

720665

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

54

**PROPIEDADES BIOLÓGICAS ESTRUCTURALES  
DEL ESTREPTOCOCO GRUPO A**

**T E S I S**

**Que Para Obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a**

**AMADA PLIEGO CASTAÑEDA**

**México, D. F.**

**1978**



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.

CLAS TESIS 1978  
ABO M.T. 342  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROC \_\_\_\_\_  
S \_\_\_\_\_



Jurado asignado según el tema.

Presidente: \_\_\_\_\_  
Oscar Amor Dodero

Vocal: \_\_\_\_\_  
Guadalupe Velez Prass

Secretaria: \_\_\_\_\_  
Elda Peniche Quintana

1er. suplente: \_\_\_\_\_  
Leonor Soto Martínez

2do. suplente: \_\_\_\_\_  
Beatriz Luna Millan

Sitio donde se desarrollo el tema: Bibliotecas de la  
ciudad Universitaria.

Nombre completo y firma del sustentante:

\_\_\_\_\_  
Amada Pliego Castañeda

Nombre completo y firma del asesor del tema:

\_\_\_\_\_  
Q.F.B. Elda Peniche Q.

A mis padres y hermanos  
con cariño y gratitud por  
su apoyo físico y moral.

A la maestra Q. F. B. Elda Peniche por su acertada supervisión y guía en la elaboración del tema.  
A la Dirección General de los Servicios Médicos de esta universidad y en especial al laboratorio de Inmunología por su apoyo y aportación del material necesario para la elaboración del tema así como su participación en mi formación profesional. A Hilda y Benjamín por hacer más presentable este trabajo, a mis maestros y amigos que contribuyeron al término de esta etapa de mi vida.  
A todos ellos mis más sinceros agradecimientos

## CONTENIDO

### INTRODUCCION

#### I.- GENERALIDADES

A.- Antecedentes

B.- Características generales del estreptococo

C.- Objetivo del estudio

#### II.- CLASIFICACION DEL ESTREPTOCOCO

#### III.-EFECTOS Y PROPIEDADES DEL ESTREPTOCOCO

1.- Comportamiento in vitro

2.- Cultivo

3.- Conservación

4.- Esterilización

#### IV.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES DEL ESTREPTOCOCO GRUPO "A"

1.- Cápsula

2.- Pared celular

3.- Membrana celular

4.- Citoplasma

5.- Exotoxinas y enzimas

6.- Formas L

#### V.- COMENTARIOS

#### VI.- Bibliografía

## INTRODUCCION

Después de más de un siglo del descubrimiento del estreptococo, no ha sido posible tomar una medida segura que prevenga la patología de este germen, y solamente en poco se ha disminuído la frecuencia de dicha patología, este hecho desafortunado junto con la severidad de los efectos que de su infección resultan, han hecho necesarios los estudios cada día más profundos de su naturaleza y las propiedades que ella implica. En este trabajo se pretende hacer una revisión lo más completa posible de esas propiedades, con el objeto de esclarecer las múltiples interrogantes que de su comportamiento resultan, fijando la atención en sus características estructurales y bioquímicas como un enfoque desde el cual pudiera lograrse el objetivo. Se intenta también la elaboración de un modelo estructural con la integración de los conocimientos dispersos en la literatura ubicándolos en el modelo de Krause de 1963 que sirve de base a este estudio y que en este momento resulta ya incompleto dada la cantidad de información que a este respecto existe; la proposición de la unión entre las estructuras no dadas y las posibilidades que se tienen para la erradicación definitiva de este microorganismo que ha llenado una gran parte de la patología humana no solo a nivel infeccioso sino también a nivel inmunológico y la intervención que en cada proceso, tiene uno u otro de sus componentes. Por otra parte como todo estudio bibliográfico, se pretende reunir la mayor información posible con el objeto de tener un mejor acervo que permita el manejo de este germen y una fuente de datos para las personas interesadas en el tema.

## 1.- GENERALIDADES

A.- Antecedentes.- Desde 1864 es bien conocida la importancia que en la Médicina tiene el estreptococo, ya que fué en éste año en el que Billroth lo describió después de observarlo a partir de lesiones purulentas. Posteriormente fueron aislados de otros enfermos con escarlatina, erisipela, septicemia, etc.; probando así su enorme distribución y su capacidad de producir enfermedades diversas ( 73 y 51 ). Hoy en día se sabe que existen variedades patógenas de éste germen en los animales que no son patógenas para el hombre y viceversa, así como variedades que parasitan en forma natural y sin causar daño en condiciones normales a sus huéspedes, como es el caso de los enterococos.

B.- Características generales del estreptococo.- El mismo Billroth les dió el nombre de estreptococos y los describió como microorganismos esferoidales de 0.1 a 1.0 micras de diámetro, en forma de cocos que se asocian en cadenas de 2 a 16 ó más microorganismos, por medio de una unión que tiene la misma composición de su pared celular dependiendo del medio en que se encuentren (11 y 44) Con la tinción Gram se tiñen de color violeta por la afinidad que tienen a los colorantes básicos y su propiedad de retenerlos debido a la presencia de ribonucleato de magnesio que forma un complejo con el colorante y el lugol insoluble en alcohol-acetona; cuando estos gérmenes envejecen pueden perder su capacidad de tinción, probablemente por la actividad de las nucleasas que el mismo germen produce.

Los estreptococos se multiplican por bipartición transversal alar -

gando así la cadena estreptococcica ésta se puede separar en cocos aislados o diplococos dependiendo del medio en que se encuentren. La existencia de anticuerpos anti proteína M estreptococcica evita que haya separación y facilita el alargamiento de la cadena (90), esto mismo ocurre en los medios de cultivo enriquecidos cuando son líquidos.

D.- Objetivo del estudio. - Es un hecho real el gran número de conocimientos que se tienen en relación a las diferentes características morfológicas, estructurales, bioquímicas y funcionales del estreptococo (99, 107, 61). Aunado a éstos, están los que resultan de su capacidad patogénica. A pesar de este conocimiento y del gran armamento terapéutico, no se ha podido erradicar sino solamente disminuir la frecuencia de su patología.

En cuanto a la fiebre reumática y su relación con el estreptococo se refiere, nos ha inquietado que en sus mecanismos etiofisiopatogénicos estén involucrados mecanismos inmunológicos. Desde 1956 Kaplan describió la presencia de anticuerpos antisarcolema y antissarcolema en pacientes con fiebre reumática (47). Posteriormente se pudo demostrar la presencia en el suero de estos pacientes de otros tipos de anticuerpos tales como: antimiocina, anticorazón (72 y 4), anticarbohidrato A estreptococcico y antiproteína valvular (33). Otros datos que hacen pensar en la participación inmune en el daño tisular en la fiebre reumática son: la presencia de inmunoglobulinas y el tercer componente del complemento hemolítico - (beta-1-c) en los nódulos de Aschoff, que se refieren como característicos de la fiebre reumática (34). Otro hecho importante es que se ha demostrado en los es-

tudios de Zabriskie y otros investigadores, el gran mimetismo o similitud antigénica de las células de mamíferos entre ellos el hombre con la estructura antigénica del estreptococo (106).

Estos hechos han movido nuestro interés para la realización de una revisión y actualización sobre los conocimientos básicos estructurales del estreptococo del grupo A.

