



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

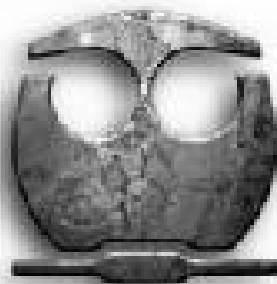
**Presencia y distribución de la secuencia de
inserción IS1562 en aislamientos clínicos y de
referencia de *Streptococcus pyogenes*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

NOÉ RAMÍREZ ALEJO



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente PROFR. RAÚL GARZA VELASCO

Vocal PROFRA. MARÍA DEL PILAR GRANADA MACÍAS

Secretario PROFR. LUIS MANUEL PEREA MEJÍA

1er. Suplente PROFRA. NORMA TREJO MEDINA

2do. Suplente PROFRA. ROSALBA ESQUIVEL COTE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Epidemiología Molecular, Tercer Piso, Torre de Investigación,
Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. Con el
financiamiento de la DGAPA-UNAM, Proyectos: IN 218103 ; IN215608-3.

M. en C Luis Manuel Perea Mejía
Asesor

M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel
Supervisor Técnico

Noé Ramírez Alejo
Sustentante

*Para mi padre y mi hermano, cuyos recuerdos
me acompañan en mi mente y en mi corazón,
en cada logro obtenido y en cada paso que doy.*

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo incondicional de mis maestros y amigos, la Dra. Alma Edna Inzunza Montiel y el Dr. Luis Manuel Perea Mejía; cuyos consejos y enseñanzas me permitieron no sólo crecer como estudiante, sino como ser humano. Siempre me estimularon a dar lo mejor de mí. En ellos encontré personas con entera disposición de transmitir sus experiencias tanto académicas como personales, todas ellas me enriquecieron de una manera invaluable y me hicieron ver la vida de otra manera. Gracias por todas aquellas ocasiones en que me brindaron su confianza y su afecto.

Gracias:

A mi madre, a mi tía María y a mi abuelo por todo su apoyo, su confianza y su amor. Nunca hubiera llegado hasta este punto sin ustedes y quiero que también sientan este logro suyo, porque lo es.

A mis tías, Concepción e Isabel, por apoyarme y seguirme apoyando, así como por su confianza y cariño.

A mis amigos Pilar y Manolo, por enseñarme que la amistad es un sentimiento tan fuerte que puede vencer al tiempo y la distancia, y mantenerse tan intacto y limpio como cuando surgió.

A mi amigo Pancho, quien es el mejor amigo que pude encontrar en esta etapa de mi vida, cuantas anécdotas pasamos, cuantas desveladas, cuantos logros. Gracias mi hermano, espero que siempre me honres con tu amistad y cariño.

A la señora Irma Muñoz, por haberme abierto las puertas de su hogar, por haberme dado su confianza y por habernos aguantado tanto durante estos 5 años.

A Eloisa, mi novia. Que te puedo decir mi amor, eres la parte más importante de este trabajo. Todo lo que pasamos durante este tiempo; todo el esfuerzo y trabajo mancomunados que hay a lo largo de estos 5 años. Gracias por todo tu apoyo, gracias por darme tu mano cuando me he caído, gracias por sostenerme en pie cuando tropiezo. Simplemente gracias por creer en mí. Espero que me permitas seguir caminando a tu lado.

Al Dr. Javier Díaz por todos sus consejos y por haberme brindado su amistad.

A mis maestras y maestros por haberme formado; y algunos de ellos por honrarme con su amistad.

A mis compañeros de la carrera por todos los momentos buenos y malos que compartimos durante este tiempo.

A la Dra. Laura Ongay y Guadalupe Codiz del Instituto de Fisiología Celular por colaborar con las secuencias presentadas en este trabajo.

*“¿Quién suscita el odio más enconado de los llamados
buenos y justos? Aquel que rompe las tablas de sus
valores, el despreciador, el corruptor- esto es-
el hombre creador.”*

F. Nietzsche

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
I. GENERALIDADES.....	6
1. Aspectos generales de los <i>Streptococcus</i>	6
1.1 Morfología e identificación.....	7
Morfología microscópica.....	7
Cultivo.....	8
1.2. Relación entre especie, grupo de Lancefield y tipo de hemólisis.....	9
Clasificación de Brown.....	9
Clasificación de Lancefield.....	10
Pruebas bioquímicas.....	11
2. <i>Streptococcus pyogenes</i> (EGA).....	13
2.1. Estructura.....	14
2.2. Factores de virulencia.....	14
3. Enfermedades clínicas por EGA.....	18
3.1. Enfermedades estreptocócicas supurativas.....	18
3.2. Enfermedades estreptocócicas no supurativas.....	22
4. Genética del Estreptococo del Grupo A.....	24

4.1. Regulón Mga.....	24
4.2. Transposones.....	25
Mecanismos de transposición.....	28
Secuencia de inserción 1562 (IS1562).....	29
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
1. Material biológico.....	32
2. Identificación de <i>Streptococcus pyogenes</i>	33
3. Identificación del elemento móvil IS1562.....	34
3.1. Extracción de ADN.....	34
3.2. Evaluación del ADN.....	34
3.3. Amplificación del elemento IS1562.....	34
3.4. Amplificación de la región Mga.....	36
3.5. Amplificación del elemento IS1562 dentro de la región Mga.....	38
3.6. PCR utilizando primers combinados (M-IS e IS-C5).....	38
4. Secuenciación del elemento IS1562 en las cepas clínicas y de referencia.....	39
4.1. Purificación de los productos de la PCR del elemento IS1562, región Mga, M-IS e IS-C5	40
4.2. Secuenciación de los productos de la PCR del elemento IS1562, región Mga, M-IS e IS-C5	41
4.3. Análisis de las secuencias.....	42
Secuencia de Inserción IS1562.....	42

Región Mga.....	42
Productos de las reacciones utilizando primers combinados (M-IS e IS-C5).....	43
5. Resultados y discusión.....	44
5.1. Distribución del elemento móvil IS1562.....	44
5.2 Amplificación de la región Mga.....	48
5.3 Amplificación del elemento IS1562 dentro de la región Mga.....	51
5.4 PCR utilizando primers combinados (M-IS e IS-C5).....	53
6. Análisis del elemento IS1562 en las cepas clínicas y de referencia.....	54
6.1 Secuencias de los amplificados de IS1562.....	54
6.2 Secuencias de la región Mga.....	57
6.3 Secuencias de los PCR combinados.....	59
6.4 Importancia de la determinación alélica y ubicación del elemento IS1562.....	61
Conclusiones.....	63
Bibliografía.....	65

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
AE	Buffer de Elución
AW1	Buffer de lavado 1
AW2	Buffer de lavado 2
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CAMP	Christine, Atkins, Muench-Peterson
CO ₂	Dióxido de Carbono
Da	Daltones
EGA	Estreptococo del Grupo A
GNA	Glomerulonefritis aguda
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
INF γ	Interferón γ
IS	Secuencia de Inserción
IS1562	Secuencia de Inserción 1562
kb	Kilobases
MAC	Complejo de Ataque a la Membrana

mg	Miligramos
Mga	Regulador de múltiples genes de GAS
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro
O ₂	Oxígeno
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PTSA _s	Toxinas pirogénicas y superantígenos
PYR	L-pirro-lidonil-B-naftilamida
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SCTE	Síndrome del choque tóxico estreptocócico
SIC	Proteína estreptocócica inhibitoria de la lisis mediada por el complemento
SPE _s	Exotoxinas Pirogénicas Estreptocócicas
SPE A	Exotoxina Pirogénica Estreptocócica A
SPE B	Exotoxina Pirogénica Estreptocócica B
SPE C	Exotoxina Pirogénica Estreptocócica C
SPE F	Exotoxina Pirogénica Estreptocócica F
SSA	Superantígeno Estreptocócico
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
TNF- β	Factor de Necrosis Tumoral β

U	Unidades
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pyogenes (EGA) ha tenido una historia de variación en los patrones de enfermedad. Entre los siglos XVIII y XIX fue la principal causa de muertes maternas, debido a que causaba una enfermedad llamada fiebre puerperal. La bacteria presente en el tracto vaginal, infecta el útero antes o durante el parto, y la infección rápidamente se volvía sistémica. En esos días, y en siglos anteriores, la muerte de las madres después de dar a luz era mucho más común de lo que es hoy en día. Actualmente la fiebre puerperal es prácticamente desconocida en países desarrollados, y está volviéndose menos común en países en vías de desarrollo gracias a la implementación de medidas higiénicas.

En la Segunda Guerra Mundial, las infecciones de las heridas por *S. pyogenes* fueron las responsables de más muertes entre los soldados que los mismos traumas que causaban dichas heridas. En particular, esta bacteria causaba la eritema y destrucción del tejido, lo que se conocía como gangrena estreptocócica (fascia necrotizante). Grandes áreas de la piel eran destruidas, seguido de la entrada de la bacteria al torrente sanguíneo y la muerte del paciente por choque séptico. Entre los siglos XIX y XX, reaparecieron casos de este tipo de enfermedad estreptocócica, pero en esta ocasión en una población civil. Actualmente los casos de fascitis que permanecen son raros, gracias a la

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pyogenes (EGA) ha tenido una historia de cambios en los patrones de enfermedad. Entre los siglos XVIII y XIX fue la principal causa de muertes maternas, debido a que causaba una enfermedad llamada fiebre puerperal. La bacteria presente en el tracto vaginal, infecta el útero antes o durante el parto, y la infección rápidamente se volvía sistémica. Es esos días, y en siglos anteriores, la muerte de las madres después de dar a luz era mucho más común de lo que es hoy en día. Actualmente la fiebre puerperal es virtualmente desconocida en países desarrollados, y está volviéndose menos común en países en vías de desarrollo gracias a la implementación de medidas sanitarias.

En la Segunda Guerra Mundial, las infecciones de las heridas por *S. pyogenes* fueron las responsables de más muertes entre los soldados que los mismos traumas que causaban dichas heridas. En particular, esta bacteria causaba la invasión y destrucción del tejido, lo que se conocía como gangrena estreptococal (fascitis necrotizante). Grandes áreas de la piel eran destruidas, seguido de la entrada de la bacteria al torrente sanguíneo y la muerte del paciente por choque séptico. Entre los siglos XIX y XX, reaparecieron casos de este tipo de enfermedad estreptocócica, pero en esta ocasión en una población civil. Afortunadamente los casos de fascitis que permanecen son raros, gracias a la

implementación de medidas sanitarias adecuadas, así como el pronto y efectivo tratamiento de las heridas infectadas.

Otro tipo de infección ocasionada por *S. pyogenes* es conocida popularmente como el “envenenamiento de la sangre”, y aunque tiene síntomas menos agresivos, suele ser mortal. Nuevamente la infección comienza en una herida. La respuesta inflamatoria está caracterizada por líneas rojas que salen radialmente desde la herida, así como dolor considerable en la región afectada. Y aunque la cantidad de piel dañada es mínima; la bacteria puede entrar al torrente sanguíneo causando un choque séptico fatal.

A finales del siglo XIX, se describió otra enfermedad causada por *S. pyogenes*: la Fiebre escarlatina. En ella se presenta un *rash* rojo y difuso característico por la transmisión de la bacteria vía aérea. La Fiebre escarlatina es una enfermedad de niños y en épocas pasadas se consideraba fatal. Para tratar de controlarla, se fumigaron las casas de pacientes infectados utilizando ácido carbónico, aunque dicho “tratamiento” fue poco satisfactorio debido a que la bacteria era transmitida por las personas que vivían en la casa, y no por sábanas u otros fómites contaminados. Al paso del tiempo, la Fiebre escarlatina se volvió menos contagiosa, y por la década de los 40's fue considerada una enfermedad infantil leve.

Posteriormente, se relacionó a *S. pyogenes* con otros dos tipos de enfermedades: la Glomerulonefritis y la Fiebre reumática. Ambas enfermedades se presentan con mayor frecuencia en adultos que en niños. Algunas de la

infecciones producidas por el EGA en piel desencadenan la condición llamada Glomerulonefritis (inflamación de los riñones); y las faringitis ocasionadas por el EGA conducen a una enfermedad febril (Fiebre reumática), la cual puede progresar hasta daño de las válvulas cardiacas (enfermedad reumática del corazón). Sin embargo la glomerulonefritis se caracteriza por malestar e inflamación generalizada, la cual impide la excreción de los fluidos, esto es limitante por sí mismo para el paciente aunque no causa ningún daño a largo plazo en el riñón. En contraste, la enfermedad reumática del corazón puede causar daño permanente en las válvulas cardiacas, mismo que conduce a la muerte por fallo cardiaco, y en los casos de los pacientes que sobreviven a dichos ataques, quedan predispuestos a posteriores infecciones en las válvulas cardiacas (endocarditis). Tanto la fiebre reumática como la enfermedad reumática del corazón, han desaparecido de los países desarrollados.

A finales del siglo XX hubieron casos aislados de fiebre escarlatina y de infecciones invasivas de *S. pyogenes*. El más famoso caso de neumonía ocasionada por *S. pyogenes* fue el ocurrido a Jim Henson, el creador de la popular serie "Los Muppets". Henson desarrolló neumonía bacteriana y murió luego de algunas semanas, a pesar del intenso tratamiento médico. Actualmente el EGA es una de las principales amenazas para pacientes con heridas quirúrgicas y aquellos que utilizan catéteres; además de que continúa generando una significativa morbilidad y mortalidad a través de las múltiples enfermedades que provoca en la población general (21).

Cuando miramos hacia el siglo pasado, no resulta extraño que *S. pyogenes* aparezca como uno de los patógenos Gram positivos mejor estudiado. Desde que se publicaron los primeros resultados al respecto, la aparición de técnicas moleculares ha originado un incremento casi logarítmico en cuanto a información nueva acerca de este microorganismo. Los primeros 25 años estuvieron enfocados hacia la comprensión de la biología del *S. pyogenes*, para poder así responder algunas de las interrogantes acerca de su patogénesis; sin embargo, las técnicas moleculares han acaparado la atención de los investigadores frente a los estudios biológicos tradicionales, buscando entender la complejidad genética de esta bacteria. Ahora con la disponibilidad del genoma de la bacteria, se ha regresado a la biología de éste, haciendo preguntas más específicas respecto a su patogenicidad.(5)

Por último, en este nuevo siglo, el aspecto biológico estará apoyado por sofisticadas manipulaciones genéticas, las cuales resultarán en nuestro entendimiento acerca de la complejidad inherente en el desarrollo de las enfermedades estreptocócicas (6).

I. GENERALIDADES

1. Aspectos generales de los *Streptococcus*

El género *Streptococcus* es un grupo formado por diversos cocos Gram positivos que normalmente se disponen en cadenas o en pares y se distribuyen ampliamente en la naturaleza (39). Algunos son miembros de la flora normal y otros se asocian con enfermedades humanas importantes. Presentan también diversidad en cuanto a su resistencia a la terapia con antibióticos, desde la presentada en raras ocasiones por *Streptococcus pyogenes* hasta la multiresistencia enterocócica(6). La mayoría de las especies son anaerobios facultativos, y algunos crecen sólo en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (10 % de CO₂ que favorece el crecimiento y la hemólisis) (6). Sus requerimientos nutricionales son complejos necesitando para su aislamiento medios enriquecidos con sangre o suero. Fermentan los hidratos de carbono, produciendo ácido láctico, y a diferencia del género *Staphylococcus* (catalasa-positivos), los estreptococos son catalasa-negativos (39). Los estreptococos son importantes patógenos humanos.

La diferenciación de las especies dentro de un género es complicada debido a que se utilizan los tres esquemas siguientes para clasificar a los microorganismos:

- ❖ Propiedades serológicas: los grupos de Lancefield A – V, sin existir I, J, N, L.
- ❖ Patrones hemolíticos: hemólisis completa (β), hemólisis incompleta (α) y ausencia de hemólisis.
- ❖ Propiedades bioquímicas (fisiológicas).

