



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

**TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Streptococcus pyogenes*
DE EXUDADOS FARÍNGEOS**

**TESINA PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
PRESENTA:**

BIOL. DIANA RODRÍGUEZ CLEMENTE

TUTOR: M. EN C. LUIS MANUEL PEREA MEJÍA

MEXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

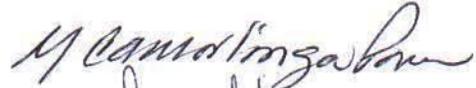
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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: Dra. Margarita Camorlinga Ponce



Vocal: M. en C. María de los Ángeles Granados Silvestre



Secretario: Dra. Claudia Huesca Gómez



Primer suplente: M. en C. Isela Montufar Robles

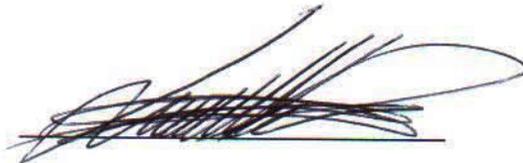


Segundo suplente: M. en C. Jesús Reséndiz Sánchez



Trabajo realizado en el Laboratorio de Epidemiología Molecular, Torre de Investigación. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F. Financiada con apoyos del proyecto DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN221511) y FM 066-2012.

Asesor del Tema:



M. en C. Luis Manuel Perea Mejía

Sustentante:



Biol. Diana Rodríguez Clemente

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres, Ing. Humberto Javier Rodríguez Juárez y Enfra. María Magdalena Clemente Mendoza, que cuentan con mi amor incondicional y sin quienes este trabajo no habría sido posible.

A mis hermanos Ana Sofía y Jose Javier.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente.

A mi director de tesina el M. en C. Luis Manuel Perea Mejía, por haberme brindado su apoyo en todos los aspectos en que se le puede brindar apoyo a un ser humano.

A la Dra. Alma Inzunza por enseñarme con paciencia y ánimo cada una de las técnicas realizadas.

A los miembros del jurado por haber dedicado parte de su valioso tiempo a este trabajo.

A las Dras. L.Ongay y G. Codiz de la Unidad de Biología Molecular del IFC UNAM, por la determinación de las secuencias.

A DGAPA-PAPIIT, UNAM por la beca otorgada para realizar mi tesina.

Al Laboratorio de Epidemiología Molecular de la Facultad de Medicina, UNAM.

RESUMEN

Introducción.- Debido al tamaño y la severidad de las enfermedades provocadas por Estreptococos de grupo A (EGA), es necesaria la vigilancia epidemiológica para detectar cambios en la distribución de los tipos M, para lo cual se ha utilizado el análisis de la región hipervariable de la proteína M como blanco primario en la tipificación epidemiológica de los EGA.

Objetivo.- Realizar la tipificación molecular de los tipos M de 131 cepas de EGA de origen clínico obtenidas de exudados faríngeos procedentes del Laboratorio Olarte y Akle, y de la Unidad de Medicina Familiar 92 del IMSS, en el período de Junio del 2011 a Diciembre del 2012.

Metodología.- A partir del DNA genómico extraído de cada cepa, se amplificaron los genes *emm*, *sic* y *sof*, realizando una clasificación preliminar de los tipos M presentes. Posteriormente se realizó la digestión de los productos de PCR del gen *emm* por la enzima *Ddel*, para obtener los patrones de restricción y así poder identificar el tipo M específico de cada cepa.

Resultados.- Se encontraron EGA con patrones de restricción nuevos para los tipos M6, M44, M75, M87 y se tipificaron siete tipos M que no habían sido reportados previamente. Las frecuencias en los tipos M ha cambiado respecto a estudios en el laboratorio de Epidemiología Molecular en el año 2004, ya que aunque el tipo M1 y M12 se mantienen en los primeros lugares de frecuencia epidemiológica. Se observaron frecuencias altas no esperadas para los tipos *stG6* (10%), M11 (10.7%) y M89 (9.2%), en cambio se observó una frecuencia baja, respecto a la esperada, en el tipo M75. En el laboratorio privado el tipo M más frecuente fue el M89, mientras que en el público fue el M1, además en el laboratorio público se observó una frecuencia alta del tipo M2.

Conclusiones.- Los tipos M1 y M12 permanecen dentro de los más frecuentes en la población estudiada. La distribución de los tipos M de las cepas aisladas en el Laboratorio Olarte y Akle y en la UMF 92 no fue la misma, lo que puede deberse al tipo de población y número de muestras analizadas por laboratorio. De acuerdo a la distribución de los tipos M encontrados en este estudio, el porcentaje de cobertura potencial de la vacuna contra la proteína M se mantendría arriba del 80%.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	5
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	8
ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
Generalidades.....	12
Clasificación.....	13
<i>Streptococcus pyogenes</i>	17
Factores de virulencia.....	19
El exudado faríngeo y la faringitis.....	24
Importancia epidemiológica de la proteína M.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	40
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS.....	42
MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
1. Diseño.....	43
2. Criterios.....	43
3. Diagrama de flujo de la metodología.....	44
4. Material biológico.....	45
5. Extracción del DNA genómico.....	46

	Página
6. Amplificación del gen <i>emm</i>.....	47
Diagrama de las condiciones utilizadas en la PCR.....	48
7. Amplificación de los genes <i>sic</i> y <i>sof</i>.....	49
8. Digestión de los productos de PCR del gen <i>emm</i>.....	51
9. Clasificación de los patrones de restricción.....	52
RESULTADOS.....	54
1. Extracción del DNA genómico.....	54
2. Amplificación del gen <i>emm</i>.....	55
3. Amplificación de los genes <i>sic</i> y <i>sof</i>.....	56
4. Obtención y clasificación de los patrones de restricción del gen <i>emm</i>.....	58
Diagrama de flujo para la tipificación.....	65
5. Resultados de la tipificación.....	69
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	76
ANEXOS.....	78
REFERENCIAS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Características de la secuencia completa de la proteína M6.	32
Figura 2. Extracción de DNA genómico de las cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> de origen faríngeo mediante el kit DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN).....	54
Figura 3. Amplificación del gen <i>emm</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> obtenidos a través de la PCR.....	55
Figura 4. Amplificación de los genes <i>sic</i> y <i>sof</i> en cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i>	56
Figura 5. Patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática del gen <i>emm</i>	58
Figura 6. Nuevos patrones de restricción encontrados.....	60
Figura 7. Ejemplo de un gel en el que se observan patrones de diferentes.....	61
Figura 8. Patrones de restricción de las cepas M11, M89 y <i>stG6</i>	61
Figura 9. Patrones de restricción de las cepas <i>stG6</i>	63
Figura 10. Patrones de restricción de las cepas identificadas con tipo M4 y M28.....	64
Figura 11. Patrones de restricción más frecuentes de cada uno de los 20 tipos M encontrados.....	69

	Página
Tabla I. Clasificación de las especies del género <i>Streptococcus</i> basándose en la secuencia del gen <i>16SrRNA</i>	15
Tabla II. Ejemplos de tipos M asociados con presentaciones epidemiológicas y clínicas específicas.....	30
Tabla III. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen <i>emm</i>	47
Tabla IV. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de los genes <i>sic</i> y <i>sof</i>	49
Tabla V. Oligonucleótidos usados en este estudio.....	50
Tabla VI. Pesos moleculares promedio de los amplificadores del gen <i>emm</i> , su coeficiente de variación y el genotipo <i>sof</i> de los diferentes tipos M encontrados.....	57
Tabla VII. Tipos M obtenidos a través de la observación y comparación de los patrones de restricción experimentales y los patrones de referencia del laboratorio.....	59
Tabla VIII. Tipos M obtenidos a través de la secuenciación del gen <i>emm</i>	62
Tabla IX. Distribución de los tipos M respecto al número total de cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> tipificadas.....	70
Tabla X. Distribución de los tipos M de <i>Streptococcus pyogenes</i> en relación al laboratorio de origen.....	73
Tabla XI. Clave del CDC y ATCC de las cepas de referencia utilizadas para cada tipo M.....	80

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
µL	Microlitros
µM	Micromolar
aa	aminoácidos
AE	Amortiguador de Elusión
ARDS	Síndrome de distress respiratorio del adulto
ASO	Antiestreptolisina O
AW1	Amortiguador de lavado 1
AW2	Amortiguador de lavado 2
BHI	Infusión cerebro y corazón
C3	Proteína de complemento
C3b	Proteína de complemento
C5a	Anafilotoxina, Proteína de complemento
CD44	Glicoproteína de membrana celular, presente en la superficie de células epiteliales
CDC	Centros para la prevención y Control de Enfermedades
C.V.	Coefficiente de variación
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EGA	Estreptococos del grupo A
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
<i>emm</i>	Gen que codifica para la proteína M de <i>Streptococcus pyogenes</i>
Fc	Fracción constante de las inmunoglobulinas
IFC	Instituto de Fisiología Celular
Ig	Inmunoglobulina
IMSS	Instituto Mexicano de Seguro Social

LPM	Linfocitos polimorfonucleares
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mL	Mililitro
No.	Número
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PRDA's	Pruebas Rápidas de Detección de Antígenos
PYR	Pirolidonil aril-amidasa
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
S.A. de C.V.	Sociedad Anónima de Capital Variable
<i>sic</i>	Gen que codifica para la proteína estreptocócica inhibidora del complemento
<i>sof</i>	Gen que codifica para la proteína conocida como Factor de Opacidad del Suero
Spe	Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas
SSTE	Síndrome de choque tóxico estreptocócico
TAE	Amortiguador de Tris-Ácido Acético-EDTA
TBE	Amortiguador de Tris-Boratos-EDTA
U	Unidades
UMF	Unidad de Medicina Familiar
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Luz ultravioleta

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

El género *Streptococcus* es un grupo muy numeroso y heterogéneo, está conformado por bacterias que se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza. Hay especies que son importantes patógenos para el ser humano, pero la mayoría son comensales, miembros de la microbiota normal humana de piel y mucosas (Montes et al. 2007).

Los estreptococos han sido descritos en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (De Vos et al. 2011) como bacterias de forma ovoide o esférica, de menos de 2 μm de diámetro, no esporuladas, Gram positivas, catalasa negativas, anaerobias facultativas, con tendencia a formar cadenas o parejas. Son bacterias inmóviles que fermentan la glucosa produciendo ácido láctico. El contenido de guanina y citosina (C + G) del DNA genómico está entre 34 a 46 mol%. Las distintas especies del género *Streptococcus*, excepto *S. thermophilus*, crecen bien en medios enriquecidos con sangre de carnero, suero o carbohidratos, a 35-37°C, especialmente si son incubados en una atmósfera con dióxido de carbono (CO_2) al 5.7%. Algunas especies, incluso necesitan CO_2 para crecer, como *S. pneumoniae* y ciertos estreptococos del grupo *viridans*. Muchos estreptococos, el neumococo entre ellos, crecen mejor en condiciones anaerobias. En general, las colonias de los estreptococos en agar sangre de carnero no son pigmentadas. La característica de algunas especies es formar colonias grandes, mientras otras forman colonias

pequeñas (colonias puntiformes, menores de 0.5 mm de diámetro) (De Vos et al. 2011).

CLASIFICACIÓN

Basándonos en la secuencia del gen *16SrRNA*, los estreptococos se clasifican en 5 grandes grupos (Montes et al. 2007):

1. Grupo piogénico: formado principalmente por especies beta-hemolíticas, de colonias grandes, y que incluye especies que son patógenos importantes para el ser humano.
2. Grupo *mitis*: incluye al patógeno neumococo (*S. pneumoniae*) y a otros estreptococos habituales de la cavidad bucal, que producen alfa-hemólisis en agar sangre.
3. Grupo *anginosus* o *milleri*: formado por especies que se encuentran en la cavidad oral humana, en el tracto genital y gastrointestinal, con colonias de tamaño pequeño y característico olor a caramelo.
4. Grupo *salivarius*: incluye 3 especies de estreptococos genotípicamente relacionados, que normalmente se encuentran en la cavidad oral humana: *S. vestibularis*, *S. salivarius* y *S. termophilus*. El último de ellos se relaciona con productos lácteos. Todos los miembros del grupo son positivos a la prueba bioquímica Voges-Proskauer y no fermentan la arginina, el manitol ni el sorbitol.

5. Grupo *bovis*: formado por especies que principalmente habitan en el canal intestinal de los animales y que, en ocasiones, infectan a humanos. Pertenecen al grupo D de Lancefield.

Además de estos cinco grupos, existe otro denominado “grupo *mutans*” que engloba ocho especies que no están incluidas en los grupos mencionados anteriormente, y que son genéticamente diversas, aunque fenotípicamente similares. En este grupo hay especies relacionadas con la producción de la caries dental (Tabla I).

Otra denominación muy utilizada entre los microbiólogos es el término estreptococos del “grupo *viridans*”. También existen estreptococos no incluidos en ninguna de las denominaciones anteriores y poco conocidos por su escasa participación en infecciones en humanos (Montes et al. 2007).

Además se puede clasificar a los estreptococos en función de la hemólisis; los principales patógenos humanos entre los estreptococos son los beta-hemolíticos, pertenecientes a los grupos A y B, y el neumococo (alfa-hemolítico). Algunos estreptococos en agar sangre de carnero inducen un halo de hemólisis completa alrededor de la colonia (beta-hemolisis) y otros estreptococos no inducen ningún cambio (colonias no hemolíticas o gammahemolíticas). La beta-hemólisis está producida por las hemolisinas, mientras que la alfa-hemolisis se debe a la liberación de peróxido de hidrógeno desde la colonia, lo que produce una oxidación de la hemoglobina en metahemoglobina (Montes et al. 2007).

Tabla I. Clasificación de las especies del género *Streptococcus* basándose en la secuencia del gen 16SrRNA

Grupo piogénico	Grupo mitis	Grupo anginosus	Grupo salivarius	Grupo bovis	Grupo mutans	Otros estreptococos
<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. equinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. suis</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. vestibularis</i>	<i>S. alactolyticus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. intestinales</i>
<i>S. disgalactiae</i> spp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. gallolyticus</i> spp. <i>gallolyticus</i>	<i>S. ratus</i>	<i>S. entericus</i>
<i>S. disgalactiae</i> spp. <i>equisimilis</i>	<i>S. sanguis</i>			<i>S. gallolyticus</i> spp. <i>macedonicus</i>	<i>S. cricetus</i>	<i>S. acidominimus</i>
<i>S. canis</i>	<i>S. gordonii</i>			<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. downei</i>	<i>S. gallinaceus</i>
<i>S. equi</i> spp. <i>equi</i>	<i>S. parasanguis</i>			<i>S. lutetiensis</i>	<i>S. ferus</i>	<i>S. thoraltensis</i>
<i>S. equi</i> spp. <i>zooepidemicus</i>	<i>S. crista</i>			<i>S. infantarius</i>	<i>S. macacae</i>	<i>S. pluranimalium</i>
<i>S. uberis</i>	<i>S. australis</i>				<i>S. orisratti</i>	<i>S. hyovaginalis</i>
<i>S. parauberis</i>	<i>S. infantis</i>					<i>S. ovis</i>
<i>S. hyointestinalis</i>	<i>S. peroris</i>					
<i>S. iniae</i>	<i>S. sinensis</i>					
<i>S. didelphis</i>						
<i>S. phocae</i>						
<i>S. porcinus</i>						
<i>S. urinalis</i>						

(Montes et al. 2007)

Lancefield (1933), hizo una primera clasificación de los estreptococos basándose en las reacciones serológicas de los carbohidratos de la pared celular. Los antígenos de Lancefield son nombrados con letras desde la A hasta la W, con la excepción de la I y la J. Estos antígenos de grupo se pueden demostrar mediante diferentes métodos (precipitación, aglutinación, anticuerpos marcados, etc.). La técnica más empleada es la aglutinación mediante métodos comerciales de extracción rápida de antígenos que caracterizan, principalmente, estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A, B, C, F y G. El antígeno del grupo D, que es un ácido teicóico, está asociado a varias especies del grupo *bovis* y a todas las bacterias del género *Enterococcus*, que anteriormente se clasificaban en el género *Streptococcus*. Los aislamientos beta-hemolíticos de los grupos Lancefield A, C, F y G pueden subdividirse en 2 grupos: formadores de colonias grandes (>0.5 mm de diámetro) y

formadores de colonias pequeñas (<0.5 mm de diámetro). Los primeros pertenecen al grupo piogénico y los segundos al grupo *anginosus* o *milleri*. Estos últimos se caracterizan por tener la prueba bioquímica de Voges-Proskauer positiva (Montes et al. 2007).

Tanto en *S. pyogenes*, por la gran diversidad de antígenos de proteína T y M de la pared, como *S. pneumoniae* y *S. agalactiae*, por la composición de los polisacáridos de la cápsula, existen diferentes tipos de cepas (serotipos, genotipos), lo cual tiene gran repercusión en la epidemiología de la infección causada por ellas, así como en el desarrollo de vacunas (Montes et al. 2007).

Muchos estreptococos son conocidos por causar enfermedades a los humanos, algunas especies son altamente virulentas y responsables de enfermedades mayores. *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. pneumoniae* son particularmente notables como causas de infecciones severas en el hombre, pero varias otras especies están frecuentemente relacionadas con la endocarditis, abscesos y otras condiciones (Hardie et al. 1995). Algunas especies menos virulentas, como las que componen al grupo *mitis*, pueden volverse más agresivas patológicamente en individuos inmunológicamente comprometidos, generando sepsis o Síndrome de distress respiratorio del adulto (ARDS adult respiratory distress syndrome). El grupo *anginosus* (o *milleri*) está comúnmente asociado con abscesos en varias partes del cuerpo, incluyendo la boca, el cerebro, el hígado y otros órganos (Gossling, 1988) mientras que las especies del grupo *mutans*,

especialmente *mutans* y *sobrinus*, están implicadas en la etiología de la caries dental (Hamada et al. 1980).

Streptococcus pyogenes

Es también conocido como estreptococo beta-hemolítico del grupo A o como estreptococo del grupo A (EGA) de Lancefield (Facklam, 2002), es una bacteria frecuentemente encontrada en la garganta y la piel de los humanos y muchos de sus portadores cursan asintomáticos; a pesar de esto es la bacteria más patógena del género; el gran número de infecciones atribuibles a ésta bacteria incluye enfermedades comunes como faringitis, impétigo, celulitis, y fiebre escarlatina. Además de que puede producir enfermedades invasivas, entre las cuales se encuentran fiebre puerperal, fiebre reumática, glomerulonefritis, fasisis necrotizante, meningitis y síndrome de choque tóxico estreptocóccico (SSTE) (Bahnan et al. 2011; Bisno et al. 2003; Martin et al. 2011).