## II.- CLASIFICACION DEL ESTREPTOCOCO

Dentro de la escala biológica, los estreptococos se sitúan dentro de los vegetales, orden IV de los Eubacteriales, familia Lactobacteriaceae, tribu Streptococaceae, género Streptococcus (107). Existen diversas formas de clasificarlos - una de las más usadas es su comportamiento in vitro en el medio de gelosa-sangre, en el que muestran su capacidad de hemólisis sobre los eritrocitos de carnero. Schärdler propuso que esta propiedad se utilizara para clasificarlos, idea que más tarde usó Brown, quién los diferenció en tres grupos: alfa, beta y gama hemolíticos. La alfa hemólisis se define como la capacidad de romper eritrocitos con liberación de hemoglobina y ésta da una coloración verdosa al medio. La beta hemólisis se define como la destrucción total de los eritrocitos dando un halo transparente alrededor de la colonia del microorganismo. Por último la gama hemólisis (impropiamente llamada así) se define como la ausencia de esta propiedad (9).

Es en base a los estudios de Lancefield, que se usen para su clasificación las características antigénicas de estos microorganismos.

La base de la clasificación por grupos es la molécula estructural de la pared celular llamada carbohidrato o sustancia C específica de grupo. A la fecha se han descrito los grupos A, B, C, D, E, F, G, H, L, M, N, O, P, Q, y R.

La clasificación de los subgrupos o tipos, dependen de las características antigénicas de las proteínas estructurales componentes de la pared celular. Sin tomar en cuenta la hemólisis o la resistencia a la bacitracina ya que se han encontrado estreptococos del grupo A no hemolíticos y resistentes a la bacitracina (59 y 107). El número de tipos en cada grupo es variable, en el grupo A se han descrito 60 serotipos (53 y 54).

### III.- EFECTOS Y PROPIEDADES DE ESTREPTOCOCO

#### 1.- Comportamiento in vitro.

A).- Cultivo. - Los estreptococos requieren de medios enriquecidos para su crecimiento; no existen medios específicos, pero necesitan complementarse 15 aminoácidos, las vitaminas del complejo B, purinas y pirimidinas (85, 86 y 103) y favorecen su crecimiento sustancias reductoras como cisteína y tioglicolato. Cuando se desea favorecer la síntesis de una enzima o exotoxina, es necesario recurrir a medios más complejos tales como infusión de carne y peptona, cuyos componentes sean dializables. Su pH óptimo de crecimiento oscila entre 6.4 y 7.6 y su temperatura óptima es de 37 °C.

Los medios que son favorables y más comunmente usados para el desarrollo de estreptococos patógenos son medios adicionados de sangre total, suero sanguíneo ó trasudados con glucosa al 0.5%.

En medios sólidos los estreptococos grupo A forman tres tipos de colonias que se han designado como mate, brillante o lustroso y mucóide, y dependen de las propiedades estructurales y enzimáticas de los microorganismos que las forman principalmente por la presencia de ácido hialurónico capsular.

Las cepas mucóides presentan abundante material capsular produciendo una colonia húmeda, lisa y brillante, y cantidad importante de proteína M; las colonias mate contienen menor cantidad de ácido hialurónico y contiene también proteína M, ambas son virulentas. Por último las colonias brillantes son muy pequeñas, no tienen cápsula los microorganismos que la forman, contienen poca o ninguna proteína M y son avirulentas (17). Sin embargo se han descrito variantes, en las cuales el tipo mate era avirulento y el brillante virulento (58); también se ha descrito otra variante de tipo mucóide y virulenta que pasó a ser brillante (69 y 56).

B).- Conservación..- En forma natural, los estreptococos pueden permanecer vivos en esputo, exudados y excreciones de animales durante algunas semanas. En medios de cultivo artificiales, pueden conservarse durante 10 días a temperatura ambiente, o en congelación durante varias semanas en cualquier medio de cultivo, si este medio contiene sangre desfibrinada el tiempo de conservación se alarga y puede durar meses o años cuando se han liofilizado (107).

C).- Esterilización..- Los estreptococos se destruyen por exposición durante 30' a 60°C, en autoclave a 120°C, 15 lb de presión durante 10' ó bien por la acción de solvente químicos tales como: tintura de yodo, fenol al 0.5%, mercurcromo al 2% y hexilresorcinol al 0.01% (107).

#### IV.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES DEL ESTREPTOCOCO GRUPO "A"

Los estudios iniciales encaminados a conocer la estructura química del estreptococo, fueron realizados por Lancefield en 1928, quien con extractos de estreptococos tratados con ácido clorhídrico caliente, trataba de obtener las sustancias que en base a su antigenicidad se pudieran tipificar o clasificar; posteriormente fueron encontradas las sustancias, contenido básico de los germenos y después se diseñaron experimentos para encontrar la localización de dichos componentes (91 y 92).

Después de una serie de estudios, Krause en 1963 dió a conocer su modelo de estructura de cápsula, pared y membrana del estreptococo del grupo A, de acuerdo a la distribución que se les había demostrado en estudios experimentales ( fig. # 1 ).

1.- Cápsula.- La cápsula se describe como el elemento celular más externo, que está cubriendo y rodeando al germen. La cápsula es un polímero de ácido hialurónico que contiene cantidades equimoleculares de N-acetil glucosamina y ácido glucurónico (65). Este compuesto, es químicamente idéntico al hialuronato de mamíferos y quizá esta sea la causa de que aún reuniendo las características de antígeno no evoque respuesta inmune (40 y 75) Seastone encuentra evidencia además, de que la cápsula le confiere al germen resistencia contra la fagocitosis (81); este hecho fué corroborado por Hirsch y Church, utilizando leucocitos de conejo, observó que los estreptococos capsulados eran deficientemente fagocitados, en cambio cuando se agregaba hialuronidasa al sistema, la fagocitosis se incrementaba (82 y 41) ( fig. # 2 ).

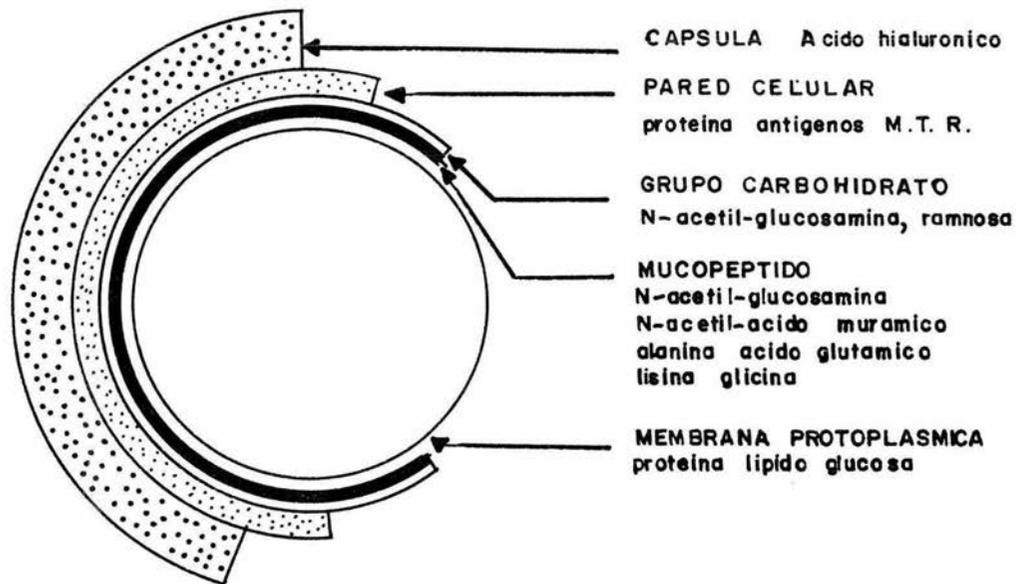
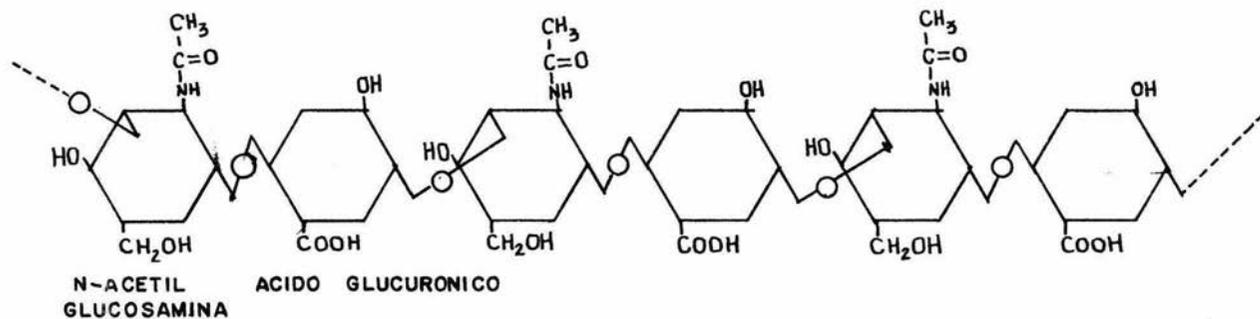