El esquema de clasificación serológica lo desarrolló Rebeca Lancefield en 1933 para diferenciar las cepas β - hemolíticas, de las α - hemolíticas y las no hemolíticas. Los *Streptococcus* poseen antígenos específicos de grupo, la mayoría de los cuales son hidratos de carbono presentes en la pared celular. Estos antígenos se pueden detectar fácilmente mediante pruebas inmunológicas, y han sido útiles para la identificación rápida de algunos patógenos estreptocócicos (39).

1.1 Morfología e identificación

Morfología microscópica

Los cocos individuales son esféricos u ovoides de 0.5-1 μm y se disponen en cadenas. Se dividen en un plano perpendicular al eje largo de la cadena. Los miembros de esta cadena con frecuencia presentan un aspecto de diplococos y en ocasiones se observan formas parecidas a bacilos. La longitud de las cadenas varía y está condicionada por factores ambientales (6). Forman cadenas cortas en las muestras clínicas y cadenas largas cuando crecen en los medios de cultivo (39). Los estreptococos son Gram positivos; sin embargo, conforme un cultivo envejece y las bacterias mueren, pierden esta característica y se tornan Gram negativos; esto puede ocurrir después de incubar durante una noche (44).

Algunos estreptococos sintetizan un polisacárido capsular comparable al del neumococo. La mayor parte de las cepas de los grupos A, B y C producen cápsulas compuestas de ácido hialurónico. Las cápsulas son más notables en los cultivos jóvenes y su función es impedir la fagocitosis. La pared de la célula

estreptocócica contiene proteínas (antígenos M, R y T), carbohidratos (específicos de grupo) y peptidoglucanos. Las vellosidades que se prolongan a través de la cápsula de los estreptococos del grupo A, contienen en parte proteína M y están cubiertos de ácido lipoteicóico. Este último es importante para la adhesión de los estreptococos a las células epiteliales (6).

Cultivo

La mayor parte de los estreptococos crece en medio sólido como colonias discoideas, comúnmente de 1 a 2 mm de diámetro, translúcidas, grisáceas, convexas y de bordes regulares. Las cepas que producen material capsular con frecuencia dan lugar a colonias mucoides (6). Para su cultivo se prefiere el agar-sangre porque satisface las necesidades de crecimiento y sirve como indicador de los patrones de hemólisis anteriormente señalados (44). Un aspecto que debe tomarse en cuenta al preparar este medio es adicionar la sangre de carnero a una base que no contenga azúcares reductores, dado que la eventual fermentación de estos últimos por los microorganismos presentes en la muestra analizada, generaría la disminución del pH, restándole actividad a las estreptolisinas, e inclusive, retardando el crecimiento de los estreptococos(44). Las colonias en este medio pueden estar rodeadas por una zona en la que se han hemolizado los eritrocitos suspendidos en el agar (20). Los estreptococos son metabólicamente activos y degradan diversos carbohidratos (principal fuente de energía), proteínas y aminoácidos. Los requerimientos nutritivos varían ampliamente entre las diferentes especies. Los patógenos de humanos son más exigentes y requieren una variedad de factores de crecimiento (6).

En tanto que la mayor parte de los estreptococos hemolíticos patógenos crecen mejor a 37°C, los enterococos del grupo D crecen bien entre 15 y 45 °C. Los enterococos también crecen en concentraciones de cloruro de sodio (6.5%), en 0.1% de azul de metileno, y en medio de cultivo agar bilis-esculina (6). Variantes de la misma cepa de estreptococo pueden mostrar colonias de forma diferente. Esto es particularmente notable entre las cepas del grupo A, que dan lugar a colonias mate o brillosas. Las colonias mate consisten en microorganismos que producen mucha proteína M. Estos microorganismos tienden a ser virulentos y poco susceptibles a la fagocitosis. Las colonias brillantes tienden a producir poca proteína M y con frecuencia no son virulentas (6).

1.2 Relación entre especie, grupo de Lancefield y tipo de hemólisis

Clasificación de Brown

Las **estreptolisinas** son las responsables de la hemólisis producida, de las cuales existen dos tipos: la estreptolisina “S” que es activa en presencia de O₂, y es no inmunógena; y la estreptolisina “O”, la cual es inmunógena e inactiva en presencia de O₂ (20). Brown propuso, en 1919, que los estreptococos pueden subdividirse en tres clases dependiendo del tipo de hemólisis que producen en placas de gelosa sangre:

1. Estreptococos β-hemolíticos o Hemolíticos: cuando producen hemólisis total debido a la lisis de los eritrocitos alrededor de la colonia.

2. Estreptococos α -hemolíticos o *viridans*: cuando producen hemólisis parcial o “verde” alrededor de la colonia y que es asociada a la oxidación de la hemoglobina eritrocitaria hasta biliverdina y no hasta bilirrubina.
3. Estreptococos no hemolíticos: Cuando no producen hemólisis.

Clasificación de Lancefield

En 1933, Rebeca Lancefield diseñó la forma de clasificar a los estreptococos, en función de las características antigénicas de su carbohidrato “C” presente en la pared celular. La especificidad serológica de los carbohidratos de cada grupo se determina mediante un aminoazúcar. Para los estreptococos del grupo A, este azúcar es la ramnosa-N-acetilglucosamina; para el grupo B, el polisacárido de ramnosa-glucosamina; para el grupo C, la ramnosa-N-acetilgalactosamina; para el grupo D el ácido glicerol teicoico que contiene D-alanina y glucosa (6). Cada especie de estreptococo pertenece a un determinado grupo de Lancefield manifestando o no, algún tipo de hemólisis (Tabla 1) (20).

ESPECIE	GRUPO	HEMÓLISIS
<i>S. pyogenes</i>	A	β
<i>S. agalactiae</i>	B	β
<i>S. esquisimilis</i>	C	β
<i>Enterococcus faecalis</i>	D	N.H.
<i>S. canis</i>	G	β
<i>S. sanguis</i>	H	α
<i>S. salivarius</i>	K	α

Tabla 1. Relación entre especie, Grupo de Lancefield y Tipo de hemólisis

Pruebas bioquímicas

Para obtener una mayor confiabilidad en la identificación de las distintas especies de estreptococos, es necesario realizar pruebas no serológicas de tipo microbiológico, entre las que cabe mencionar las siguientes (7):

- Sensibilidad a 0,04U de bacitracina: Se emplea para identificar a *S. pyogenes* dado que este es incapaz de desarrollar a esas concentraciones de antibiótico. Hay que asegurarse que los discos adquiridos sean diferenciales (0,04U) y no de sensibilidad.
- Prueba de PYR: Consiste en poner en evidencia la actividad de la enzima pirrolidonil aminopeptidasa, que es producida por *Streptococcus pyogenes* pero no por otro estreptococo β -hemolítico, mediante la hidrólisis de PYR (L-pirro-lidonil-B-naftilamida) en discos comerciales (34).
- Prueba de CAMP: Sólo los estreptococos del grupo B son capaces de sintetizar un péptido difusible y termoestable, conocido como factor de CAMP, cuya principal característica biológica consiste en realzar la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, ya que en el punto en el que convergen el factor de CAMP y la β -hemolisina, se observa una hemólisis más evidente, que aparece en forma de punta de flecha. Para realizar la prueba se siembra en agar gelosa sangre de carnero una estría recta de la cepa de *S. aureus* y, previa esterilización del asa, se toma una asada del estreptococo problema, para trazar estrías rectas perpendiculares a la de *S. aureus* (a 1cm aproximado de distancia). La placa se incuba durante 24 horas, a 35°C (13).

- Prueba de la esculinasa en presencia de bilis: Ésta se emplea para diferenciar a los estreptococos del grupo D (actualmente *Enterococcus*) los cuales poseen capacidad de crecer en presencia de bilis al 4%; y de sintetizar la esculinasa, que les permite llevar a cabo la hidrólisis de la esulina.
- Prueba de sensibilidad a 5U de optoquina: La optoquina es un derivado de la quinina que inhibe selectivamente el desarrollo del *S. pneumoniae* a muy bajas concentraciones (20). Se utiliza para identificar a *S. pneumoniae* de otros estreptococos alfa hemolíticos.

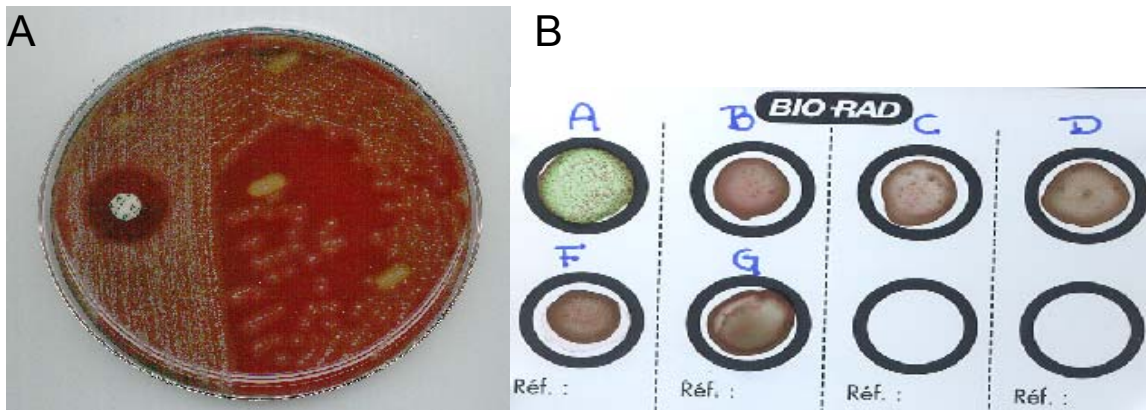


Figura 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. pyogenes*. **A.** Cultivo de agar sangre mostrando la prueba de bacitracina positiva. **B.** Determinación de Grupo de Lancefield usando antisueros comerciales.

2. *Streptococcus pyogenes* (EGA)

El reservorio para las infecciones de *Streptococcus pyogenes* es la mucosa nasal-oral humana. Por lo que otros animales no son fuente de infección de este patógeno. La infección más común es la faringitis como consecuencia de cambios climáticos, y en la pasada década también sufrió un dramático incremento el número de enfermedades sistémicas en muchas regiones del

mundo. Históricamente, *S. pyogenes* ha sido asociado a casos de sepsis e infección sistémica fulminante. El descubrimiento de que *S. pyogenes* puede ser internalizado por células epiteliales de mamíferos ofrece una explicación en los cambios de la epidemiología y en la capacidad de esta especie para penetrar las barreras mucosa y epidérmica (18).

En los caldos de cultivo los estreptococos del grupo A se encuentran como células esféricas u ovoideas que forman cadenas de longitud corta o media (4 a 10 células). Las cepas que carecen de estreptolisina S presentan una hemólisis β sólo bajo condiciones anaerobias, porque la estreptolisina O restante no es activa en presencia de oxígeno. Esta característica tiene importancia práctica, porque estas cepas pasarían inadvertidas si los cultivos se incubaran de manera anaeróbica (44).

2.1 Estructura

El carbohidrato específico de grupo, el cual constituye aproximadamente el 10% del peso seco de la célula (antígeno del grupo A de Lancefield) es un dímero de N-acetilglucosamina y de ramnosa (39).

La cápsula está formada por un polímero de ácido hialurónico, contiene unidades de repetición de ácido glucorónico y N-acetilglucosamina, no es inmunogénica y lo protege contra fagocitosis (39). La asociación epidemiológica de cepas altamente mucoides con fiebre reumática y enfermedades invasivas severas por estreptococos sugiere que la cápsula juega un papel importante en infecciones diseminadas (41). La proteína M es la principal proteína específica de tipo que se asocia a los estreptococos virulentos. Una proteína secundaria

específica de tipo que constituye un marcador epidemiológico útil es la proteína T (resistente a la tripsina). Se ignora cuál es la función estructural de esta proteína. Otros componentes importantes de la pared celular de *S. pyogenes* son las proteínas tipo M, el ácido teicoico y la proteína F (39).

2.2 Factores de virulencia

- **Proteína M.** Mientras que la región carboxilo-terminal se encuentra anclada a la membrana, la región amino terminal se extiende hacia la superficie, en forma de un dímero alfa helicoidal, dando la apariencia de “fibrillas”. La proteína M está formada por cuatro unidades de repetición (A-D), donde la variación de la unidad A (localizada en la región amino terminal) es la más importante, debido a que en ella se encuentra la especificidad del serotipo; protege a la bacteria de la fagocitosis al adsorber al factor H (proteína reguladora del complemento) y al fibrinógeno; favorece de esa manera la degradación del componente C3b del complemento. La respuesta inmune hacia la proteína M promueve la producción de anticuerpos protectores que favorecen la fagocitosis; sin embargo, estos anticuerpos pueden reaccionar con estructuras localizadas en los tejidos del hospedero como ocurre en los casos de Fiebre reumática y Glomerulonefritis aguda (41). Las proteínas M se subdividen en moléculas de clase I y clase II. Las de clase I comparten antígenos expuestos, mientras que las de clase II carecen de dichos antígenos. A pesar de que las cepas portadoras de ambas clases de antígenos pueden provocar infecciones supurativas y glomerulonefritis,

- tan sólo las bacterias que contienen proteínas M de clase I se asocian a fiebre reumática (39).
- **Proteínas semejantes a M.** Son codificadas por un complejo de más de 20 genes que componen la superfamilia de genes *emm* y tienen la capacidad de unirse a inmunoglobulinas o tener actividad antifagocitaria pueden unirse al inhibidor de proteasa alfa 2 microglobulina, lo que puede protegerla de la actividad de proteasas fagocitarias (41).
 - **Proteína F.** Es el ligando de la fibronectina (localizada en la matriz extracelular) puede ser la principal adhesina que participa en la unión hacia células epiteliales de la faringe y de la piel (41).
 - **Estreptolisinas O y S.** Son hemolisinas localizadas en la superficie celular, lisan eritrocitos, plaquetas y leucocitos y son las responsables de la hemólisis observada en la placa de agar sangre (44).
 - **Estreptocinasa.** Promueve la degradación de los coágulos al convertir plasminógeno a plasmina (41).
 - **Desoxirribonucleasas.** Han sido identificadas cuatro variantes inmunogénicas (A-D); no son enzimas citolíticas, pero pueden despolimerizar ADN libre presente en el pus, reduciendo la viscosidad del material en el absceso y facilitando su diseminación (41).
 - **C5a Peptidasa.** Es una enzima proteolítica (endopeptidasa) de localización superficial, corresponde a una potente serin-proteasa que escinde al factor del complemento C5a, el cual actúa como quimioatrayente, provocando una disminución en el reclutamiento de polimorfonucleares en el sitio de infección (41).

- **Proteína estreptocócica inhibitoria de la lisis mediada por el complemento (SIC).** Bloquea al complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento. Su presencia se ha determinado en el serotipo M1 (uno de los más virulentos), presenta un gran polimorfismo y recientemente se ha determinado la presencia de anticuerpos contra esta proteína (41). La extrema divergencia y rápida emergencia de variantes indican que esta proteína tiene un importante papel biológico. Recientes estudios en SIC mostraron que también inhibe las funciones de las proteínas de la inmunidad innata, tales como el inhibidor de la proteinasa secretada por leucocitos y la lisozima (15). Estudios bioquímicos han sugerido que SIC interfiere con la función del complejo de ataque a la membrana (MAC) por la posible unión a una o más proteínas componentes del mismo (1). Se ha demostrado que SIC se une a las proteínas C6 y C7, evitando su incorporación dentro del MAC (15).
- **Exotoxinas pirogénicas.** Pertenecen a una larga familia de toxinas pirogénicas y superantígenos (PTSAs) producidas por los EGA y por *Staphylococcus aureus*. Dichas PTSAs pueden ser clasificadas en subfamilias (SPEA, SSA y la subfamilia SPEs B y C). En estas subfamilias no sólo se observan homologías significativas de aminoácidos, sino que también permiten tener uno o más epítopes para anticuerpos (18). Las SPEs son termoestables y relativamente resistentes a la degradación proteolítica. Tres exotoxinas pirogénicas de los estreptococos (SPE A-C) han sido ampliamente estudiadas y reconocidas como factores de virulencia importantes por su participación como

pirógenos que incrementan el choque endotóxico y originan efectos nocivos asociados al sistema inmune. SPE A o toxina eritrogénica es considerada la responsable de la erupción “rash” observado en la fiebre escarlatina, también es capaz de formar complejos con endotoxinas lo cual es letal para los linfocitos T (18, 41).

