como A y B fueron obtenidos de cepas de *Streptococcus pyogenes* cuyo gen *emm* se secuenció previamente y que correspondieron a una cepa M28 y una cepa M4 respectivamente.



**Figura 7.** Patrones de restricción resultantes de la doble digestión del producto de PCR del gen *emm* con las enzimas *HincII* y *HaeIII* (Patrones A al G). El patrón de restricción H corresponde a un control de corte utilizando una cepa de *Streptococcus pyogenes* M1.

Se amplificó nuevamente el gen *emm* y se secuenció al menos una cepa de cada diferente patrón de restricción. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

Serotipo M	Patrón de Restricción
M4	B, D, F, G
M28	A, C
M 68-1	E

**Tabla 3.** Serotipos M asociados a los patrones de restricción obtenidos al someter el producto de PCR del gen *emm* a doble restricción

#### 5.5.1. Doble restricción de cepas M4 (*emm4*).

El alelo *emm4* presentó al menos cuatro patrones de restricción diferentes al ser sometido a doble digestión con *HincII* y *HaeIII* (Figura 7, Tabla 3).

Reportes previos han demostrado que el serotipo M4 puede presentar más de un patrón de corte con estas enzimas (Martín D.R. 2000), sin embargo los RFLP's obtenidos en este estudio fueron diferentes a los reportados por otros investigadores (Martín D.R. 2000), lo cual nos da una idea de la variación que puede presentar el gen *emm* aún dentro de un mismo serotipo M.

La secuencia de nucleótidos de la región hipervariable del gen *emm* de las cepas M4 con diferentes RFLP's concuerdan en un 100% con la secuencia reportada, lo cual indica que los diferentes patrones de M4 son consecuencia de diferencias localizadas en alguna otra región del gen.

Para determinar la región del gen *emm4* en la cual se localizan estas diferencias, se podría secuenciar el gen completo de al menos dos cepas de cada uno de estos patrones de restricción, y con base en el análisis de las secuencias completas, tratar de dilucidar las consecuencias que estos cambios tendrían sobre la proteína M4 expresada en la superficie de la bacteria.

El peso molecular de los productos de PCR del gen *emm* varió dentro de un mismo serotipo M. Aún cuando estas variaciones pueden ser atribuidas a diferentes factores, se realizó un análisis para determinar si, en el caso de M4, las diferencias se relacionaron con algún patrón restricción. Los resultados de este análisis se resumen en la tabla 4.

Patrón de Restricción	# de Cepas	%del total de M4	Peso Molecular (pb)
B	8	47	799.43
D	1	5.8	950
F	7	41.2	907
G	1	5.8	857
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100%</b>	

**Tabla 4.** Relación entre los RFLP's de la cepas M4 y el peso molecular del producto de PCR del gen *emm*.

A partir de la revisión de todos los patrones de corte de M4, se observó que los patrones denominados B y F de la figura 7 fueron los más comunes entre las cepas con este serotipo, representando 47 y 41 % del total de cepas M4 respectivamente (tabla 4). Adicionalmente, entre los subgrupos formados dentro de las cepas M4 con estos patrones de restricción, existe una diferencia en el peso molecular del producto de PCR del gen *emm* aproximadamente 100 pares de bases entre los patrones B y F.

Sólo se encontró una cepa de M4 que presentó el patrón de restricción D y una presentó el patrón G lo que constituye el 5.8 % del total de cepas M4 encontradas en la muestra estudiada.

#### **5.5.2. Doble restricción de cepas M28 (*emm28*).**

De manera similar, al someter a la doble restricción el producto de PCR del serotipo M28 se observaron dos patrones de restricción distintos para este tipo M (patrones A y C de la figura 7).

Ambos patrones son similares y la diferencia radica en que el patrón C presenta una banda adicional de aproximadamente 100 pares de bases. Sólo 2 de las 14 cepas M28 presentan el patrón de restricción denominado C, además, para estas cepas el tamaño molecular del producto de PCR del gen *emm* es aproximadamente 100 pares de bases mayor que el del resto de las M28 (alrededor de 960 pb para las cepas con el patrón C contra cerca de 850 pb para el resto de las cepas M28).

Dentro de un mismo serotipo M la variación en el tamaño del producto de PCR es consecuencia de variaciones en el tamaño del gen *emm*. Estas variaciones conducen, tanto en el caso de las cepas M4 como en el de las M28, a diferencias en el número y tamaño de las unidades de repetición A y B de la proteína M y por tanto en el tamaño de la proteína M en sí. Estos cambios en el tamaño de la proteína pueden proveer a la bacteria de alguna ventaja selectiva ya que al cambiar de tamaño también cambia el carácter antigénico de las moléculas de M evitando que algunos anticuerpos puedan unirse a ellas y evadiendo su destrucción por el sistema inmune del hospedero (Fischetti V. 1991; Cunningham M. 2000).

### 5.5.3. Doble restricción de cepas M68-1 (*emm68-1*).

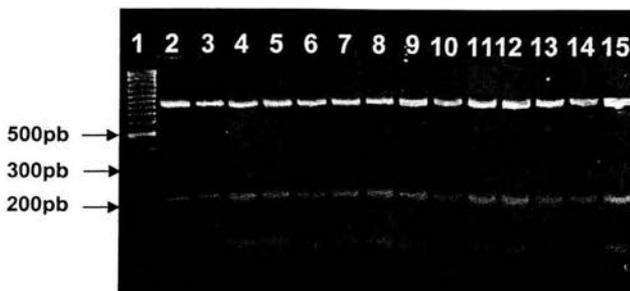
A partir del experimento de doble restricción encontramos que existe un serotipo M adicional que al ser sometido a digestión con la enzima *Ddel* también muestra el patrón de restricción característico de M28 y M4. Este serotipo se identificó mediante la secuenciación como M68-1 (*emm68-1*) con una correspondencia del

100% y el patrón de restricción obtenido mediante la doble digestión se muestra en la figura 7 carril E.

#### 5.5.4. Doble restricción de cepas M1 (*emm1*).

Como antecedente a la tipificación de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico, se contó con la determinación del gen que codifica para el factor inhibidor del complemento (*sic*), presente principalmente en EGA M1. Aún cuando el patrón de restricción de M1 es característico (figura 5), se encontraron cepas de origen clínico con el patrón de RFLP de M1 y reportadas como cepas carentes del gen *sic*, lo que nos llevó a considerar la posibilidad de tener cepas diferentes a M1 que presenten el patrón de corte con *Ddel* de este serotipo, tal como ocurrió en el caso de M4 y M28.