FIG. No 1 Diagrama esquemático de la  
 célula de estreptococo hemolítico  
 - TIPO A



**FIG. No 2 CAPSULA  
POLIMERO DE ACIDO HIALURONICO**

2.- Pared celular.- La pared celular ésta constituida básicamente de proteínas y azúcares aminados. La primera capa la constituyen los antígenos proteicos de los que dependen los serotipos, se diferencian por sus propiedades fisicoquímicas y en base a estas diferencias se han descrito las siguientes: M, T, R, B y otras.

Proteína M. Swason utilizando anticuerpos anti proteína M marcados con ferritina los que hacia reaccionar con estreptococos decapsulados y después observando al microscopio electrónico, dió a conocer la localización de esta proteína en la superficie del coco (92). La proteína M es estable a hidrólisis ligeramente ácida ó alcalina y lábil a hidrólisis enzimática con tripsina o pepsina. Tiene un peso molecular de 36,500 Daltons y es probable que presente dímeros de peso molecular de 70,000 Daltons. El análisis de aminoácidos le revela un mayor contenido de glicina y ácido glutámico en relación con otros aminoácidos (14). También es considerado como un factor de virulencia en la inhibición de la fagocitosis del germen. Otros estudios muestran que la proteína M tiene dos fracciones; una de ellas le da la tipospecificidad (TSM) y la otra no se relaciona con la especificidad (NTSM) (96). Esta última fracción le confiere propiedades de virulencia, además de que se pudo demostrar que es contra esta fracción de la proteína que van dirigidos los anticuerpos citotóxicos y los linfocitos sensibilizados (5); hecho de gran importancia ya que esta fracción presenta reacción cruzada con antígenos de estructura de las células del huésped especialmente del tejido cardiaco (6) previamente descrito por Kaplan (48). Actualmente se han logrado separar estas fracciones y se ha llegado a obtener la fracción TSM libre de inmunotoxicidad con lo cual se ha obtenido una vacuna tipo-especifica en

contra la infección de este microorganismo (103), con la base de haberse demostrado antes, la protección que los anticuerpos antiproteína M, daban en contra de las infecciones por estreptococo del mismo tipo contra el que se tenían los anticuerpos (104).

Antígeno T.- Este antígeno es un conjunto de proteínas que se designan como - antígeno T, es también responsable de la especificidad, algunos serotipos T son M pero no todos los serotipos M son T; se encuentran asociados ambos antígenos - y se separan por sus diferencias hidrolíticas, ya que el antígeno T es eliminado - en las hidrólisis ácidas pero es resistente a las hidrólisis por enzimas. Para investigar los serotipos T se utilizan reacciones de aglutinación del microorganismo - tratado con enzima ( tripsina ó pepsina ) ( 35 y 36 ).

Antígeno R.- Al igual que los anteriores es también una proteína, es resistente a la acción enzimática por tripsina pero sensible a la pepsina; se destruye por calor muy lentamente y a pH ácido. Este antígeno R se ha encontrado en los estreptococos del grupo A de los tipos 2, 3, 28 y 48 ( 35 ).

Antígeno B.- Este también es una proteína lábil a la digestión de enzimas é hidrolisisalcalina, pero resistente a la hidrólisis ácida por tiempos cortos. Se describió en el estreptococo del grupo A del tipo 3 y parece ser que bloquea la formación de anticuerpos antiproteína M. Por último existe otro grupo de proteínas que se pierden en las hidrólisis y no ha sido posible averiguar su naturaleza (31). Cuando se han extraído por medios químicos o enzimáticos los antígenos proteicos queda expuesto sobre la célula estreptocócica, el carbohidrato de grupo.

El carbohidrato o sustancia C de grupo, es un polímero de N-acetil glucosamina

y ramnosa en proporción 1:2.58 para el estreptococo del grupo A; el carbohidrato ocupa el 10% del peso seco del microorganismo (61 y 79). Este carbohidrato es la base de la clasificación por grupos de Lancefield.

La localización exacta se demostró en microscopía electrónica utilizando para ello anticuerpos marcados con ferritina. Se sitúa en la cara interna de las proteínas y en la cara externa del mucopéptido (91). La cadena de ramnosa está unida por enlaces 1,2 y 1,3 glucosídicos y una unión alfa 1,3 en el residuo terminal de la N-acetil glucosamina (12). McCarty describió sus propiedades antigénicas y observó que la especificidad reside en el residuo de la N-acetil glucosamina; ésto se probó por estudios inmunológicos, sometiendo el carbohidrato a la acción de una enzima similar a una glucosaminidasa, con lo que se perdía la especificidad de grupo, pero se observaba la actividad de otro determinante antigénico, el de la ramnosa (62).

Ayoub y Wannamaker pudieron demostrar la presencia de beta N-acetil glucosaminidasa en los leucocitos humanos y macrófagos de conejo, con la diferencia de que esta enzima solo degrada el polisacárido de estreptococo del grupo A específicamente (2).

Es a la luz de estos estudios donde se empezó a visualizar la posibilidad de una reacción cruzada entre el carbohidrato del estreptococo del grupo A y algunas estructuras de mamíferos que tengan dentro de su composición química a la N-acetil glucosamina, como son las sustancias de grupo sanguíneo (12). En 1967 Goldstein y sus Col. describieron la reacción cruzada entre este antígeno y una glicoproteína de las válvulas de corazón de humano y bovino (33).

Este hecho se toma como un argumento para la posible explicación de la fisiopatología de la lesión valvular en la fiebre reumática.

La síntesis de los carbohidratos de grupo de los estreptococos es dependiente de la temperatura y tiene su máximo a 22°C in vitro ( 3 ). Cuando se inyecta el carbohidrato por vía intraperitoneal o subcutánea en animales experimentales permanece en el sitio de la inyección durante 13 semanas si se encuentra asociado al mucopéptido, cuando se encuentra solo, desaparece rápidamente y se va a localizar en las células fagocíticas del bazo, hígado, nódulos linfáticos del tubo digestivo y en menor proporción en ganglios linfáticos periféricos y en el pulmón. El carbohidrato por sí mismo produce lesiones inflamatorias granulomatosas crónicas (80).