SPE B tiene actividad de proteasa y se ha demostrado que es un importante factor de virulencia, importante en la internalización de células epiteliales y endoteliales. (18)

SPE C está epidemiológicamente asociada con el desarrollo de enfermedades invasivas severas por *S. pyogenes* (18).

SPE F fue originalmente llamado Factor Mitógeno, debido a su capacidad para inducir la producción de citocinas. Entre los estreptococos, SPE F parece estar presente sólo en el EGA; induce la producción de citocinas por parte de las células mononucleares en sangre periférica, incluyendo INF- γ y TNF- β (18).

3. Enfermedades clínicas por EGA

Los estreptococos del grupo A son la causa de faringoamigdalitis estreptocócica (inflamación aguda de la faringe y amígdalas) que se caracteriza por fiebre y dolor al deglutir. Las infecciones de piel y tejidos blandos varían, desde las pústulas cutáneas minúsculas denominadas impétigo, hasta una enfermedad tóxica grave e invasora que puede ser mortal en cuestión de días. Además de las afecciones agudas (supurativas), los estreptococos del grupo A causan enfermedades inflamatorias (no supurativas) que no son infecciones directas,

sino trastornos representativos de estados en los que la reacción inmunológica a los antígenos estreptocócicos produce lesión de los tejidos del hospedero (44).

3.1 Enfermedades estreptocócicas supurativas

- ✓ **Faringitis.** Se desarrolla generalmente entre 2 a 4 días después de la exposición al patógeno, con el inicio brusco de dolor de garganta, fiebre, malestar general y cefalea. La faringe posterior puede tener un aspecto eritematoso con presencia de exudado, y puede existir una acusada linfadenopatía cervical. A pesar de estos síntomas y signos clínicos, resulta difícil distinguir la faringitis estreptocócica de la faringitis vírica (44).
- ✓ **Escarlatina.** Es una complicación de la faringitis estreptocócica que tiene lugar cuando la cepa infecciosa contiene un bacteriófago temperado en estado lisogénico que estimula la producción de una exotoxina pirógena. Aparece un exantema eritematoso difuso, inicialmente en la parte superior del tórax para luego extenderse a las extremidades en un plazo de 1 ó 2 días desde el inicio de los síntomas clínicos de faringitis. Generalmente respeta la zona peribucal (palidez peribucal), así como las palmas y las plantas (44). La lengua está cubierta en un primer momento de un exudado blanco amarillento, posteriormente se descama y revela una superficie roja y desnuda (lengua de fresa). El exantema, el cual palidece con la presión, se observa mejor en el abdomen y los pliegues cutáneos (líneas de Pastia). Con la introducción del tratamiento antimicrobiano

- ahora las complicaciones supurativas de la faringitis estreptocócica son infrecuentes (39).
- ✓ **Pioderma.** Es una infección localizada y purulenta de la piel que afecta fundamentalmente las zonas expuestas (cara, brazos, piernas). La infección comienza cuando la piel se coloniza por *S. pyogenes* tras un contacto directo con una persona o fómites contaminados. Posteriormente el microorganismo se introduce en los tejidos subcutáneos a través de alguna interrupción de la barrera que supone la piel (arañazos, picaduras de insectos). Se forman vesículas que más tarde se transforman pústulas para después romperse y producir costras (39). Es típica la diseminación dérmica de la infección como consecuencia del rascado. Se observa fundamentalmente en niños pequeños con malas condiciones de higiene personal, y suele registrarse durante los meses cálidos y húmedos del verano. Las cepas estreptocócicas que provocan infecciones cutáneas son diferentes de las que causan faringitis, aunque los serotipos asociados a pioderma pueden colonizar la faringe y dar lugar a un estado de portador permanente (39, 44).
 - ✓ **Erisipela.** Es una infección aguda de la piel. Los pacientes presentan dolor local e inflamación (eritema, calor), linfadenomegalia y signos sistémicos (escalofríos fiebre). La piel afectada es típicamente sobreelevada y se distingue claramente de la no afectada. La erisipela se da con mayor frecuencia en niños pequeños y ancianos, tradicionalmente afectaba la cara pero en la actualidad es más frecuente en la piernas, y

- por lo general se ve precedida de una infección respiratoria o cutánea por *S. pyogenes* (39).
- ✓ **Celulitis.** En la celulitis a diferencia de la erisipela, se involucran tejidos subcutáneos profundos y no hay diferencia entre la zona de la piel infectada y la sana. Como en la erisipela la inflamación local y los signos sistémicos son observados. En estos casos se requiere de la identificación del microorganismo involucrado ya que varias bacterias pueden ser responsables de la celulitis (41).
 - ✓ **Fascitis necrotizante.** Es una infección que ocurre en el tejido subcutáneo profundo, la cual es caracterizada por una destrucción masiva del músculo y grasa a lo largo de los planos faciales. El microorganismo es introducido al tejido a través de la piel dañada (cortaduras menores, o traumas, infecciones virales, quemaduras, cirugía). Comienza con una evidencia de celulitis, que posteriormente desencadena una gangrena con síntomas sistémicos. La toxicidad sistémica, la falla multiorgánica y la muerte (la mortalidad excede al 50%) son característicos de la enfermedad, por lo que una terapia apropiada es requerida para prevenirla. A diferencia de la celulitis, que puede ser tratada con terapia antimicrobiana, en la fascitis se requiere de un tratamiento adicional más agresivo que implica la eliminación quirúrgica del tejido infectado (41).
 - ✓ **Síndrome del choque tóxico estreptocócico (SCTE).** Entre 1987 y 1989 se realizaron los primeros reportes de un síndrome de choque tóxico causado por *S. pyogenes* semejante al desarrollado a la fecha por *Staphylococcus aureus*. Este síndrome generalmente inicia con el dolor e

inflamación del tejido blando en el sitio de la infección aunado a sintomatología no específica como: fiebre, escalofríos, malestar, náuseas, vómito y diarrea. Posteriormente el dolor se intensifica y la enfermedad progresa a choque y falla multiorgánica (riñón, pulmones, hígado, corazón), a diferencia del choque tóxico por estafilococo, en el SCTE se presenta bacteremia y la mayoría de los pacientes desarrolla fascitis necrotizante. Entre los factores predisponentes se encuentran trauma en la piel, cirugía, varicela y quemaduras. Los serotipos de EGA asociados epidemiológicamente a enfermedades invasivas son los tipos M1, M3, M11, M12 y M28, siendo los tipos M1 y M3 los más comunes. Las cepas son mucoides y la producción de algunas exotoxinas pirogénicas (principalmente la SPE A) es característica. La mortalidad varía del 30 al 70% (41).

3.2 Enfermedades estreptocócicas no supurativas

- ✓ **Fiebre reumática.** La fiebre reumática es una complicación tardía de las infecciones faríngeas por EGA. La sintomatología de la fiebre reumática puede variar dependiendo de la severidad de la enfermedad y del huésped involucrado. El período de latencia entre la faringitis estreptocócica y el desarrollo de fiebre reumática es de una a cinco semanas. La enfermedad se manifiesta como una inflamación de las articulaciones (artritis), corazón (carditis), sistema nervioso central (corea de Sydenham), piel (eritema marginal), y nódulos subcutáneos. Todas estas características son importantes dentro de los criterios de Jones

- establecidos para el diagnóstico de fiebre reumática. Entre las manifestaciones clínicas menores que se pueden presentar se incluyen: fiebre, artralgia, aumento en la velocidad globular, elevación de la proteína C reactiva y el intervalo prolongado P-R (ondas de actividad eléctrica del miocardio) del electrocardiograma. La enfermedad tiene una naturaleza autoinmune relacionada a la producción de anticuerpos autorreactivos y células T que muestran una reactividad cruzada entre componentes del EGA y tejidos del huésped. La importancia médica de la fiebre reumática representa la afectación cardíaca que ocasiona miocarditis o valvulitis conllevando a la muerte u obligando el remplazamiento de las válvulas afectadas. La enfermedad es causada por diferentes serotipos de EGA (M3, M18 y en menor grado, M5), está relacionada a faringitis estreptocócica y no a infecciones de piel (41).
- ✓ **Glomerulonefritis aguda (GNA).** Es caracterizada por una inflamación aguda del glomérulo renal con edema, hipertensión, hematuria y proteinuria. La severidad varía desde la forma asintomática (detectada por uroanálisis) a una falla renal aguda. La GNA puede originarse a partir de la faringitis, impétigo y probablemente por otras infecciones por EGA. Diferentes serotipos M han sido asociados con GNA, los tipos M2, M49, M57, M60 y M6, son asociados a impétigo y faringitis, y los tipos M1, M4, M12 y M25 asociados sólo a faringitis. La patogénesis de la GNA puede involucrar una respuesta inflamatoria ocasionada por complejos inmunes. La presencia de proteínas de la bacteria con efectos nefritogénicos, una disminución en el complemento sérico y la observación de sus efectos en

glomérulo sugieren un evento mediado por dichos complejos. Entre los mecanismos propuestos se incluyen: 1) Depósito de complejos inmunes; 2) Reacción cruzada de anticuerpos contra antígenos del estreptococos y del glomérulo; 3) Alteración del tejido glomerular por productos del estreptococo (proteinasas y estreptocinasas) y 4) Activación directa por componentes del estreptococo depositados en el glomérulo. La GNA ocurre principalmente en niños, adultos jóvenes, y personas mayores de 40 años, los hombres son afectados 2 veces más que las mujeres. La recurrencia es baja probablemente ocasionada por la respuesta inmune tipo específica (41).

4. GENÉTICA DEL ESTREPTOCOCO DEL GRUPO A

Algunas especies de estreptococos no son naturalmente competentes para la integración de ADN exógeno. Sin embargo, el ADN transferido de manera conjugativa en los estreptococos del Grupo A, está restringido a la transferencia de plásmidos y transposones, y no hay evidencia de que algún rasgo distintivo de virulencia sea codificado por estos tipos de elementos móviles. Sin embargo, son indudablemente importantes en la transmisión de resistencia a varios antibióticos. El análisis de varios loci polimórficos, más notablemente los genes que codifican para la proteína M, han proveído evidencia considerable de transferencia horizontal de material genético entre poblaciones naturales de *S. pyogenes* (18).

4.1 Regulón Mga

Como se mencionó anteriormente, entre los principales factores de virulencia del EGA se encuentran la proteína M, o las similares a M, y la C5a peptidasa, codificadas por genes localizados en una región referida como regulador de múltiples genes de GAS (regulón Mga). Su expresión está controlada por el regulador transcripcional *mga* localizado corriente arriba del gen *emm*. Así mismo, para las cepas M1, en dicha región se encuentra el gen *sic* que codifica para la proteína inhibidora del complejo de ataque a la membrana (MAC). Por lo anterior, Mga representa un único regulador que controla genes necesarios para la adherencia, internalización y evasión de la respuesta inmune. También presenta influencia en la expresión de más del 10% del genoma de *S. pyogenes*, entre los cuales se encuentran genes primarios y operones involucrados en el transporte y utilización de carbohidratos así como el hierro y los aminoácidos. La expresión del regulón está asociada a condiciones favorables de crecimiento, lo cual hace suponer, que le permite al microorganismo colonizar nuevos nichos en el hospedero (29).

Actualmente han sido identificados dos alelos divergentes del regulador *mga*, y estos son *mga-1* y *mga-2*, los cuales muestran 24.5% de diversidad en cuanto a los nucleótidos en el extremo 3' del gen (28). Las cepas que presentan *mga-1* están asociadas al desarrollo de faringitis, mientras que aquellas que poseen el alelo *mga-2* lo están a las infecciones en la piel, o en cepas que pueden causar infección en ambos sitios. Estos datos sugieren que los alelos, y los genes que regulan, les han permitido a las cepas que los contienen una ventaja en distintos

nichos, así que parecen estar directamente involucrados en la especialización para la colonización de ciertos tejidos por parte de EGA (4).

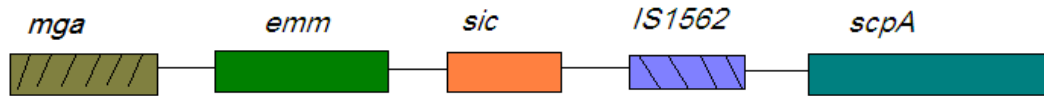


Figura 2. Arreglo de la región Mga en el tipo M1 de *S. pyogenes*. Inicia con el regulón *mga*, seguido del gen que codifica para la proteína M (*emm*). Corriente arriba de éste se ubica el gen *sic*, y en medio de él y el gen codificante para la C5a peptidasa (*scpA*), se localiza la secuencia de inserción IS1562.

4.2 Transposones

La recombinación genética permite intercambio entre cromosomas homólogos, generando nuevas combinaciones de alelos, pero por el contrario, no permite la reorganización del material genético. Por otro lado, los elementos transponibles o transposones contribuyen a la variación genética debido a que son capaces de transportarse por sí mismos a otras ubicaciones dentro del genoma, y algunas veces, también causan rearrreglos de otras secuencias genómicas. Los transposones son interesantes no solo por los mecanismos involucrados en su manipulación del ADN, sino también por las consecuencias evolutivas que su movilidad genera, pues proveen la principal fuente de mutaciones en el genoma (32).

Existen dos clases principales de transposones: los grupos de transposones que existen como secuencias de ADN que codifican para proteínas y que son capaces de manipular directamente el ADN para propagarse por ellos mismos; y en el otro grupo se encuentran los transposones pertenecientes a los retrovirus,

en los cuales la fuente de su movilidad radica en la capacidad que tienen de hacer copias de ADN, así como de sus transcritos de ARN.

Los transposones que se mueven vía ADN se encuentran tanto en procariotes como eucariotes. Cada transposón bacteriano acarrea genes que codifican para enzimas que son requeridas en el proceso de transposición (transposasas), sin embargo, también requieren funciones auxiliares de la célula en la cual residen (tales como la ADN polimerasa o la ADN girasa) (32).

Los rearrreglos del genoma pueden ser promovidos directa o indirectamente:

- El evento de transposición por sí mismo permite la ocurrencia de deleciones o inversiones, o conduce al movimiento de una secuencia del hospedero a una nueva localización.
- Los transposones sirven como sustrato para los sistemas de recombinación celular debido a que proveen sitios para recombinación recíproca. Tales intercambios resultan en deleciones, inserciones, inversiones o translocaciones.

Presumiblemente la propagación de un elemento por transposición está balanceada por el daño hecho si un evento de transposición inactiva un gen necesario, o si el número de transposones se vuelven una carga en el sistema celular. Se debe recordar que cualquier evento de transposición confiere una ventaja selectiva que conducirá a una supervivencia preferencial del genoma que contenga el transposón activo.

Los transposones simples son llamados secuencias de inserción. Estos elementos son abreviados con las siglas IS, seguidas de un número el cual indica la historia de su aislamiento, pero no corresponde al número total de elementos aislados hasta ahora.

Los elementos IS son constituyentes normales de cromosomas bacterianos y de plásmidos. Cada elemento IS es diferente en secuencia, pero hay algunas características comunes en su organización. Un elemento IS termina en una corta secuencia repetida invertida (aproximadamente 9 pb). La presencia de la repetición terminal significa que la secuencia se encuentra flanqueando el ADN en cualquier lado de éste (32).

Todos los elementos IS contienen una sola región larga codificante, empezando sólo al interior de una de las repeticiones invertidas y terminando antes o dentro de la otra repetición invertida. Dicha región codifica para una transposasa.