Para descartar esta posibilidad, todas las cepas de *Streptococcus pyogenes* reportadas como *sic* negativas que presentaron el RFLP de M1 se agruparon junto con un par de cepas control M1 y su producto de PCR del gen *emm* fue sometido a doble restricción. El resultado obtenido se muestra en la figura 8.

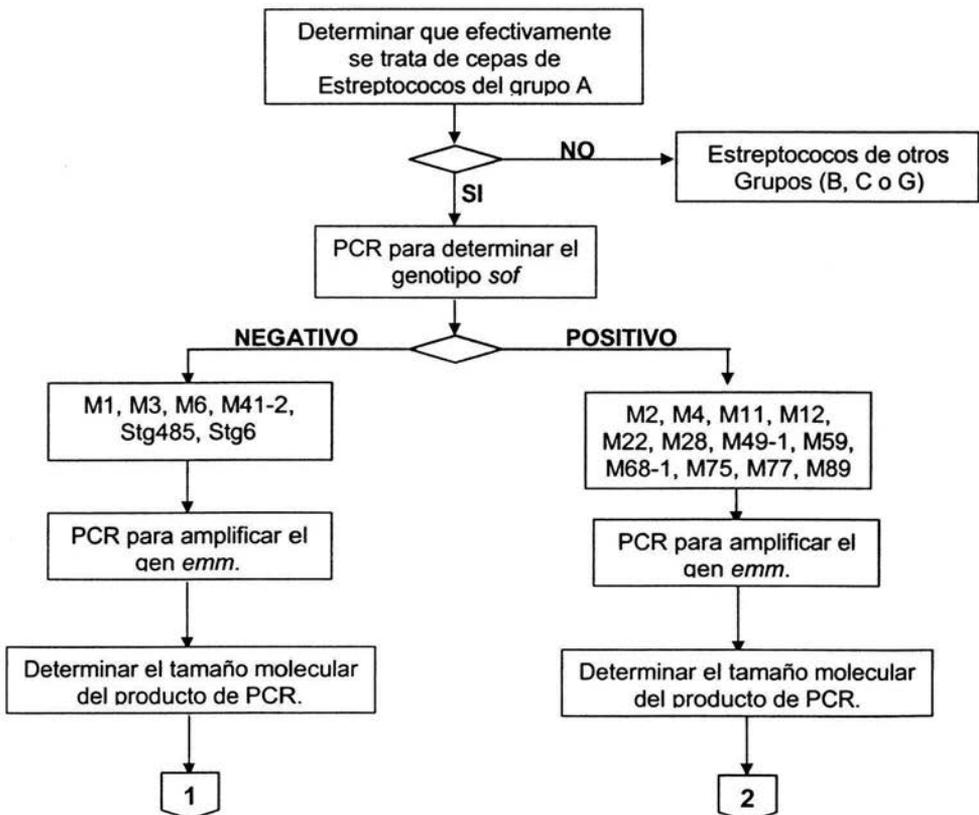


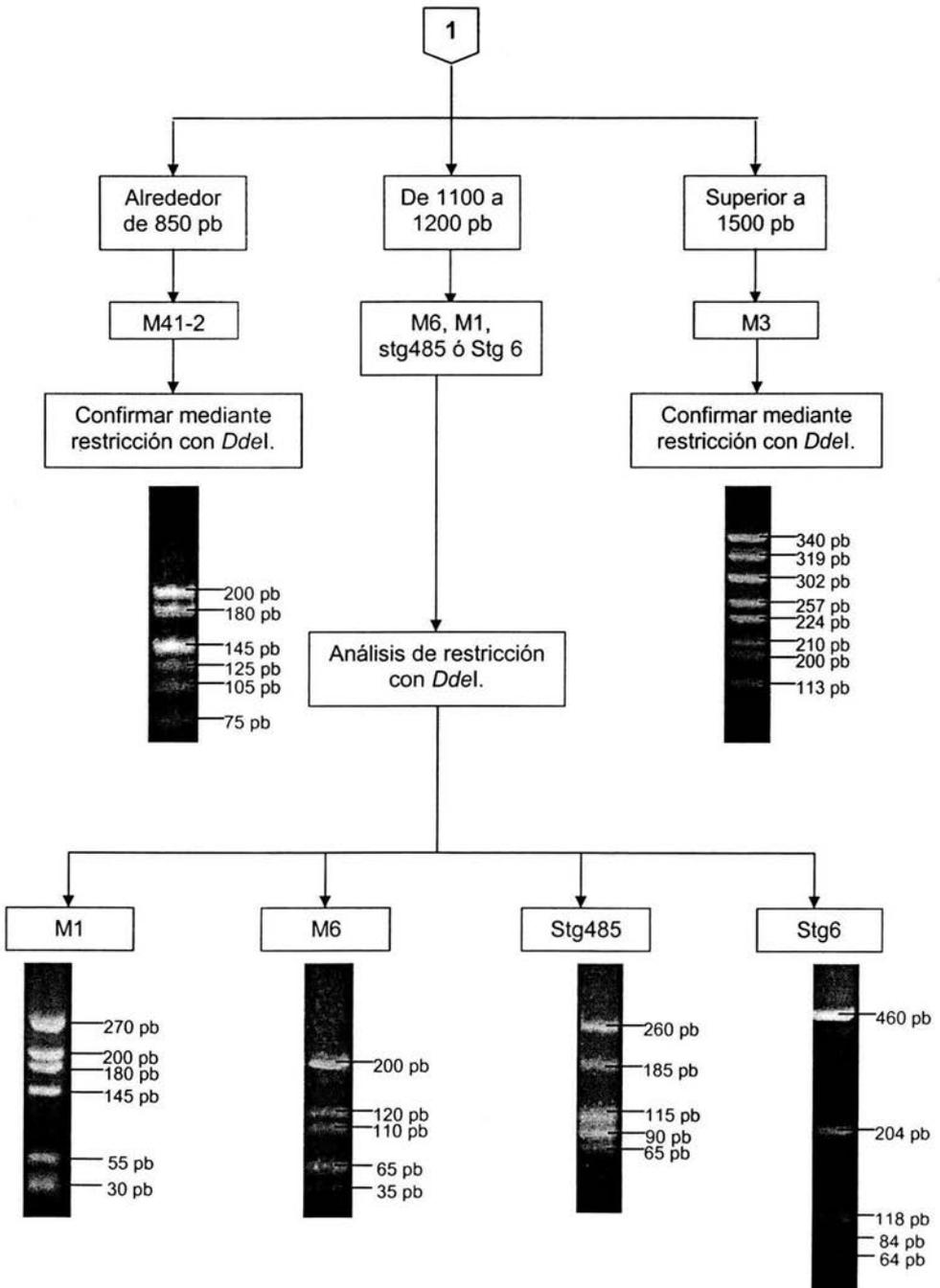
**Figura 8.** Doble restricción de productos de PCR del gen *emm*. Carriles 3-14 cepas con RFLP característico de M1 reportadas como *sic* negativas. Carriles 2 y 15 cepas control de M1.