En cuanto a la inmunidad que provoca, se pudo observar que deja memoria inmunológica de larga vida y que la respuesta de anticuerpos está dada por inmunoglobulina G (18). Después de períodos prolongados la estructura del carbohidrato A<sub>1</sub> cambia a la estructura de la variante de A, esta es una estructura en la que se ha perdido la N-acetil glucosamina terminal y por esto tiene una especificidad antigénica diferente ( 52 ).

Mucopéptido.- Es la sustancia responsable de la rigidez de la pared celular, está compuesto de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico en proporción 1:0.7 y un número reducido de aminoácidos, que en el estreptococo son: alanina lisina, glicina y ácido glutámico en proporción 3:1:1:1; éstos fueron identificados después de hidrólisis con tripsina ya que con este tratamiento la fracción mucopéptido de la pared queda en forma soluble, no es una sustancia específica del

estreptococo, es común a todos los microorganismos, con la única variación en la composición de los aminoácidos. Es el sitio de acción de enzimas como la lisosima, que dió pauta para investigar los enlaces que lo unen; es tóxico por sí mismo, ya que cuando es inyectado in vivo y bien purificado, produce lesiones dermonecróticas agudas y persiste en la piel de conejo de 4 a 8 horas después de la inyección, ésto fué probado por autorradiografía usando anticuerpos marcados (80).

Acidos Teicoicos. - El modelo de Krause y las revisiones de McCarty resumen una gran cantidad de datos acerca de la estructura de la pared celular del estrep to coco, sin incluir los ácidos teicoicos que se encuentran inmediatamente exte ri o res a la membrana plasmática. Estos fueron localizados al microscopio electro n f ico por la presencia de láminas opacas al electrón, teñidas con acetato de ura n i lo, propiedad característica de los compuestos que tienen abundantes grupos fos f ato y que sugiere la presencia de ácidos teicoicos y glicerol en las prepara ci o nes a partir de estrep to coc os del grupo A. Esto sólo se observa en microorga n i s m os que tienen su pared parcialmente removida y está ausente en los extractos de pared (91). Estos ácidos se describen en general para los microorganismos Gram + como el constituyente del 20 - 40% del peso de la pared celular, es una cadena polimérica de glicerol, ligada por enlaces fosfodiéster con grupos oxi dr il os alternados y el fosfato de glicerol unido al residuo terminal de la N-ace ti l glu co s a m i na del mucopéptido (55). Un ácido teicoico de Streptococcus pyo g e n e s 1-RP41 es un ácido lipoteicoico compuesto de 40% de glicerol, 20% de ala n i na, 13% de fósforo y 8% de glucosa con un contenido variable de ácidos fos f o r o.



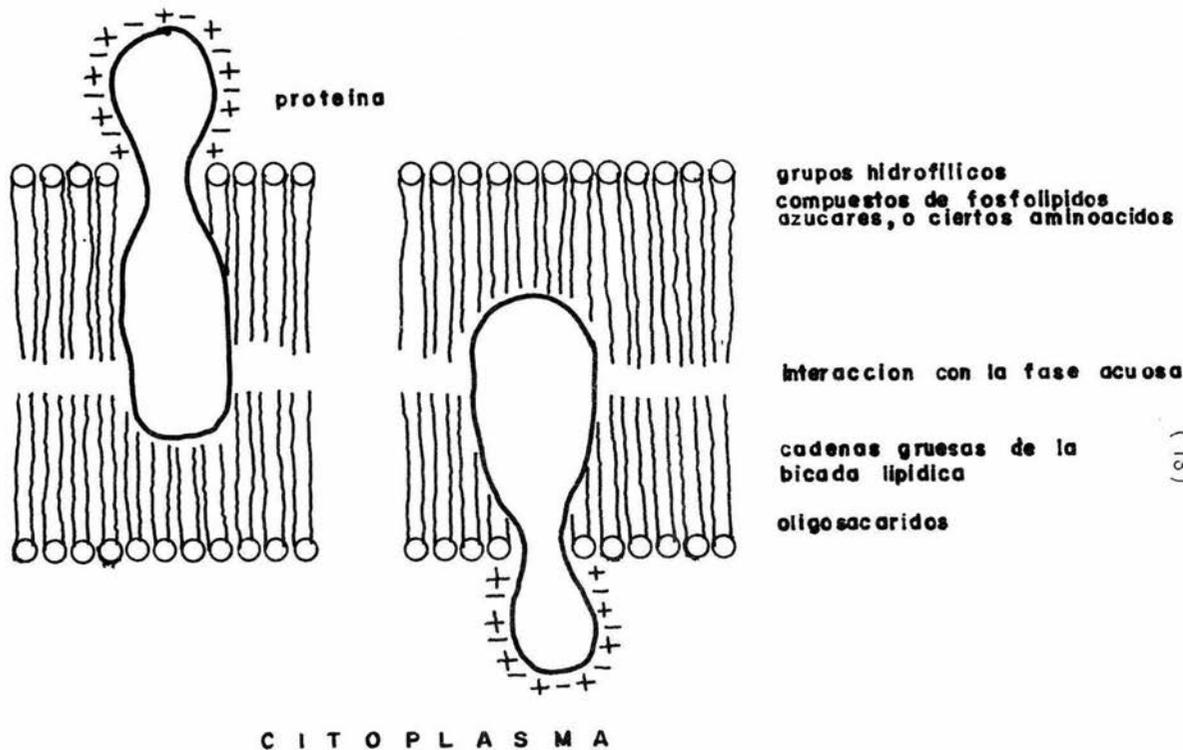
Con respecto a su inmunidad, los ácidos teicoicos en solución no son inmunogénicos; sin embargo, cuando se precipitan en presencia de suero bovino metilado se estimula la producción de anticuerpos que cuando crece demasiado llega a producir reacciones alérgicas y llegar hasta choque anafiláctico, probablemente por formación de complejos inmunes que gastan complemento. En presencia de otros antígenos se comporta en forma variable dependiendo del antígeno algunas veces como depresor de la respuesta inmune y otras como activador de la misma ( 77 y 66 ).

En la patogénesis del germen juegan un papel importante ya que se demostró que estos ácidos lipoteicoicos enlazan espontáneamente las membranas de células de mamíferos por medio de un enlace esterfosfato de los ácidos grasos, dicha unión se lleva a cabo con una fibra del ácido lipoteicoico que aflora a la superficie del coco decapsulado, y que se conserva aún después de la hidrólisis de la proteína M cuando se usan enzimas ( 24 ).

Membrana Celular.- Fue ampliamente estudiada por Freimer ( 26 ), quién aisló las membranas libres de fragmentos de pared celular y de contaminación con material citoplásmico, induciendo primero formas L de estreptococo grupo A, por remoción enzimática de la pared celular con lisina del fago asociado. Las formas L fueron rotas por acción del sonido, sometidas a la acción de nucleasas para eliminar el material nuclear y por último sometidas a ultracentrifugación para separar las membranas.

Las membranas así obtenidas se observaron al microscopio electrónico para comprobar su integridad. El análisis químico muestra que están constituidas en la si-

# MEMBRANA CELULAR



(18)

FIG. No 4

guiente forma: lípidos 18.5%, proteínas 66.9%, nitrógeno total 10.7%, fósforo 0.5% y solamente 0.6% de RNA, -ramnosa en menos de 1,1% y hexosamina menos de 0.5%.