Existen más de 10 millones de casos de infecciones no invasivas anualmente en EUA provocadas por EGA (primeramente en garganta e infecciones de la piel superficiales y de heridas). Las enfermedades invasivas por EGA ocurren en aproximadamente 9000 a 11500 individuos por año (3.2 a 3.9/100 000 infecciones) en los EUA, mientras que en el mundo cada año 700 000 personas adquieren una enfermedad invasiva, una infección invasiva se define como la presencia de un microorganismo en un sitio normalmente estéril (Dmitriev et al. 2010). Las enfermedades más severas que pueden poner en riesgo la vida de los pacientes

son el SSTE y la fascitis necrotizante, cada uno equivale del 6 al 7% de los casos por EGA. Se calcula que causa aproximadamente 500 000 muertes cada año en el mundo (Dhanda et al. 2011). Las tasas de enfermedades invasivas han permanecido estables por los últimos siete años, pero la resistencia a la eritromicina se ha incrementado en todo el mundo (Roche Diagnostics, 2010). Existen también secuelas no supurativas posteriores a una infección estreptocócica, como fiebre reumática, la glomerulonefritis y la artritis reactiva (Cunningham, 2000).

S. pyogenes crece en colonias beta-hemolíticas en medios de agar sangre de carnero, que generalmente son sensibles a la bacitracina (cualquier halo de inhibición con el disco de 0.04 U de bacitracina). Aglutinan con el antígeno del grupo A de Lancefield y son pirolidonil aril-amidasa (PYR) positivas. Mediante pruebas comerciales rápidas (p.ej. Quick Vue® In-Line, Quidel Corporation, EE. UU. y otros) se puede detectar directamente en la muestra clínica (exudado faríngeo) antígenos de EGA en aproximadamente 10 minutos. La especificidad es muy alta (>95%) (Gerber, 1989; Gerber et al. 2004; Tanz et al. 2009) pero la sensibilidad depende de la cantidad de estreptococos que haya en la muestra, aunque realizada en condiciones ideales suele ser aproximadamente del 80% (Gerber et al. 2004; Tanz et al. 2009).

FACTORES DE VIRULENCIA

Proteína M

La proteína M está compuesta de dos cadenas polipeptídicas con configuración alfa-hélice, que está anclada en la membrana celular, atravesando la pared celular y apareciendo como fibras en la superficie celular. Las cadenas están conformadas de bloques repetitivos (nombrados A-D), cada uno difiere en tamaño y en la secuencia de aminoácidos (aa), dentro de la cual hay siete aa no polares repetidos. Ésta periodicidad es característica de las proteínas con estructura secundaria alfa-hélice como la tropomiosina de los mamíferos. La estructura del extremo carboxilo terminal (COOH-) de la proteína, está localizada entre la pared y la membrana celular, este extremo se encuentra altamente conservado entre las cepas de EGA. La porción amino terminal (-NH₂) de la proteína se extiende al ambiente y concluye en una serie de aproximadamente 11 aa, dicha secuencia varía entre los diferentes aislamientos clínicos. Ésta porción, junto con el segmento de la región adyacente A, constituye la región hipervariable de la proteína M (Bisno et. al. 2003). Así la región amino terminal (o hipervariable), es la más lejana a la célula y la más propensa a que se le unan anticuerpos, este dominio hipervariable se encuentra asociado con la identificación del serotipo M. Las regiones cercanas a la célula son las menos diversas (Metzgar et al. 2011).

La proteína M es el factor de virulencia más importante de los EGA (Vähäkuopus et al. 2012), provoca numerosos mecanismos antifagocíticos, los cuales serán descritos posteriormente.

Cápsula

Está compuesta de ácido hialurónico, un polímero de alto peso molecular que consiste de residuos alternados de N-acetilglucosamina y ácido glucorónico (Bisno et al. 2003).

Las cepas estreptocócicas varían grandemente en el grado de su encapsulación, y los que tienen la producción de cápsulas más exuberantes tienen una apariencia mucóide cuando son cultivados en placas de agar sangre de carnero. En cultivos líquidos, la producción de cápsula es mayor en la fase logarítmica de crecimiento. La asociación de la cápsula con la resistencia a la fagocitosis ha sido reconocida por muchos años (Stollerman et al. 2008), pero ha sido demostrado de mejor manera usando una técnica molecular moderna. Una mutante lisogénica acapsular pierde su capacidad antifagocítica en comparación con una cepa cápsulada, y su virulencia en ratones decrece 100 veces. Así pues, en ciertas cepas altamente cápsuladas de EGA, la cápsula puede tener prioridad sobre la proteína M en la resistencia a la fagocitosis (Bisno et al. 2003).

Las cepas de EGA ricas en proteína M y cápsula son extremadamente virulentas para los humanos, y se ha observado ampliamente que las cepas mucóides causan infecciones invasivas (Bisno et al. 2003).

El hialuronato capsular de los EGA es muy similar al encontrado en el tejido conectivo de los humanos. Por esta razón es un inmunógeno pobre y por ende es difícil de encontrar en las personas anticuerpos contra el ácido hialurónico de EGA. De cualquier manera tales anticuerpos han sido obtenidos de conejos inmunizados

con EGA capsulados y en ratones inmunizados con hialuronato unido a liposomas (Bisno et al. 2003).

Adherencia

Antes que un patógeno microbiano pueda iniciar una enfermedad en el humano, tienen primero que unirse a la mucosa o a la superficie cutánea. De manera que tiene que sobrevivir a la competencia con las poblaciones competitivas de la microbiota habitual y evitar numerosas fuerzas electrostáticas y mecánicas que tienden a desplazarlo. Por ésta razón, los patógenos exitosos han desarrollado varios mecanismos que promueven preferencialmente la adherencia firme a los tejidos del hospedero. Las estrategias mediante las cuales los EGA se adhieren, y después invaden al hospedero humano, son diversas y complejas, e implican varios tipos de adhesinas. Además la expresión de factores de adherencia específicos puede diferir entre cepas dependiendo de sus atributos genéticos, el sitio del tejido predilecto y los factores ambientales locales. La interpretación de datos experimentales relacionados con este fenómeno es complicada por el rango de sistemas en los cuales ellos han sido estudiados, incluyendo los cultivos de líneas celulares y los animales experimentales (Bisno et al. 2003).

Se han realizado diferentes estudios relacionan a la proteína M como un mediador de la adherencia y persistencia de los EGA en la cavidad orofaríngea murina. Aunque trabajos subsecuentes han mostrado que la proteína M no promueve la adhesión a las células epiteliales bucales o de las amígdalas, los experimentos en los cuales EGA son infundidos en la cavidades orofaríngea de roedores ha arrojado

resultados conflictivos, probablemente relacionados con las diferencias en las cepas utilizadas y las especies de los roedores. La proteína M parece ser importante en la adherencia a las células Hep-2 en los cultivos de tejidos. Por otra parte, en experimentos usando mutaciones definidas en genes que codifican para proteínas de superficie ha sido demostrado que la proteína M media la adherencia de los keratinocitos de la piel vía la unión de la región de repetición al cofactor CD46 de la membrana del keratinocito (Bisno et al. 2003).

Colonización

Una vez que la adherencia se ha logrado, el EGA tiene que mantenerse en la faringe y/o en la piel para establecer un estado de colonización prolongada. Las cepas con proteína M (pero no las mutantes M-negativa) forman agregados en el epitelio bucal y de las amígdalas, los cuales promueven la colonización microcolonial. Este evento puede explicar los reportes de cepas M-positivas que persisten por más tiempo en la cavidad orofaríngea de los babuinos y ratas, que de lo que lo hacen las cepas M-negativas, aunque la proteína no es aparentemente requerida para la adherencia inicial (Bisno et al. 2003).

Internalización

Generalmente no se piensa que algunos de los EGA sean patógenos intracelulares, aunque algunos experimentos en los últimos años han demostrado que estos microorganismos pueden penetrar una variedad de células epiteliales respiratorias humanas cultivadas, así como con la adherencia bacteriana, muchos mecanismos

parecen estar implicados en la penetración celular. Las proteínas M y F han sido implicadas en el proceso de internalización, el cual promueve rearrreglos en el citoesqueleto e interacciones entre la adhesión estreptocócica, las integrinas del hospedero, y el ligando de las integrinas (Bisno et al. 2003).

La trascendencia biológica de la entrada intracelular de los EGA resta de ser descubierta. Es posible que tal penetración sea el preludio de una profunda invasión al tejido, además es probable que tal entrada provea un santuario intraepitelial para la persistencia de un escudo del microorganismo contra los fagocitos, los anticuerpos y los antibióticos como penicilina, que no cruza fácilmente las membranas celulares eucarióticas (O'Seaghda et al. 2013). Así pues, hay evidencia de que los EGA pueden ser recobrados de biopsias de amígdalas infectadas, así como de amígdalas removidas quirúrgicamente de portadores asintomáticos (Bisno et al. 2003).

Exotoxinas

Los estreptococos elaboran una gran variedad de factores extracelulares que mejoran su habilidad para causar enfermedades en el ser humano. Entre estos factores se encuentran las exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (Spe), la mejor caracterizada de las Spe es la toxina pirogénica estreptocócica A (Steer et al. 2012), que se presenta en las cepas responsables de fiebre escarlatina.

De las Spe, las designadas A y C, son reconocidas como miembros de una gran familia de toxinas, que son generalmente llamadas toxinas pirogénicas debido a su habilidad para inducir fiebre, pero también comparten su superantigenicidad

(Stevens et al. 2000). También han sido frecuentemente asociadas a enfermedades invasivas y son producidas por medio de recombinación de fagos, ya que son de origen diverso y de alta movilidad.

Las Spe funcionan como superantígenos, que estimulan los linfocitos T de forma específica (Cunningham, 2012) al unirse al complejo de histocompatibilidad mayor clase II. Los linfocitos T activados liberan citocinas que median el choque séptico y la lesión de los tejidos (Brooks et al. 2011).

Los EGA también generan hemolisinas, que en estos microorganismos se denominan “estreptolisinas”:

- La estreptolisina “S”, que es activa en presencia de O₂ y no inmunógena, y
- La estreptolisina “O”, que es inmunógena e inactiva en presencia de O₂.

Las cepas de EGA, que sintetizan ambas estreptolisinas, producen una hemólisis total o beta, ya que destruyen los eritrocitos que circundan sus colonias, desde la superficie del agar sangre de carnero, a través de la estreptolisina “S”, que es activa en presencia de O₂; hasta la parte profunda de la placa, en donde la presión de O₂ tiende a cero y la estreptolisina “O” puede actuar eficazmente (Garza et al. 2005).

EL EXUDADO FARÍNGEO Y LA FARINGITIS

Existe un amplio traslape entre los signos y síntomas de la faringitis estreptocócica y la no estreptocócica (usualmente viral), y la habilidad para identificar la faringitis estreptocócica con precisión, en base a la exploración clínica únicamente es generalmente pobre (Wannamaker, 1972; Breese, 1977; McIsaac et al. 2004; Poses

et al.1985). Por lo tanto, excepto cuando existen síntomas virales y epidemiológicos obvios, una prueba de laboratorio debe ser realizada para determinar si el EGA está presente en la faringe (Bisno, 1996; Poses et al. 1985).

La faringitis aguda provocada por EGA tiene ciertas características epidemiológicas y síntomas clínicos (Bisno, 1996; Carapetis et al. 2005). El desorden es prevalentemente una enfermedad de niños entre 5-15 años de edad (Mitchell et al. 2011; Okabe et al. 2011) incidente en climas templados. Usualmente ocurre en invierno y al inicio de la primavera. Los pacientes con faringitis por estreptococos comúnmente presentan ardor en la garganta (generalmente de inicio repentino), dolor a la deglución y fiebre. Pueden también estar presentes cefalea, náuseas, vómito, y dolor abdominal especialmente en niños. En la exploración los pacientes presentan inflamación de las amígdalas, con o sin supuración; a menudo con nódulos linfáticos inflamados y sensibles. Otros síntomas pueden incluir la úvula (“campanilla”) enrojecida e inflamada, petequias en el paladar, escoriaciones en las narinas y exantema. Ninguno de estos signos es específico para la faringitis por EGA. En cambio, la ausencia de fiebre o la presencia de síntomas clínicos como conjuntivitis, tos, ronquera, resfriado, estomatitis anterior, lesiones ulcerativas intra-orales discretas, exantema viral, y diarrea sugiere considerablemente una etiología viral (Shulman et al. 2012).

Pruebas Rápidas de Detección de Antígeno (PRDA's)

Una gran desventaja de los exudados faríngeos es el retraso (por toda la noche o mayor) en obtener los resultados. Las PRDA's han sido desarrolladas para la

identificación de faringitis por EGA directamente de exudados faríngeos, en un tiempo menor. La identificación rápida y el tratamiento oportuno de pacientes con faringitis provocada por EGA, puede reducir el riesgo de diseminación permitiendo que el paciente regrese a su actividad habitual pronto y que se pueda reducir la diseminación y mortalidad asociada (Randolph et al. 1985; Gerber et al. 2004). Se ha reportado que el uso de las PRDA's en ciertas poblaciones incrementa significativamente el número de pacientes tratados apropiadamente para faringitis estreptocócica, comparada con los cultivos tradicionales (Centor et al. 2010).

Las PRDA's actualmente disponibles son altamente específicas, aproximadamente 95%, cuando son comparadas con cultivos en agar sangre de carnero (Gerber, 1989; Gerber et al. 2004; Tanz et al. 2009). Los resultados falsos positivos son inusuales y por tanto las decisiones terapéuticas pueden ser hechas con confianza en la base de una prueba positiva (Gerber et al. 2004; Tanz et al. 2009; Johnson et al. 1998). Desafortunadamente, la sensibilidad de la mayoría de estas pruebas es de 70%-90%, comparadas con el cultivo (Sensibilidad de 78%) (Gerber et al. 1997).

Las primeras PRDA's (principios de 1980) usaban métodos de aglutinación en látex, eran poco sensibles y tenían un final poco claro. Las pruebas nuevas basadas en técnicas de inmunoensayo enzimático ofrecen mayor sensibilidad (70%-90%) (Gerber et al. 2004; Tanz et al. 2009). Recientemente, se han desarrollado las PRDA's que usan pruebas de DNA quimioluminiscente o inmunoensayo; aunque los inmunoensayos no están comercialmente disponibles. Las PRDA's no son utilizadas de manera rutinaria en la identificación de EGA, sino a solicitud del médico. Existe una variedad de PRDA's disponibles, y no todas son parecidas en su rendimiento,

como la prueba con una sola hebra de DNA quimioluminiscente que detecta secuencias específicas de rRNA únicas en EGA (Group A Streptococcus Direct Test, GenProbe ®; sensibilidad 86%-94% y especificidad 95-100%), o como LightCycler Strept-A assay (Roche Applied Science®; sensibilidad 93% y especificidad 98%) que consiste en un sólo ciclo de PCR en tiempo real (Gerber et al. 2004; Tanz et al. 2009). Ni el cultivo del exudado faríngeo, ni las PRDA's pueden identificar portadores asintomáticos cuando estos presentan una faringitis viral. Sin embargo, estas permiten a los médicos abstenerse de prescribir antibióticos a la gran mayoría de pacientes con odinofagia para los cuales los resultados del cultivo o la PRDA son negativos. Esto es de extrema importancia, ya que sólo en EUA más del 70% de los pacientes con esta sintomatología son vistos en clínicas primarias y reciben prescripciones de antimicrobianos (Nyquist et al. 1998), mientras que solo del 20-30% es probable que tengan faringitis por EGA (Bisno, 1996; Ebell et al. 2000; Wannamaker, 1972). Debido al incremento general en las tasas de resistencia a antibióticos, la terapia antimicrobiana debería ser prescrita solamente para aquellos pacientes en los cuales ha sido comprobada la faringitis provocada por EGA (Bisno et al. 2002; Snow et al. 2001; Report of the committee on infectious disease, 2012; Dajani et al. 1995).

La medición de los títulos de anticuerpos anti estreptocócicos es a menudo útil para el diagnóstico de secuelas no supurativas de faringitis por EGA, como: fiebre reumática y glomerulonefritis (Shet et al. 2002). Sin embargo, esta prueba no es útil en el diagnóstico de faringitis aguda porque los títulos de los anticuerpos de las dos pruebas comúnmente usadas, antiestreptolisina O (ASO, sensibilidad 98% y

especificidad 97%) (Centis Diagnósticos, 2013) y antiDNAasa B, no alcanzan los niveles máximos hasta las 3 u 8 semanas posteriores a la infección aguda por EGA y puede permanecer elevada por meses incluso sin infección activa de EGA (Johnson et al. 2010).

IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA PROTEÍNA M

Se ha observado que es más probable que la infección con un tipo M específico lleve a un resultado clínico específico. Algunos aspectos de este resultado tipo-específico derivan directamente de las propiedades virulentas de la proteína M, y entonces son rápidamente predichas a través de la determinación del serotipo de la proteína M, ya sea vía serológica o por medio de la secuenciación del gen *emm* (gen que codifica para la proteína M). La tendencia para inducir la fiebre reumática es posiblemente el mejor ejemplo estudiado (Metzgar et al. 2011).

En EUA y en Europa, el serotipo de la proteína M, o serotipo M, está altamente correlacionado con fenotipos clínicos específicos. Aspectos como la mortalidad están asociados con cepas de los serotipos M1, M3 y M12, la fiebre puerperal está asociada con M28, el SSTE está asociado con M1 y M3, la fiebre reumática con cepas de los serotipos M5 y M18 y la faringitis con serotipos M1, M3, M5, M6, M12, M14, M17, M19 y M24 (Tabla II). A pesar de los cambios genéticos de estos serotipos a través del tiempo, incluyendo alteraciones en su virulencia y en factores de resistencia a antibióticos, estas asociaciones permanecen estables. Esto indica que la proteína M por sí misma, o las proteínas codificadas por genes relacionados

con el gen *emm*, son las fuentes más probables de las presentaciones clínicas específicas. Además se han documentado relaciones entre la dominancia proporcional de serotipos específicos (particularmente de cepas M1 y M3) y la tasa de infecciones invasivas ocasionadas por EGA. Los períodos de dominancia de éstas cepas se correlacionan con los incrementos regionales de enfermedades invasivas ocasionadas por EGA, sugiriendo que la aparición de cepas M1 y M3 en pacientes con faringitis puede servir como aviso de la aparición de enfermedades invasivas provocadas por EGA en la comunidad (Metzgar et al. 2011).