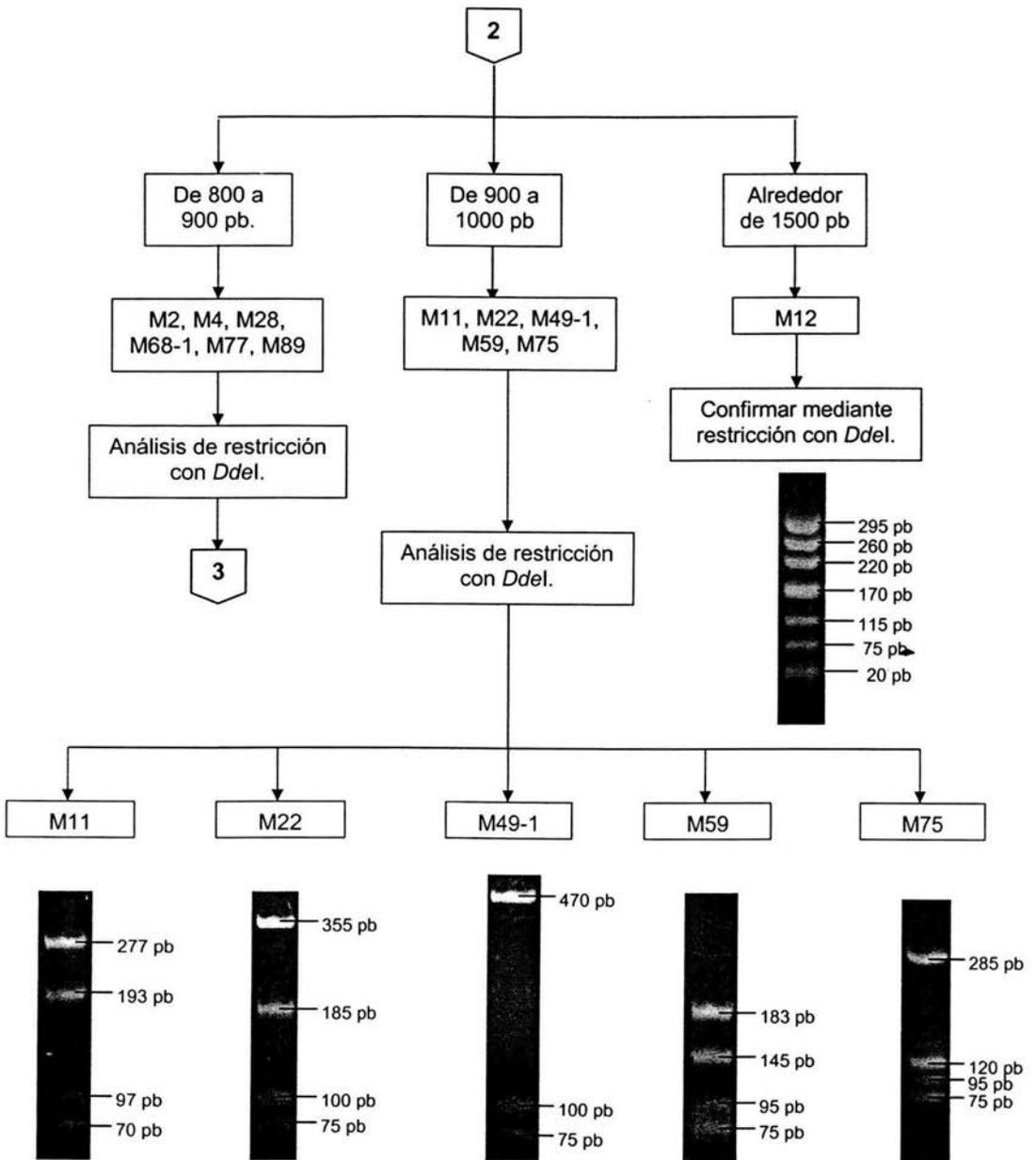
Se puede apreciar en la figura 8 un único patrón de restricción compartido por todas las cepas sometidas a este análisis, por lo que podemos inferir que las cepas M1 aparentemente *sic* negativas efectivamente pertenecen a este serotipo.