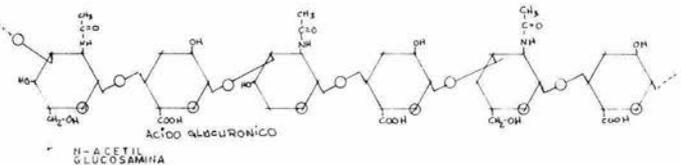
Las propiedades inmunológicas de las membranas fueron diferentes a las de la pared celular; y cruzan antigénicamente con antígenos de subsarcolema de corazón de mamíferos, los antígenos responsables de esto fueron aislados, purificados y caracterizados como 4 polipéptidos de peso molecular 32, 28, 26 y 22 mil Daltons (95), se probó también la citotoxicidad dirigida en contra de miofibrillas cardíacas en cultivos celulares por linfocitos sensibilizados con antígenos estreptocócicos de membranas (57). Estas membranas como las de otras células, pueden ser esquematizadas en el modelo de Singer (8.4) (fig. Núm. 4).

Citoplasma. - El citoplasma del estreptococo posee las mismas funciones que el citoplasma de otras bacterias; cuando se realizan extracciones de estreptococos con álcalis diluidos se encuentran, entre otros elementos, sustancias nucleares que se denominan sustancias P. Antigénicamente son indiferenciables por grupo o tipo y se presume que todos los estreptococos poseen las mismas sustancias nucleares (84). En el citoplasma se ha podido demostrar la producción de 20 sustancias extracelulares con características toxigénicas diferentes, la mayor parte de naturaleza proteica y con actividad enzimática. Estas son: hialuronidasa, proteínasa, toxinas eritrogénicas A, B y C, estreptolisinas O, S, S', y D, hemolisina intracelular, desoxirribonucleasas A, B, C y D, nicotinadenindinucleotidasa, amilasa, esterasa, estreptocinasas A y B y ribonucleasa. La titulación de los anticuerpos en contra de algunas de estas toxinas se utilizan en la práctica clíni

# REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES DEL ESTREPTOCOCCO DEL GRUPO A

PARED CELULAR

CAPSULA polimero de acido Hialuronico

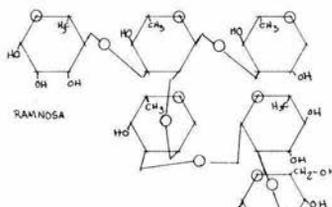


PROTEINAS

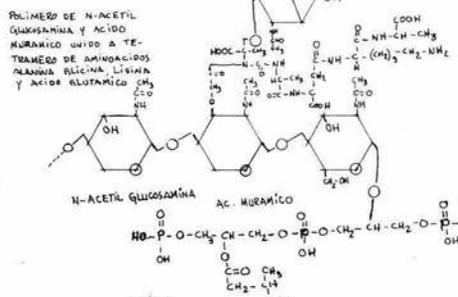
- M** TERMOESTABLE RESISTENTE A SUCROSA ACIDA O ALKALINA LIBRE
- T** NO ES UNA SOLA PROTEINA SINO UNA UNION DE PROTEINAS RESISTENTE A LA DIGESTION DE ENZIMAS PROTEOLITICAS TERMOESTABLES
- R** ES COMUN A LOS TIPOS 2, 3, 28, 48 TERMOESTABLE A 100°C X 15'
- B** INHIBIE LA FORMACION DE ANTICUERPOS ANTI M? TERMOESTABLE

OTRAS. SE PIERDEN EN LOS HIDROLISIS ACIDOS O ALKALINOS.

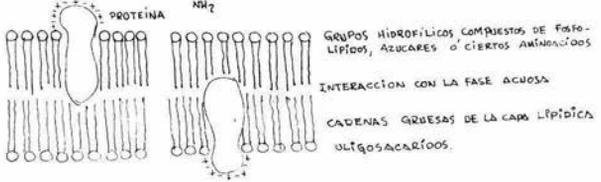
POLISACARIDO o sustancia del grupo (A).



MUCOPEPTIDO



ACIDOS TEICOICOS



MEMBRANA CELULAR

C I T O P L A S M A .

Fig. No 5

ca rutinaria de las infecciones estreptocócicas (46, 7 y 93).

Entre otros experimentos, estos productos extracelulares fueron puestos de manifiesto por análisis electroforético del sobrenadante de un cultivo de estreptococo del grupo A, cuando se eliminaron de este medio las células, los componentes del medio de cultivo y se hizo correr este líquido en gel de almidón, obteniendo una separación que mediante elución del gel fué posible determinar sus características físicoquímicas e inmunológicas (97). Los productos de terminados en este experimento fueron: desoxirribonucleasa, ribonucleasas y estreptocinasa.

Desoxirribonucleasas. - McCarty y Tilled (94 y 60) describieron por primera vez estas enzimas como exotoxinas que desdoblan el ácido desoxirribonucleico, a partir de cultivos de estreptococos; más tarde Wannamaker describió cuatro isoenzimas a las que llamó A, B, C y D, con especificidad antigénica diferente y las siguientes características: la DNAsa C es más resistente a la inactivación por calentamiento, la DNAsa A y C son indiferenciables en cuanto a la inhibición por RNA bacteriano mientras que la B es marcadamente inhibida y la digestión prolongada del RNA con DNAsa B lo destruye química y biológicamente, este hecho evidencia la característica de la DNAsa B como una simple nucleasa que desdobla ambos ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico (98) requieren de iones divalentes para su mejor funcionamiento. Algunas cepas de estreptococo del grupo A producen los cuatro tipos de desoxirribonucleasas pero predominantemente la B. El grupo C de estreptococo produce predominantemente la A. El papel de esta toxina en la patogénesis del microorganismo no es muy clara, pero probablemente sea su actividad enzimática, la que evoca respuesta inmune y

los anticuerpos que se producen se utilizan en el diagnóstico de la infección.

**Ribonucleasa.**- es la enzima que desdobra el ácido ribonucleico, no ha sido posible separarla de la desoxirribonucleasa B, requiere de iones divalentes para su actividad, es inhibida por el ácido ribonucleico, y la relación de ambas actividades es constante en varias preparaciones y después de una inactivación parcial por calentamiento, fué probada también una mutua inhibición por una mezcla de sustratos ( 97 ).

**Proteínasa.**- Elliot y sus colaboradores obtuvieron esta enzima y su precursor inactivo en forma cristalina; este precursor se activa en condiciones de pH 5.5 y 6.5 en presencia de compuestos sulfhidrilo. Es activa contra la proteína M del mismo germen ya que en medios adecuados para su producción, se destruyen automáticamente la proteína M, la hialuronidasa y la estreptoquinasa. La producción de anticuerpos es escasa y se determina por hemaglutinación ( 25 ). Esta enzima probablemente intervenga en la capacidad invasiva del germen.