A pesar de que los elementos de resistencia a antibióticos en los EGA son de origen diverso y de alta movilidad, ya que muchos son transferidos de cepa a cepa (y a veces de otras especies diferentes de EGA) por medio de recombinación de fagos, se ha observado relación entre el serotipo M de las cepas y su resistencia a determinados antibióticos, como la resistencia a los macrólidos (Silva-Costa et al. 2012). Una fuerte asociación entre la resistencia a eritromicina (u otros macrólidos) ha sido observada para M4, M6, M12 y M5, ya que estos serotipos son responsables de mucha de la resistencia a macrólidos observada en EUA (Metzgar et al. 2009; Kaplan 1999; Martin 2002), Bélgica (Descheemaeker, 2000), Grecia (Grivea et al. 2006) y España (Alberti et al. 2003) mientras que en México la resistencia a eritromicina ha sido asociada con el serotipo M75 (Rivas, 2005). Otros ejemplos son la resistencia a ofloxacina presentada por los serotipos M6 en EUA (Metzgar et al. 2009) y Noruega (Meisal et al. 2010).

En México los tipos M predominantes son el M12(19.7%), M1(18.5%) y M75(13.9%), según estudios realizados previamente en el laboratorio de Epidemiología Molecular (Perea-Mejía et al. 2006; Figueroa, 2004).

Tabla II. Ejemplos de tipos M asociados con presentaciones epidemiológicas y clínicas específicas.

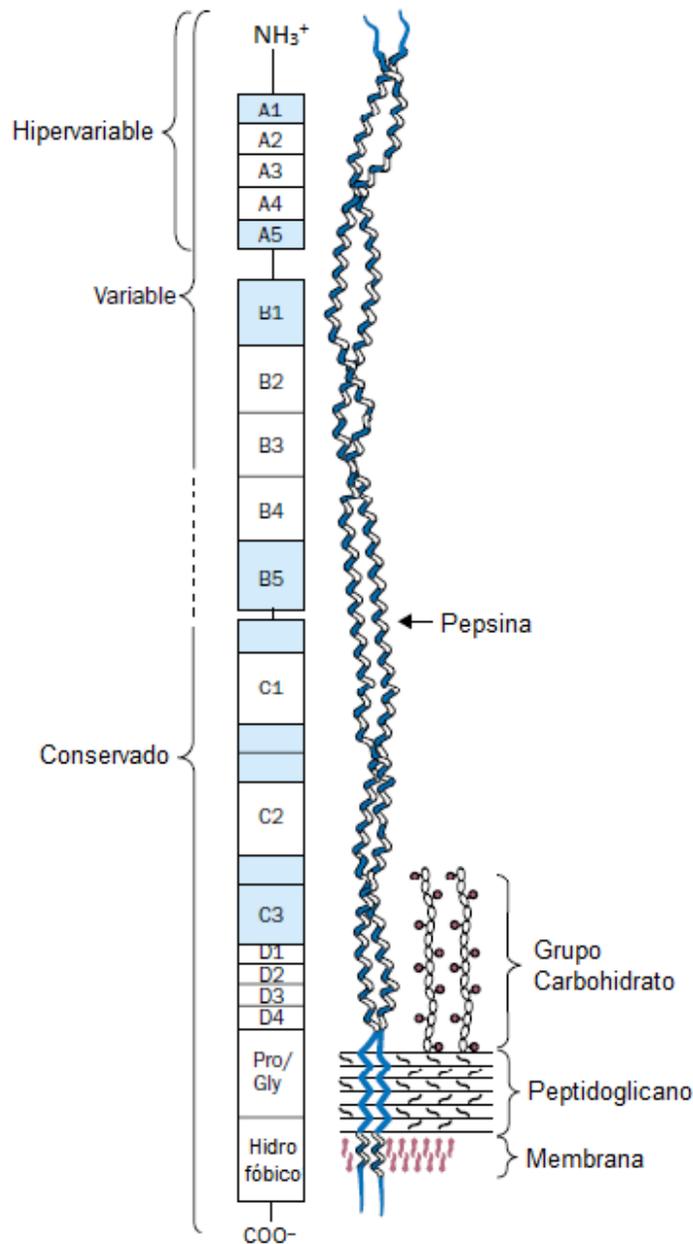
Presentación clínica	Tipos M asociados	Referencias
Faringitis	M1, M3, M5, M6, M12, M14, M17, M19, M24	Cunningham, 2000
Fiebre reumática	M1, M3, M5, M6, M11, M12, M14, M17, M18, M19, M24, M27, M29, M30, M32, M41	Bessen et al. 1989; Bisno, 1991; Shulman et al. 2006
FRA epidémica	M5, M18	Smoot et al. 2002
Epidemias de frecuencia geográfica	M1	Stollerman, 2001; Banks et al. 2002
Fatalidad	M1, M3, M12, M28	O'Loughlin et al. 2007; Luca-Harari et al. 2008
Fascitis necrotizante	M1, M3, M28	Luca-Harari et al. 2008; Meisal et al. 2010; Mihaila-Amrouche et al. 2004
SSTE	M1, M3	Banks et al. 2002; Hoge et al. 1993; Szczypa et al. 2006; Zachariadou et al. 2013
Impétigo	M33, M41, M42, M52, M53, M70, M28	Cunningham, 2000
Sepsis puerperal	M28	Luca-Harari et al. 2008; Meisal et al. 2010; Mihaila-Amrouche et al. 2004
Glomerulonefritis	M1, M4, M12, M49, M55, M57, M60	Bisno, 1991
Meningitis	M1, M12	Meisal et al. 2010

Metzgar et al. 2011

La proteína M como factor de virulencia

La principal defensa que tiene el humano en contra de una infección invasiva por EGA es la fagocitosis mediada por los leucocitos polimorfonucleares (LPM), es por esto que la proteína M es un factor de virulencia crítico en un EGA, ya que es un constituyente antifagocítico (Wozniak et al. 2012) que impide la acción de los fagocitos y los LPM.

La proteína M ejerce un efecto antifagocítico impidiendo la opsonización, mediante su interferencia con la vía alterna de activación del complemento. Al menos dos mecanismos son propuestos para explicar este efecto. Uno es la unión de las proteínas de control del complemento a la proteína M. El factor H, un componente regulatorio del sistema de control del complemento, se une a la región de repetición C de la proteína M (Figura 1), y la proteína tipo H (FHL-1) se une a la proteína M en la región hipervariable. Aunque ésta interacción puede impedir la unión del fragmento opsónico C3b a la superficie bacteriana, el significado funcional de este proceso ha sido cuestionado. (Bisno et al. 2003).



Bisno et al. 2003

Figura 1. Características de la secuencia completa de la proteína M6. Los bloques A, B, C y D designan el lugar de los bloques de secuencias repetitivas. Los bloques sombreados indican aquellos en los cuales la secuencia diverge de la secuencia consenso. Pro/Gly denota las regiones ricas en prolina y glicina probablemente localizadas en el peptidoglicano. La pepsina identifica la posición del sitio sensible a pepsina después del aa 228.

Otro constituyente del sistema de control de complemento, la proteína humana C4b, también se une a la región hipervariable de M y a las proteínas de la familia M, e impide la fagocitosis. FHL-1 y C4b, como el factor H, parecen unirse a la proteína M bajo condiciones fisiológicas. Un segundo mecanismo antifagocítico es la unión del fibrinógeno a la proteína M. Ésta proteína se une a la molécula cerca de la región amino terminal de una manera que no está entendida completamente. Como con el factor H, la unión del fibrinógeno también disminuye enormemente la vía alterna del complemento mediada por la unión de C3b a la célula bacteriana y así impide el reconocimiento por los LPM. El grado de unión del fibrinógeno, varía ampliamente entre los diferentes serotipos M (Bisno et al. 2003).

Los anticuerpos opsónicos dirigidos en contra de la porción variable de la proteína M anula los mecanismos protectores descritos anteriormente, activando la vía clásica del complemento. Tales anticuerpos confieren inmunidad específica contra el tipo M bacteriano. Así un individuo que produce anticuerpos contra la proteína M tipo 1, puede permanecer susceptible a otros tipos M de EGA. Es por esto que se dice que la proteína M ofrece protección a través de la diversidad, ya que provee de superficies inmunológicamente diferentes a cada tipo M, evitando que el EGA sea reconocido por anticuerpos generados contra un tipo M diferente (Metzgar et al. 2011).

Proteínas de superficie adicionales relacionadas a la proteína M han sido identificadas. Aunque su estructura es muy parecida a la de la proteína M, estas proteínas difieren en su habilidad para interactuar con las diferentes proteínas

humanas. Los genes que codifican para estas proteínas (*enn*, codifica a una proteína de unión a IgG₃ o IgA; *mrp*, proteína Mrp; *fcrA*, codifica para una proteína de unión a IgG, reactiva con la IgG humana; *arp*, proteína Arp; *protH*, proteína H y otras) (Boyle, 1995) han sido designados como miembros de la superfamilia del gen *emm*. Algunas de las proteínas tipo M se unen a IgG o IgA y parecen cooperar con la proteína M en su efecto antifagocítico. Así pues, una función notable de la familia de la proteína M es su habilidad para unirse a un amplio rango de proteínas hospederas incluyendo entre otras la albumina, el fibrinógeno y el plasminógeno (Bisno et al. 2003). Además la proteína M también contribuye a la resistencia a la fagocitosis funcionando como receptor tipo II de la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (Cunningham, 2000; Metzgar et al. 2011).

Tipificación

La tipificación de cepas de EGA es frecuentemente usada para caracterizar la epidemiología y patogénesis de las infecciones por EGA. El blanco más común de los métodos de tipificación es la proteína M, la cual, como se ha dicho antes, es un factor de virulencia de la superficie celular que sirve como blanco en la respuesta inmune a EGA que confiere la resistencia tipo específica (Tartof et al. 2010).

Un sistema de tipificación molecular basado en la secuenciación es llamado tipificación de la secuencia *emm* (*emm* sequence typing), si el tipo M se determina por este método se le llama genotipo M, el cual se basa en el análisis de la región hipervariable amino terminal del extremo 5' del gen *emm* (que codifica para la

proteína M) para discriminar entre un genotipo y otro. Esta técnica es ampliamente utilizada en laboratorios de investigación y referencia como los CDC (Tartof et al. 2010).

Las diferencias antigénicas en la región hipervariable también constituyen la base para la tipificación serológica establecida por Lancefield de los EGA (Facklam, 2002), la cual se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, para la que se obtienen anticuerpos para cada serotipo M existente y la serotipificación se logra de la confrontación de la cepa problema contra el antisuero, en la cual si se observa aglutinación se da como positivo, si el tipo M ha sido determinado por este método se le llama serotipo M. Los tipos M encontrados se denominan con la letra M, seguida del número asignado, por ejemplo M1 ó M12, sin embargo existen los tipos *stC* y *stG*, como el *stC839* o el *stG245*, que fueron encontrados primero en estreptococos del grupo C y G respectivamente, por lo cual, aunque también se encuentran en EGA, se mantiene el nombre original del tipo M. Existen más de 124 tipos M reconocidos, los últimos 22 han sido recientemente descritos (Facklam, 2002).

La amplificación de los genes *sic* (factor de estreptococos que inhibe la lisis mediada por complemento) y *sof* (factor de opacidad) son auxiliares en la tipificación de los EGA. La presencia del gen *sic* indica que la cepa presenta genotipo M1 (Akesson et al. 1996), mientras que el gen *sof* ha sido asociado a genotipos específicos (entre otros M2, M4, M11, M12, M22, M28, M44, M48, M49, M75, M87, M89, M90 y *stG6*) (Johnson et al. 1993; Reheder, 1995; Cunningham,

2000); con esta información se puede realizar un tamizaje grueso de las cepas, como primer paso en la tipificación.

Vacunas contra EGA

En el año 1940 aproximadamente 4000 adultos se inyectaron con la vacuna de todo el microorganismo inactivado. En ellos se produjeron reacciones locales y sistémicas, algunas de las cuales fueron severas pero no previnieron la enfermedad provocada por EGA (Kotloff et al. 2004).

En 1960 se realizaron ensayos clínicos en adultos y niños usando vacunas parentales que consistían en la proteína M parcialmente purificada o en preparados de la pared celular con altos contenidos de proteína M. Estos ensayos generaron reacciones inmunológicas inconsistentes. Aunque cuando se inyectaron con adyuvantes lipídicos minerales inducían anticuerpos bactericidas, dando evidencia de que el uso de la proteína M podía ser prometedor (Kotloff et al. 2004).

Estudios realizados en 1970 demostraron la indiscutible realidad de que desarrollar una vacuna contra EGA era posible. Voluntarios sanos se inmunizaron con tres dosis mensuales de placebo o con proteína M1, M3 o M12, subcutánea purificada con aluminio o vía aerosol. Los voluntarios se enfrentaron al reto antigénico un mes después, con EGA de los mismos tipos M en las amígdalas y la faringe, como resultado se observó que las vacunas protegieron a los voluntarios de la enfermedad (Kotloff et al. 2004).

Un avance importante ocurrió cuando los investigadores descubrieron las técnicas necesarias para crear fragmentos de proteína M altamente purificados. Un péptido del tipo M24 fue bien tolerado por los voluntarios, desencadenó una respuesta inmunológica bactericida y no generó reacción cruzada con el tejido miocárdico del paciente, demostrando que la reactividad cruzada podía evitarse y que al mismo tiempo la inmunidad tipo-específica podía lograrse (Kotloff et al. 2004).

Sin embargo, la reactividad cruzada de los anticuerpos generados por la vacuna se presentó entre ciertos epitopes de la proteína M y el corazón, articulaciones y cerebro. En ensayos clínicos de 1960 que involucraban a la proteína M3 purificada, se generó controversia cuando los investigadores reportaron un aparente incremento en la tasa de frecuencia de artritis reumatoide entre los niños vacunados, comparados con el grupo control. Permanece incierto si los casos de artritis reumatoide encontrados tuvieron relación con la vacunación, pero los ensayos clínicos experimentado con vacunas contra EGA se detuvieron por 30 años (Kotloff et al. 2004).

Actualmente las vacunas en desarrollo contra EGA pueden ser divididas en las que están basadas en la proteína M y las que no. La proteína M contiene tres dominios: Una región de repetición "A"/Extremo amino terminal, el cual es extremadamente variable y es usado en epidemiología para la tipificación molecular de los EGA; un dominio de repetición "B" (los anticuerpos contra esta región no son opsónicos) y una región de repetición, conservada "C". Las dos vacunas que han pasado a la etapa de investigación clínica son: la vacuna 26-polivalente, basada en la región

amino terminal de las proteínas M y las vacunas basadas en la región conservada de la proteína M (la vacuna J8 y la vacuna StreptInCor) (Steer et al. 2013).

La vacuna 26-polivalente consiste en los péptidos recombinantes de la región amino terminal de las proteínas M de 26 diferentes tipos M de EGA. Esta vacuna se sometió a la fase I/II de ensayo clínico en voluntarios adultos humanos y se observó segura e inmunogénica. Se indujeron anticuerpos opsónicos funcionales en contra de todos los tipos M incluidos en la vacuna. Estudios epidemiológicos demuestran una buena cobertura por parte de esta vacuna en países industrializados (arriba del 72%) pero también una cobertura pobre en países en vías de desarrollo (tan baja como 24% en la región del Pacífico) (Steer et al. 2013).

Las vacunas basadas en la región conservada de la proteína M contienen antígenos contra esta región. La vacuna StreptInCor contiene epitopes reconocidos por las células T y B, mientras que las vacunas J8 y J14 contienen epitopes únicamente reconocidos por las células B. Estudios en ratones, particularmente con la vacuna J8, han demostrado que éstos antígenos producen anticuerpos opsónicos que protegen contra el reto antigénico. A diferencia de la vacuna polivalente, éstas vacunas no han entrado a la fase de experimentación clínica pero tienen la ventaja de basarse en un sólo antígeno (Steer et al. 2013).

Factores extracelulares como la C5a peptidasa, el carbohidrato de EGA y la proteína de unión a fibronectina de EGA han estado en investigación por más de 20

años con algunos resultados alentadores, pero ninguno de estos candidatos ha entrado a la fase experimental (Steer et al. 2013).

A pesar del considerable progreso obtenido en el número de candidatos para vacunas, aún quedan obstáculos por resolver en su desarrollo contra EGA. Estos incluyen, pero no están limitados a: problemas de seguridad, un entendimiento incompleto de la protección inmunológica en humanos y datos epidemiológicos inadecuados. Existen preocupaciones relacionadas a la seguridad de la vacuna, basadas en el riesgo teórico de reacciones autoinmunes que lleven al desarrollo de fiebre reumática (Steer et al. 2013). El desarrollo exitoso de una vacuna contra EGA aún está a varios años de distancia, además de que una vacuna que sea efectiva y económicamente asequible para países en desarrollo es una posibilidad aún más distante. Por lo tanto aunque es importante mantener en investigación el desarrollo de la vacuna, también es necesario instituir medidas de control en la salud pública contra EGA mundialmente, particularmente en los países en vías de desarrollo (Steer et al. 2009).

JUSTIFICACIÓN

La tipificación de la proteína M en cepas de EGA puede ofrecer resultados útiles para mostrar asociaciones de cepas específicas con brotes (Stollerman, 1975; Kaplan et al. 1989; Miner et al. 2004; Veasy et al. 2004), mientras que la información geográfica acerca de la distribución de los serotipos M puede ser usada para evaluar la cobertura de vacunas candidatas (Dale, 1999; Batzloff et al. 2006). La vigilancia epidemiológica para detectar cambios en la distribución de las enfermedades provocadas por EGA, es necesaria debido al tamaño y la severidad de la problemática de estas enfermedades. Considerar la distribución de los tipos M obtenidos, por medio de la tipificación, es importante, además, cuando se intenta entender la etiología de los cambios en las tasas de resistencia o las tasas de brotes clínicos específicos.

HIPÓTESIS

En base a estudios previos realizados en el laboratorio de Epidemiología Molecular, se espera que los tipos M predominantes de *Streptococcus pyogenes* sean el M1, M12 y M75, seguidos de los tipos M2, M3, M4, M6, M22 y M28, sin importar la entidad de origen de los aislamientos.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la tipificación molecular de las cepas de *Streptococcus pyogenes* de exudados faríngeos en laboratorios clínicos del Valle de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas a partir de exudados faríngeos procedentes del Laboratorio Olarte y Akle y de la UMF 92 del IMSS.
2. Corroborar la identificación de las cepas.
3. Extraer el DNA genómico de la cepas.
4. Realizar la PCR para la amplificación de los genes *emm*, *sic* y *sof* de las cepas.
5. Obtener el patrón de restricción del gen *emm* amplificado de cada cepa, utilizando la enzima *Ddel*.
6. Comparar los patrones de restricción obtenidos con la literatura, con el fin de tipificarlos.
7. Secuenciación del gen *emm* de las cepas con patrones de restricción no identificados.
8. Comparar los tipos M obtenidos de las cepas provenientes del Laboratorio Olarte y Akle y de la UMF 92.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO

El presente es un estudio transversal, observacional, retrospectivo, comparativo y cerrado.