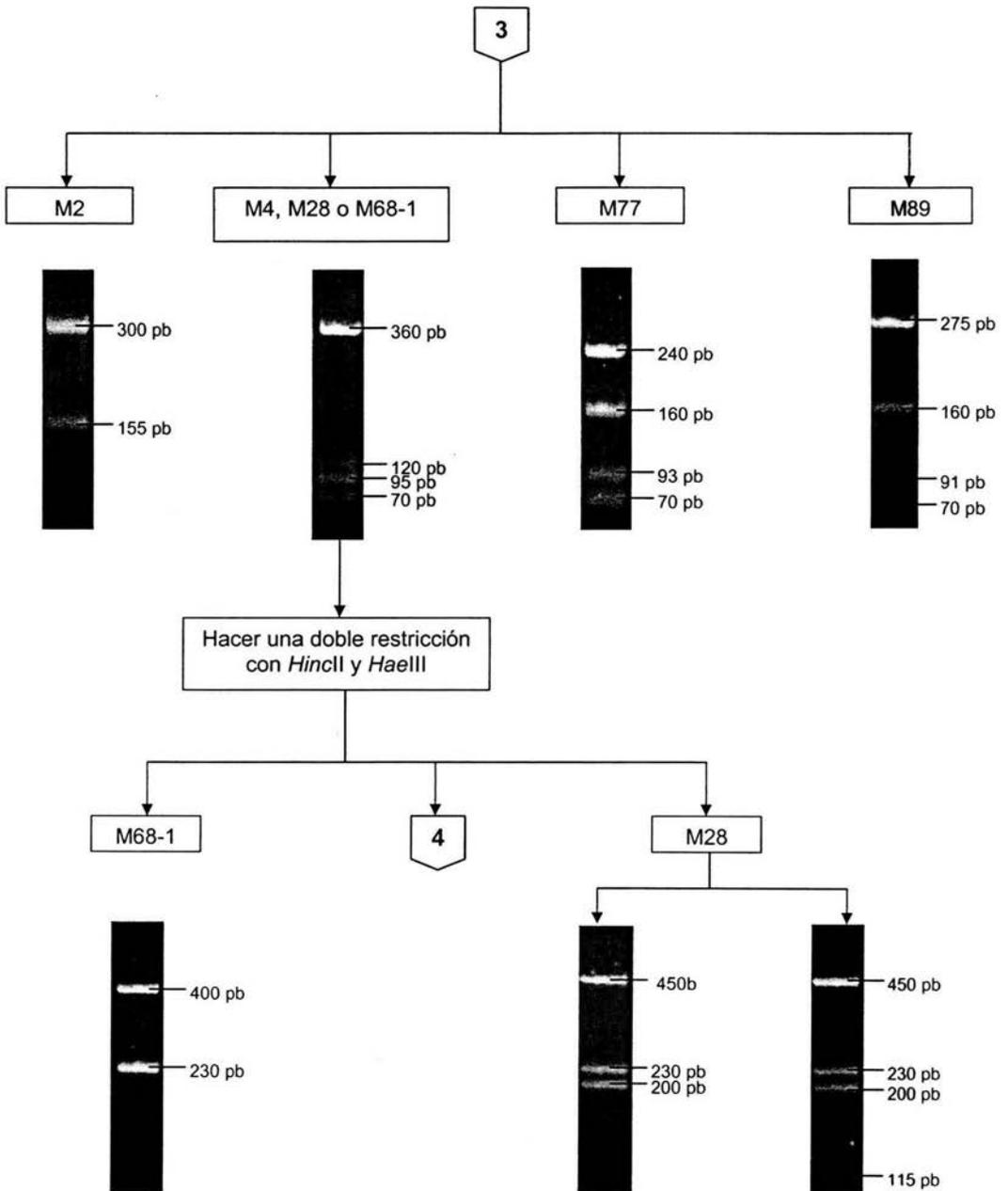
### 5.6. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA TIPIFICACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS DE *Streptococcus pyogenes*.

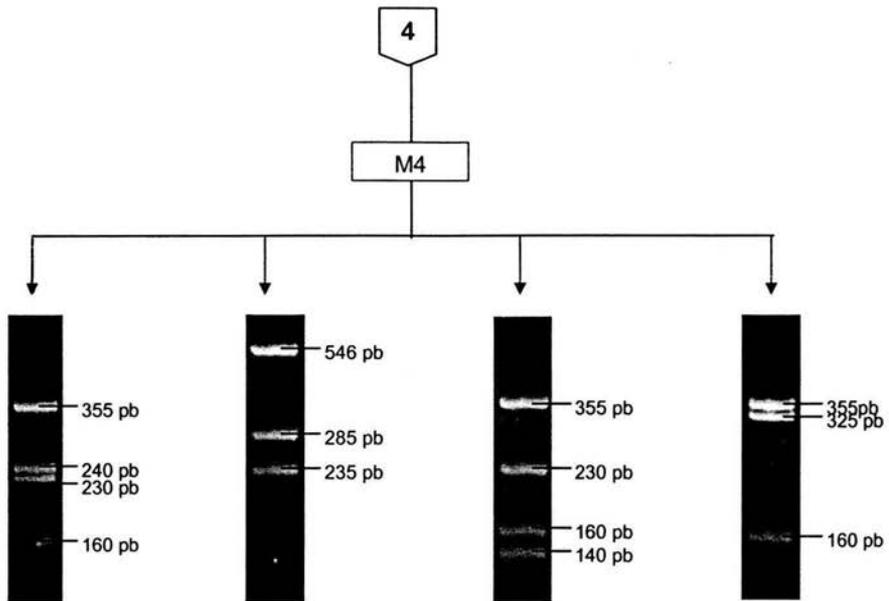
Con el objetivo de facilitar futuras tipificaciones de *Streptococcus* del grupo A, se presenta el siguiente diagrama de flujo que resume la secuencia de acciones necesarias para la identificación de los serotipos M encontrados en este estudio.











## 5.7. RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN.

### 5.7.1. Frecuencia de serotipos M.

El número total de cepas de *Streptococcus* recibidas de los diferentes Hospitales de la Ciudad de México fue de 313. De ellos se lograron tipificar a 254 cepas (81.15% del total) distribuidas en 16 alelos del gen *emm* y 2 alelos denominados *stg* (Tabla 6).

El 18.8 % del total de cepas no fueron tipificadas (59 aislamientos) debido a que aproximadamente la mitad no pertenecen a los *Streptococcus* de grupo A, y con el resto tuvimos algunos problemas entre los que se encuentran:

1. Falta de amplificación.
2. Producto de PCR insuficiente para el análisis de restricción.

### 3. Amplificación inespecífica mediante PCR.

De las 254 cepas tipificadas, 210 (82.67%) fueron aisladas de exudados faríngeos y 44 (17.33%) provienen de aislamientos no faríngeos.

Las entidades clínicas de donde provienen los aislamientos de GAS y el número de cepas tipificadas de cada uno de estos hospitales se muestran en la tabla 5. En ella, se incluyó un rubro denominado varios para agrupar a diferentes fuentes que colaboraron con este estudio proporcionando una o dos cepas de *Streptococcus pyogenes*.

En la tabla 6 se muestra la distribución de los alelos del gen *emm* que se encontraron en las muestras estudiadas, el número de cepas perteneciente a cada uno de los serotipos encontrados y el porcentaje que este número representa con respecto a las 254 cepas tipificadas, además del serotipo M de la proteína para la cual codifica cada uno de estos alelos. Los resultados se muestran en orden descendente de acuerdo al número de cepas de cada alelo encontrado.

Como se puede observar en la tabla 6, los serotipos M predominantes en la muestra de estudio son M12 (19.69%), M1 (18.50%), M75 (13.78%), representando por sí solos el 51.97 % del total de las cepas tipificadas.

Si agregamos a este grupo los siguientes 5 serotipos más comunes encontrados en nuestro estudio [M6 (8.66%), M4 (7.09%), M3 y M28 (representando 5.51% del total cada uno) y M2 (5.12%)], podemos observar que sólo estos 8 tipos M constituyen el 83.86% (213 aislamientos) del total cepas tipificadas.