**Hialuronidasa.**- Esta enzima depolimeriza al ácido hialurónico y dado que esta es la sustancia esencial del tejido conectivo de mamíferos, se le considera un factor de invasividad del germen. Algunos estreptococos forman cápsula de ácido hialurónico y hialuronidasa que destruye su propia cápsula. McCarty (64), ha señalado que las dos funciones se excluyen mutuamente, pero una misma cepa puede producir cápsula mientras se desarrolla en ciertas condiciones y hialuronidasa si crece en condiciones distintas. Es una enzima específica de especie, tiene un peso molecular aproximado de 70,000 daltons, pH óptimo de 6.0 y su actividad es incrementada por agentes reductores ( 39 ). Esta enzima tiene grandes usos te

rapéuticos como vector del agente terapéutico ( 76 y 89 ), en procesos inflamatorios crónicos y en infecciones oftálmicas . Es también producida por el fago asociado a estreptococo 12/12, pero esta última difiere de la hialuronidasa estreptocócica antigénicamente ( 66 ). El fago la usa para disolver la cápsula del microorganismo en la infección. Los anticuerpos antihialuronidasa estreptocócica se utilizan como medio de diagnóstico de las infecciones ya que se elevan considerablemente ( 101 ).

Estreptocinasa.- Tilled y Garner ( 94 ) fueron los primeros en observar la acción de esta enzima en filtrados de cultivos líquidos de estreptococo del grupo A, la estreptocinasa es capaz de remover los coágulos de fibrina humana activando al plasminógeno. Christian por su parte, encontró que  $5 \times 10^{-5}$  microgramos de la estreptocinasa producen un efecto perceptible sobre un coágulo de fibrina. La estreptocinasa es de naturaleza proteica y es destruida por la tripsina. La mayor parte de las cepas del grupo A la producen y algunas cepas de los grupos C y G, la C en mayor proporción y es la que se usa con fines terapéuticos.

Dillon y Wannamaker ( 19 ) han publicado que cepas del grupo A producen dos tipos de estreptocinasa con diferente movilidad electroforética la A y la B, de las que la A es la más común. Esta enzima es antigénica y es posible que lise los coágulos de fibrina que tratan de localizar la infección y sea por esto que las infecciones epidérmicas y subcutáneas se diseminan con gran rapidez. Los usos terapéuticos más comunes son en trombosis pulmonar ( 6, 9 ), en terapia trombolítica de oclusiones en el área interna de la arteria coronaria ( 20 ), y a dosis bajas en terapia de estenosis arterial ( 32 ). Al momento de esta revisión

sólamente se encuentra parcialmente purificada.

**Nicotinamida-adeninadínucleotidasa.** - Esta enzima fué descubierta por Carlson y col. en 1965. Una buena proporción de cepas del estreptococo del grupo A la producen, así como una buena proporción de cepas del grupo C y G. Es antigénica, desdobra el nicotinaminadínucleótido, Ayoub y Wannamaker encontraron en el suero de pacientes con infección estreptocócica la forma inactiva de la enzima (10 y 1). Se ha encontrado una correlación entre la capacidad de ciertas cepas para producir la enzima y la leucotoxicidad (8). Después de varios esfuerzos se logró su purificación gracias al truco de bloquear los grupos sulfhidrilo de la proteínasa estreptococcal, con ello se evitó la destrucción de la NADasa y se pudieron determinar sus propiedades fisicoquímicas que son: NADglycohidrolasa de peso molecular 55,000 Daltons pH óptimo 7.3, temperatura óptima 40°C Km  $5.1 \times 10^{-4}$  y es inhibida por iodoacetamida (74). Su papel en la patogenesis del germen es muy probablemente la leucotoxicidad.

**Amilasa.** - Fué descrita y ampliamente estudiada por Crowley, la sintetizan algunas cepas del grupo A, cuando se cultivan en medios líquidos enriquecidos, su producción se incrementa cuando se agrega al medio un sustrato como plasma humano, almidón, glucógeno o maltosa (13), la enzima tiene propiedades de alfa amilasa.

**Esterasa.** - Esta enzima fué descrita por Stock, en cultivos de estreptococos grupo A tiene como sustrato al acetato de beta naftilo. Evoca respuesta inmune en el hombre y animales, pero los anticuerpos no inhiben su acción de enzima (88) Describieron además 5 tipos inmunológicos de esterases por la presencia de anti-

cuerpos específicos en suero humano a distintos extractos de estreptococos del grupo A usando el método de la doble difusión en tubo ( 32 y 88 ). Se ha probado también la técnica de inmunoelectroforesis y se ha comprobado la tipoespecificidad de los anticuerpos en contra de esta enzima ( 37 ) y la correlación que existe con los títulos de antiestreptolisinas en los pacientes con fiebre reumática ( 38 ).

La característica de patogénesis de esta toxina, radica en que los anticuerpos que evoca no inhiben su acción de enzima.

#### Hemolisinas:

Estreptolisina "O". - Todd en 1932 describió esta lisina, su acción hemolítica y su antigenicidad ( 42 ); actualmente se sabe que es un fosfolípido asociado a una proteína con un peso molecular aproximado de 60,000 Daltons; es oxígeno lábil activada por compuestos de sulfhidrilo, ya que solo es activa en su forma reducida, han sido estudiados sus efectos citotóxicos sobre las diferentes células de mamíferos así como el origen del daño sobre las membranas de las células a las cuales es citotóxica ( 22 ).

Experimentos realizados en los que las células susceptibles se trataron con sustancias que enlazan al colesterol de las membranas y se observó que con este tratamiento ya no se producía la alteración de dichas membranas, partiendo de la base que el colesterol inhibe la acción de la estreptolisina  $\odot$  in vitro ( 70 ), estos hechos hicieron posible la observación de que solamente aquellas células que tienen colesterol en sus membranas son susceptibles a la lisina ( 83 ). También ha sido observado el cambio que produce en el ritmo cardíaco cuando es inyectada en ani-

males de laboratorio ( 43 ). En cuanto a las infecciones en piel, no se encontraba la causa de que el 20% de los pacientes presentaran títulos bajos de antiestreptolisinas en contraste con los títulos altos de anti DNAsa B, viendo la posibilidad de que hubiera una correlación entre el colesterol y los lípidos presentes y la inhibición de la estreptolisina como antígeno; se probaron ambos a partir de conejo y se demostró que los dos inhiben la acción de antígeno de la estreptolisina pero en mayor proporción el colesterol ( 49 ).

La importancia de esta toxina estriba en que el colesterol es un fosfolípido presente en la mayoría de las células y que quizá esta situación favorezca el desarrollo de su actividad tóxica en corazón y en células como leucocitos. Afortunadamente evoca respuesta de anticuerpos neutralizantes de su acción.

Estreptolisina "S" .- Fué también Todd quien describió esta lisina; es oxígeno - estable, no antigénica, cardiotóxica, letal al ratón, causa hinchazón de mitocondrias, destruye lisosomas, causa hemólisis renal severa y necrosis tubular. Su actividad se mide por la acción hemolítica in vitro, o bien por el efecto citotóxico que provoca en algunas células de mamíferos, es de naturaleza lipoproteica y es inhibida por lecitina y beta lipoproteínas ( 28 ). Es responsable de la hemólisis en las cajas de Petri con medios de gelosa-sangre.

Las características sobre eritrocitos de carnero fueron estudiadas por Duncan y sus colaboradores, tratando eritrocitos de carnero con estreptolisina S a varias temperaturas, observaron una primera interacción dependiente de la temperatura, y la subsecuente hemólisis que ocurre entre 0-10° C, expuesta la toxina a 10° C se eleva la hemólisis. Se vió además que la presión coloidosmótica de la

célula interviene en la liberación de hemoglobina ( 23 ).