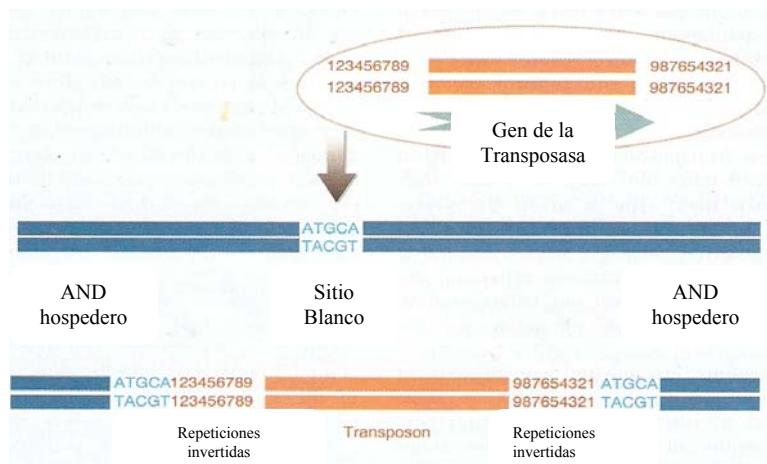


Figura 3. Transposición. Se muestra el sitio blanco y las secuencias de repeticiones invertidas características de una secuencia de inserción.

Mecanismos de transposición

Se pueden distinguir tres principales mecanismos por medio de los cuales los transposones se mueven (Tabla 1).

Tipo de transposición	Característica
Transposición replicativa	El elemento es duplicado durante la reacción, así que una copia permanece en el sitio original, mientras que la otra se inserta en un nuevo sitio.
Transposición no replicativa	Los elementos transponibles se mueven como una entidad física directamente de un sitio a otro y requiere únicamente de una transposasa.
Transposición conservativa	El elemento es escindido de un sitio en el donador e insertado en otro sitio blanco presente en el receptor. Son elementos largos y pueden mediar la transferencia no sólo del elemento por sí mismo, sino también del ADN donador de una bacteria a otra.

Tabla 2. Mecanismos de transposición. Se describe la principal característica involucrada en los mecanismos de transposición.

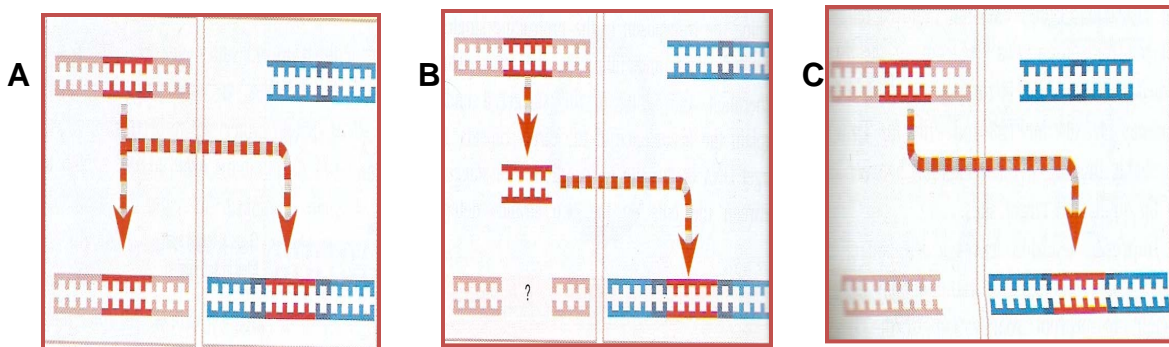


Figura 4. Mecanismos de transposición. A. *Transposición replicativa.* B. *Transposición no replicativa.* C. *Transposición conservativa.*

Secuencia de inserción 1562 (IS1562)

Los genes de virulencia en bacterias patógenas están a menudo localizados en una región del cromosoma llamada isla de patogenicidad. En las bacterias Gram negativas estas islas pueden contener IS, las cuales promuevan rearrreglos o la transferencia horizontal de genes de virulencia. Anteriormente, no había sido reportada la presencia de IS en las islas de patogenicidad de las bacterias Gram positivas (22). En 1998, Bergen et al. identificaron el elemento IS1562 en cepas de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1, en las cuales la ubicación de dicho elemento fue descrita como dentro del regulón de virulencia Mga, exactamente corriente arriba del gen *ScpA*, mismo que codifica para la C5a peptidasa; y corriente abajo del gen *sic*, que codifica para la proteína inhibidora del complemento (3). Este elemento IS codifica para una enzima llamada transposasa, que participa en el desplazamiento del mismo en el genoma. Lo anterior sugeriría que el mecanismo de transposición de dicho elemento es una transposición no replicativa dado que únicamente requiere de una transposasa y los mecanismos de reparación del hospedero. A partir de su identificación, se originaron diversas hipótesis acerca de la importancia de que un elemento móvil se encontrara localizado en una zona del cromosoma de *S. pyogenes* tan determinante en su metabolismo y virulencia. Así, Bergen et al. hicieron mención acerca de la posibilidad de que IS1562 contribuyera a la virulencia de esas cepas, ya que aumenta la transcripción de los genes ubicados corriente abajo de ella. También se sugirió que junto con el gen *sic*, podían formar parte de restos de un transposón compuesto insertado en el regulón (3).

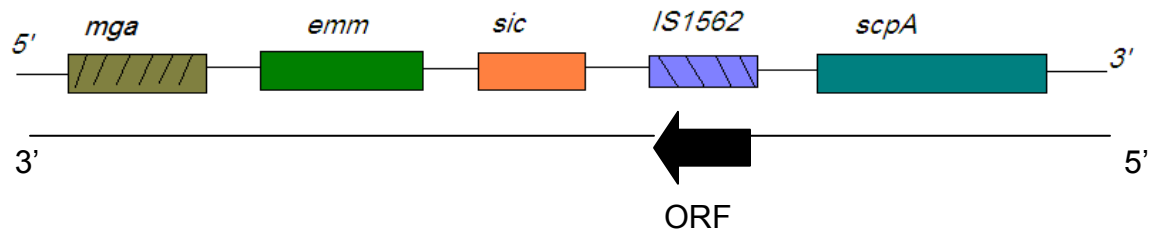


Figura 5. Localización del elemento IS1562 dentro de la región Mga en cepas M1 y de su ORF.

Smoot *et al.* en 2002 secuenciaron el genoma de cepas M18 de *Streptococcus pyogenes*, las cuales estaban asociadas a brotes de Fiebre Reumática Aguda. En dicho estudio se sugiere que las secuencias de inserción presentes en el genoma de este grupo de cepas M18 son la principal fuente de variación respecto al genoma de M1. Es importante mencionar que detectaron la presencia de una isla de patogenicidad de un tamaño de 13.8 kb, la cual se encuentra ausente en M1; y el elemento IS1562 está insertado en el centro de la misma (48).

Otro estudio llevado a cabo por Hidalgo-Grass *et al.* en el mismo año, describió un nuevo locus asociado a la capacidad invasiva de cepas M14 aisladas de casos de Fascitis Necrotizante. Dicha región fue denominada *sil* (Locus estreptocócico de invasión) y fue analizada, encontrando que está formada por 5 genes (*sil* A-E) y que corriente arriba del gen *sil* A está ubicado el elemento IS1562, siendo el único elemento móvil aledaño al locus (28). Así, se sugiere que *sil* pudo haber sido adquirido por transferencia horizontal durante la evolución de EGA. Por otro lado, al ser encontrado el elemento IS1562 en una región tan importante para la virulencia de cepas M1 (regulón Mga), de cepas M14 (locus *sil*), así como en la isla de patogenicidad presente en el genoma de M18, provee de mayor evidencia acerca de que dicho elemento juega un papel

importante en la plasticidad y diversidad genómica de *Streptococcus pyogenes*. Actualmente han sido descritos dos alelos de ésta secuencia de inserción, y estos son la IS1562 presente en M12 y la que se encuentra presente en el tipo M1 (24).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Conocer la distribución de la Secuencia de Inserción 1562 (IS1562) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de diferentes serotipos M, provenientes de aislamientos clínicos y de una colección de referencia.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Conocer si la IS1562 está dentro del regulón de virulencia Mga.

- ❖ Saber si la presencia de la secuencia de inserción 1562 es constante dentro de un mismo tipo M.

- ❖ Determinar el alelo, M1 ó M12, al que pertenecen algunos de los elementos IS1562 amplificados.

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Material biológico

En el presente trabajo se usaron 195 cepas de referencia donadas por el Dr. R. Facklam del Laboratorio de Estreptococos, del CDC en Atlanta (Tabla 2); y 184 cepas clínicas de diferentes hospitales de la Ciudad de México (Tabla 3). Tanto las cepas de referencia como las de origen clínico fueron previamente tipificadas molecularmente en los diferentes serotipos M, así como la caracterización de algunos de sus genes de virulencia (17, 36).

Cepas de referencia utilizadas para la búsqueda de IS1562	
Grupo A	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, , 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, St1207, St1389, St1967, St1969, St31, St2037, St204, St211, St213, St2147, St245, St2460, St2461, St2904, St2911, St2917, St2926, St2940, St369, St3757, St3765, St6735, St7700, St809, St833, St854, St104, St292, St554, St1041033, St980584, St3850-01, St1731-01, St11014, St3060
Grupo C	Stc1400, Stc36,Stc1400, Stc3852, Stc5344, Stc5345, Stc57, Stc6979, Stc74a, Stc839, Stc1741-01, Stc74a, Stc839, Stc1741-01, Stck249, Stck401,
Grupo D	Std432, Std631, Std633

Grupo G	Stg480, Stg10, Stg11.1, Stg1389, Stg166b, Stg1750, Stg3390, Stg4222, Stg4545, Stg4831, Stg485, Stg4974, Stg5063, Stg6, Stg62647, Stg643, Stg652, Stg653, Stg663, Stg840, Stg93464, Stg2078
Grupo L	27L, StL1376, StL1929, StL2764

Tabla 3. Cepas de referencia. En color naranja se muestran los diferentes tipos M analizados. El resto de las cepas corresponden a *Streptococcus* de otros grupos de Lancefield.

Serotipo M	No de cepas utilizadas	Serotipo M	No de cepas utilizadas
M1	51	M48	2
M2	7	M49	4
M3	6	M59	2
M4	6	M60	3
M6	6	M65	4
M11	6	M75	21
M12	23	M77	5
M18	2	M78	5
M22	5	M89	5
M28	2	St	2
M30	2	Stc	2
M41-2	3	Stg	11

Tabla 4. Número de cepas clínicas analizadas y el serotipo M al que pertenecen. St corresponde a cepas del Grupo A, mientras que Stc y Stg son cepas del Grupo C y G respectivamente.

2. Identificación de *Streptococcus pyogenes*

A las cepas de origen clínico se les confirmó el tipo beta de hemólisis, así como su morfología colonial. Posteriormente se determinó la sensibilidad a la bacitracina resembrando las cepas en agar sangre y colocándoles un disco comercial de 0,04 U del antibiótico (TIPIBACT[®], Bio- Rad[®]), incubándolas a 37°C por 24 horas en microaerofilia. La determinación del grupo de Lancefield se realizó mediante una prueba comercial de coaglutinación con partículas de látex (kit Pastorex[®] Strep, Bio Rad[®]).

3. Identificación del elemento móvil IS1562

3.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las cepas clínicas se utilizó el kit comercial DNeasy[®] Tissue (QIAGEN[®]).

3.2 Evaluación del ADN

Una vez que se extrajo el ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Reserarch Organics) al 0.8% con 5 µg/mL de bromuro de etidio (Reserarch Organics).

3.3 Amplificación del elemento IS1562

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó la amplificación de la Secuencia de Inserción 1562 en las cepas de referencia y en las cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes*, agrupándolas con base en el tipo M.

Los eventos de la PCR fueron: 30 ciclos con una desnaturalización de la doble cadena de ADN a 94°C por 50 segundos, alineamiento de los primers o iniciadores con las cadenas individuales a 47 °C durante 50 segundos y elongación de la nueva cadena complementaria por parte de la Taq polimerasa a 72°C por 80 segundos. (Diagrama 1).

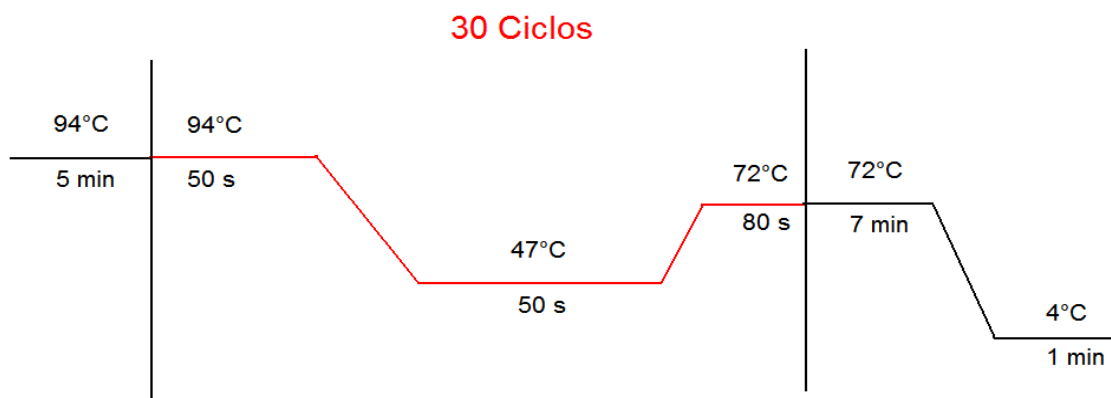


Diagrama 1. Representación de las condiciones de la PCR para la amplificación de IS1562. Se observan las etapas de la PCR con sus respectivas temperaturas y tiempos.

La mezcla de reacción para la amplificación del elemento IS1562 consistió en un volumen final de 30 µL (Tabla 4).

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
Agua Ultrapura	19.63
Deoxinucleótidos trifosfatados Disolución 1.25mM (Applied Biosystems®)	5
Buffer 10X con MgCl ₂ 1.5mM (Applied Biosystems®)	3
Primer IS1562 Forward 10mM	0.6
Primer IS1562 Reverse 10mM	0.6
ADN muestra	1
Taq ADN Polimerasa (Altaenzymes®)	0.17
Volumen Final	30

Tabla 5. Mezcla maestra de la PCR para el amplificado de IS1562.

Los primers empleados en la amplificación de IS1562 tienen la siguiente secuencia (2):

IS1562 F: 5'-TAG TCT TTC CAA ATA TGC CGT GTG -3'

IS1562 R: 5'-TAT GAC CTA GTA GAA GAC ACC T-3'

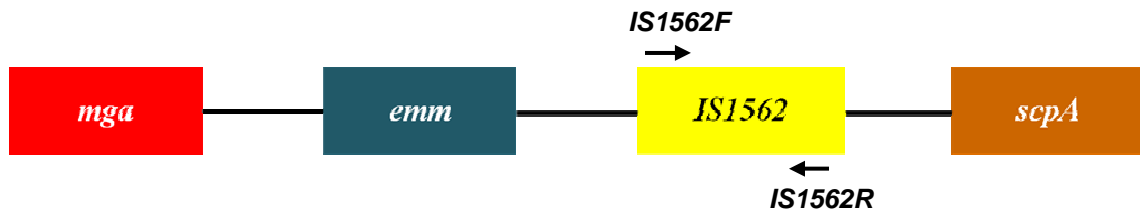


Figura 6. Sitio de alineamiento de los primers para amplificar IS1562 en una cepa diferente a M1.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Corbett research®.

Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa (Reserarch Organics) al 1.5% con 5 µg/mL de bromuro de etidio (Reserarch Organics) y utilizando un marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas®) debido a que el peso molecular esperado para IS1562 fue de 1000 pb.