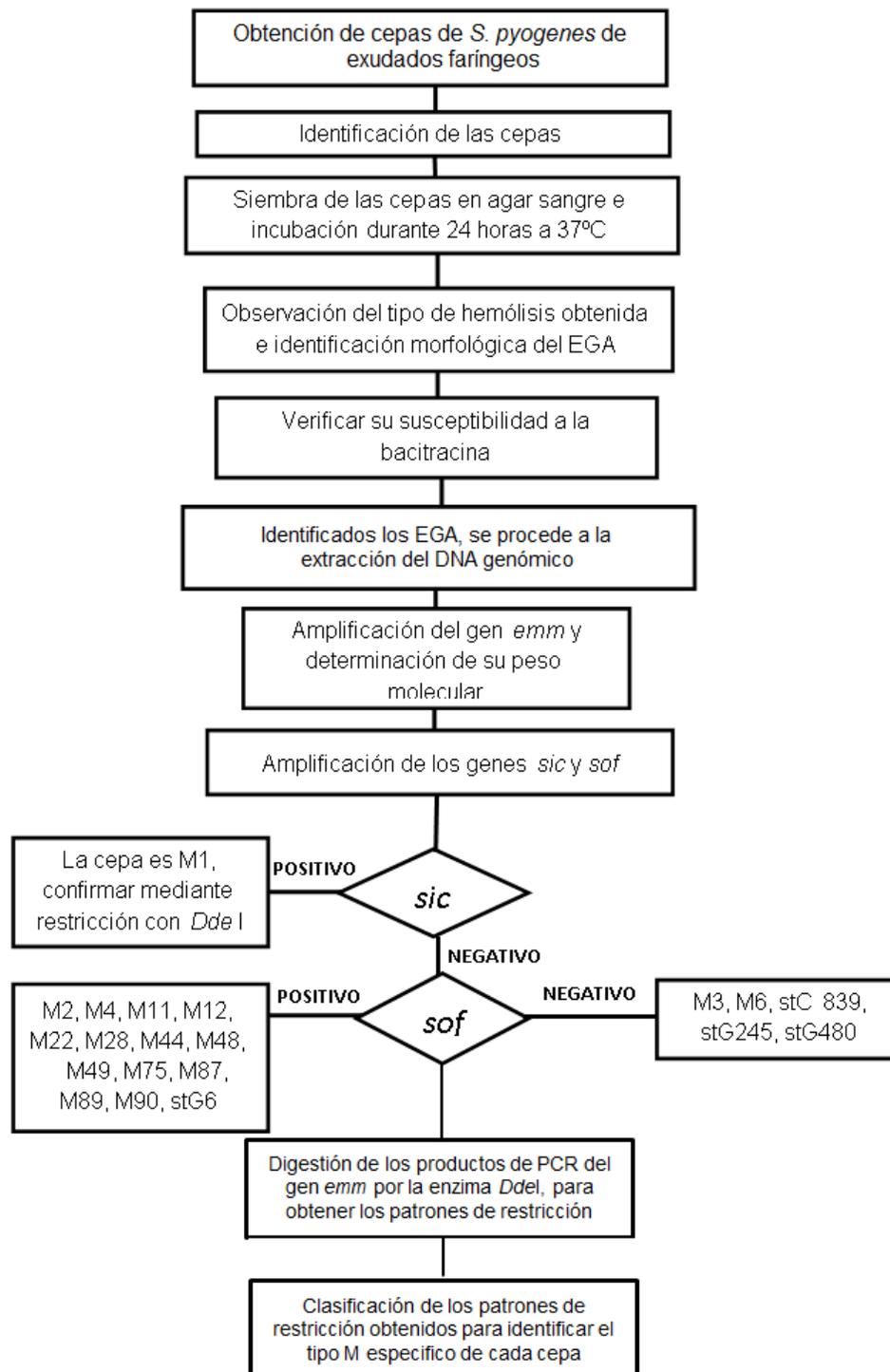
2. CRITERIOS

Inclusión: 131 Cultivos faríngeos de EGA, aislados durante el período de Junio de 2011 a-Diciembre de 2012.

Exclusión: EGA provenientes de cultivos diferentes al faríngeo, ni cepas que no fueran EGA.

Eliminación: Cepas no viables, o cepas que no amplificaron el gen *emm*.

3. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA



4. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el presente estudio se obtuvieron 131 cepas de *S. pyogenes* aisladas a partir de exudados faríngeos; 37 cepas provenientes del Laboratorio Olarte y Akle y las restantes 94 provenientes de la UMF 92 del IMSS; las primeras fueron aisladas durante el período de Agosto-Diciembre de 2012, mientras que las segundas en el período de Junio de 2011 a Septiembre de 2012.

Las cepas fueron obtenidas sin restricción de edad o género del paciente y se conservaron en medio BHI (Bioxon ®), con glicerol al 15%, a una temperatura de menos 70°C hasta su uso.

Identificación de las cepas

Para determinar si las cepas obtenidas eran EGA, se les sembró en cajas de agar sangre de carnero y se incubaron durante 24 horas a 37°C, con la finalidad de observar el tipo de hemólisis producida por las colonias puras, observándose la beta-hemólisis en todas ellas.

Así mismo, se verificaron todas sus características microscópicas, es decir que debían ser colonias, que después de 24 horas de incubación presentaran un color de blanco a grisáceo y tuvieran de 1 a 2 mm de diámetro con zonas de beta-hemolisis de dos a cuatro veces el tamaño de la colonia. Una vez que se hubieron identificado morfológicamente, se verificó su susceptibilidad a la bacitracina,

mediante la medición del halo de inhibición provocado por un disco de bacitracina (0.04U; Bio-Rad ®) en el cultivo bacteriano.

Realizadas estas pruebas, se comprobó la presencia del antígeno de superficie formado por N-acetil glucosamina y ramnosa, característico de los EGA, para esto se utilizó la prueba de coagulación comercial para estreptococos (Kit Pastorex, Bio-Rad ®).

Cuando cada cepa estuvo purificada e identificada como EGA, se conservaron en medio BHI (Bioxon ®) con glicerol al 15%, a una temperatura de -70°C.

5. EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

La extracción se lleva a cabo utilizando el kit DNeasy ® Tissue Kit (QIAGEN), la técnica puede consultarse en los anexos (QIAGEN, 2006).

Evaluación de la calidad del DNA genómico aislado

Para comprobar la calidad del DNA genómico obtenido se corrió 4 µL de este en un gel de agarosa (Invitrogen ®) al 1 % en amortiguador de Tris-Boratos-EDTA (TBE 0.5X), utilizando bromuro de etidio (10 mg/mL) como colorante del DNA para visualizarlo. La corriente utilizada fue de 85-90 volts durante 40 minutos.

6. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *emm*

Para la amplificación del gen *emm* de los estreptococos se utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la que se utilizan las siguientes cantidades en la preparación de la mezcla maestra:

Tabla III. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen *emm*

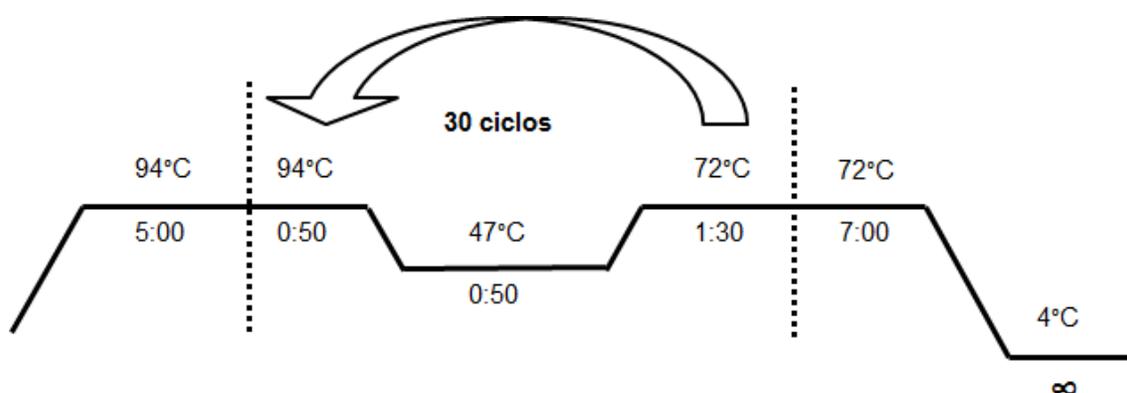
Amortiguador 10X para PCR con MgCl₂ (Roche ®)	5 µL
Desoxirribonucleótidos (dNTP's) (Roche ®)	8 µL de un stock 1.25 mM
Oligonucleótido <i>emmA</i> (Biosynthesis ®)	1 µL de un stock 10 mM
Oligonucleótido <i>emmB</i> (Biosynthesis ®)	1 µL de un stock 10 mM
DMSO (Stratagene ®)	0.2 µL
Taq polimerasa (5 U/µL) (Roche ®)	0.2 µL
H₂O	33.6 µL
DNA genómico de la muestra	1 µL

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 µL.

Para la fase de inicio de la PCR se llevó la mezcla a una temperatura de 94 °C durante cinco minutos (desnaturalización inicial). Durante la desnaturalización se llevó la mezcla a 94 °C por 50 segundos. Para la unión del oligonucleótido a su secuencia complementaria, es decir para el "alineamiento" se utilizó una temperatura de 47 °C durante 50 segundos y finalmente para la elongación de la cadena se sometió la mezcla de reacción a 72 °C por un minuto 30 segundos. El termociclador (GeneAmp ® PCR System 9700) se mantuvo trabajando por 30 ciclos y al final de estos la mezcla se sometió a 72°C por siete minutos (extensión final).

Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su utilización, como puede verse en el siguiente diagrama.

Diagrama de las condiciones utilizadas en la PCR



La secuencia de los oligonucleótidos (Whatmore et al. 1995; Beall et al. 1996) utilizados para amplificar el gen, son las siguientes (Tabla V):

Oligonucleótido emmA: 5'-GGG AAT TCT ATT SGC TTA GAA AAT TAA-3'

Oligonucleótido emmB: 5'-GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT-3'

El oligonucleótido emmA es un oligonucleótido degenerado, en el cual la "S" equivale a C o G. El tamaño del producto de PCR es variable y va desde 700 hasta 1600 pb

La amplificación se visualizó mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5X, la cantidad de amplificado que se agregó por pozo fue de 4µL, se usó el marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas ®) y la corriente utilizada fue de 85-90 volts durante 40 minutos. Se agregó bromuro de etidio 10 mg/mL (Sigma ®) a la agarosa como

colorante del DNA y se visualizó en un transiluminador de UV (WiseUv ®) para tomar una fotografía digital.

7. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *sic* y *sof*

Además de la amplificación del gen *emm*, se realizó la amplificación de los genes *sic* y *sof*. Con lo cual se pudo realizar un tamizaje grueso agrupando los pesos moleculares parecidos del gen *emm* y tomando en cuenta su genotipo *sof*.

A continuación se detalla la mezcla de reacción utilizada:

Tabla IV. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de los genes *sic* y *sof*

Amortiguador 10X para PCR con MgCl₂ (Roche ®)	3 µL
Desoxirribonucleótidos (dNTP's) (Roche ®)	5 µL de un stock 1.25 mM
Oligonucleótido SIC 1 (Byosynthesis ®)	0.6 µL de un stock 10 mM
Oligonucleótido SIC 2 (Byosynthesis ®)	0.6 µL de un stock 10 mM
Oligonucleótido SOF 1 (Byosynthesis ®)	0.6 µL de un stock 10 mM
Oligonucleótido SOF 2 (Byosynthesis ®)	0.6 µL de un stock 10 mM
Taq polimerasa (5 U/µL) (Roche ®)	0.17 µL
Glicerol (Stratagene ®)	0.2 µL
H₂O	18.23 µL
DNA genómico de la muestra	1 µL

La reacción final fue de 30 µL.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes, son las siguientes (Tabla V):

Oligonucleótido SIC 1: 5'-TAA GGA GAG GTC ACA AAC TA-3'

Oligonucleótido SIC 2: 5'-TAA CGT TGC TGA TGG TGT AT-3'

Oligonucleótido SOF 1: 5'-GTA TAA ACT TAG AAA GTT ATC TGT AGG-3'

Oligonucleótido SOF 2: 5'-GGC CAT AAC ATC GGC ACC TTC GTC AAT T-3'

La amplificación se confirmó nuevamente mediante un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5X, se agregaron 4 µL por pozo, se corrieron controles *sic* (+) y *sof* (+), la corriente utilizada fue de 85-90 volts durante 40 minutos y el marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas ®). Se agregó bromuro de etidio 10 mg/mL a la agarosa como colorante de los amplificados.

Las cepas *sic* (+) se encuentran únicamente en las cepas tipo M1, mientras que las *sic* (-), pueden dividirse en *sof* (+) y *sof* (-), para así realizar una clasificación preliminar y reducir el número de tipos M posibles para cada cepa. De ésta manera se realizó un tamizaje inicial para la identificación de las cepas.

Tabla V. Oligonucleótidos usados en este estudio

Gen	Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos	Pb	Referencia
<i>emm</i>	emmA	5'-GGG AAT TCT ATT SGC TTA GAA AAT TAA-3'	700 hasta 1600 pb	Whatmore, 1995; Beall, 1996
	emmB	5'-GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT-3'		
<i>sic</i>	SIC 1	5'-TAA GGA GAG GTC ACA AAC TA-3'	1200 pb	Perea-Mejía et al. 1997
	SIC 2	5'-TAA CGT TGC TGA TGG TGT AT-3'		
<i>sof</i>	SOF 1	5'-GTA TAA ACT TAG AAA GTT ATC TGT AGG-3'	700 pb	Beall et al. 1996
	SOF 2	5'-GGC CAT AAC ATC GGC ACC TTC GTC AAT T-3'		

8. DIGESTION DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN *emm*

Clasificación preliminar de las cepas

Las cepas *sic* (+), presumiblemente de tipo M1, se agruparon para confirmar su tipo M mediante el análisis de restricción con *Ddel*.

Las cepas para tipificación *sic* (-) se agruparon basadas en dos criterios:

- 1) De acuerdo a su genotipo *sof*, determinado por PCR, positivo si presentaban el gen *sof*, negativo si no lo presentaban
- 2) De acuerdo al peso molecular del gen *emm*

Así se formaron grupos para ser escindidos con la enzima de restricción *Ddel*. Esto facilitó la determinación de su tipo M partiendo del supuesto de que las cepas de un mismo tipo M presentan el mismo resultado para el gen *sof* y un peso molecular del producto de PCR del gen *emm* similar.

Para obtener los pesos moleculares de las cepas se utilizó el Software Kodak® 1D 3.5v, con el que se analizó la fotografía digital de los amplificados *emm*.

Digestión

Una vez realizada la clasificación preliminar de las cepas se procedió a realizar la digestión con la enzima *Ddel* (Invitrogen®).

Para la digestión se utilizó la enzima *Ddel*, enzima de restricción que corta en la secuencia de nucleótidos C/TNAG (N=A, C, G o T). La mezcla para la reacción de restricción fue de 40 µL: 35.8 µL del producto de PCR que se desea digerir, 4 µL

del amortiguador Tango (Fermentas ®) y 0.2 µL de la enzima *Ddel* de 10 U/ µL. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante un mínimo de ocho horas.

Toda la mezcla de reacción se corrió en un gel de agarosa (agarosa 1000 Invitrogen®) al 2.5% en amortiguador TBE (0.5X) con bromuro de etidio. La corriente utilizada fue de 85-90 volts, durante 60 minutos, usando el marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas ®).

9. CLASIFICACIÓN DE LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN

Una vez obtenido el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), o patrón de restricción resultante de la digestión con las enzimas de restricción, se tomó una fotografía digital.

Posteriormente se clasificaron los patrones de restricción, bajo la premisa de que las muestras que pertenecían a un mismo tipo M, mostrarían un mismo patrón de restricción. Los patrones se compararon con una serie de patrones de restricción obtenidos a partir de cepas de referencia proporcionadas por los CDC y de cepas tipificadas con anterioridad en el laboratorio.

Secuenciación de las cepas con patrones de restricción no identificados

Las cepas cuyos patrones de restricción del gen *emm* no pudieron identificarse mediante la comparación con los patrones de referencia del laboratorio, se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (IFC).

Para esto se realizó una nueva amplificación del gen *emm* de éstas cepas y cuando se realizó el gel se observó que el producto de PCR se presentara en suficiente cantidad (5-20 ng/ μ L) para que se llevara a cabo la secuenciación.

Los productos de PCR se purificaron utilizando columnas comerciales (Microcon® 100) en las cuales los productos de PCR se centrifugaron a 12500 rpm durante 15 minutos, el filtrado se desechó; después se invirtió la columna y se centrifugó a 13500 rpm por cinco segundos. Una vez que los productos de PCR se purificaron, nuevamente se observaron en un gel de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TBE (0.5X). Para determinar la masa molecular de las muestras a secuenciar, se utilizó el marcador de peso y masa molecular Low Mass (Gibco BRL®), para lo cual se le tomó una foto digital al gel y mediante el Software Kodak 1D 3.5 se determinó la concentración de DNA genómico en cada carril.

Las muestras se secuenciaron en el laboratorio de Biología Molecular del IFC a través de un secuenciador automatizado (Perkin-Elmer ®), utilizando el oligonucleótido *emmA* como iniciador. Los resultados de la secuenciación fueron analizados en la página de los Centros para la prevención y el control de enfermedades (CDC) <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>, para obtener el genotipo de cada cepa.

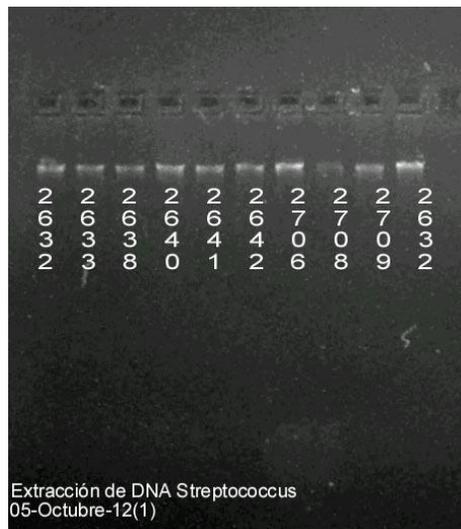
Una vez tipificadas las cepas de *S. pyogenes*, mediante el análisis de su patrón de restricción, se procedió a analizar la distribución general de los tipos M obtenidos en base a la literatura; así como a comparar las frecuencias de los tipos M entre los laboratorios de origen.