La característica más importante de esta toxina consiste en no ser antigénica y por esto su capacidad patogénica está dada porque dicha toxina se encuentra libre durante la actividad de la infección, dependiendo de ello algunas manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Estreptolisina "S" .- Es un complejo proteico-polinucleótido-polisacárido, se diferencia por sus características fisicoquímicas, es similar en sus propiedades hemolíticas pero se demostró que tiene como precursores de su formación, sustancias diferentes a la estreptolisina S, como son oligonucleótidos y polinucleótidos ( 28 ).

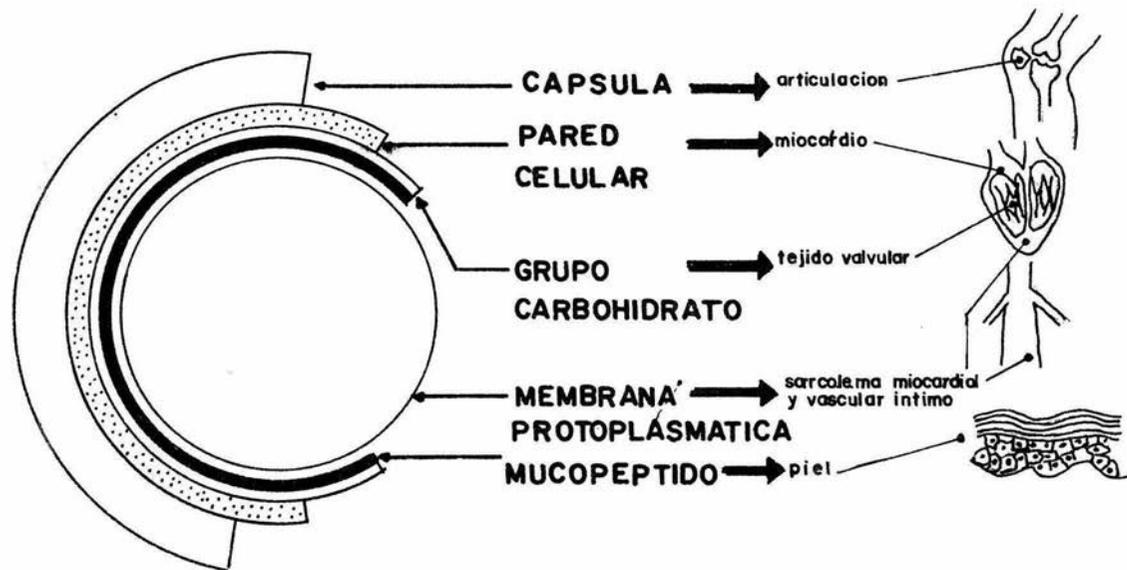
Estreptolisina D .- Esta es una lisina que enlaza a las células y que se encuentra fija a las células estreptocócicas, ya que su acción fue demostrada mediante la incubación de estreptococos del grupo A lavados con eritrocitos de diferentes especies animales, en presencia de  $Mg^{++}$  y compuestos de sulfhidrilo ( 29 ). Tiene también diferentes propiedades fisicoquímicas con respecto a las demás lisinas.

Hemolisina intracelular.- fue puesta de manifiesto cuando los estreptococos del grupo A fueron sometidos a la acción del sonido, es sumamente activa y se distingue fácilmente de la estreptolisina O por las diferencias que hay en la inhibición de ambas lisinas ( 30 ).

Toxina eritrogénica.- Se han descrito 3 tipos : A, B, y C (102) de acuerdo a su diferente movilidad electroforética ; es antigénica, tiene acción vasodilatadora principalmente en los vasos pequeños, es pirogénica, letal al ratón, aumenta la susceptibilidad a la endotoxina, deprime la respuesta del sistema retículo endotelial, es soluble, se destruye por calentamiento, provoca el exantema de la

escarlatina (102). Esta enzima sólo la producen las cepas lisogénicas del estreptococo y es neutralizada por los anticuerpos específicos. Se utiliza en la reacción de Dick y en la de Schultz Carlson (45), y se asocia al ácido hialurónico capsular. Siendo el efecto más importante de esta toxina la depresión del sistema retículo endotelial, los estudios actuales se encuentran avocados hacia la purificación y estudio inmunológico de la toxina (15).

Formas "L". - Las formas L de estreptococos son bacterias sin su pared celular, que tienen características especiales de cultivo y conservación por carecer de ella (16) pero en general, conservan la capacidad de sintetizar todos y cada uno de los productos que sintetizan los estreptococos completos (78), a pesar de su fragilidad a los cambios de osmolaridad, las formas L de estreptococo tienen ventaja competitiva dentro del huésped sobre las formas normales, con respecto a la supervivencia dentro de éste. Aparecen en forma espontánea in vivo o in vitro y pueden inducirse por medio de penicilina o bacitracina, este hecho in vivo se favorece con la terapéutica empleada comúnmente para combatir la infección (107). Afortunadamente las formas L son más fácilmente fagocitadas que un estreptococo completo en condiciones normales



( 29 )

FIG. No 6 Representación diagramática del estreptococo grupo A describiendo los antígenos que presentan reactividad inmunológica cruzada con varios tejidos.

## COMENTARIOS

El estreptococo visto a nivel molecular ofrece una gran diversidad de complicaciones que parcialmente se han dilucidado, la gran cantidad de conocimientos vertidos en la literatura ha mostrado esa complejidad y la gran cantidad de cosas que aún quedan como incógnitas en relación a este germen.

La cápsula tienen sus características propias ya que al parecer el germen la usa como protección ante el sistema de defensa del organismo y la elimina cuando a él le conviene, esto es cuando produce hialuronidasa, en cuanto al huésped se refiere, existen diferentes capacidades en los sueros de pacientes para decapsular al estreptococo, desgraciadamente el factor decapsulante en el suero humano no se ha podido aislar y caracterizar de manera que se pudiera en un momento dado predecir su implicación en el mecanismo de la infección y sus secuelas.

Las proteínas tienen poca toxicidad por sí mismas pero tienen gran capacidad inmunotóxica. En cuanto a las posibilidades de prevenir su infección mediante una vacuna, se han encontrado siempre con la barrera de la similitud antigénica que existe con las estructuras de mamíferos y la probabilidad de que al intentar una vacunación se propicie una autoinmunidad cuando la inmunización se intenta con estructuras de estreptococo, cosa que se ha buscado ampliamente y que hasta hoy no se ha logrado por las características mencionadas durante el desarrollo del trabajo, sin embargo a la fecha se ha comprobado la protección que los anticuerpos anti proteína M estreptocócica dan contra la infección y se ha logrado una vacuna libre de inmunotoxicidad tipo específica, la dificultad que ofre-

ce esta vacuna es que existen 60 serotipos para el grupo "A" así como la falta de estudios respecto a la inmunidad que deja esta vacuna. Por otra parte es necesario considerar que la proteína M es una proteína de un conjunto, entre las que se encuentra la proteína B que parece bloquear la respuesta inmune ante dicha proteína M y que esta proteína no se encuentra expuesta cuando los estreptococos son capsulados.

Por su parte el polisacárido y el mucopéptido son estructuras toxigénicas por sí mismas, ya que además de la similitud antigénica que comparten con válvulas de corazón y piel respectivamente así como los procesos inflamatorios que producen estas estructuras, son degradadas en diferentes proporciones dependiendo del huésped, esta característica pudiera también ser importante en las condiciones que el huésped presente ante la enfermedad.

Los ácidos teicoicos toman ahora un gran auge en relación al proceso de la infección, por la capacidad que tienen de enlazar las células de las mucosas y servir así en la primera interacción con el huésped para que el germen logre su establecimiento.