Hospital	No. de Aislamientos
ISSSTE- Gonzalo Castañeda (HGC)	84
Instituto Nacional de Pediatría (INP)	46
Hospital Médica Sur (Privado) (HMS)	36
ISSSTE- López Mateos (HLM)	18
IMSS- Gabriel Mancera (HGM)	15
Instituto Nacional de Cardiología (INC)	13
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)	9
IMSS-Centro Médico SXXI (CMN)	8
Varios.	25
Total de Cepas Tipificadas	254

**Tabla 5.** Número de cepas de *Streptococcus pyogenes* tipificadas y las entidades clínicas de donde fueron colectadas.

Tipo <i>emm</i>	Serotipo M	No. de Cepas	Porcentaje
<i>emm12</i>	M12	50	19.69
<i>emm1</i>	M1	47	18.50
<i>emm75</i>	M75	35	13.78
<i>emm6</i>	M6	22	8.66
<i>emm4</i>	M4	18	7.09
<i>emm3</i>	M3	14	5.51
<i>emm28</i>	M28	14	5.51
<i>emm2</i>	M2	13	5.12
<i>emm22</i>	M22	11	4.33
<i>emm89</i>	M89	9	3.54
<i>emm11</i>	M11	5	1.97
<i>emm77</i>	M77	5	1.97
<i>emm49-1</i>	M49-1	3	1.18
<i>emm59</i>	M59	3	1.18
<i>stg6</i>	Stg 6	2	0.79
<i>emm41-2</i>	M41-2	1	0.39
<i>emm68-1</i>	M68-1	1	0.39
<i>stg485</i>	Stg 485	1	0.39

**Tabla 6.** Distribución de los alelos del gen *emm* respecto al número total de cepas de *Streptococcus pyogenes* tipificadas.

La predominancia de estos serotipos, en especial M1 y M12, parece no estar restringido a una zona geográfica en particular, por lo que en la mayoría de los estudios epidemiológicos estos dos serotipos son los más comúnmente encontrados partiendo tanto de aislamientos faríngeos como no faríngeos. Esta tendencia se ha observado en diversos lugares, por ejemplo España (**Alberti S.** 2003), Hong Kong (**Ho P.L.** 2003), Estados Unidos (**Hu M.** 2002), Finlandia (**Seppälä H.** 1994), Italia (**Mencarelli M.** 1998) y México (**Espinosa L.E.** 2003), lo cual habla de la capacidad de virulencia que poseen estos serotipos. Con respecto a los serotipos M75, M6, M4, M3, M28 y M2 también se han aislado frecuentemente, pero en ningún caso en proporciones mayores a las que presenta M12 y M1.

En la tabla 6 destacan 3 cepas tipificadas mediante secuenciación como pertenecientes a los grupos Stg6 y Stg485. Es necesario aclarar que aún cuando la secuenciación nos dice que se trata de un *Streptococo* del Grupo G, las pruebas de aglutinación realizadas indican que los aislamientos corresponden a *Streptococos* del grupo A en todos los casos.

### **5.7.2. Resultados considerando el origen clínico de la muestra.**

Para facilitar el análisis de resultados, las muestras se clasificaron, según el su origen clínico, en dos grandes rubros: aislamientos faríngeos y no faríngeos. Dentro de los aislamientos no faríngeos se incluyen *Streptococos* del Grupo A aislados a partir de hemocultivos, abscesos, líquido pleural, biopsias, lavado bronquial, úlceras, líquido de cavidad abdominal, entre algunas otras. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

Serotipo M	Aislamientos Faríngeos(%)	Aislamientos No Faríngeos (%)
M12	48 (22.80%)	2 (4.54%)
M1	35 (16.66%)	12 (27.27%)
M75	32 (15.23%)	3 (6.81%)
M6	18 (8.57%)	4 (9.09%)
M4	16 (7.61%)	2 (4.54%)
M3	13 (6.19%)	1 (2.27%)
M28	14 (6.66%)	
M2	9 (4.28%)	4 (9.09%)
M22	10 (4.76%)	1 (2.27%)
M89	6 (2.85%)	3 (6.81%)
M11	1 (0.47%)	4 (9.09%)
M77	4 (1.90%)	1 (2.27%)
M49-1		3 (6.81%)
M59		3 (6.81%)
Stg 6	1 (0.47%)	1 (2.27%)
M41-2	1 (0.47%)	
M68-1	1 (0.47%)	
Stg 485	1 (0.47%)	
<b>Total</b>	<b>210 (100%)</b>	<b>44(100%)</b>

**Tabla 7.** Distribución de Serotipos M de *Streptococcus pyogenes* en relación a su origen clínico.

Podemos observar en la tabla 7 que la frecuencia con que se aislaron cada uno de los serotipos M en las cepas obtenidas a partir de un exudado faríngeo es muy similar a la observada cuando se analizan los resultados sin tomar en cuenta el origen clínico de las muestras, lo cual es lógico al considerar que los aislamientos faríngeos constituyen más del 80% del total de cepas analizadas.

Se observó también que en los aislamientos faríngeos no aparecen los serotipos M49-1 y M59, y que la frecuencia de las cepas M11 disminuye. El número de *Streptococcus pyogenes* M1 también disminuye en los aislamientos faríngeos, pero continua siendo el segundo serotipo M más frecuente del total de las cepas.

En cuanto a las cepas obtenidas de aislamientos no faríngeos la distribución de tipos M es muy diferente a la observada al considerar el número total de cepas. Destaca el hecho que dentro de este subgrupo no se encontraron los serotipos M28, M41-2, M68-1 y Stg485, mientras que los serotipos M49-1 y M59 sólo pueden encontrarse en muestras provenientes de sitios no faríngeos. También dentro de este grupo se encuentra el 80% de las cepas tipificadas como M11.

El serotipo M1 de *Streptococcus pyogenes* constituye cerca del 30% de las cepas tipificadas a partir de aislamientos no faríngeos (tabla 7), lo cual demuestra la capacidad de virulencia de este serotipo. La capacidad de M1 de colonizar otros tejidos además de la faringe se encuentra ampliamente documentada en la bibliografía (Perea-Mejia 1997; Mencarelli M. 1998; Brand E. 2000; Cunningham M. 2000; Hu M. 2002; Perea-Mejia 2002; Alberti S. 2003; Espinosa L.E. 2003; Ho P.L. 2003).