RESULTADOS

TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *Streptococcus pyogenes*

1. Extracción del DNA genómico

En la Figura 2 se muestran algunos DNA's obtenidos por el método previamente descrito, se observa su integridad, ya que como primer paso en el proceso de tipificación de las cepas, es de vital importancia obtener un DNA genómico integro, libre de impurezas, dado que de ahí se amplificaran los genes necesarios para la tipificación.



Gel al 1% de agarosa en amortiguador TBE 0.5X, utilizando Bromuro de etidio (10 mg/mL) como colorante del DNA. La corriente utilizada fue de 85-90 volts durante 40 minutos.

Figura 2. Extracción del DNA genómico de las cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen faríngeo mediante el kit DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN)

2. Amplificación del gen *emm*

A partir del DNA genómico obtenido se realizó la amplificación del gen *emm* (que codifica para la proteína M del estreptococo), dichas amplificaciones demostraron que este gen posee un peso molecular de entre 900 pb y 2000 pb (Figura 3; Tabla VI); la diferencia entre los pesos moleculares se explica debido a las diferencias en el número y tamaño de los bloques de repetición de las diferentes regiones en la proteína M (Figuroa, 2004).

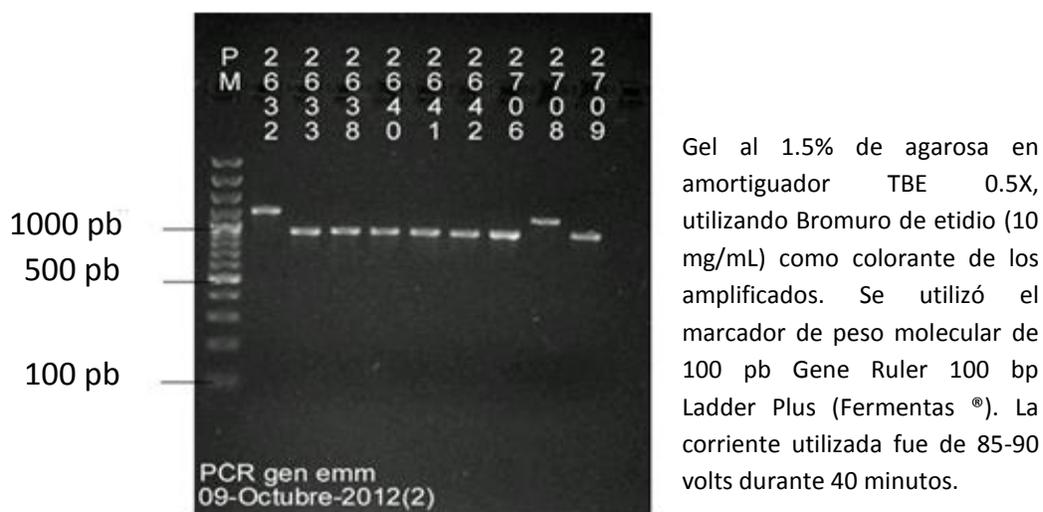


Figura 3. Amplificación del gen *emm* de *Streptococcus pyogenes* obtenidos a través de la PCR, el marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®) se observa en el primer carril. Arriba en la imagen el número interior del laboratorio, asignado a cada cepa

La calidad y cantidad del producto amplificado son importantes, ya que con estos se realizó el análisis de restricción con la enzima *Ddel*, como se describirá más adelante.

Una vez obtenidos los amplificados del gen *emm* y calculado el peso molecular de todas las cepas estudiadas, se agruparon de mayor a menor peso molecular, con la

confianza de que los pesos moleculares similares pertenecerían a los mismos tipos M.

3. Amplificación de los genes *sic* y *sof*

Se realizó la amplificación del gen *sic* con el cual pudieron identificarse las cepas M1, y del gen *sof* para agrupar las cepas restantes de acuerdo a su genotipo.

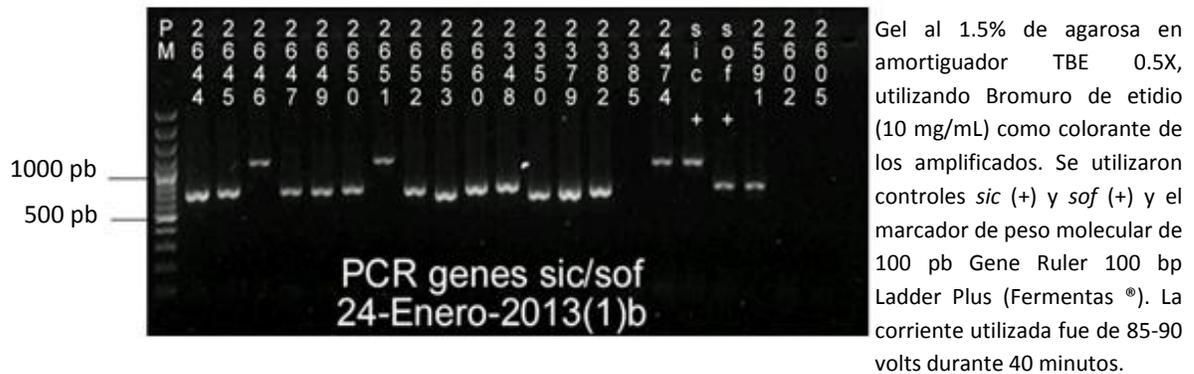


Figura 4. Amplificación de los genes *sic* y *sof* en cepas de *Streptococcus pyogenes*. Se observan los controles para *sic* y *sof* así como la diferencia en los pesos moleculares de estos. El marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®) se encuentra en el primer carril. Arriba en la imagen el número interior del laboratorio, asignado a cada cepa

Como se puede apreciar en la Figura 4, el peso molecular aproximado para el gen *sic* es de 1200 pb y para el gen *sof* es de 700 pb; en las PCR's realizadas pudimos identificar los amplificados de los genes *sic* y *sof* por el peso molecular que presentaban y de acuerdo con los controles utilizados para cada gen (Figura 4). En el estudio encontramos 28 cepas positivas para el gen *sic*, lo cual nos indicó que estas cepas pertenecían al tipo M1 (información que se corroboró al analizar su

patrón de restricción), cabe mencionar que este tipo M presenta un genotipo *sof* negativo. Además se encontraron 86 cepas positivas y 17 negativas para el gen *sof*. La presencia del gen *sof* en los diferentes tipos M encontrados en el estudio se observan en la Tabla VI, junto con los pesos moleculares promedio del gen *emm*.

Tabla VI. Pesos moleculares promedio de los amplificadores del gen *emm*, su coeficiente de variación y el genotipo *sof* de los diferentes tipos M encontrados (P-Positivo, N-Negativo)

Tipo M	n	Peso promedio obtenido	Coefficiente de variación (%)	<i>Sof</i>
M1	28	1354.6	7.7%	N
M2	8	977.8	8.5%	P
M3	8	1616.1	6.9%	N
M4	1	1114.3	----	P
M6	5	1083.0	13.4%	N
M11	14	1034.3	7.3%	P
M12	20	1730.8	5.8%	P
M22	7	1116.9	10.5%	P
M28	3	944.4	7.6%	P
M44	1	1231.6	----	P
M48	2	985.0	0.7%	P
M49	1	1006.0	----	P
M75	2	989.2	5.1%	P
M87	1	1066.7	----	P
M89	12	1052.6	9.2%	P
M90	2	1112.4	3.6%	P
stC839	1	1536.9	----	N
stG6	13	1013.6	11.7%	P
stG245	1	1720.6	----	N
stG480	1	1976.2	----	N

4. Obtención y clasificación de los patrones de restricción del gen *emm*

El agrupamiento de las cepas basado en el peso molecular y el genotipo *sof* facilitó la interpretación de los patrones de restricción, obteniendo geles en los que se repetían patrones correspondientes a un mismo tipo M, como se muestra en la figura 5, donde se observan patrones de restricción iguales.

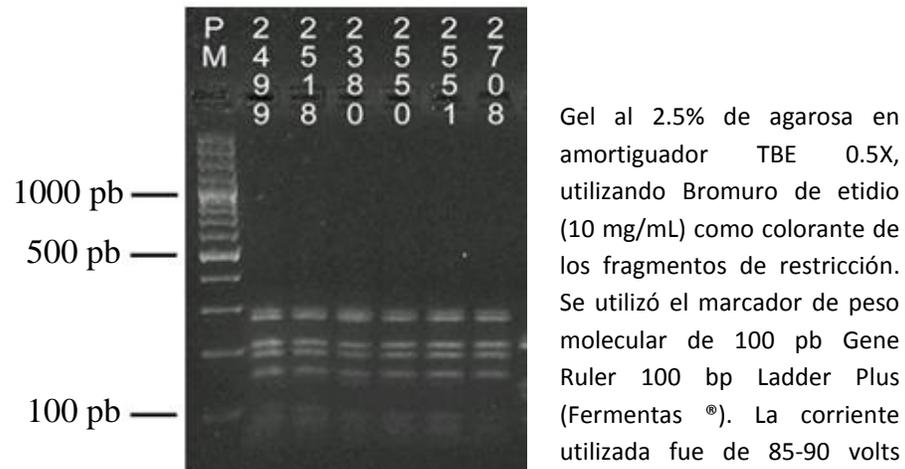


Figura 5. Patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática del gen *emm*. Arriba en la imagen el número interior del laboratorio, asignado a cada cepa

Partiendo de la premisa de que cada tipo M presenta un patrón de restricción específico, se procedió a comparar el patrón de restricción de cada cepa con una serie de patrones de restricción obtenidos a partir de cepas de referencia proporcionadas por los CDC y de cepas previamente tipificadas en el laboratorio. Se identificaron 26 patrones de restricción diferentes basados en el número y similitud de las bandas que los conformaban. De estos, 12 patrones de restricción se relacionaron sin problemas con el tipo M correspondiente, logrando tipificar al 68% de las cepas estudiadas (Tabla VII), sin embargo los otros 14 patrones de

restricción restantes no lograron ser identificados dentro de los patrones de referencia del laboratorio, por lo cual 14 cepas fueron enviadas a secuenciar el gen *emm*, con el fin de determinar los tipos M del restante 32% de la población de estudio.

Tabla VII. Tipos M obtenidos a través de la observación y comparación de los patrones de restricción experimentales y los patrones de referencia del laboratorio.

Tipo M	No. de cepas identificadas
M1	28
M12	20
M11	12
M3	8
M22	7
M6	4
M28	3
M48	2
M89	2
M4	1
M49	1
M75	1
Total	89

Como puede observarse en la Tabla VII, de las 89 cepas que pudieron ser identificadas mediante la técnica de comparación de los patrones de restricción, los tipos M1, M12, M11, M3 y M22 son los más frecuentes por este método. Las cepas representadas por estos tipos M suman el 57% del número total de cepas estudiadas, mientras que en estudios previos las mismas cepas suman el 50% del total (Figuroa, 2004).

El gen *emm* de las cepas cuyo patrón de restricción no pudo ser identificado fue enviado para determinar su secuencia al IFC, UNAM, resultados presentados en la Tabla VIII; donde, como puede verse para los casos de los genotipos *stG6* y *emm11*, un mismo genotipo M puede dar lugar a más de un patrón de restricción. Para las cepas 2564(M6), 2589(M44), 2379(M75) y 2493(M87) el patrón de restricción es completamente diferente al que se esperaba dados sus genotipos (Figura 6), lo cual puede deberse a alguna mutación fuera de la región hipervariable, que si bien genera la existencia de un patrón de restricción diferente, no modifica el genotipo de la cepa determinado por secuenciación.

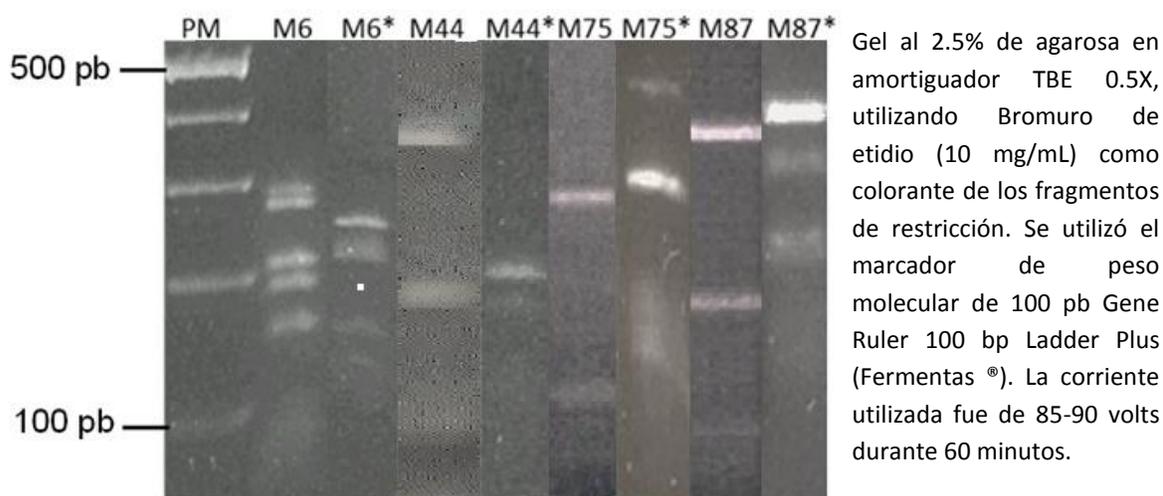


Figura 6. Nuevos patrones de restricción encontrados. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, a continuación se muestran: el patrón de restricción esperado, seguido del nuevo patrón de restricción encontrado (marcado por un asterisco).

Debido a que en algunos geles no fue posible determinar con certeza el peso molecular de las bandas, caso de las cepas 2650(M2), 2639(M90), 2573(M11), 2504(*stC839*), 2599(*stG6*) y 2726(*stG245*) (Tabla VIII), los patrones podían

confundirse con los de otros tipos M (Figura 7) y para evitar una tipificación errónea se decidió determinar el tipo M por secuenciación.

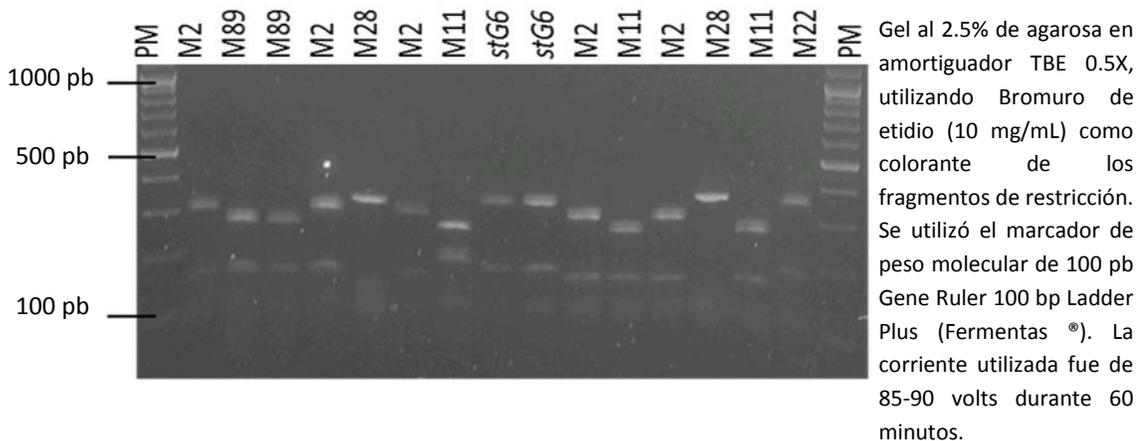


Figura 7. Ejemplo de un gel en el que se observan patrones de restricción diferentes.
 Para el caso de las cepas 2478(M11), 2573 (M11), 2517(M89) y 2604(stG6) la disposición de las bandas de restricción fue semejante a la observadas en las cepas de referencia, con ligeros cambios en el peso molecular de algunas bandas por lo que estas cepas fueron tipificadas por secuenciación, generando nuevos patrones de restricción debido a las diferencias en los pesos moleculares pero no respecto a la disposición de las bandas (Figura 8).

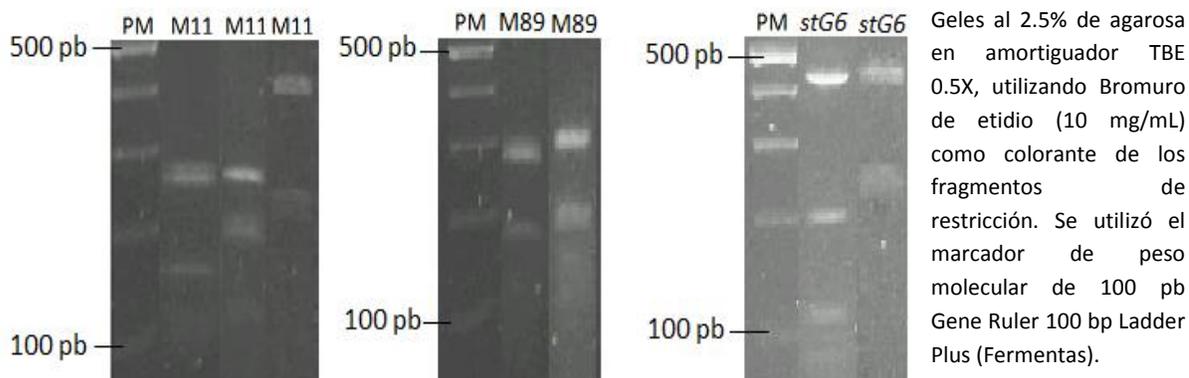


Figura 8. Patrones de restricción de las cepas M11, M89 y stG6. Para cada cepa se muestra primero el patrón de restricción esperado seguido de los obtenidos.

Tabla VIII. Tipos M obtenidos a través de la secuenciación del gen *emm*: en la primera columna se observa el número asignado al patrón de restricción, en la tercera la clave de la cepa secuenciada y en la última el genotipo *emm* determinado por secuenciación.