3.4 Amplificación de la región Mga

Debido a que la secuencia de inserción fue identificada y caracterizada dentro del regulón de virulencia de una cepa M1 de *S. pyogenes* (3), se decidió amplificar dicha región tanto en algunas cepas de la colección de referencia como clínicas, en ambos casos, positivas por PCR para el elemento IS1562.

El volumen final de la reacción de PCR fue de 50 µL, debido a que se utilizó como templado para la amplificación de la secuencia de inserción, y fue secuenciada posteriormente (Tabla 5).

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
Agua Ultrapura	33.25
Deoxinucleótidos trifosfatados Disolución 1.25mM (Applied Biosystems®)	8
Buffer 10X con MgCl ₂ 17.5mM (Roche®)	5
Primer <i>emm1A</i> * 10mM	1
Primer SBR 10mM	1
ADN muestra	1
Taq ADN Polimerasa Expand Long (Roche®)	0.75
Volumen Final	50

Tabla 5. Mezcla maestra de la PCR para la región Mga.

Los primers utilizados para esta amplificación corresponden al inicio del gen *emm* y al principio del gen *scpA*, abarcando así la región de interés dentro del regulón. La secuencia de estos primers es descrita a continuación (2,12).

emm1A*. 5'-GGG AAT TCT ATT SGC TTA GAA AAT TAA-3'

SBR. 5'-AGA CAT GAG CTCAAT GGC AAG TTT ATCAA TGG TAATTTTTG-3'

NOTA. El primer ***emm1A**** tiene una S debido a que es un primer degenerado.

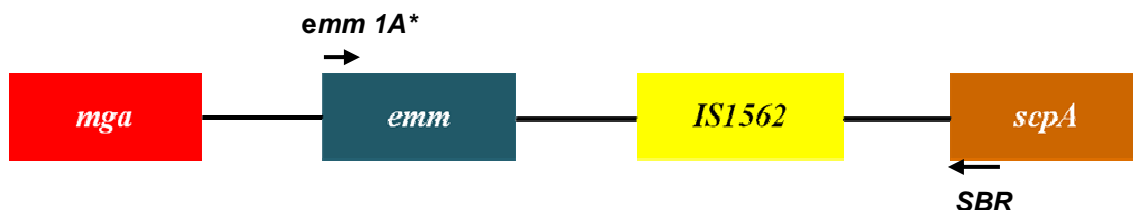


Figura 7. Esquema de la localización de los primers utilizados para amplificar la región Mga en una cepa diferente a M1

Las condiciones de la PCR fueron 30 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 50 segundos, un alineamiento a 50°C durante 30 segundos y la extensión a 68°C por 5 minutos (Diagrama 2). El producto esperado estaba entre 2000-4000 pb.

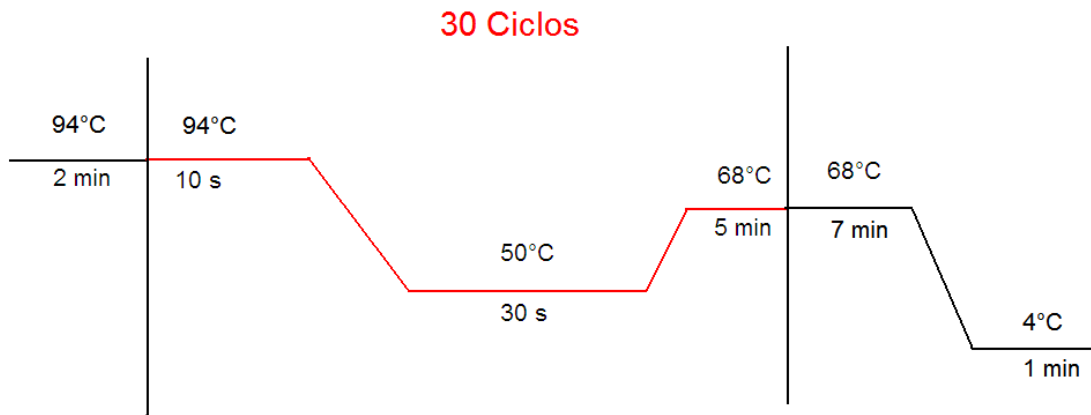


Diagrama 2. Representación de las condiciones de la PCR para la amplificación de la región Mga.

Los productos amplificados se observaron en geles de agarosa al 1% con 5 µg/mL de bromuro de etidio y utilizando un marcador de peso molecular (λ ADN/HindIII, Invitrogen®, 0.5 µg/mL).

3.5 Amplificación del elemento IS1562 dentro de la región Mga

Se empleó como templado el producto amplificado de la región Mga.

3.6 PCR utilizando primers combinados (M-IS e IS-C5)

Con el fin de confirmar mediante la PCR la presencia del transposón IS1562 dentro del regulón Mga, y posteriormente tratar conocer los genes que se

encontraban flanqueando al mismo, se utilizaron dos combinaciones de primers; buscando así tener amplificados los genes contiguos a la IS1562, y demostrar por el peso molecular de los productos amplificados, que la secuencia de inserción se encontraba localizada en esa zona, además de deducir, por el peso de ambos combinados, si podían existir o no genes adyacentes a la secuencia de inserción. Posteriormente se secuenciaron dichos productos únicamente para garantizar la veracidad de los resultados, mediante los pesos moleculares obtenidos por la PCR. Los primers de M-IS fueron ***emm1A**** y **1562R**, mientras que para IS-C5 se emplearon **1562F** y **SBR**.

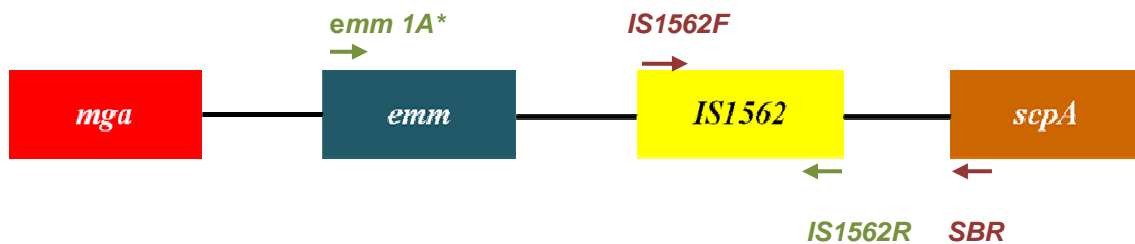


Figura 8. Esquema de localización de las combinaciones de primers. De color verde se encuentran los primers utilizados para la amplificación de M-IS, mientras que de rojo oscuro se observan los primers para IS-C5.

4. Secuenciación del elemento IS1562 en las cepas clínicas y de referencia

Una vez identificadas las cepas en las que se demostró la presencia de la secuencia de inserción, se determinó la secuencia de nucleótidos de algunos de los amplificados de IS1562 para determinar la identidad entre ellas y con las secuencias descritas para IS1562 en M1 y en M12.

4.1 Purificación de los productos de la PCR del elemento

IS1562, región Mga, M-IS e IS-C5.

Se purificaron los productos de la PCR para eliminar remanentes de los reactivos empleados en la reacción, así como restos de ADN, utilizando un kit comercial Microcon® de Millipore®, que consiste en filtros con una membrana que impide el paso de moléculas cuyo peso sea superior a 100 000Da. Este procedimiento se realizó de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Colocar una columna sobre un tubo de colecta y adicionar 370 μ L de agua estéril desionizada. Tener cuidado de no tocar la membrana de la columna.
2. Posteriormente agregar el producto de PCR a la columna con ayuda de una micropipeta.
3. Centrifugar a 2500 rpm por 14 minutos y desechar el filtrado.
4. Transferir la columna a un tubo nuevo de colecta y agregar a la columna 390 μ L de agua estéril desionizada.
5. Centrifugar a 2500 rpm por 14 minutos y desechar el filtrado.
6. Invertir con cuidado la columna en un nuevo tubo de colecta y centrifugar a 10000 rpm por 3 minutos.
7. El filtrado colectado contiene el producto de PCR purificado. Adicionar agua estéril ultrapura obteniendo un volumen final de 15 μ L.

Para garantizar la purificación de los productos de PCR se realizó una electroforesis de los mismos, utilizando como marcador de peso molecular Low

DNA Mass (Invitrogene®) para conocer la cantidad de ADN presente en la muestra, dato necesario para el proceso de secuenciación.

4.2 Secuenciación de los productos de la PCR del elemento IS1562, región Mga, M-IS e IS-C5.

Una vez purificados los productos se secuenciaron en un equipo automatizado ABI-3100 de Applied Biosystems® en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Los amplificados fueron secuenciados utilizando los primers descritos a continuación:

GEN	PRIMER
IS1562	<i>IS1562F</i>
	<i>IS1562R</i>
Región Mga	<i>emm1A*</i>
	<i>SBR</i>
M-IS	<i>IS1562R</i>
IS-C5	<i>IS1562F</i>

Tabla 6. Primers empleados para la secuenciación de los amplificados.

La secuencia obtenida fue representada gráficamente en un electroferograma y manejada en un archivo electrónico que contenía la secuencia nucleotídica como tal (secuencia electrónica).

4.3 Análisis de las secuencias

Las secuencias electrónicas fueron comparadas con el respectivo electroferograma para poder dar significado a algunas de las ambigüedades presentes en estos últimos, utilizando el software EditSeq® (DNASTAR® Madison Wis).

Una vez hecho lo anterior, se procedió a comparar las secuencias entre ellas, con el fin de encontrar similitudes o variaciones. Para lograrlo se utilizó el software MegAlign® (DNASTAR® Madison Wis), que permite, con las opciones Clustal V y Clustal W, alinear las secuencias mostrando un código de colores que indican el grado de similitud existente entre ellas. También se identificaron mutaciones presentes, las cuales incluían desde cambios en algunas bases, hasta inserciones o deleciones de varios pares de bases.

Secuencia de Inserción IS1562

Las secuencias del elemento móvil IS1562 se compararon entre sí. Con ayuda del software MegAlign® (DNASTAR® Madison Wis), se alinearon las secuencias problema con aquellas reportadas en el GenBank para elaborar un árbol filogenético con el cual se pudiera distinguir la distancia entre los alelos del elemento IS1562 identificados en las cepas analizadas.

Región Mga

El principal interés de secuenciar la región Mga, fue detectar los posibles genes que se encontraran en ambos extremos de la secuencia de inserción. Con el primer *emm* 1A* se deseaba conocer la secuencia ubicada corriente arriba de

IS1562 y ver si dicha secuencia corresponda a algún gen ya caracterizado o si solamente se trataba de la secuencia intergénica entre el gen *emm* y la secuencia de inserción 1562; mientras que con el primer *SBR* se pretendía tener la secuencia existente entre el principio del gen *scpA* y el elemento IS1562.

Productos de las reacciones utilizando primers combinados (M-IS e IS-C5)

Para los casos en los que se empleó esta reacción, la secuencia con el primer *IS1562R* (M-IS) mostró el final de la secuencia de inserción. Con el primer *IS1562F* (IS-C5) se buscó obtener el principio de IS1562. Por lo tanto, mediante el resultado de la PCR con primers combinados y posteriormente con la secuenciación de dichos productos, se garantizó la presencia del elemento IS1562 dentro de la región Mga.

5. Resultados y discusión

5.1 Distribución del elemento móvil IS1562

Se analizaron un total de 195 tipos M de la colección de referencia y 21 tipos M de las cepas clínicas, y la distribución que presentó el elemento IS1562 dentro de cada grupo se describe en las Tablas 7 y 8.

Cepas de referencia utilizadas para la búsqueda de IS1562	
Grupo A	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, St1207, St1389, St1967, St1969, St31, St2037, St204, St211, St213, St2147, St245, St2460, St2461, St2904, St2911, St2917, St2926, St2940, St369, St3757, St3765, St6735, St7700, St809, St833, St854, St104, St292, St1041033, St980584, St3850-01, St1731-01, St11014, St3060
Grupo C	Stc1400, Stc36, Stc3852, Stc5344, Stc5345, Stc57, Stc6979, Stc74a, Stc839, Stc1741-01, Stc74a, Stc839, Stc1741-01, Stck249, Stck401
Grupo D	Std432, Std631, Std633
Grupo G	Stg480, Stg10, Stg11.1, Stg1389, Stg166b, Stg1750, Stg3390, Stg4222, Stg4545, Stg4831, Stg485, Stg4974, Stg5063, Stg6, Stg62647, Stg643,

	Stg652, Stg653, Stg663, Stg840, Stg93464, Stg2078
Grupo L	27L, StL1376, StL1929, StL2764

Tabla 7. Cepas de referencia. En color rojo se muestran las cepas positivas por PCR para IS1562.

Tipo M	Total de cepas analizadas de cada tipo M	No de cepas IS1562 (+)	No de cepas IS1562 (-)	IS1562 en C.R. del Tipo M	IS1562 (+) en Mga
M1	51	49	2	+	+
M2	7		7	-	
M3	6		6	-	
M4	6	6		+	+
M6	6	5	1	+	
M11	5	3	2	-	
M12	23	20	3	+	+
M18	2	1	1	-	
M22	5		5	-	
M28	2	1	1	-	
M30	2	1	1	+	
M41-2	3	2	1	+	
M48	2	1	1	+	
M49	4	4		+	
M59	2	2		+	
M60	3	3		+	
M65	4	3	1	-	
M75	21	2	19	-	+
M77	5		5	-	
M78	5	3	2	-	
M89	5		5	-	
St1967	2	2		+	
Stc839	2	2		+	
Stg6	3	3		+	
Stg85	4	4		-	
Stg4831	2	2		+	
CEPAS TOTALES	184	121	63		

¶

Tabla 8. Presencia o ausencia de la secuencia de inserción 1562 en los diferentes tipos M analizados; **a.** Cepas de referencia (C.R.) de cada tipo M. Se realizó esta comparación para conocer la movilidad de este elemento dentro de un mismo tipo M, tomando la C.R. como control.

En ambas tablas se muestran también otras cepas cuyo tipo M no corresponde a ninguno de los descritos hasta ahora (St), así como cepas de los grupos C (Stc)

y G (Stg). Estas últimas también se estudiaron debido a que se conocía la presencia del gen *emm* dentro de estos grupos de *Streptococcus*, así que se planteó la posibilidad de que la secuencia de inserción se encontrara cercana a dicho gen. Como se observa en la tabla 7, las cepas de Stc y Stg, al igual que las pertenecientes a los grupos D (Std) y L (StL) albergan el elemento IS1562 dentro de su genoma, lo cual muestra que no es exclusivo de *S. pyogenes*, y que sería probable que algunos genes asociados a ciertos grupos puedan moverse a otros, haciendo más diversos a estos últimos y por lo tanto más virulentos. Esto resulta interesante al observar que de las 15 cepas de referencia Stc, todas resultaron positivas para IS1562 (15/15); al igual que los grupos Std (3/3) y StL (4/4). Quizá quienes presentaron un poco más de variación fueron las cepas Stg con 17 positivas de 22 analizadas (17/22).

Los tipos M que contaron con un mayor número de cepas analizadas fueron los tipos M1, M12 y M75 (51, 23 y 21 cepas respectivamente), debido a que son los más prevalentes en los diferentes aislamientos hechos de hospitales que colaboran con el laboratorio. En cuanto a la distribución de IS1562 en las cepas analizadas en la colección de referencia del CDC, la presencia del elemento IS1562 fue del 58% (113/195), lo que permite apreciar la movilidad de este elemento en una población sin modificaciones en cuanto a su genoma, para posteriormente contrastarla con su distribución en las cepas obtenidas de casos clínicos, y así tener una visión más amplia del papel activo que juega en el intercambio de genes y por tanto, en la variabilidad y complejidad genética de esta bacteria. De las cepas clínicas un 66% (121/184) mostraron poseer el elemento en su genoma, lo que indica que está teniendo una movilidad

importante entre las cepas de distintos tipos M, y que no se encuentra sólo en el tipo M1. También se debe mencionar que la presencia de IS1562 en cepas que carecen del gen *sic* podría sugerir que en algún momento en la evolución de *S. pyogenes* este elemento haya acarreado a este gen a los tipos M1.