La mayoría de los serotipos obtenidos a partir de aislamientos no faríngeos ya han sido reportados como serotipos invasivos particularmente M1 y M3 (Cunningham

M. 2000; Espinosa L.E. 2003; Eyal O. 2003), sin embargo en nuestro estudio sólo encontramos una cepa M3 proveniente de un aislamiento no faríngeo.

### **5.7.3. Resultados con relación a las entidades clínicas de donde provienen los aislamientos de *Streptococcus pyogenes*.**

La tabla 8 resume la información obtenida al agrupar las cepas de *Streptococcus* tipificadas con base a la entidad clínica en donde fueron colectadas.

A partir de esta clasificación, observamos que los serotipos M1 y M75 son los más homogéneamente distribuidos, encontrándose al menos una cepa de cada uno en los diferentes hospitales que participaron en este estudio.

El serotipo M6 se encontró en 8 de las 9 entidades clínicas de donde se aislaron los estreptococos, el M12 y M4 se encontraron en 7 de las 9 instituciones de salud, el M3 en 6, M22, M28 y M89 en 5, etc.

Podemos observar que la distribución de serotipos que pueden encontrarse dentro de un mismo hospital fue más amplia en tres entidades clínicas: el Instituto Nacional de Pediatría, el Hospital Gonzalo Castañeda y el Hospital Médica Sur. Estos tres hospitales, particularmente el Hospital Gonzalo Castañeda, proporcionaron el mayor número de aislamientos para el estudio (tabla 5), lo cual podría explicar la variedad de serotipos encontrados en ellos, pues conforme se incrementa el número de cepas analizadas aumenta la probabilidad de encontrar una mayor variedad de las mismas.

Dentro de las cepas provenientes del Instituto Nacional de Pediatría encontramos 14 de los 18 serotipos reportados en este trabajo. Esto podría explicarse considerando las características de este Instituto, pues se trata de una institución

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Serotipo M	HCG	INP	HMS	HLM	HGM	INC	INER	CMNHE	Varios	Total
M1	7	12	8	5	1	4	4	1	5	47
M2	1	8	4							13
M3	2	1	3	1		5			2	14
M4	1	3	3	2	3			2	4	18
M6	7	2	3	1	1	1	2		5	22
M11		3	1						1	5
M12	32	3	6	5	1		1		2	50
M22	5	1	2					1	2	11
M28	9	1	1					1	2	14
M41-2			1							1
M49-1		1				2				3
M59		3								3
M68-1			1							1
M75	13	4	2	3	9	1	1	1	1	35
M77	2	1		1			1			5
M89	3	3	1					1	1	9
Stg485	1									1
Stg6	1							1		2
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>46</b>	<b>36</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>25</b>	<b>254</b>

Tabla 8. Distribución de Serotipos M en las entidades clínicas en donde fueron aisladas.

que presta servicio a una población que proviene de distintas partes de la República Mexicana y por otra parte, el INP atiende solamente a niños.

Debemos recordar que la proteína M es altamente inmunogénica y que una vez que un individuo se infecta por *Streptococcus pyogenes* genera anticuerpos contra el serotipo M del microorganismo causante de la infección, además, se genera memoria inmunológica por lo que es difícil que esa persona se infecte nuevamente con una cepa del mismo serotipo. Dado que todos los pacientes son niños, es probable que sea la primera vez que se enfrentan a una infección por Estreptococos y que sean susceptibles de enfermar ante el ataque de una gran diversidad de serotipos M.

En el Instituto Nacional de Cardiología, sólo encontramos 5 serotipos M del total de 18 que se enlistan en las tablas anteriores. Dada la naturaleza del hospital es congruente que las cepas aisladas en esta institución fueron tipificadas como serotipos con una alta capacidad invasiva, a saber, M1, M3, M6 y M49-1, los cuales se encontraron en cepas aisladas principalmente de hemocultivos.

### **5.7.4. Cambios en la distribución de Serotipos M en la población de la Ciudad de México y el desarrollo de vacunas contra *Streptococcus pyogenes*.**

En la actualidad se han hecho varios intentos por producir una vacuna que pueda prevenir la infección por Estreptococos del grupo A (Brand E. 2000; Hu M. 2002). El intento más reciente de producir una vacuna contra Estreptococos del grupo A se logró gracias a la tecnología recombinante, construyendo una vacuna constituida por cuatro proteínas de fusión que contienen 26 antígenos de diferentes proteínas M. La selección de los serotipos incluidos en esta vacuna fue

en base a estudios epidemiológicos que mostraron cuales son los serotipos M más frecuentes en Estados Unidos (Hu M. 2002).

Considerando que la frecuencia de los diferentes serotipos M cambia según la región geográfica es importante conocer si una vacuna como esa resultaría útil para la población mexicana.

Analizando los 26 determinantes antigénicos que están contenidos en esta vacuna multivalente (Hu M. 2002), encontramos que están incluidos 12 de los 18 serotipos M encontrados en este estudio: M1, M2, M3, M6, M11, M12, M22, M28, M59, M75, M77 y M89, lo cual constituye el 89% del total de cepas tipificadas.

Podemos resaltar que M4 no está incluido dentro de la vacuna multivalente (Hu M. 2002) aún cuando es el quinto serotipo más frecuente en nuestra muestra de estudio. No se incluyó este serotipo en la vacuna debido a que la proteína recombinante purificada tipo M4 no provoca la producción de anticuerpos que faciliten la opsonización de la bacteria (Hu M. 2002), sin embargo, se ha demostrado que la vacuna multivalente produce algunos anticuerpos que tienen reacción cruzada con algunas cepas de M4 provocando la destrucción de la bacteria.

De acuerdo a nuestros resultados una vacuna de esta naturaleza sería de gran utilidad en la prevención del 89.7% de enfermedades causadas por *Streptococcus pyogenes* en la Ciudad de México, porcentaje que se incrementa al 96.8% si la vacuna fuera efectiva contra todas las cepas M4 encontradas en nuestro estudio. Es posible también que la vacuna presente reacciones cruzadas con algún otro serotipo M no incluido en su formulación, lo cual podría incrementar la efectividad de la vacuna en la prevención de infecciones estreptocócicas, pero no en una

proporción demasiado importante como para tratar de evaluar esta posibilidad con todos los serotipos M conocidos.