Patrón de restricción	No. de cepas que presentan el patrón de restricción	Clave de la cepa secuenciada	Genotipo determinado
1	12	2604	<i>stG6</i>
2	10	2517	<i>emm89</i> (M89)
3	8	2650	<i>emm2</i> (M2)
4	2	2639	<i>emm90</i> (M90)
5	1	2564	<i>emm6</i> (M6)
6	1	2478	<i>emm11</i> (M11)
7	1	2573	<i>emm11</i> (M11)
8	1	2589	<i>emm44</i> (M44)
9	1	2379	<i>emm75</i> (M75)
10	1	2493	<i>emm87</i> (M87)
11	1	2504	<i>stC839</i>
12	1	2599	<i>stG6</i>
13	1	2726	<i>stG245</i>
14	1	2385	<i>stG480</i>
Total	42		

Respecto a la cepa 2385 podemos decir que el patrón de restricción obtenido sí coincide con el del genotipo *stG480*, sin embargo se tenía reportado en estudios previos en el laboratorio de Epidemiología Molecular que el genotipo *stG480* en la cepa tipo era *sic* (+), mientras que la cepa 2385 era *sic* (-), por tener un genotipo *sic* diferente se decidió confirmar por secuenciación.

En el caso de las cepas con genotipo *stG6* se presentaron dos patrones de restricción diferentes: el primero ya había sido reportado en el laboratorio de Epidemiología Molecular (Perea-Mejía et al. 2006; Figueroa, 2004) y lo presentó solamente una cepa, con clave 2599, su peso molecular de 1387 pb difería de las otras doce cepas que presentaron el mismo genotipo pero un patrón de restricción nuevo, los pesos moleculares del gen *emm* oscilaban entre 911 pb y 1035 pb. Además sería interesante de indagar el hecho de que las doce cepas con patrón de restricción nuevo amplificaron el gen *sof*, lo cual no concuerda con los registros del laboratorio de Epidemiología Molecular. Los genotipos de estos dos patrones de restricción diferentes fueron obtenidos mediante secuenciación, de manera que en este estudio se encontró un patrón de restricción nuevo para *stG6* en comparación con el reportado previamente por el laboratorio de Epidemiología Molecular (Figueroa, 2004) (Figura 9).

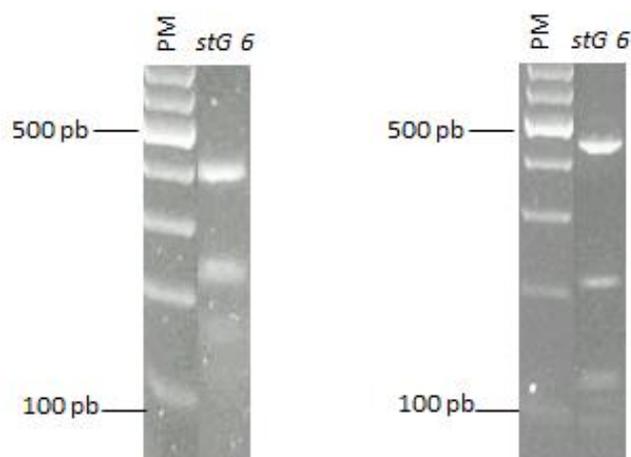


Figura 9. Patrones de restricción *stG6*, a la izquierda se muestra el patrón obtenido y a la derecha el patrón esperado de acuerdo a los patrones de referencia. A lado de cada uno el marcador de peso molecular.

Las cepas *stG6*, M89 y M2, que representan 31 de las cepas enviadas a secuenciar y 24% del total de las cepas del estudio, fueron identificadas por secuenciación, salvo dos cepas M89; en contraste con las cepas cuyo tipo M fue obtenido por observación y comparación, ninguna cepa M1, M12, M3 o M22 (55.7% de la población) fue enviada a secuenciar.

Para el caso de los genotipos M4 y M28 el patrón de restricción obtenido fue muy parecido, por lo cual una vez identificadas las posibles cepas que podían presentar este genotipo (2660, 2657 y 2629) (Figura 10) se volvieron a obtener los patrones de restricción de las cepas, pero ésta vez al correrse se incluyeron en el gel controles clínicos conocidos para M4 y M28, de manera que al comparar los patrones de restricción experimentales obtenidos su identificación se completó sin problema (Figura 10).

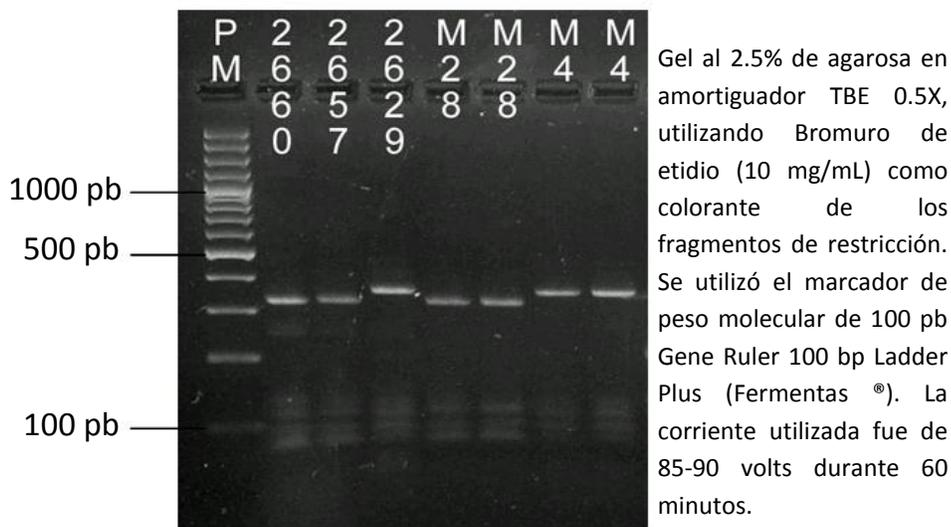
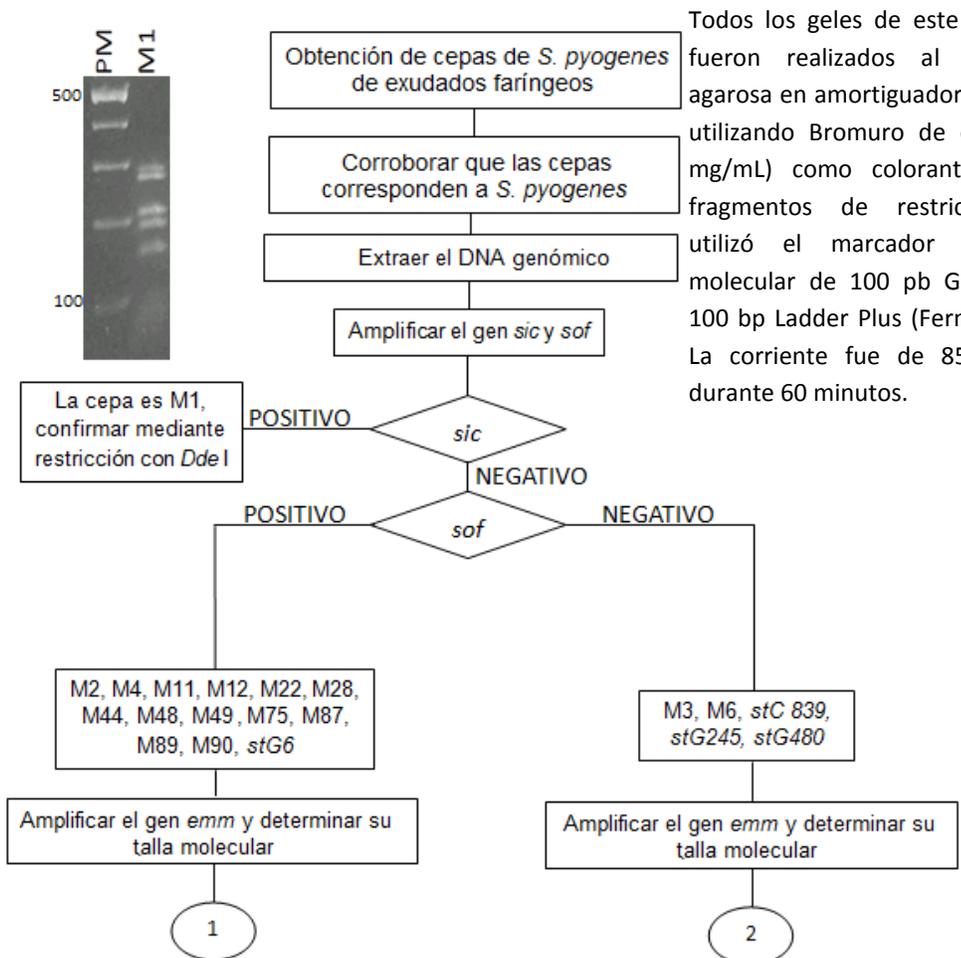


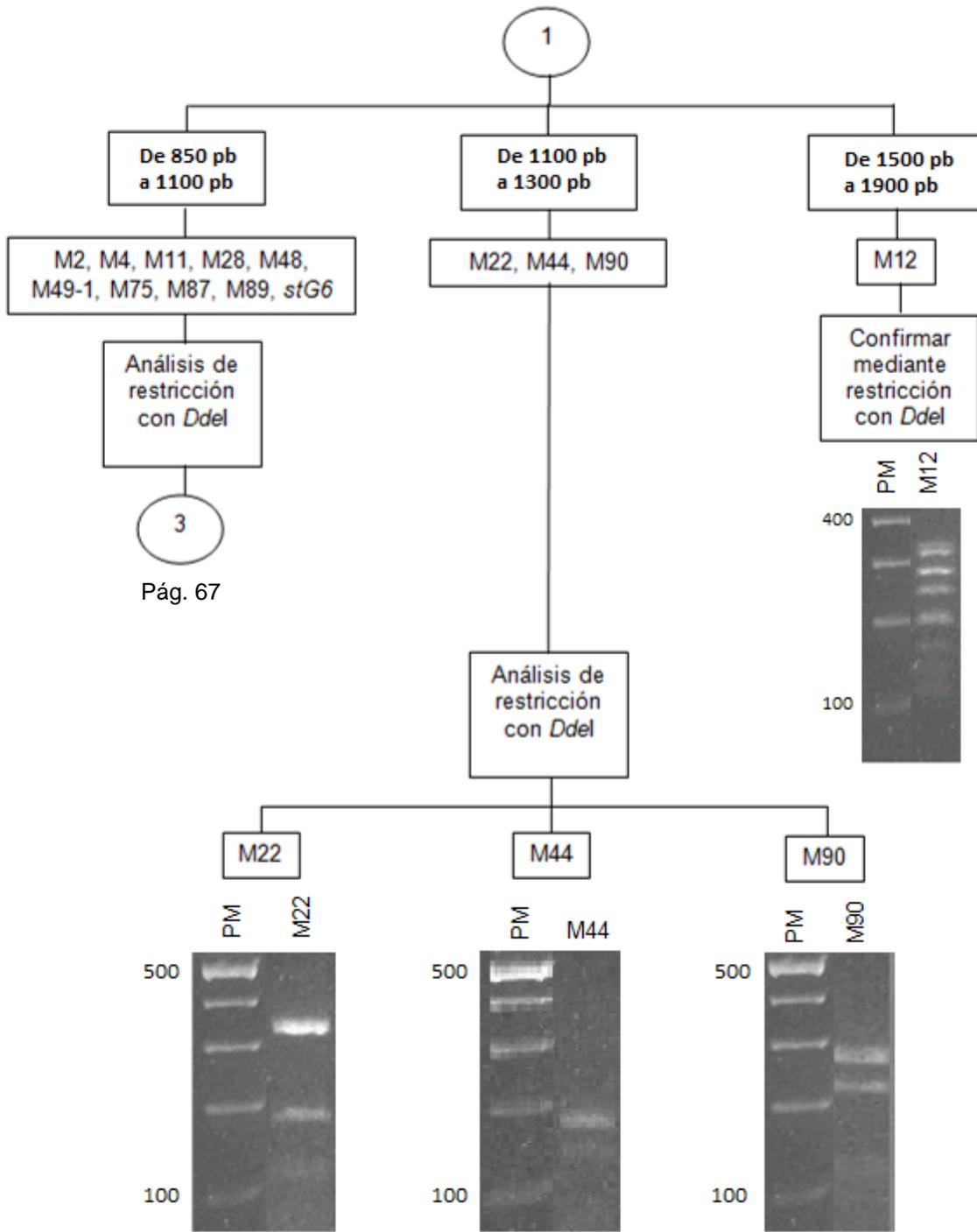
Figura 10. Patrones de restricción de las cepas identificadas con tipo M4 y M28. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular y en los últimos cuatro carriles dos controles clínicos para cada cepa M28 y M4. Arriba en la imagen el número interior del laboratorio, asignado a cada cepa.

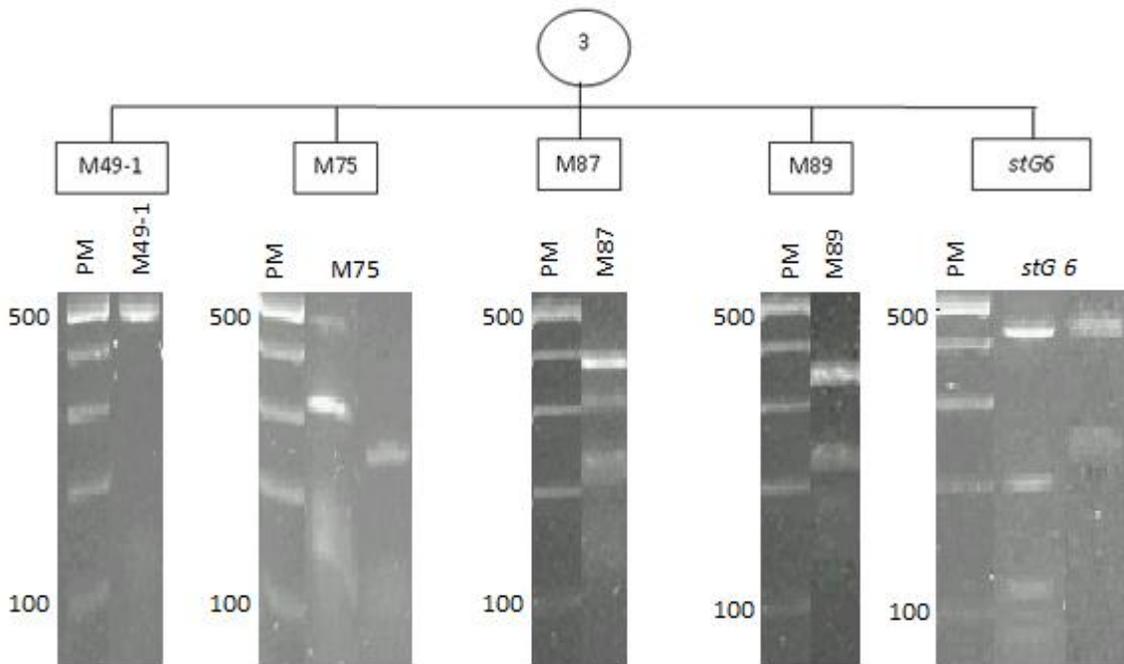
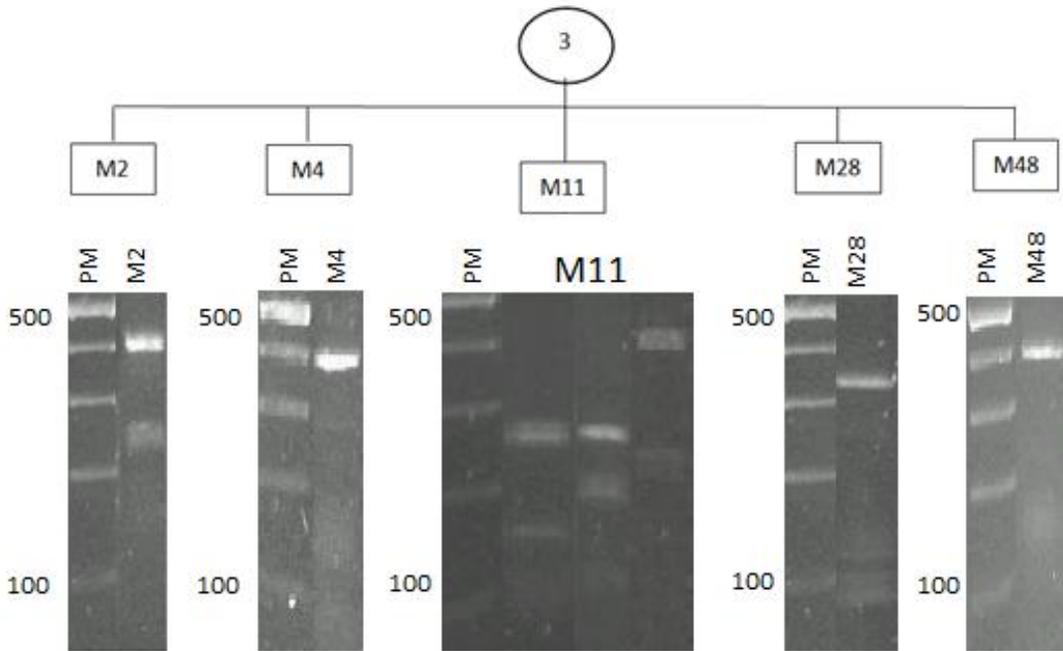
El tomar en cuenta las variaciones encontradas en los patrones de restricción contribuirá a mejorar la tipificación molecular que se realiza en el laboratorio de Epidemiología Molecular. El siguiente diagrama de flujo muestra la secuencia de la tipificación que se llevó a cabo, mostrando los patrones para cada uno de los tipos M identificados, esto facilita la interpretación de los resultados y contribuirá a las estrategias de tipificación en el futuro.