Cabe mencionar los casos en los que la cepa de referencia de un tipo M mostró un resultado negativo para IS1562, mientras que en algunas cepas clínicas analizadas de ese mismo tipo M, si se encontró presente la secuencia de inserción (tipos M11, M18, M28, M65 y M75) lo que podría contribuir a la sugerencia de algunos autores acerca de que el intercambio genético en poblaciones naturales de *S. pyogenes* se puede llevar a cabo principalmente por transferencia horizontal (3,18, 31,32). Este fenómeno resulta importante, debido a que representa un posible mecanismo para el acarreo de nuevos genes que hacen que tipos M que antes estaban marginados a un padecimiento específico, colonicen nuevos nichos en el hospedero y causar enfermedades a las que antes no se encontraban asociados.

Cuando se amplificó la secuencia de inserción IS1562, se esperaba un producto con un peso molecular de 1000 pb. No se observó variación en el peso de las amplificaciones obtenidas, tanto las cepas de referencia como las cepas clínicas probadas presentaron el tamaño antes mencionado. Además, el rendimiento de la PCR bajo las condiciones de reacción empleadas fue óptimo (en la electroforesis se obtuvieron bandas intensas y sin mostrar barridos). La determinación del peso molecular de los amplificados se realizó con ayuda del software Kodak® 1D 3.5v.



Figura 9. Amplificados de IS1562 en cepas de referencia. Electroforesis en 1.5 % de agarosa. En el primer carril se colocaron 4 μ L de marcador de peso molecular (PM) de 100 pb (Fermentans®), mientras que en los carriles 2 a 17 se colocó el producto amplificado IS1562. En los carriles 2 y 3 se encuentran los controles positivos (154 y 180). El tipo M de las cepas se indica debajo del amplificado.

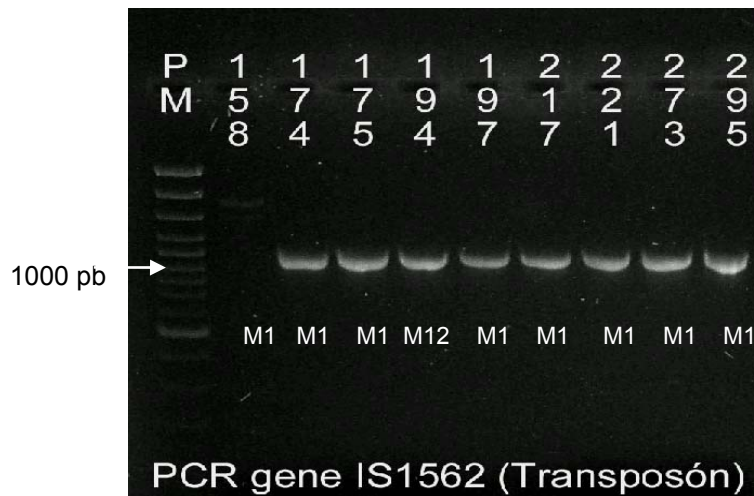


Figura 10. Amplificados de IS1562 en cepas clínicas. A partir del carril 2 hasta el 10 se observan los amplificados de IS1562 (4 μ L) de cepas clínicas de los tipos M1 y M12. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular (PM) de 100 pb.

5.2 Amplificación de la región Mga

El tamaño de estos productos de PCR estaba en función de los genes presentes dicha región. Por lo tanto, los pesos moleculares variaron en un intervalo de

2000 pb hasta 4000 pb. Se utilizaron dos aislamientos de *S. pyogenes* como controles de peso molecular de la región. El Mga de la cepa de referencia M1 (cepa 300) contiene la secuencia de inserción y el gen *sic*, que en conjunto con los otros genes amplificados, tiene un peso molecular aproximado de 4000 pb. El otro control que se utilizó fue una cepa clínica (cepa 153) que no contiene la secuencia de inserción ni el gen *sic* en Mga y cuenta con un peso molecular aproximado de 2000 pb.

Los resultados fueron diversos, pues el gen *sic* solamente lo tienen los aislamientos tipos M1 de *S. pyogenes*. La región Mga de los diferentes tipos M analizados mostró los siguientes tamaños: en dos cepas (301 y 304) que contenían IS1562 en esa zona fue de aproximadamente 3000 pb; para las cepas (163, 222, 306, 311 y 312) en las que además de la secuencia de inserción se encontraban otros genes adyacentes (por ejemplo, genes similares a *emm*) el tamaño fue superior a 3000 pero menor a 4000 pb. Para aquellas cepas que no contienen IS1562 ni otros genes adicionales en la región (158, 204, 213, 305, 317 y 302) su Mga mostró un peso de 2000 pb. La cepa 301 (cepa M2) carece de la secuencia de inserción, sin embargo, su región Mga posee un tamaño de aproximadamente 3000 pb, lo que indica la presencia de algún gen dentro de ésta, cuyo peso sea equivalente al del elemento IS1562.

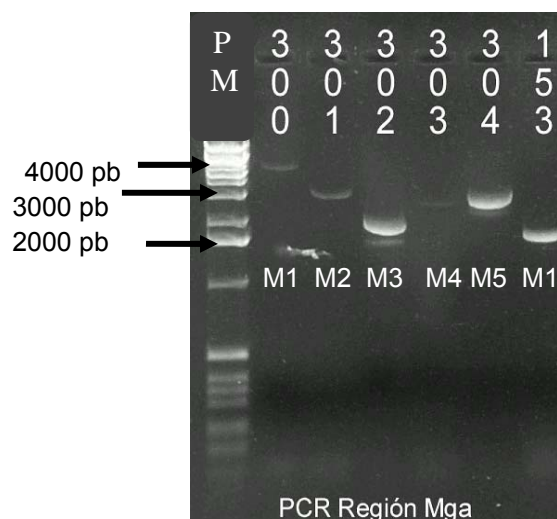


Figura 11. Ejemplos de amplificados de la región Mga. En el primer carril se colocó PM= Marcador de peso molecular 1 kb ADN Extensión Ladder (Life Technologies®). Del carril 2 al 7 se colocaron los amplificados de Mga. El carril 2 corresponde a la cepa de referencia M1 (peso de aproximadamente 4000 pb). En el último carril se colocó el producto de Mga de la cepa 153, misma que carece de la secuencia de inserción y de *sic* (peso de aproximadamente 2000 pb)

Para las cepas clínicas se obtuvieron algunos resultados interesantes: la cepa 158 del tipo M1, presentó un peso molecular de la región Mga de 2000 pb, idéntico al peso mostrado por la cepa 153 (M1), de la cual se ha comprobado que carece del gen *sic* y de la secuencia de inserción IS1562. Por tanto, lo anterior hizo suponer que la cepa 158 también carecía de ambos genes en esa región. A su vez, la cepa 249 también del tipo M1, carece del elemento IS1562 en su genoma, pero no del gen *sic*, por lo que su regulón Mga presenta un tamaño cercano a 3000 pb.

Otro hallazgo interesante fue el de las cepas clínicas 163 y 222, ambas del tipo M75, que fueron las únicas de ese tipo M que amplificaron la secuencia de inserción 1562, y posteriormente mostraron un Mga con un tamaño aproximadamente de 4000 pb, por lo que IS1562 podía localizarse en esa región, además de otro gen entre IS1562 y el gen *emm*. Lo anterior nos hace pensar en que al encontrarla en dos cepas M75, mostraba la capacidad y

actividad móvil de dicho elemento dentro de un tipo M al que aparentemente era ajeno.

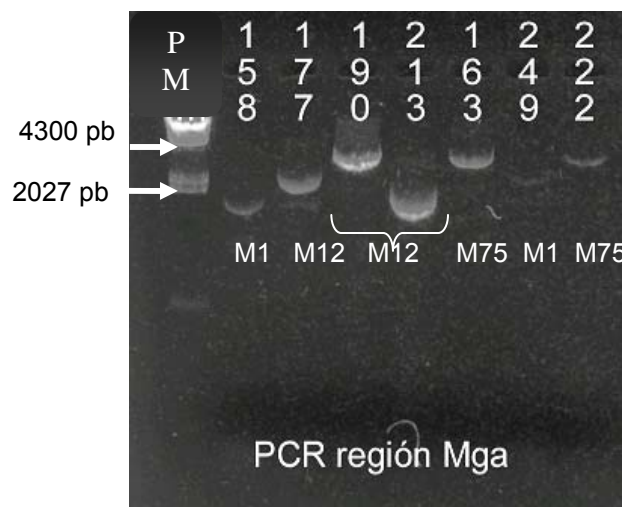


Figura 12. Productos de la PCR de la región Mga en cepas clínicas. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular (Invitrogen®, λ ADN/HindIII, 0.5 µg/mL). Obsérvese que la cepa 158 (M1) presenta un peso molecular de 2000 pb, mientras que las cepas 163 y 222 tienen un peso de 3000 pb. La cepa 249 corresponde a un tipo M1 que carece de la secuencia de Inserción 1562 en su genoma.

5.3 Amplificación del elemento IS1562 dentro de la región Mga

La secuencia de inserción 1562 se amplificó a partir de la región Mga, en los casos en que el peso molecular del regulón estaba aproximadamente entre 2000-4000 pb. Por ejemplo, como se observa en la Figura 13, el amplificado de la región Mga para la cepa 303 (cepa de referencia) mostró un peso cercano a 3000 pb, lo que hace suponer que la secuencia de inserción está dentro de esta región. En la figura 13 se puede apreciar un amplificado positivo para IS1562 dentro del Mga de esta cepa.

Lo mismo se realizó con las cepas clínicas, por ejemplo, la secuencia de inserción 1562 dentro de la región Mga de las cepas 163 y 222, ambas M75. Al

contrastar este resultado con el peso molecular del regulón *Mga* obtenido para las dos, nos sugiere que IS1562 se encontraba en esa región. No obstante, para estas cepas en particular, permanece la interrogante acerca de que otro gen pudiera estar entre IS1562 y *emm* ya que el peso molecular del *Mga* fue de aproximadamente 4000 pb.

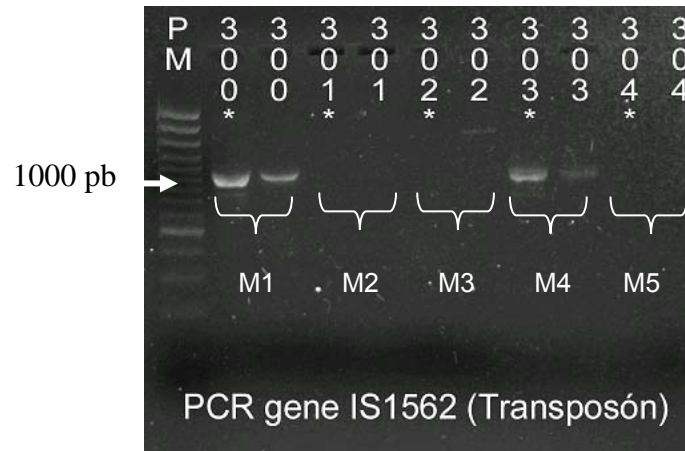


Figura 13. Ejemplos de amplificados de IS1562 en cepas de referencia. Las cepas con asterisco fueron los amplificados de IS1562 a partir de la región *Mga* como templado, mientras que las cepas sin asterisco representan el amplificado de IS1562 a partir del genoma. Lo anterior se realizó como control positivo, puesto que el resultado de la secuencia de inserción dentro del genoma ya se conocía.

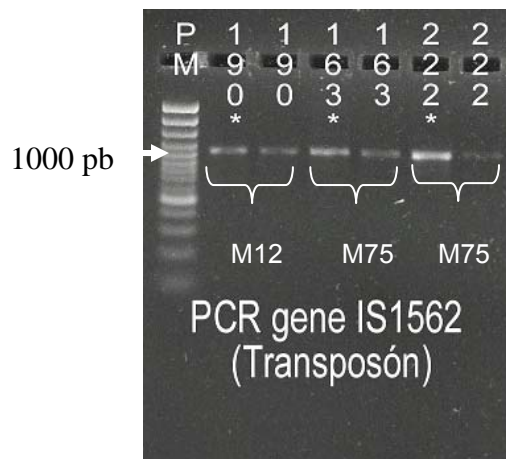


Figura 14. Ejemplos de amplificados de IS1562 en cepas clínicas. Al igual que para las cepas de referencia, se utilizó como control positivo) un amplificado de IS1562 a partir del genoma. Las cepas con asterisco son amplificados de IS1562 a partir de la región *Mga*. La cepa 190 corresponde a un tipo M1, mientras que las cepas 163 y 222 son tipo M75. Se utilizó como marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentans ®).

5.4 PCR utilizando primers combinados (M-IS e IS-C5)

Una vez reconocidas algunas de las cepas que tenían la secuencia de inserción dentro del regulón Mga, se realizaron las reacciones utilizando las combinaciones de primers. Los resultados fueron variados, pues se obtuvieron diferentes pesos moleculares. Con el PCR combinado denominado M-IS se utilizaron los primers *emm1A** - IS1562R, por lo que el peso molecular esperado era aproximadamente de 2400 pb; o menor, en los casos en los que solo existiera una secuencia intergénica entre esos genes. Las cepas M1, al poseer el gen *sic* en ese espacio (excepto la cepa 158), mostraron un tamaño ligeramente mayor a 2400 pb, debido a las variaciones en el peso de este gen. Para el caso del otro PCR combinado denominado IS-C5, en el que se utilizaron los primers IS1562F-*SBR*, los productos esperados fueron de un tamaño de 1600 pb, ya que este producto incluía a la secuencia de inserción, el inicio del gen *ScpA* y la secuencia entre ambos. Todas las cepas mostraron este peso molecular, pues ninguna presentaba algún gen que modificara su tamaño.

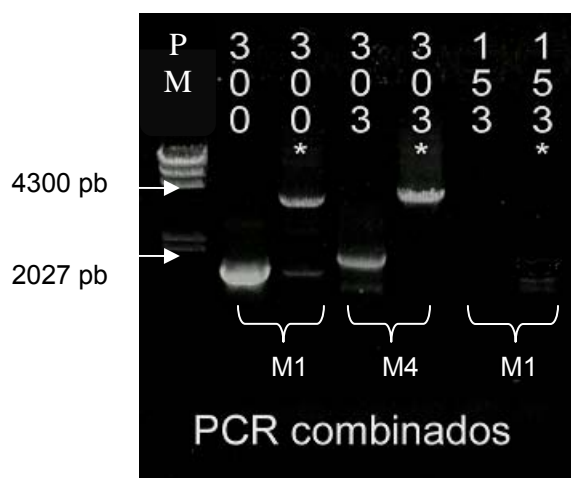


Figura 15. Amplificados M-IS e IS-C5. Las muestras marcadas con asterisco representan el producto de M-IS, mientras que las otras son el producto de IS-C5.

Como se observa en la Figura 15, la cepa 300 muestra un peso superior a 2400 pb, debido a la presencia del gen *sic* responsable por la variación en su peso. IS-C5 en esta cepa tiene un peso de alrededor de 1600 pb, pues ningún gen se encuentra entre IS1562 y el inicio del gen *ScpA*. El mismo caso se aprecia para la cepa 303 (M4), aunque el tamaño de su M-IS es aproximadamente 4000 pb debido a la presencia de otro gen entre *emm* e IS1562. Probablemente se trate de un gen similar a *emm*. La cepa 153 no posee el transposón en esa región, por lo que no amplificó con ningún combinado.

6. Análisis del elemento IS1562 en las cepas clínicas y de referencia

6.1 Secuencias de los amplificados de IS1562

Para determinar el alelo al que pertenecen los productos de IS1562, se seleccionaron 6 cepas de diferentes tipos M para ser secuenciadas. Los tipos M seleccionados fueron M1, M75, M55, M61, M62 y M63. Las secuencias electrónicas de IS1562 fueron comparadas entre ellas para conocer el grado de similitud entre sí. Las secuencias mostraron alrededor de 98.5 % de identidad, aunque las únicas que obtuvieron un 99% fueron las cepas clínicas 222 y 163, ambas M75. Los electroferogramas fueron analizados para resolver las ambigüedades presentes en las secuencias electrónicas. Dichas ambigüedades fueron responsables del 1% de variación entre las cepas M75, aunque no son consideradas de importancia pues muchas fueron resueltas.