El resultado, sin considerar a las cepas M4, no es significativamente diferente al resultado publicado Espinosa, *et al* (Espinosa L.E. 2003), quien realizó un estudio similar a este en cepas de *Streptococcus pyogenes* provenientes de la Ciudad de México y de Durango, aisladas desde 1991 hasta el año 2000. En ese estudio se afirma que esta vacuna podría tener efecto protector para prevenir el 86% de los casos analizados.

Aún cuando la vacuna multivalente tendría excelentes resultados en la población de la Ciudad de México, si se quiere lograr la máxima cobertura de una vacuna multivalente, esta debe estar formulada con base en los serotipos M predominantes para cada región en particular, además, la determinación de los tipos M más frecuentes en una determinada población debe ser periódica, en vista de los cambios que se han reportado en la prevalencia de los serotipos M a lo largo del tiempo en una misma población (Kaplan E.L. 2001).

El presente trabajo continúa la vigilancia epidemiológica de la distribución de serotipos M en la Ciudad de México en los años 2001-2003, y podemos afirmar que no hay grandes cambios en cuanto a la prevalencia de serotipos M a lo largo de estos años.

Cabe señalar que los resultados que se muestran no necesariamente pueden extrapolarse a la población de todo el país, por lo que sería necesario continuar con los estudios epidemiológicos en otras regiones de la república y que en caso de que se lograra la introducción de una vacuna multivalente como medida profiláctica para evitar o reducir infecciones por *Streptococcus pyogenes*, se debe

sobre la distribución de tipos M, pues al usar como blancos inmunológicos a los serotipos más frecuentes es posible que se incremente el número de aislamientos de serotipos M ahora considerados como raros o poco frecuentes.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

---

## 6.-CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, podemos concluir los siguientes puntos:

- ◆ El tamaño molecular del producto de PCR del gen *emm* y el genotipo *sof* de las cepas de *Streptococcus pyogenes* varían según el serotipo M al que pertenecen, por lo que la determinación de estas dos variables facilita la tipificación de cepas de Estreptococos del grupo A.
- ◆ La restricción del producto de PCR con la enzima *Ddel* nos permite la identificación de la mayoría de los serotipos encontrados en este estudio, a excepción de los serotipos M4, M28 y M68-1, donde es necesario realizar una doble digestión con las enzimas *HincII* y *HaeIII* para lograr discriminar un serotipo de otro.
- ◆ A partir de 313 aislamientos de Estreptococos logramos la identificación de 254 cepas, distribuidas en 18 diferentes serotipos: 16 pertenecientes a alelos del gen *emm* y 2 alelos clasificados como *stg*.
- ◆ Los serotipos predominantes fueron el M12, M1 y M75, seguidos de los serotipos M6, M4, M3, M28, M2 y M22. Estos serotipos también han sido identificados como de alta prevalencia en estudios epidemiológicos alrededor del mundo.
- ◆ El serotipo M1 es considerado una de las cepas más virulentas en diversos estudios epidemiológicos, esto quedó de manifiesto al encontrar con alta frecuencia a este serotipo asociado tanto a cuadros faríngeos, como a cuadros invasivos, y por el hecho de que se lograron aislamientos de este

serotipo de todas y cada una de las entidades clínicas participantes en el estudio.

- ◆ La más amplia variedad de serotipos M se encontró en dos entidades de salud: el Hospital Gonzalo Castañeda y el Instituto Nacional de Pediatría.
- ◆ La vacuna recombinante que involucra 26 determinantes antigénicos diseñada para prevenir infecciones causadas por *Streptococcus pyogenes* sería efectiva para prevenir alrededor del 95% de los casos a partir de los que se aislaron las muestras utilizadas en este estudio.
- ◆ Resulta muy importante mantener una vigilancia epidemiológica de los serotipos M más frecuentemente encontrados en la población mexicana dado que se han reportado cambios en la prevalencia de los serotipos M a lo largo del tiempo en una misma población. Esta vigilancia resultaría más necesaria en caso de introducir una vacuna como la descrita anteriormente, pues al usar como blancos inmunológicos a los serotipos más frecuentes es posible que se incremente el número de aislamientos de serotipos M ahora considerados como raros o poco frecuentes.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Akesson P, Sjöholm A.G., Björck L.** (1996.). "Protein SIC, a Novel Extracellular Protein of *Streptococcus pyogenes* Interfering with Complement Function." J Biol Chem. **271**(2): 1081-8.
- Alberti S., García-Rey C., Domínguez M.A., Aguilar L., Cercenado E., Gobernado M., García-Perea A. and Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens.** (2003). "Survey of *emm* Gene Sequences from Pharyngeal *Streptococcus pyogenes* Isolates Collected in Spain and Their Relationship with Erythromycin Susceptibility." J. Clin. Microbiol. **41**(6): 2385-2390.
- Beall B., Facklam R. and Thompson T.** (1996). "Sequencing *emm*-specific PCR Products for Routine and Accurate Typing of Group A Streptococci." J. Clin. Microbiol. **34**: 953-958.
- Bisno A.L., Brito M. O. Colins C. M.** (2003). "Molecular Basis of Group A Streptococcal Virulence." Lancet Infect. Dis. **3**(4): 191-200.
- Brand, E. R., Sriprakash K.S., Hobb R.I., Hayman W.A., Zeng W., Batzloff M.R., Jackson D.C. and Good M.F.** (2000). "New Multi-determinant

---

Strategy for a Group A Streptococcal Vaccine Designed for the Australian Aboriginal Population." Nat. Med. **6**: 645-459.

**Cleary P., Kaplan E. L., Livdahl C.** (1998). "DNA Fingerprints of *Streptococcus pyogenes* are M Type Specific." J. Infect. Dis. **158**: 1317-1323.

**Cunningham M. W.** (2000). "Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections." Clin. Microbiol. Rev. **13**: 470-511.

**Espinosa L.E., Li Z., Gomez Barreto D., Calderon Jaimes E., Rodríguez R.S., Sakota V., Facklam R.R. and Beall B.** (2003). "M Protein Gene Type Distribution among Group A Streptococcal Clinical Isolates Recovered in Mexico City, Mexico, from 1991 to 2000, and Durango, Mexico, from 1998 to 1999: Overlap with Type Distribution within the United States." J. Clin. Microbiol. **41**(1): 373-378.

**Eyal O., Jadoun J., Bitler A., Skutelski E., Sela S.** (2003). "Role of M3 Protein in the Adherence and Internalization of an Invasive *Streptococcus pyogenes* Strain by Epithelial Cells." Inmunol. Med. Microbiol. **38**(3): 205-213.