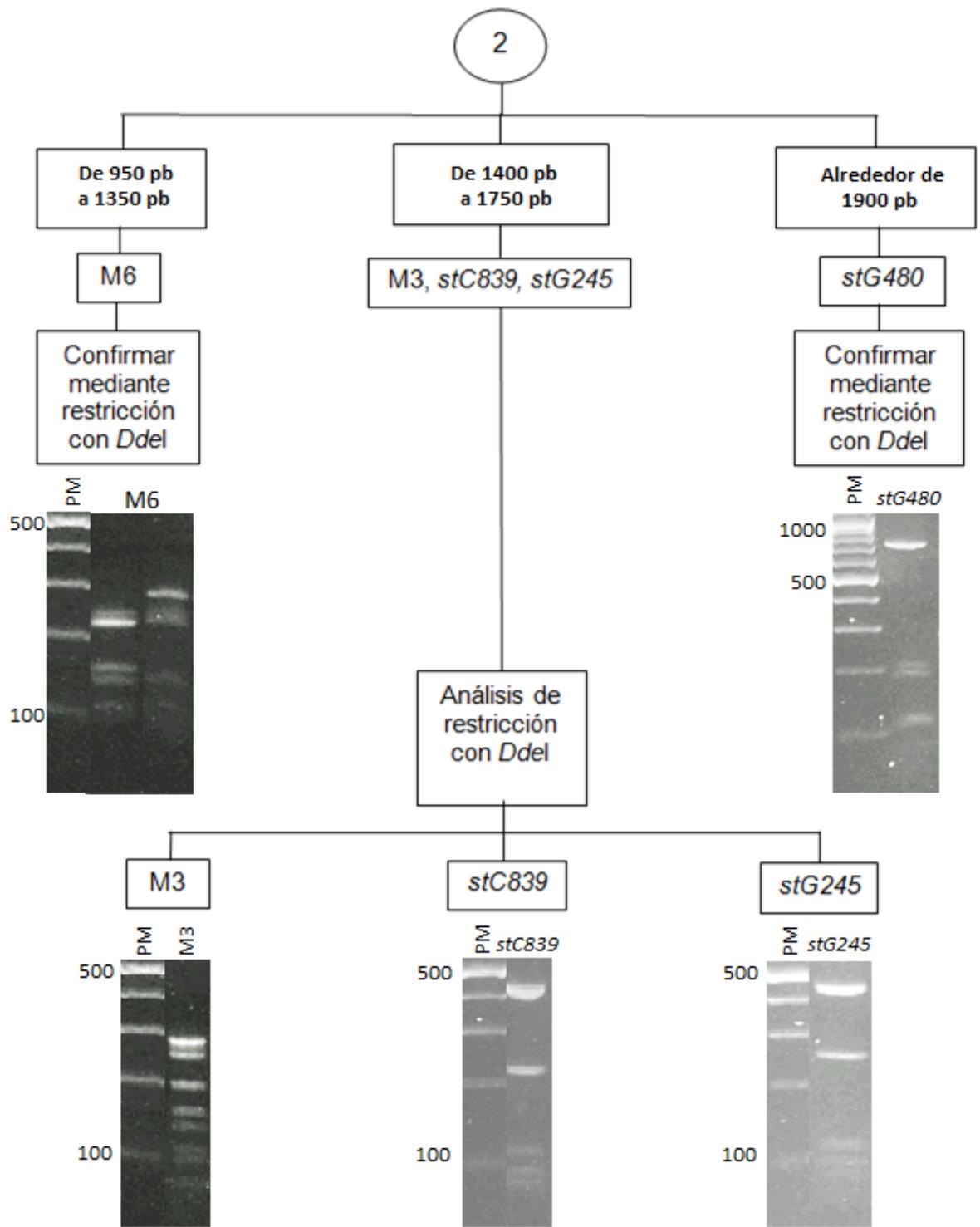
Diagrama de flujo para la tipificación



Todos los gels de este diagrama fueron realizados al 2.5% de agarosa en amortiguador TBE 0.5X, utilizando Bromuro de etidio (10 mg/mL) como colorante de los fragmentos de restricción. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb Gene Ruler 100 bp Ladder Plus (Fermentas®). La corriente fue de 85-90 volts durante 60 minutos.







5. Resultados de la tipificación

El número total de cepas que se tipificaron en este estudio fueron 131, de las cuales el 28% fueron procedentes del Laboratorio Olarte y Akle mientras que el 72% procedían de la UMF 92 del IMSS.

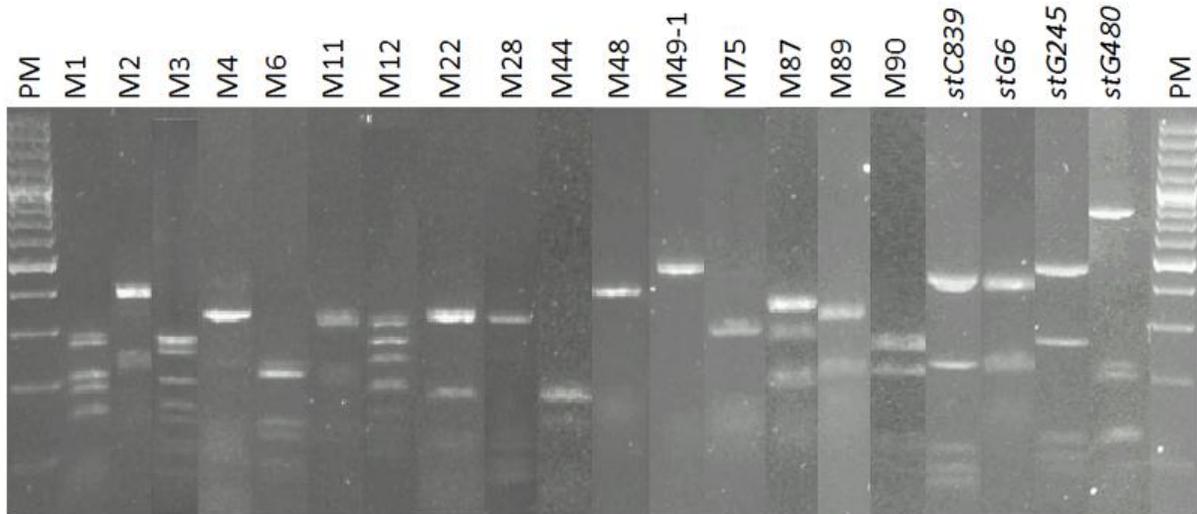


Figura 11. Patrones de restricción más frecuentes de cada uno de los 20 tipos M encontrados. A ambos lados se observa el marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®).

Gel al 2.5% de agarosa en amortiguador TBE 0.5X, utilizando Bromuro de etidio (10 mg/mL) como colorante de los fragmentos de restricción. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb Gene Ruler 100 bp Ladder Plus (Fermentas®). La corriente utilizada fue de 85-90 volts durante 60 minutos.

De las 131 cepas tipificadas se obtuvieron 20 tipos M diferentes (Tabla IX) (Figura 11), entre los cuales se encuentran 16 alelos del gen *emm*, tres denominados *stG* y uno *stC* (Tabla IX). En la tabla IX, la distribución está dada en número de cepas por tipo M y en porcentaje en referencia al número total de cepas estudiadas. Como se puede observar en la Tabla IX el tipo M más encontrado fue el M1 (21.4%), M12 (15.3%) y M11 (10.7%), representando el 47.4% de la población de estudio. Si

sumamos a este grupo los siguientes cinco tipos M más frecuentes del estudio, es decir los tipos *stG6* (9.9%), M89 (9.2%), M3 (6.1%), M2 (6.1%) y el M22 (5.3%), obtendremos que el 84% de las cepas del estudio está únicamente representada por ocho tipos M. Cabe mencionar que los tipos M44, M48, M87, M90, *stC839*, *stG245* y *stG480* no habían sido tipificados previamente en el laboratorio de Epidemiología Molecular (Perea-Mejia et al. 2006).

Tabla IX. Distribución de los tipos M respecto al número total de cepas de *Streptococcus pyogenes* tipificadas

Tipo M	No. de Cepas	%
M1	28	21.4 %
M12	20	15.3%
M11	14	10.7%
<i>stG6</i>	13	9.9%
M89	12	9.2%
M3	8	6.1%
M2	8	6.1%
M22	7	5.3%
M6	5	3.8%
M28	3	2.3%
M75	2	1.5%
M48	2	1.5%
M90	2	1.5%
M4	1	0.8%
<i>stG245</i>	1	0.8%
<i>stC839</i>	1	0.8%
M44	1	0.8%
M87	1	0.8%
M49	1	0.8%
<i>stG480</i>	1	0.8%

DISCUSIÓN

Para representar las frecuencias de los tipos M encontrados por laboratorio se realizó la Tabla X. Como puede verse en el Laboratorio Olarte y Akle se identificaron 12 tipos M diferentes, mientras que de la UMF 92 fueron 17 los tipos M encontrados, lo cual puede explicarse debido al tamaño desigual del número de cepas analizadas del Laboratorio Olarte y Akle en relación con las de la UMF 92 (37 y 94 cepas respectivamente); ya que al incrementarse el número de cepas aumenta la probabilidad de encontrar una mayor variedad de las mismas, reflejado en los tipos M determinados. Así también se puede observar que la distribución de los tipos M en las cepas provenientes de la UMF 92 es muy parecida a la distribución general de los tipos M (Tabla IX), lo cual también es razonable al considerar que los aislamientos de la UMF 92 representan el 72% de total de cepas analizadas.

Además se observa que el tipo M89 representa el principal tipo identificado en el Laboratorio Olarte y Akle con 21.6% de las cepas, seguido por los tipos M1, M12 y StG6 con 13.5% cada uno. Mientras que en la UMF 92 el tipo M1 con 24.5% fue el más importante, seguido del M12 con 16% y el M11 con 11.7%; el tipo M89 apareció en séptimo lugar con el 4.3% de las cepas de la UMF 92.

En estudios precedentes se ha observado que la frecuencia del tipo M89 es por lo general muy baja y que los tipos M1 y M12 suelen presentarse elevados en la mayoría de los estudios de tipificación, sin importar el lugar geográfico, como se presenta en los trabajos realizados en Chile (Wozniak et al. 2012), Brasil (Tartof et al. 2010), Finlandia (Hulkko et al. 2008; Vähäkuopus, 2012), Portugal (Silva-Costa

et al. 2012; Steer et al. 2012), India (Dhanda et al. 2011) ,China (Liang et al. 2012; Wu et al. 2013), Grecia (Stathi et al. 2008) y México (Figuroa, 2004; Perea-Mejía et al. 2006) por mencionar algunos; sin embargo algunos estudios han reportado porcentajes altos para el tipo M89 como en Finlandia, donde se reportó en el 16% de los aislamientos faríngeos (Vähäkuopus, 2012), y Portugal donde presentaba la misma frecuencia para el tipo M12 en pacientes con faringitis (Friães et al. 2012).

Por otra parte la frecuencia del tipo *stG6* se mantuvo en la UMF 92 con respecto a la del Laboratorio Olarte y Akle (13.5%), apareciendo en el cuarto lugar de frecuencias junto con el tipo M2, con 8.5% de cepas cada uno; es de resaltar que no se identificaron cepas tipo M2 en las cepas del Laboratorio Olarte y Akle.

La frecuencia inusual del tipo *stG6* en cepas de EGA (13%) no ha sido reportada antes por lo que ésta es la primera vez que se observa dicho comportamiento.

Otro tipo M importante que no figuró significativamente en el estudio fue el M75, el cuál ha sido reportado en el tercer lugar de frecuencia con el 12.5% en 391 cepas de *S. pyogenes* en estudios recientes en el laboratorio de Epidemiología Molecular (Figuroa, 2004; Perea-Mejia et al. 2006) y que en este estudio con 131 cepas sólo aparece con el 1.5% total, siendo tipificado únicamente en las cepas de la UMF 92.

En nuestra población se ha reportado este tipo M asociado a la resistencia a macrólidos como la eritromicina (Perea-Mejia et al. 2006; Rivas , 2005), por lo que la modificación de sus tasas de frecuencia es relevante en estudios para la estimación del riesgo de resistencia así como para la evaluación de la cobertura de vacunas; así pues esta alteración es una prueba de las altas tasas de cambio en la

distribución de los tipos M en una población determinada, resaltando la importancia de estudios de vigilancia epidemiológica como este para detectarlos.

Tabla X. Distribución de los tipos M respecto al número de cepas de *Streptococcus pyogenes* tipificadas por laboratorio de origen.

Lab. Olarte y Akle			UMF 92 IMSS		
Tipo M	No. de Cepas	(%)	Tipo M	No. de Cepas	(%)
M89*	8	(21.6%)	M1*	23	(24.5%)
M1*	5	(13.5%)	M12*	15	(16.0%)
M12*	5	(13.5%)	M11*	11	(11.7%)
stG6*	5	(13.5%)	stG6*	8	(8.5%)
M22*	4	(10.8%)	M2	8	(8.5%)
M11*	3	(8.1%)	M3*	7	(7.4%)
M48	2	(5.4%)	M89*	4	(4.3%)
M3*	1	(2.7%)	M6*	4	(4.3%)
M6*	1	(2.7%)	M22*	3	(3.2%)
M90*	1	(2.7%)	M28	3	(3.2%)
M4	1	(2.7%)	M75	2	(2.1%)
stG245	1	(2.7%)	M90*	1	(1.1%)
			stC839	1	(1.1%)
			M44	1	(1.1%)
			M87	1	(1.1%)
			M49	1	(1.1%)
			stG480	1	(1.1%)

*p=0.05

La UMF 92 cuenta con 17 tipos M diferentes, mientras que el Laboratorio Olarte y Akle cuenta con 12 tipos M diferentes, como se ha mencionado antes esta diferencia probablemente se debe al número desigual de cepas recibidas de cada

uno de los laboratorios; algunos de los tipos M encontrados de las cepas provenientes de la UMF 92 pero no del Laboratorio Olarte y Akle son los M2, M28, M44, M49, M75, M87, el *stC839* y el *stG480*. Sin embargo, contrario a lo que podía esperarse, algunos tipos M como el M4, M48 y el *stG245*, no figuraron en los tipos M encontrados en la UMF 92, pero si en el Laboratorio Olarte y Akle. Los tipos M que se encontraron en el ambos laboratorios son nueve y están marcados con un asterisco en la tabla X, para determinar si existía una diferencia significativa entre las frecuencias obtenidas de cada laboratorio, se realizó una t no pareada la cual arrojó que las frecuencias no difieren significativamente con una $p=0.05$, sin embargo, dado que el número de cepas y los tipos M encontrados en cada laboratorio no fueron iguales, no se realizó una prueba estadística más representativa.

Para prevenir las infecciones causadas por EGA se ha propuesto por Hu y col. (Hu et al. 2002) el uso de una vacuna 26-polivalente, que actúa en 26 tipos M diferentes (M24, M5, M6, M19, M29, M14, M1, M12, M28, M3, M1.2, M18, M2, M43, M13, M22, M11, M59, M33, M89, M101, M77, M114, M75, M76, M92) (Filleron et al. 2012), que se encuentra en fase experimental; considerando que la frecuencia de los tipos M varía de acuerdo al lugar geográfico (CDC, 2011; Richardson et al. 2010), es importante realizar estudios de frecuencia para evaluar la cobertura potencial de dicha vacuna.

En este estudio 10 de los 20 tipos M encontrados serían susceptibles a la acción de la vacuna: M1, M2, M3, M6, M11, M12, M22, M28, M75 y M89, los cuales

constituyen el 82% de las cepas con las que se realizó este trabajo. Es de resaltar el *stG6* con 9.9% no se encuentra dentro de la vacuna.

Aunque el efecto de la vacuna 26-polivalente en esta población parece tener una amplia cobertura y promete ser de verdadera utilidad para la prevención de estas infecciones, para poder lograr una cobertura máxima de una vacuna multivalente, esta debe realizarse con aquellos tipos M más frecuentes en la región donde pretende aplicarse.

Respecto a las frecuencias encontradas en estudios anteriormente realizados en el laboratorio de Epidemiología Molecular en el 2004 (Figuroa, 2004) se puede decir que las frecuencias en los tipos M ha cambiado significativamente, ya que aunque el tipo M1 y M12 se mantienen en los primeros lugares de frecuencia epidemiológica desde 2004 a la fecha, el tipo M11 antes con un 2.0% de frecuencia, ha pasado a ocupar el tercer lugar de frecuencia con 10.7% de las cepas en el estudio, así como el tipo *stG6* que pasó de tener el 0.8% a tener el 9.9% y el tipo M89 del 3.5% al 9.2% de frecuencia; caso contrario a las cepas M75 que en 2004 obtuvieron una frecuencia de 13.8% para contar en la actualidad únicamente con el 1.5% y las cepas M4 que antes tuvieron 7.1% de frecuencia ahora han pasado a tener el 0.8%.

Además la estimación de la cobertura potencial de la vacuna ha cambiado respecto al 2004, con 89%, al presente estudio con 82%. Estos cambios corroboran la importancia de mantener una vigilancia epidemiológica con respecto a los tipos M de una población. Datos que son importantes para el desarrollo de vacunas multivalentes contra la proteína M.

CONCLUSIONES

1. El 21.4% de las cepas requirieron tipificarse por secuenciación, debido a que los patrones de restricción representaron patrones no observados previamente o muy semejantes entre sí.
2. Los tipos M1 y M2 de las cepas tipificadas permanecen dentro de los más frecuentes en la población de estudio.
3. El tipo *stG6* presento una mayor frecuencia que la reportada en estudios previos.
4. La frecuencia de aislamientos del tipo M75 fue muy baja en el presente estudio (1.5%) con respecto a estudios previos (14%).
5. Se observaron patrones de restricción diferentes a los esperados en algunas de las cepas M6, M44, M75 y M87 por lo que se infiere que estas contienen variaciones genéticas en el gen *emm*.
6. Las cepas *stG6* analizadas muestran de manera inusual la presencia del gen *sof*, demostrando la diversidad genética que puede existir en las diferentes poblaciones.
7. Se encontraron siete tipos M (M44, M48, M87, M90, *stC839*, *stG245* y *stG480*) no reportados previamente.
8. La distribución de los tipos M de las cepas aisladas en el Laboratorio Olarte y Akle y en la UMF 92 no fue la misma, en el laboratorio privado el tipo M89 fue el más frecuente y en el público fue el M1. Lo que puede deberse al tipo de población y número de muestras analizadas por laboratorio.

9. De acuerdo a la distribución de los tipos M encontrados en este estudio, el porcentaje de cobertura potencial de la vacuna contra la proteína M sería elevado.

ANEXOS

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO (QIAGEN, 2006)

La extracción de DNA genómico se inicia sembrando la cepa pura en 2 mL de caldo de cultivo Todd-Hewitt, se deja incubando toda la noche a 37 °C con agitación constante a 250 rpm.

Utilizando el kit DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN) se realizan los siguientes pasos:

1. Se toma 1 mL del caldo de cultivo y se coloca en un tubo Eppendorf para centrifugarlo a 8 000 rpm durante siete minutos para así obtener un botón de bacterias, mientras que el sobrenadante se descarta.
2. Se prepara la solución amortiguadora de lisis para bacterias Gram positivas, adicionando 20 mg de lisozima (Amresco®) por cada mL a utilizar.
3. Al botón bacteriano obtenido se le adiciona 180 µL de solución de lisis y se mezcla en el Agitador.
4. Incubación a 37°C por 30 minutos.
5. Se adiciona 25 µL de Proteinasa K (20 mg/mL) (DNeasy®), más 200 µL de amortiguador A1 y se mezcla en el Agitador.
6. Incubación a 70 °C por 30 minutos.
7. Se adiciona 200 µL de etanol absoluto y se mezcla, a continuación se toma ésta mezcla y se coloca en las columnas de extracción (DNeasy®) de DNA genómico, embebidas en su respectivo tubo de colecta.
8. Se centrifuga la columna a 8 000 rpm durante un minuto. El residuo obtenido se decanta.