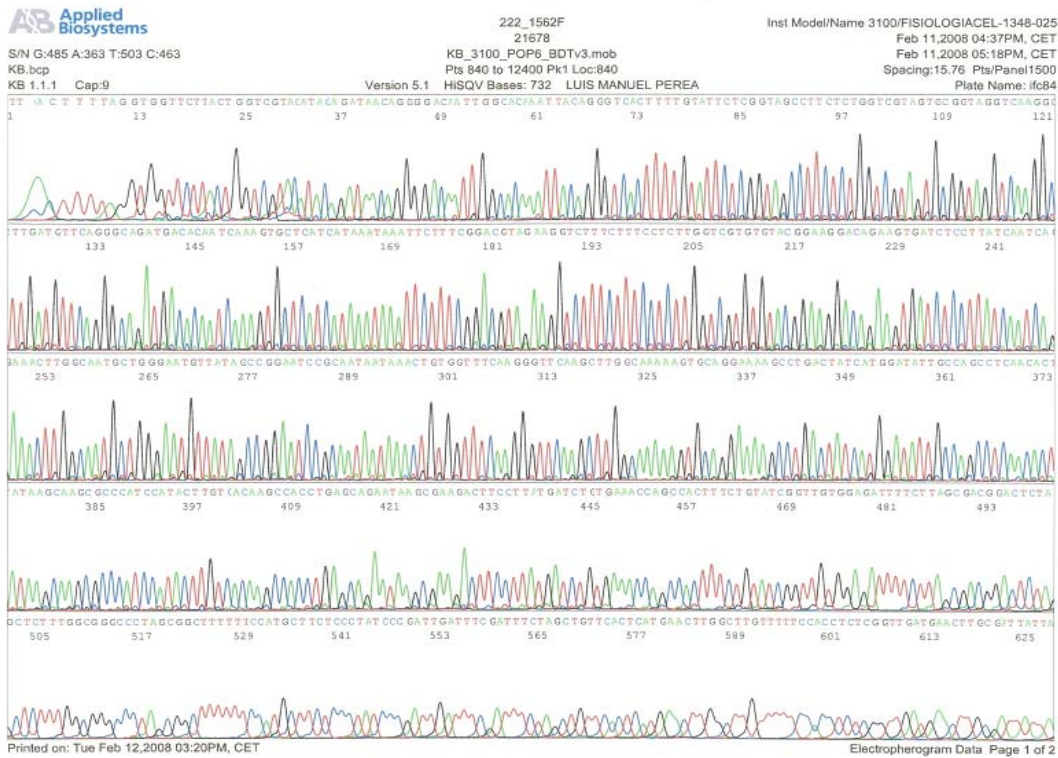


Figura 18. Electroferograma de la cepa 222, correspondiente a las secuencia de IS1562.

Al ser comparadas, las secuencias con las reportadas en el GenBank el resultado fue que el IS1562 de las cepas M75, M55 (cepa 347), M62 (cepa 354) y M63 (cepa 355) tuvieron un 99% de similitud con las secuencias de IS1562 reportadas para M12 (con clave de acceso al GenBank [gi|94545005|CP000261.1](#)), M18 (con clave de acceso [gi|19747722|AE009990.1](#)), M4 (con clave de acceso [gi|94546904|CP000262.1](#)) y M6 (con clave de acceso [gi|50902420|CP000003.1](#)); lo cual indica que la secuencia de inserción presente en todos estos tipos M pertenece al mismo alelo, es decir, al alelo reportado de M12. Para el alelo de IS1562 reportado en el tipo M1, mostraron una identidad de 97%.

Una vez comparadas las secuencias problema, se realizó un árbol filogenético usando el software MegAlign® (DNASTar® Madison Wis) para conocer la relación entre las secuencias analizadas.

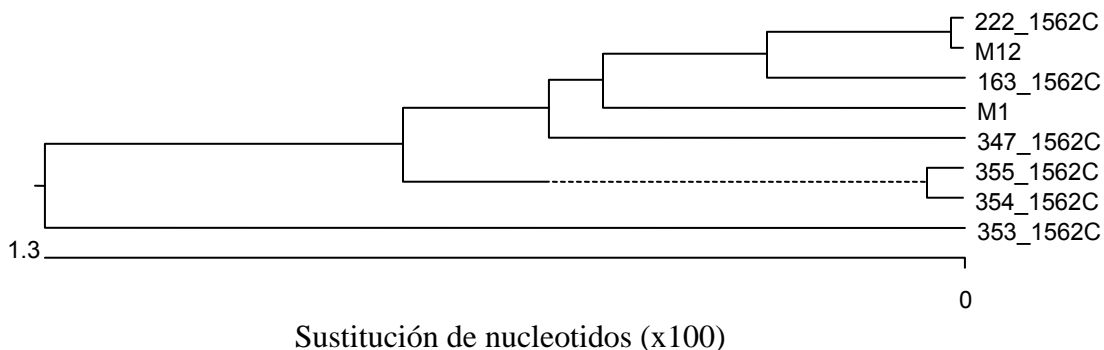


Figura 19. Árbol filogenético armado con las secuencias de IS1562 de algunos de los tipos M analizados y los dos alelos existentes de IS1562: M1 y M12.

Como se observa en la Figura 19, la similitud entre la cepa 222 (M75) y la cepa M12 reportada en el GenBank son casi idénticas, mientras que ambas con la cepa 163 (M75) muestran una sustitución de 30 nucleótidos, variación ocasionada por las ambigüedades presentes en la secuencia de la cepa 163. La línea punteada indica variaciones entre la secuencia de las cepas 355 (M63) y 354 (M62). Ninguna cepa corresponde al alelo de M1, sin embargo, la cepa 353 (M61) mostró una sustitución de 130 nucleótidos respecto a las demás, lo que indica que no hubo gran similitud con ellas. Esto podría sugerir la presencia de algún alelo diferente a los reportados hasta ahora.

Las similitudes y divergencias encontradas se resumen a continuación en la Tabla 6.

Cepa	Tipo M	% de Identidad con M12	% de Divergencia con M12
222	M75	100	0
163	M75	99	0
347	M55	95.7	1.5
353	M61	85.2	2.8
354	M62	98.2	1.1
355	M63	98.3	1.1

Tabla 6. Porcentajes de similitud y divergencia de las secuencias IS1562 para las cepas clínicas M75 y de referencia, con los alelos de IS1562 M1 y M12.

La similitud entre los alelos de IS1562 para M1 y M12 es de 97.4% con una divergencia de 1.1%. De acuerdo a esto y a que las cepas mostraron una alta identidad (excepto la cepa 353) con la secuencia de inserción presente en M12, se determinó a la IS1562 de M12 como el alelo predominante en las cepas secuenciadas.

6.2 Secuencias de la región Mga.

Al secuenciar el regulón se utilizaron el par de primers *emm1A**-SBR. Al secuenciar con el primer *emm1A** la secuencia obtenida correspondía únicamente al gen *emm*, así que no se podía conocer la secuencia presente entre este gen y la secuencia de inserción. Lo que se intentó fue secuenciar utilizando un primer que se uniera a la parte final del gen *emm* para poder conocer la secuencia siguiente. Desafortunadamente, ninguno de los primers empleados (*P6C* y *M1310*) se unió a esa parte del gen *emm* de los tipos M diferentes a M1, por lo que no fue posible la secuenciación de la región intergénica de *emm* e IS1562. Se sugiere diseñar algún primer que pueda unirse

a una zona cercana al final del gen *emm* y que esté presente en todos los tipos M.



Figura 20. Electroferograma del gen *emm1*. Se utilizó el *primer emm1A** para secuenciar la región Mga.

No obstante, utilizando el *primer SBR* si fue posible obtener la secuencia de la región entre IS1562 y el gen *scpA*, demostrando su localización adjacente como se suponía por el PM del producto amplificado.

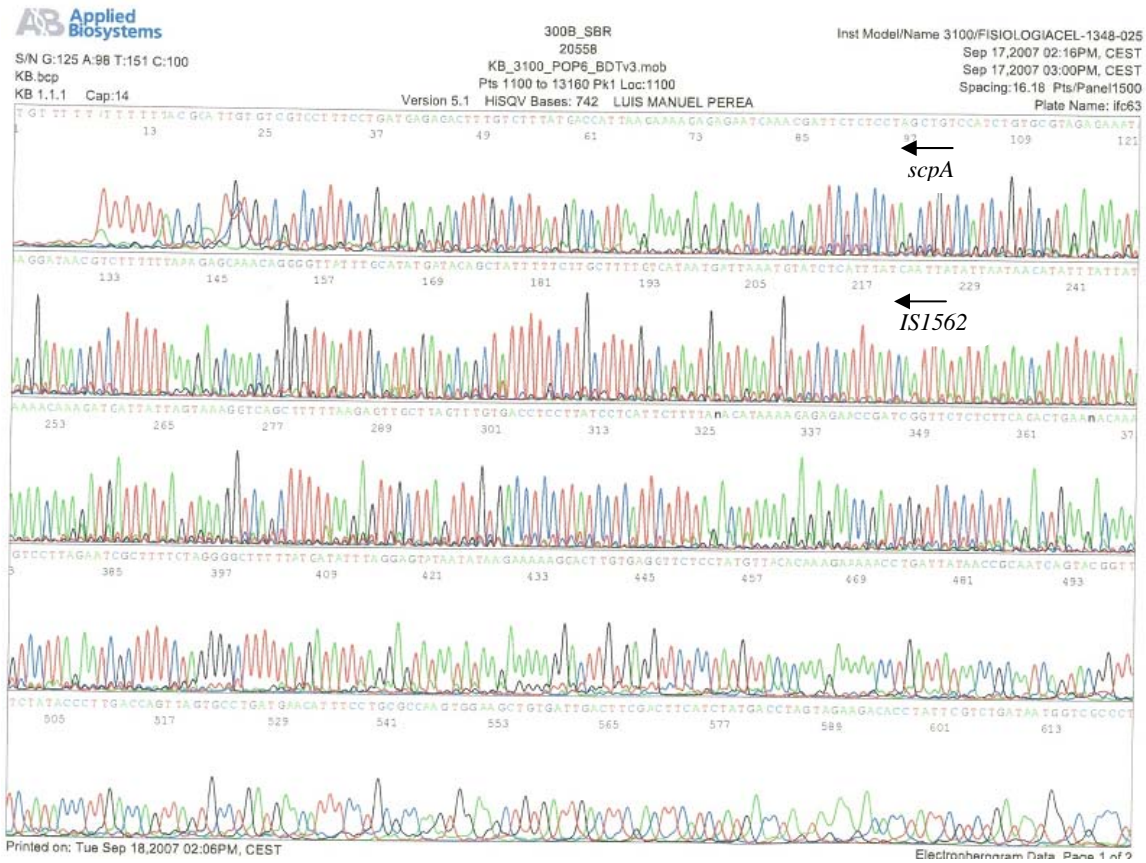


Figura 21. Cromatograma correspondiente a la secuencia intergénica de IS1562 y *ScpA*, y a la parte final del transposón, mismas que se encuentran indicadas con las flechas. Se utilizó el primer SBR para secuenciar esta región.

6.3 Secuencias de los PCR combinados

El uso del PCR combinado M-IS confirmó la presencia de IS1562 dentro de la región Mga, pues la secuencia obtenida corresponde al inicio de éste. Por su parte, la secuencia del combinado IS-C5 mostró el final de IS1562. Con ambos la presencia de la secuencia de inserción en esta zona quedó demostrada.

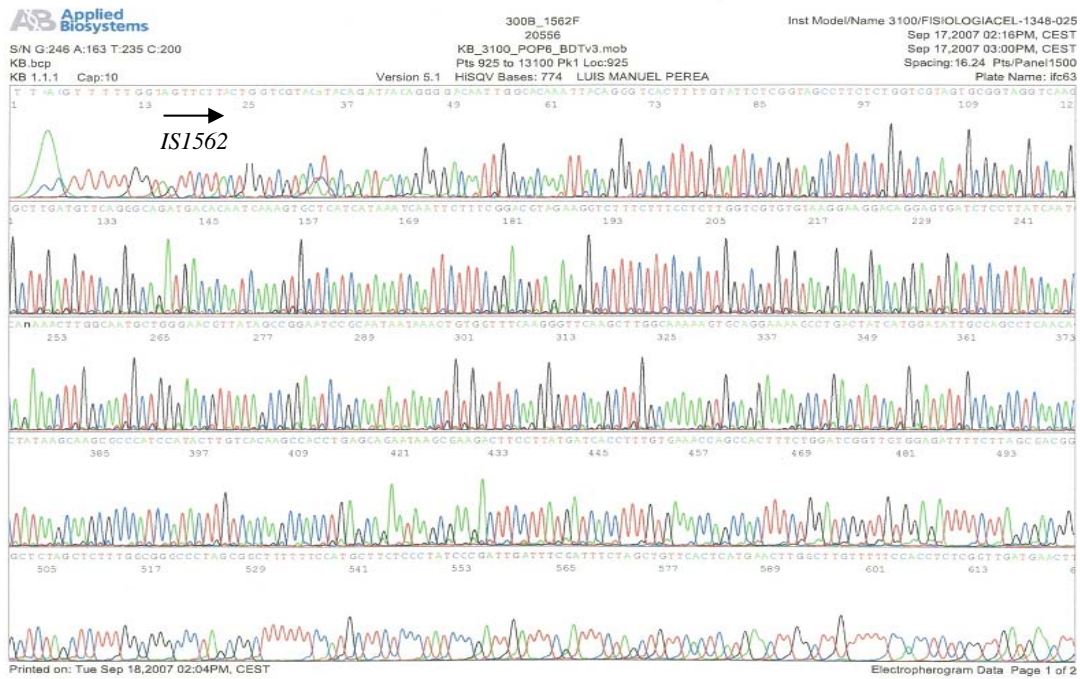


Figura 22. Cromatograma del PCR combinado M-IS. Muestra con la flecha la parte principal de la secuencia de inserción 1562.

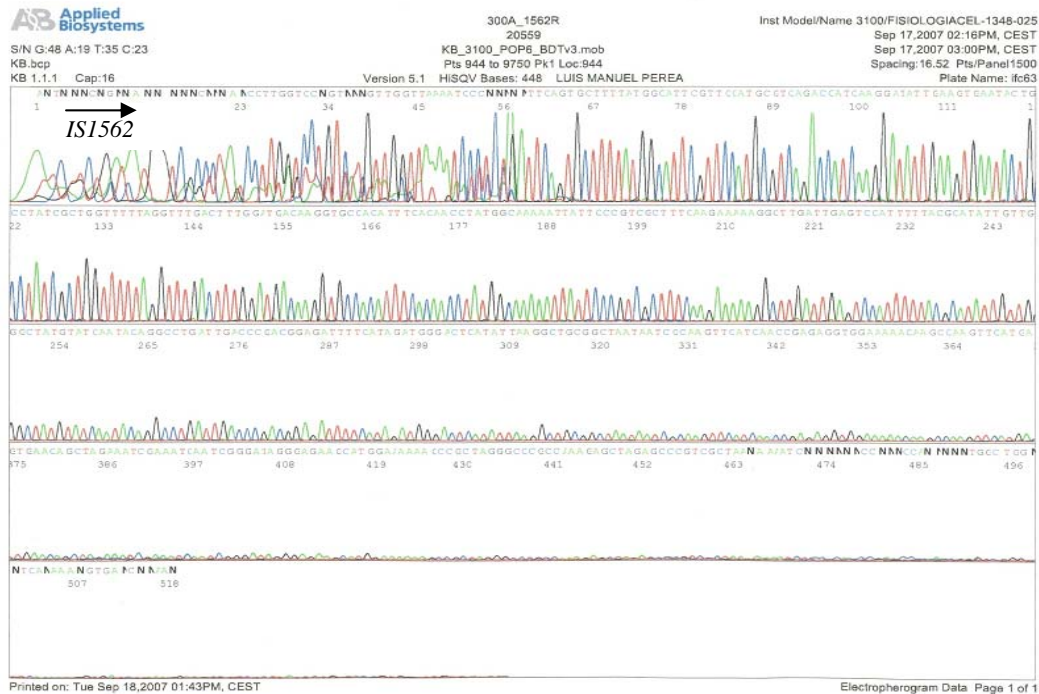


Figura 23. Cromatograma del combinado IS-C5. La secuencia muestra con una flecha la parte final del IS1562.