**Facklam R., Beall B., Efstratiou A., Fischetti V., Johnson D., Kaplan E., Kriz P., Lovgren M., Martin D., Schwartz B., Totolian A., Bessen D., Holligshhead S., Rubin F., Scott J., and Tyrrell G.** (1999). "*emm* Typing

---

and Validation of Provisional M Types for Group A Streptococci." Emerg. Infect. Dis. **5**(2): 247-253.

**Facklam R., Martin D.R., Lovgren, M., Johnson, D.R., Esfration, A., Thompson, T.A., Gowan, S., Kriz, P., Tyrrel, G.J., Kaplan, E., Beall, B.** (2002). "Extension of the Lancefield Classification for Group Streptococci by Addition of 22 New M Protein Gene Sequence Types from Clinical Isolates: *emm* 103 to *emm* 124." Clin Infect Dis. **34**(1): 28-38.

**Fischetti V. A.** (1991). "Streptococcal M Protein." Sci. Am. **264**: 58-65.

**Fischetti V. A.** (2000). Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria. Gram-Positive Pathogens. ASM. Washington, D.C., Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., Rood, J.I.: 11-24.

**Frick I.M., Akesson P., Rasmussen M, Schmidtchen A, Bjorck L.** (2003). "SIC, a Secreted Protein of *Streptococcus pyogenes* that Inactivates Antibacterial Peptides." J Biol Chem. **278**(19): 16561-6.

**Gardiner D., Hartas J., Curie B., Mathews J.D., Kemp D.J. and Sriprakash K.S.** (1995). "Vir Typing: A Long-PCR Typing Method for Group A Streptococci." PCR Methods and Applications. **4**: 188-293.

**Garza Velasco R.** (1996). *Estreptococos. Manual de Prácticas, Bacteriología.*

Mexico D.F., Facultad de Química, UNAM: 23-40.

**Ho P.L., Johnson D. R., Yue A.W. Tsang D.N., Que T.L. Beall B., Kaplan E.L.**

(2003). "Epidemiologic Analysis of Invasive and Noninvasive Group A Streptococcal Isolates in Hong Kong." *J. Clin Microbiol.* **41**(3): 973-942.

**Hu, M. C., Walls M.A., Stroop S.D., Reddish M.A., Beall B., and Dale J.B.**

(2002). "Immunogenicity of a 26-Valent Group A Streptococcal Vaccine." *Infect. Immun.* **70**: 2171-2177.

**Johnson D.R. and Kaplan E. L.** (1993). "A Review of the Correlation of T-

Agglutination Patterns and M-Protein Typing and Opacity Factor Production in the Identification of Group A Streptococci." *J. Mol. Microbiol.* **38**: 311-315.

**Kaplan E.L., Wotton J. T., Johnson D.R.** (2001). "Dynamic Epidemiology of

Group A Streptococcal Serotypes associated with Pharyngitis." *The Lancet.* **358**: 1334-1337.

**Kaufhold A., Pobielski A., Baumgarten G., Blokpoel M., Top J. and Schouls**

L. (1994). "Rapid Typing of Group A Streptococci by the use of DNA Amplification and Non-Radioactive Allele-Specific Oligonucleotide Probes." *Microbiol. Letters.* **119**: 19-26.

---

**Martin D.R., Gowan S.** (2000). Serologic Determination of the M-Type-Should We Continue? The Dilemma of a Reference Laboratory. Streptococci and Streptococcal Diseases-Entering the New Millenium.Proceedings XIV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases., D.R. Martin, J.R. Tagg.: 809-814.

**Mencarelli M., C. R., Marzocchi B., Gistri A., Signori R., Rossolini A. and Cellesi C.** (1998). "M Genotyping and DNA Fingerprinting of *Streptococcus pyogenes* Isolates from an Area of Central Italy." Epidemiol. Infect. **128**: 77-84.

**Perea Mejía, L. M.** (2003). *Streptococcus.* Microbiología y Parasitología Médicas, Tercera Edición. M. Editores. México, Tay, J., Gutiérrez, M., Molina, J., López, R., Manjarrez, M.E.: 75-85.

**Perea-Mejía L.M., I.-M. A. E., Cravioto A.** (2002). "Molecular Characterization of Group A *Streptococcus* Strains Isolated During a Scarlet Fever Outbreak." J. Clin. Microbiol. **40**(1): 278-280.

**Perea-Mejía L.M., S. 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." J. Clin. Microbiol. **35**: 3220-3224.

**Pérez Romano, L. F.** (2003). Prevalencia de Genes Asociados a la Virulencia en Cepas de *Streptococcus pyogenes* de Origen Clínico. Tesis. México D.F., Facultad de Química, UNAM: 70.

**Rehder C.D., J. D. R. a. K. E. L.** (1995). "Comparison of Methods for Obtaining Serum Opacity Factor from Group A Streptococci." J. Clin. Microbiol. **33**(11): 2963-2967.

**Ruoff L., W. R. A., Beighton D.** (1999). *Streptococcus. Manual of Clinical Microbiology, Séptima Edición*. ASM. Washington, D.C., Murray R.P., Baron E.J., Pfaller M.A. Tenover F.C., Tenover R.H.: 283-296.

**Seppälä H., H. Q., Ósterblad M., Huovinen P.** (1994). "Typing of Group A Streptococci by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis." J. Clin. Microbiol. **32**(8): 1945-1948.

**Seppälä H., V.-V. J., Osterblad M., Jahkola M., Rummukainen M., Holm S.E. and Houvinen P.** (1994). "Evaluation of Methods for Epidemiologic Typing of Group A Streptococci." J. Infect. Dis. **169**: 519-525.

**Stollerman, G. H.** (1997). " Rheumatic Fever." Lancet Infect. Dis. **349**: 935-942.

Whatmore, A. M., Vivek, K., Musser, J.M., Kehoe, M.A. (1995). "Molecular Population Genetic Analysis of the *enn* Subdivision of Group A Streptococcal *emm*-like Genes: Horizontal Gene Transfer and Restricted Variation Among *enn* Genes." Mol. Microbiol. **15**(6): 1039-1048.

Whatmore, A. M. a. K., A. M. (1994)." Horizontal Gene Transfer in the Evolution of Group A Streptococcal *emm*-like Genes: Gene Mosaics and Variation in *Vir* Regulons." Mol. Microbiol. **11**(2): 363-374.