9. Se adiciona a la columna 500 μL de amortiguador AW1 y se centrifuga a 8 000 rpm durante 1 minuto. El residuo obtenido se decanta.
10. Se adiciona a la columna 500 μL de amortiguador AW2 y se centrifuga a 13 000 rpm durante tres minutos. El residuo obtenido se decanta.
11. Se adiciona a la columna 200 μL de amortiguador de elusión AE se centrifuga a 8 000 rpm durante un minuto y el residuo se recolecta.
12. Repetir el paso 11.

Tabla XI. Cepas de referencia utilizadas, con clave de los CDC y clave de acceso a la secuencia del gen *emm* correspondiente en el GenBank

Tipo M	Clave CDC	Clave GenBank
M1	SS745	X62131
M3	SS1027	X80168
M4	SS91	X15198
M6	SS93	M11338
M11	SS721	X74138
M12	SS986	M18269
M22	SS756	X75750
M28	SS789	U11948
M48	SS737	U11961
M75	SS1147	U11993
M89	SS1397	U11966

REFERENCIAS

Akesson P, Sjöholm AG, Björck L. Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J Biol Chem* 1996; 271(2):1081-1088

Albertí S, García-Rey C, Domínguez MA, Aguilar L, Cercenado E, Gobernado M, García-Perea A; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Survey of *emm* gene sequences from pharyngeal *Streptococcus pyogenes* isolates collected in Spain and their relationship with erythromycin collected susceptibility. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2385-2390

Bahnan W, Hashwa F, Araj G, Tokajian S. *emm* typing, antibiotic resistance and PFGE analysis of *Streptococcus pyogenes* in Lebanon. *J Med Microbiol* 2011; 60:98-101

Banks DJ, Beres SB, Musser JM. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol* 2002; 10(11):515-521

Batzloff MRPM, Olive C, Good MF. Advances in potential M-protein peptide-based vaccines for preventing rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Immunol Res* 2006; 35(3):233-248

Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of Group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34:953-958

Bessen D, Jones KF, Fischetti VA. Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. *J Exp Med* 1989; 169(1):269-283

Bisno AL. Acute pharyngitis: etiology and diagnosis. *Pediatrics* 1996; 97:949-954

Bisno AL. Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N Engl J Med* 1991; 325(11):783-793 Review

Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of Group A streptococcal virulence. *J Infect Dis* 2003; 3:91-200

Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM Jr, Kaplan EL, Schwartz RH. Practice guidelines for the diagnosis and management of Group A streptococcal pharyngitis. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis* 2002; 35:113-125

Boyle MD. Variation of multifunctional surface binding proteins a virulence strategy for group A streptococci? J Theor Biol 1995; 21; 173(4):415-426

Breese BB. A simple scorecard for the tentative diagnosis of streptococcal pharyngitis. Am J Dis Child 1977; 131:514-517

Brooks GF, Carrol KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg 25a. México DF. Edición McGraw-Hill Interamericana Editores, 2011

Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of Group A streptococcal diseases. Lancet Infect Dis 2005; 5:685-694

Centers for disease control and prevention. *Streptococcus pyogenes emm* sequence database (www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/emmtype_proportions.htm). Accessed August 2011

Centis Diagnósticos. ASO-Látex [en línea]. Emisión 03/2004 (<http://www.centis.cu/documentos/especificacion/car232.pdf>). Acceso Noviembre 2013.

Centor RM, Geiger P, Waites KB. *Fusobacterium necrophorum* bacteremic tonsillitis: 2 cases and a review of the literature. Anaerob 2010; 16:626-628

Cunningham MW. Pathogenesis of Group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev 2000; 13:470-511

Cunningham MW. *Streptococcus* and rheumatic fever. Curr Opin Rheumatol 2012; 24(4):408-416

Dajani A, Taubert K, Ferrieri P, Peter G, Shulman S. Treatment of acute streptococcal pharyngitis and prevention of reumatic fever: a statement for health professionals. Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the council on cardiovascular disease in the young, the american heart association. Pediatrics 1995; 96:758-764

Dale JB. Multivalent Group A streptococcal vaccine designed to optimize the immunogenicity of six tandem M protein fragments. Vaccin 1999; 17(2):193-200

Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, Ieven M, Goossens H. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. J Antimicrob Chemother 2000; 45:1467-1473

De Vos P, Boone DR, George MG, Castenholz RW, Brenner J, Krieg NR, Staley JT. Bergey's manual of systematic Bacteriology, 2da edición. Springer, 2011

Dhanda V, Vohra H, Kumar R. Virulence potential of Group A streptococci isolated from throat cultures of children from north India. Indian J Med Res 2011; 133:674-680

Dmitriev A, Chaussee M. The *Streptococcus pyogenes* proteome: maps, virulence factors and vaccine candidates. Future Microbiol 2010; 5(10):1539-1551

QIAGEN, DNeasy® Blood & Tissue Handbook. Austin, Texas, 2006

Ebell MH, Smith MA, Barry HC, Ives K, Carey M. The rational clinical examination. Does this patient have strep throat? JAMA 2000; 284:2912-2908

Facklam R. What happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clin Microbiol Rev 2002; 15(4):613-630

Figueroa Martínez FJ. Tipificación molecular del gen que codifica para la proteína M (*emm*) en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Dirigida por LM Perea Mejía. Tesis de licenciatura inédita UNAM, Facultad de Química, 2004.

Filleron A, Jeziorski E, Michon A, Rodière M, Marchandin H. Current insights in invasive Group A streptococcal infections in pediatrics. Eur J Pediatr 2012; 171:1589-1598

Friães A, Pinto FR, Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Group A streptococci clones associated with invasive infections and pharyngitis in Portugal present differences in *emm* types, superantigen gene content and antimicrobial resistance. BMC Microbiol 2012; 12:280

Garza R, Departamento de Biología. Manual de Prácticas de Bacteriología. México, Facultad de Química, UNAM, 2005

Gerber MA. Comparison of throat cultures and rapid strep test for diagnosis of streptococcal pharyngitis. Pediatr Infect Dis J 1989; 8:820-824

Gerber MA, Shulman ST. Rapid diagnosis of pharyngitis caused by Group A streptococci. Clin Microbiol Rev 2004; 17:571-580

Gerber MA, Tanz RR, Kabat W, Dennis E, Bell GL, Kaplan EL, Shulman ST. Optical immunoassay test for group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis. An office-based, multicenter investigation. JAMA. 1997; 19;277 (11):899-903

Gossling J. Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. Rev Infect Dis. 1988; 10:257-285

Grivea IN, Al-Lahham A, Katopodis GD, Syrogiannopoulos GA, Reinert RR. Resistance to erythromycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolates obtained between 1999 and 2002 from Greek children with tonsillopharyngitis: phenotypic and genotypic analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:256-261

Hamada A, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980; 44:331-384

Hardie JM, Whiley RA. The genus *Streptococcus*. The genera of lactic acid bacteria ed. Wood BJB and Holzapfel WH. Vol (2):55-124. Blackie Academic and Professional, 1995

Hoge CW, Schwartz B, Talkington DF, Breiman RF, MacNeill EM, Englender SJ. The changing epidemiology of invasive group A streptococcal infections and the emergence of streptococcal toxic shock-like syndrome. A retrospective population-based study. *JAMA*. 1993; 269(3):384-389

Hu MC, Walls MA, Stroop SD, Reddish MA, Beall B, Dale JB. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infect Immun*. 2002; 70(4):2171-2177

Hulkko T, Lyytikäinen O, Kuusi M, Möttönen T, Ruutu P. THL Report. Infectious Diseases in Finland 2008. National Institute for Health and Welfare (THL), Helsinki, 48 pp

Johnson DR, Kaplan EL. A review of the correlation of T-Aglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of Group A streptococci. *J Mol Microbiol* 1993; 38:311-315

Johnson DR, Kaplan EL. False-positive rapid antigen detection test results: reduced specificity in the absence of Group A streptococci in the upper respiratory tract infections, and bronchitis. *JAMA* 1998; 279:875-877

Johnson DR, Kurlan R, Leckman J, Kaplan EL. The human immune response to streptococcal extracellular antigens: clinical, diagnostic, and potential pathogenetic implications. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(4):481-490

Kaplan EL, Johnson DR, Cleary PP. Group A streptococcal serotypes isolated from patients and sibling contacts during the resurgence of rheumatic fever in the United States in the mid-1980s. *J Infect Dis* 1989; 159(1):101-103

Kaplan EL, Johnson DR, Del Rosario MC, Horn DL. Susceptibility of Group A beta-hemolytic streptococci to thirteen antibiotics: examination of 301 strains isolated in the United States between 1994 and 1997. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:1069-1072

Kotloff KL, Dale JB. Progress in group A streptococcal vaccine development. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23(8):765-766

Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933; 57:571-595

Liang Y, Liu X, Chang H, Ji L, Huang G, Fu Z, Zheng Y, Wang L, Li C, Shen Y, Yu S, Yao K, Ma L, Shen X, Yang Y. Epidemiological and molecular characteristics of clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* collected between 2005 and 2008 from Chinese children. *J Med Microbiol* 2012; 61(7):975-983

Luca-Harari B, Ekelund K, van der Linden M, Staum-Kaltoft M, Hammerum AM, Jasir A. Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):79-86

Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER. Erythromycin-resistant Group A streptococci in school-children in Pittsburg. *N Engl J Med* 2002; 346:1200-1206

Martin J, Murchan S, O'Flanagan D, Fitzpatrick F. Invasive Group A streptococcal disease in Ireland, 2004 to 2010. *Euro Surveill* 2011; 16

Mclsaac WJ, Kellner JD, Aufricht P, Vanjaka A, Low DE. Empirical validation of guidelines for the management of pharyngitis in children and adults. *JAMA* 2004; 291:1587-1595

Meisal R, Andreasson IK, Høiby EA, Aaberge IS, Michaelsen TE, Caugant DA. *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: *emm* types, multilocus sequence types and superantigens profiles. *J Clin Microbiol* 2010; 48:842-851

Metzgar D, Baynes D, Hansen CJ, McDonough EA, Cabrera DR, Ellorin MM, Blair PJ, Russell KL, Faix DJ. Inference of antibiotic resistance and virulence among diverse Group A *Streptococcus* strains using *emm* sequencing and multilocus genotyping methods. *PLoS One*. 2009; 4(9):6897

Metzgar D, Zampolli A. The M protein of Group A *Streptococcus* is a key virulence factor and a clinical relevant strain identification marker. *Virulence* 2011; 2(5):402-412

Mihaila-Amrouche L, Bouvet A, Loubinoux J. Clonal spread of *emm* type 28 isolates of *Streptococcus pyogenes* that are multiresistant to antibiotics. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8):3844-3846

Miner L, Petheram SJ, Daly JA, Korgenski EK, Selin KS, Firth SD, Veasy LG, Hill HR, Bale JF Jr. Molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates

collected during periods of increased acute rheumatic fever activity in Utah. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(1):56-61

Mitchell MS, Sorrentino A, Centor RM. Adolescent pharyngitis: A review of bacterial causes. *Clin Pediatr* 2011; 50(12):1091-1095

Montes M, García-Arezana JM. Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25(3):14-20

Nyquist AC, Gonzalez R, Steiner JF, Sande MA. Antibiotic prescribing for children with colds, upper respiratory tract infections, and bronchitis. *JAMA* 1998; 279:875-877

O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, Lynfield R, Gershman K, Craig A, Albanese BA, Farley MM, Barrett NL, Spina NL, Beall B, Harrison LH, Reingold A, Van Beneden C. Active Bacterial Core Surveillance Team. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. *Clin Infect Dis* 2007; 45(7):853-862

O'Seaghdha M, Wessels MR. Streptolysin O and its Co-Toxin NAD-glycohydrolase protect Group A *Streptococcus* from Xenophagic killing. *PLoS Pathog.* 2013; 9(6):1003394

Okabe T, Takeda S, Hida M, Narisada T. Study of T serotypes and *emm* genotypes of *Streptococcus pyogenes* in children with pharyngitis and tonsillitis. *J Nippon Med Sch* 2011; 78(3):174-177

Perea-Mejía LM, Rivas C, Inzunza-Montiel AE, Garza R, Cravioto A. Erythromycin resistance associated to *mefA* gene and *emm75* allele in *Streptococcus pyogenes* from uncomplicated pharyngitis in Mexico. *International congress series 1289 2006*; 99-102

Perea-Mejía LM, Stockbauer KE, Pan X, Cravioto A and Musser JM. Characterization of group A *Streptococcus* strains recovered from Mexican children with pharyngitis by automated DNA sequencing of virulence-related genes: Unexpectedly large variation in the gene (*sic*) encoding a complement-inhibiting protein. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3220-3224

Poses RM, Cedul RD, Collins M, Fager SS. The accuracy of experienced physicians' probability estimates for patients with sore throats, implications for decisions making. *JAMA* 1985; 254:925-929

Randolph MF, Gerber MA, De Meo KK, Wright L. Effect of antibiotic therapy on the clinical course of streptococcal pharyngitis. *J Pediatr* 1985; 106:870-875

Reheder CD. Comparison of methods for obtaining serum opacity factor from group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1995; 33(11): 2963-2967

Report of the Committee on infectious disease. Pickering LK, editos. 29 Edition, Group A streptococcal infection. Elk Grove Village, IL: American Academy of pediatrics 2012; 668-680

Richardson LJ, Towers RJ, Cheng AC, Currie BJ, Carapetis JR, Giffard PM, McDonald MI. Diversity of *emm* sequence types in Group A beta-haemolytic streptococci in two remote northern territory indigenous communities: implications for vaccine development. *Vaccine* 2010; 28:5301-5305

Rivas López, MC. Identificación de genes asociados a la resistencia a macrólidos en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Dirigida por LM Perea Mejía. Tesis de licenciatura inédita UNAM, Facultad de Química, 2005

Roche Diagnostics Corporation. Medical and Scientific Affairs Clinical Reviews: Group A *Streptococcus*, 2010

Shet A, Kaplan EL. Clinical use and interpretation of Group A streptococcal antibody tests: a practical approach for the pediatrician or primary care physician. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:420-426

Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerger MA, Kaplan EL, Lee G, Martin JM y Van Beneden C. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of Group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2012; 55(10):1279-1282

Shulman ST, Stollerman G, Beall B, Dale JB, Tanz RR. Temporal changes in streptococcal M protein types and the near-disappearance of acute rheumatic fever in the United States. *Clin Infect Dis* 2006; 42(4):441-447

Silva-Costa C, Friães A, Ramirez M, Melo-Cristino J. Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections. Differences between macrolide-resistant and susceptible *Streptococcus pyogenes*: Importance of clonal properties in addition to antibiotic consumption. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(11):5661-5666

Smoot JC, Barbian KD, Van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Porcella SF, Parkins LD, Beres SB, Campbell DS, Smith TM, Zhang Q, Kapur V, Daly JA, Veasy LG, Musser JM. Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(7):4668-4673

Snow V, Mottur-Pilson C, Cooper RJ, Hoffman JR. Principles of appropriate antibiotic use for acute pharyngitis in adults. *Ann Intern Med* 2001; 134:506-508

Stathi A, Papaparaskvas J, Zachariadou L, Pangalis A, Legakis NJ, Tseleni-Kotsovili A, Hellenic Strep-EURO Study Group, Tassios PT. Prevalence of *emm*-type 1 and 12 from invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Greece-results of enhanced surveillance. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(8):808-812

Steer AC, Batzloff MR, Mulholland K, Carapetis JR. Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22(6):544-552

Steer AC, Dale JB, Carapetis JR. Progress toward a global group a streptococcal vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 32(2):180-182

Steer AC, Lamagni T, Curtis N, Carapetis JR. Invasive Group A streptococcal disease. *Drugs* 2012; 72(9):1213-1227

Stevens DL, Kaplan EL. *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. Edición ilustrada. Oxford University Press, 2000

Stollerman GH. Rheumatic fever in the 21st century. *Clin Infect Dis* 2001; 33(6):806-814

Stollerman GH. The relative rheumatogenicity of strains of Group A streptococci. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1975; 44(7):35-40

Stollerman GH, Dale JB. The importance of the Group A *streptococcus* capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective. *Clin Infect Dis* 2008; 46(7):1038-1045

Szczypa K, Sadowy E, Izdebski R, Strakova L, Hryniewicz W. Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11):3975-3979

Tanz RR, Gerber MA, Kabat W, Rippe J, Seshadri R, Shulman ST. Performance of a rapid antigen-detection test and throat culture in community pediatric offices: implications for management of pharyngitis. *Pediatrics* 2009; 123:437-444

Tartof SY, Reis JN, Andrade AN, Ramos RT, Reis MG, Riley LW. Factors associated with Group A *Streptococcus emm* type diversification in a large urban setting in Brazil: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2010; 10:327

Vähäkuopus S, Vuento R, Siljander T, Syrjänen J, Vuopio J. Distribution of *emm* types in invasive and non-invasive Group A and G streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:1251-1256

Veasy LG, Tani LY, Daly JA, Korgensky K, Miner L, Bale J, Kaplan EL, Musser JM, Hill HR. Temporal association of the appearance of mucoid strains of *Streptococcus pyogenes* with a continuing high incidence of rheumatic fever in Utah. *Pediatrics* 2004; 113:168-172

Wannamaker LW. Perplexity and precision in the diagnosis of streptococcal pharyngitis. *Am J Dis Chil* 1972; 124:352-358

Whatmore AM, Vivek K, Musser JM, Kehoe MA. Molecular population genetic analysis of the *enn* subdivision of Group A streptococcal *emm*-like genes: Horizontal gene transfer and restricted variation among *enn* genes. *Mol Microbiol* 1995; 15(6):1039-1048

Wozniak A, Rojas P, Rodríguez C, Undabarrena A, Garate C, Riedel I, Román JC, Kalergis AM, García P. M-protein gene-type and hyaluronic acid capsule in Group A *streptococcus* clinical isolates in Chile: association of *emm* gene markers with *csrR* alleles. *Epidemiol Infect* 2012; 140:1286-1295

Wu PC, Lo WT, Chen SJ, Wang CC. Molecular characterization of Group A streptococcal isolates causing scarlet fever and pharyngitis among young children: A retrospective study from a northern Taiwan medical center. *J Microbiol Immunol Infect* 2013; 20, 1-7

Zachariadou L, Stathi A, Tassios PT, Pangalis A, Legakis NJ, the Hellenic Strep-Euro Study Group, Papaparaskevas J. Differences in the epidemiology between pediatric and adult invasive *Streptococcus pyogenes* infections. *Epidemiol Infect* 2013; 7:1-8