Lo anterior, permite tener una opción más para demostrar la presencia del elemento IS1562 dentro del Mga de las cepas que así lo presuman.

Además, la importancia de los productos combinados radica en que se puede vislumbrar la existencia de un gen entre la secuencia de inserción 1562 y el gen *emm*, lo cual se corrobora mediante la secuenciación utilizando *primers* que permitan abarcar esa zona del Mga.

6.4 Importancia de la determinación alélica y ubicación del elemento IS1562

Como se mencionó anteriormente existen dos alelos reportados para la secuencia de inserción 1562 (25). En algunos estudios se ha demostrado la predilección de este elemento móvil por localizarse en regiones asociadas a la virulencia de las cepas que lo contienen. Así es el caso de las cepas M19 aisladas de casos de fascitis necrotizante (26) donde IS1562 se encuentra asociada a una región del genoma a la que ellos llamaron *sil* (Streptococcal invasive locus) y que es la responsable de la capacidad invasiva de esas cepas. La secuencia de inserción presente en ellas es idéntica a la reportada cuando el genoma completo de cepas M18 fue descrito (48). En el caso de las estas últimas, la IS1562 se encontraba dentro de una isla de patogenicidad. Cabe resaltar la importancia de conocer la ubicación de la secuencia de inserción dentro del genoma, para el caso de este estudio, dentro de la región Mga. No obstante, aparecen en escena los alelos de esta secuencia, pues aún no se ha descrito a qué alelo pertenecen los elementos IS1562 de las cepas M19 y M18. Este dato sería interesante ya que permitiría conocer la posible relevancia de los alelos de IS1562 y la probable virulencia que le conferiría a la cepa que lo

contenga. Sin embargo, con los datos obtenidos en este trabajo, se puede decir que el alelo de IS1562 reportado en M12 se encontró en casi todas las cepas secuenciadas.

Se sugiere analizar la posibilidad de diseñar primers específicos que reconozcan cada uno de los alelos reportados para IS1562 y analizar su presencia en las cepas positivas con la finalidad de observar si se cuenta con cepas que contengan ambos alelos.

Al respecto de las cepas M75 que fueron las que mostraron la similitud más alta con el alelo de M12, y recordando que la región Mga de ellas evidenciaba la presencia de un gen presente entre IS1562 y el gen *emm*, se especula que dicho gen sea el DRS (Distantemente relacionado a *sic*) descrito en M12. Por lo que el siguiente paso sería intentar amplificar y secuenciar dicho gen.

CONCLUSIONES

- ✓ La presencia de IS1562 mostró una importante distribución tanto en las cepas de referencia (58%) como en las cepas clínicas (66%) analizadas.
- ✓ La secuencia de inserción 1562 se encuentra dentro del regulón Mga en algunas cepas de diferentes tipos M, lo que demuestra la afinidad de este elemento móvil para asociarse a regiones en el genoma responsables de la virulencia.
- ✓ Se encontraron un par de cepas M1 que no albergaron al elemento IS1562 dentro de su genoma, lo cual sugiere que no todas las cepas M1 lo contienen.
- ✓ De las cepas clínicas analizadas, en el 62% de los tipos M la presencia de la secuencia de inserción 1562 fue constante.
- ✓ IS1562 se encontró en cepas a las la literatura no la asociaba, por lo que estos resultados podrían apoyar la sugerencia de algunos autores acerca de que la transferencia horizontal participa de manera importante en el intercambio genético entre cepas de *Streptococcus pyogenes*.
- ✓ En las cepas secuenciadas el alelo de IS1562 prevalente fue el asociado a M12.
- ✓ Es importante conocer el tipo de alelo de IS1562 presente en las cepas, pues puede estar asociado a su virulencia.
- ✓ La elevada movilidad de IS1562 en poblaciones de *S. pyogenes* puede contribuir a que ciertas cepas causen padecimientos a los que antes no

se encontraban asociados; ello debido al posible acarreo de nuevos genes.

- ✓ IS1562 contribuye a la variabilidad y diversidad genética de *Streptococcus pyogenes*.
- ✓ Es posible que el elemento IS1562 haya participado en el acarreo del gen *sic* a la región Mga de las cepas M1 durante su proceso evolutivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Akesson, P., Sjöholm, A.G. and Björck L. (1996). Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function . J. Biol. Chem. 271: 1081-1088.**
2. **Ashbaugh, C.D., Warren, H.B., Carey, V.J., and Wessels, M.R. (1998). Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft tissue infection. J. Clin. Invest. 102: 550–560.**
3. **Berge, A., Rasmussen, M. and Björck, L. (1998). Identification of an insertion sequence located in a region encoding virulence factors of *Streptococcus pyogenes*. Infect. Immun. ; 66:3449-3453.**
4. **Bessen, D.E., Manoharan, A., Luo, F., Wertz, J.E., and Robinson, D.A. (2005). Evolution of transcription regulatory genes is linked to niche specialization in the bacterial pathogen *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol. 187: 4163–4172.**
5. **Bisno, A.L., and Stevens, D.L. (1996). Streptococcal infections of skin and soft tissues. N. Engl. J. Med. 334: 240–245.**
6. **Brooks, F.G., Butel, S.J. and Morse, A.S. (2002). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17^a ed. Manual Moderno. D.F., México: 251-259.**

7. **Binks, M.,** Mc Millan D. and Sriprakash, K.S., (2003). **Genomic location and variation of the gene for CRS, a complement binding protein in the M57 Strains of *Streptococcus pyogenes*.** Infect. Immun. 71: 6701-6706.
8. **Chen, C.,** Bormann, N., and Cleary, P.P. (1993). **VirR and Mry are homologous trans-acting regulators of M protein and C5a peptidase expression in group A streptococci.** Mol. Gen. Genet. 241: 685–693.
9. **Cleary, P.P.,** Kaplan, E.L., Handley, J.P., Wlazlo, A., Kim, M.H., Hauser, A.R., and Schlievert, P.M. (1992). **Clonal basis for resurgence of serious *Streptococcus pyogenes* disease in the 1980s.** Lancet. 339: 518–521.
10. **Courtney, H.S.** and Hasty, D.L. (1999). **Serum opacity factor is a major fibronectin-binding protein and a virulence determinant of M type 2 *Streptococcus pyogenes*.** Mol. Microbiol. 32: 89–98.
11. **Cunningham, M.W.** (2000). **Pathogenesis of group A streptococcal infections.** Clin. Microbiol. Rev. 13: 470–511.
12. **Davies, H.D.,** McGeer, A., Schwartz, B., Green, K., Cann, D., Simor, A.E., and Low, D.E. (1996). **Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario Group A Streptococcal study group.** N. Engl. J. Med. 335:547–554.

-
- 13. Facklam, R. Manual de Procedimientos. Aislamiento e Identificación de Estreptococos.** U.S. Department of Health, Education and Welfare. Atlanta, Georgia; 37-40.
- 14. Facklam, R.,** Beall, B., Efstratiou, A., Fischetti, V., Johnson, D., Kaplan, E., Kriz, P., Lovgren, M., Martin, D., Schwartz, B., Totolian, A., Bessen, D., Hollingshead, S., Rubin, F., Scott, J., Tyrrell, G., **(1999). *emm* typing and validation of provisional M types for Group A streptococci.** *Emerg. Infect. Dis.* 5: 247–253.
- 15. Fernie-King, B.A.,** Seilly, D.J., Davies, A. and Lachman, P.J., **(2002). Streptococcal inhibitor of complements inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme.** *Infect. Immun.* 70:4908-4916.
- 16. Ferretti, J.J.,** McShan, W.M., Ajdic, D., Savic, D.J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov, A., N., Kenton§, S., Shing, H., Lin§, L., S., P., Qian§, Y., Jia§, H., G., Najjar§, F., Z., **(2001). Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4658–4663.
- 17. Figueroa-Martínez, F.J. (2004). Tipificación Molecular del gen que codifica para la proteína M (*emm*) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico.** Tesis de licenciatura QFB, México, Facultad de Química, UNAM.

-
18. Fischetti, V.,A., Novick, R., Ferreti, J.,J. (2000). **Gram-Positive Pathogens**. ASM Press. Washington, D.C.: 25,27,53.
19. Galas, D.J., and M. Chandler. (1989). **Bacterial insertion sequences. Mobile ADN**. AMS, Washington, D.C.:109-162.
20. Garza Velasco, R. (1999). **Bacterias Patógenas. Parte III**. Facultad de Química, UNAM. D.F., México.: 35-37;40-44.
21. Haanes, E.J., Heath, D.G., and Cleary, P.P. (1992). **Architecture of the vir regulons of group A streptococci parallels opacity factor phenotype and M protein class**. J. Bacteriol. 174: 4967–4976.
22. Hacker, J., G. Blum-Oeler, I. Müldorfer, and H. Tschäpe. (1997). **Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution**. Mol. Microbiol. 23:1089-1097.
23. Haanes, E.J., and Cleary, P.P. (1989). **Identification of a divergent M protein gene and an M protein-related gene family in *Streptococcus pyogenes* serotype 49**. J. Bacteriol. 171: 6397–6408.
24. Hartas, J. and Sriprakash K.S., (2006). **The Mga regulon of group A *Streptococcus* sequences types *emm12* and *emm55* contain related IS1562 alleles**. Martin, D. R., Tagg, J.R., Streptococci and Streptococcal Diseases. Entering the New Millennium. Proceeding of the XVI Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases.: 371-373.

25. Hartas, J. and Sriprakash K.S., (1999). ***Streptococcus pyogenes* strains containing *emm12* y *emm55* possess a novel gene coding for distantly related SIC protein.** *Microl. Pathog.* 26:25-33.
26. Hidalgo-Grass, C., Ravins, M., Dan-Goor, M., Jaffe, J., Moses, A.E., and Hanski, E. (2002). **A locus of group A *Streptococcus* involved in invasive disease and ADN transfer.** *Mol. Microbiol.* 46: 87-89.
27. Hoe, N., Nakashima, K., Grigsby, D., Pan, X., Jun Dou, S., Naidich, S., Garcia, M., Kahn, E., Bergmire-Sweat, D. and Musser, J.M. (1999). **Rapid Molecular Genetic Subtyping of Serotype M1 Group A *Streptococcus* Strains.** *Emerg. Infec. Dis.* 5: 254-262.
28. Hollingshead, S.K., Readdy, T.L., Yung, D.L., and Bessen, D.E. (1993). **Structural heterogeneity of the *emm* gene cluster in group A streptococci.** *Mol. Microbiol.* 8: 707–717.
29. Hondorp, E.R., and McIver, K.S., (2007). **The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener.** *Mol. Microbiol. Rev.* 66: 1056-1065.
30. Ji, Y., McLandsborough, L., Kondagunta, A., and Cleary, P.P. (1996). **C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice.** *Infect. Immun.* 64: 503–510.

-
31. **Low, D.E., Schwartz, B., and McGeer, A. (1998). The reemergence of severe group a streptococcal disease: an evolutionary perspective.** Washington, DC: ASM Press.
32. **Lewin, B., (1997). Genes.** Oxford University Press. New York.: 563-577.
33. **Lukomski, S., Sreevatsan, S., Amber, C. and Reichardt, W., (1997). Inactivation of *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease significantly decreases mouse lethality of serotype M3 and M49 strains.** J. Clin. Invest. 99: 2574–2580.
34. **Mandell, D., Bennet, J. and Dolin, R. (2000). 5th ed. Principles and Practice of Infectious Disease.** Churchill Livingstone.
35. **Mclver, K.S., and Scott, J.R. (1997). Role of *mga* in growth phase regulation of virulence genes of the group A streptococcus.** J. Bacteriol. 179: 5178–5187.
36. **Mejía Espinosa Raúl. (2007). Caracterización Molecular de los genes asociados a la virulencia en cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* del serotipo M1.** Tesis de licenciatura QFB, México, Facultad de Química, UNAM.
37. **Moses, A.E. and Wessels, M.R.,(1997). Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A *Streptococcus*.** Infect. Immun. 65:64-71.

-
38. **Musser, J.M.**, Kapur, V., Szeto, J., Pan, X., Swanson, D.S., and Martin, D.R. (1995). **Genetic diversity and relationships among serotype M1 strains of *Streptococcus pyogenes***. *Dev. Biol. Stand.* 85: 209–213.
39. **Murray, P.**, et. al., (2002). **Medical Microbiology**. 4^a ed. Mosby. St. Louis, Missouri.:213-216.
40. **Pandiripally, V.**, Gregory, E., and Cue, D. (2002). **Acquisition of regulators of complement activation by *Streptococcus pyogenes* serotype M1**. *Infect. Immun.* 70: 6206–6214.
41. **Perea-Mejía, L.M.** (2003). **Streptococcus**. En Tay-Zavala, J., Gutiérrez-Quiroz, M., López-Martínez, R., Manjares-Zavala, M.A. Molina-López, J. **Microbiología y Parasitología Médicas**. 3^a ed. Méndez Editores. D.F., México.: 76-82.
42. **Perea-Mejía, L.M.**, Figueroa, F., Pérez-Romano, L., Inzunza-Montiel, A.E., Dávila, R., Garza-Velasco, R., Cravioto, A. (2006). **Prevalence of M-types and streptococcal pyrogenic exotoxin A and C genes in group A streptococcal islotes from uncomplicated pharyngitis in Mexico City**. *International Congress Series*; 1289: 38-41.
43. **Podbielski, A.** (1993). **Three different types of organization of the vir regulon in group A streptococci**. *Mol. Gen. Genet.* 237: 287–300.
44. **Ryan, K. J.**, Ray, C.G., (2005). **Sherris: Microbiología Médica**. 4^a ed. Mc Graw-Hill. D.F., México: 300-304.

-
45. Salyers, A. and Whitt, D. (2002). **Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach.** 2nd ed. ASM Press. Washington, D.C.:233-235.
46. Stanley, J., Linton, D., Desai, M., Efstratiou, A., and George, R. (1995). **Molecular subtyping of prevalent M serotypes of *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease.** J. Clin. Microbiol. 33: 2850–2855.
47. Scott, J.R., Cleary, P., Caparon, M.G., Kehoe, M., Heden, L., Musser, J.M., Hollingshead, S., Podbielski, A. (1995). **New name for the positive regulator of the M protein of group A streptococcus.** Mol. Microbiol. 17: 799-809.
48. Smoot, J.C., Barbian, K.D., Van Gompel, J.J., Smoot, L.M., Chaussee, M.S., Sylva, G.L., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Porcella, S.F., Parkins, L.D., Beres, S.B., and Musser, J.M. (2002). **Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 4668-4673.
49. Stockbauer, K., E., Grigsby, D., Pan, X., Fu, Y., Perea-Mejia, L., M., Cravioto, A. and Musser, J., M. (1998). **Hypervariability generated by natural selection in an extracellular complement-inhibiting protein of serotype M1 strains of group A *Streptococcus*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3128-3133.
-

- 50. Whatmore, A.M., and Kehoe, M.A. (1994) Horizontal gene transfer in the evolution of group A streptococcal *emm*-like genes: gene mosaics and variation in Vir regulons. Mol. Microbiol. 11: 363–374.**