La membrana por su parte, aún siendo una estructura más interna a la pared celular y relativamente poco expuesta, tiene una gran capacidad inmunotóxica ya que se ha podido demostrar la reacción cruzada entre los anticuerpos que da lugar a las células de corazón de mamíferos, por lo cual viene a ser un potencial de patogenicidad que directamente va a involucrarse en las secuelas de la infección.

En el citoplasma donde se lleva a cabo la biosíntesis de más de 20 exotoxinas, las enzimas del metabolismo del germen y los productos estructurales, se encuen-

tra un alto porcentaje de patogenicidad que generalmente se manifiesta en los signos propios de la infección y que implica por un lado la capacidad toxigénica y por otro la capacidad invasiva del germen dado en función de sus toxinas, así como su capacidad receptora a los fagos que llevan la información genética para producirlas. Es interesante ver como la naturaleza del germen se las ingenia para utilizar estas toxinas como armas útiles para penetrar y establecerse dentro del huésped sin autodestruirse, excepto en el caso de hialuronidasa y proteínasa que por lo menos in vitro se ha visto que destruyen su propia cápsula, la proteína M y algunas enzimas. En cambio las lisinas que tienen como sustrato fosfolípidos presentes también en la membrana del estreptococo y que de estar activas degradarían dichas membranas, el germen habilmente las vierte al exterior en su forma oxidada sea inactiva, hecho que algunas veces probablemente beneficie al huésped por lo menos a que parte no sean activas dentro de él, este es el caso también de otras enzimas tales como DNAsa y NADasa.

En el modelo estructural se trata de localizar todas las partes del estreptococo que aún no se encontraban unidas y que su unión está sujeta a comprobación, estas son: la unión del tetrámero de aminoácidos al puente de alanina que une el polisacárido con el mucopéptido por medio de un enlace alfa 1,3. Y la unión entre los ácidos teicoicos y el mucopéptido por medio de un enlace éster entre los oxhidrilos alternados de la cadena de ácidos teicoicos con el oxhidrilo libre de la N-acetil glucosamina terminal del mucopéptido.

Después de analizar brevemente al estreptococo desde este punto de vista, es necesario también comentar las características de la terapéutica empleada para

su control y erradicación, esto es, el uso de penicilina, antibiótico que inhibe la biosíntesis de componentes de su pared celular inespecíficamente inhibiendo también la producción de sustancias similares por parte de las células del huésped; al estreptococo, le induce las formas L y para su erradicación se necesita la acción combinada del antibiótico con la respuesta inmune; en el caso de un tratamiento incompleto o de una respuesta inmune deprimida, estas formas L pudieran sobrevivir dentro de él y volver a proliferar dando como resultado un nuevo ataque al poco tiempo de interrumpir el tratamiento, ya que estas formas L conservan su capacidad de formar otro estreptococo completo.

Tratando de explicarnos las propiedades del estreptococo con los conocimientos que tenemos, vemos que a nivel estructural está compuesto básicamente de proteínas y azúcares aminados, composición similar a estructuras de mamíferos como es el caso de la colágena en el hombre, estas similitudes bioquímicas aunadas a la gran batería enzimática del germen y la comprobación de la reacción de antigenicidad cruzada entre las diferentes entidades tanto en mamíferos como del estreptococo, explica en parte la capacidad toxigénica del microorganismo, lo que aún no estamos en posibilidad de explicarnos es el porqué de la susceptibilidad diferente de los individuos a las infecciones y a sus secuelas, sobre todo a las últimas ya que en un momento dado todas las personas que padecen infección estreptocócica están en contacto con las estructuras implicadas en la respuesta que va a desencadenar el proceso inmune que termina con los signos de fiebre reumática y solamente al 4% de ellos les da la enfermedad. Este hecho propio

más del individuo huésped que del estreptococo, sólomente sería posible relacionarlo con la capacidad que el individuo tiene para decapsular al estreptococo y exponerlo así a las defensas del organismo, la capacidad que el organismo tenga para degradar los antígenos del estreptococo así como la capacidad para responder inmunológicamente hablando ante esos antígenos, pensando en un equilibrio antígeno-anticuerpo dentro del huésped, la persona que va a desarrollar secuela de la infección estreptocócica sería un hiper respondedor inmune, o bien una persona con deficiencia en la capacidad fagocítica de sus células que permitiría la elevación del estímulo antigénico con la consecuente producción elevada de anticuerpos y la reacción ya no con su antígeno específico, sino con una estructura similar para dar origen a la reacción cruzada que termina con los signos de fiebre reumática. Por otra parte los estudios relacionados a las características genéticas del individuo que aún permanecen obscuras en su gran mayoría, tienen también su implicación, ya que se encontró una diferencia que consiste en la ausencia del factor HLA -5 en los leucocitos de las madres de pacientes que evolucionan a fiebre reumática. En cuanto a las reinfecciones, es de llamar la atención el hecho de que en lugar de que los anticuerpos formados en una infección respondieran disminuyendo la severidad de una infección subsecuente vemos que ocurre lo contrario y que precisamente la recurrencia en las infecciones aumenta la probabilidad de secuelas como fiebre reumática; esto que aún no puede precisarse pudiera ser explicado con las diversas vicisitudes de la infección; en primer lugar hasta hoy sólo se ha probado como anticuerpo protector el antiprote-

ña M y como existen 60 serotipos para el grupo A de estreptococo , esto daría la idea que por lo menos se necesitarían 60 infecciones para estar totalmente protegido, no se ha determinado hasta hoy si la reinfección de un solo individuo sea o no por el mismo serotipo de estreptococo . Por otra parte tenemos que la respuesta de anticuerpos en contra de enzimas ó estructuras de estreptococo es elevada en el proceso agudo y decrece cuando cesa el proceso salvo en caso de fiebre reumática en los que se conservan elevados los anticuerpos en contra de estructuras; la naturaleza de estos anticuerpos y la memoria inmunológica que dejan, no es suficiente para prevenir por lo menos en la respuesta específica antígeno-anticuerpo la nueva infección, por otra parte se contempla la posibilidad de que los efectos de toxinas como toxina eritrogénica que deprime al sistema retículo endotelial y la estreptolisina S que no es antigénica y es elevadamente tóxica, pudieran con sus efectos propios propiciar el nuevo ataque infeccioso ya que de otra manera el unico problema existente sería la formación de anticuerpos anti-proteína M que seguiría el proceso de primera interacción con sistema inmune en el caso de ser un serotipo distinto en cada infección , o bien que existieran serotipos para otros antígenos estreptocócicos .

En resumen , nos quedan aún muchas interrogantes con respecto al comportamiento de éste microorganismo en el huésped, sobre todo a nivel inmunológico.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ayoub, E.M., Wannamaker, L.W.J, *Immun.*, 90,793, 1963.  
A factor other streptococcal Nicotinamide adenine dinucleotidase which combines with antibody to this enzyme.
- 2.- Ayoub E. And Wannamaker L., *Federation Proc.* 26:581, 1967.  
Variation with age of N-acetyl-p-glucosaminidase activity in rat liver. *Nature* 214 (5089), 707, 1967.
- 3.- Ayoub M.E. and Dudding A.B., *The J. Exp. Med.* 138:117, 1973.  
Temperature-pependent variation in the synthesis of group -specific carbohydrate by Streptococcal varians strains.
- 4.- Ayoub M.E., and Dudding A. Burton; *J. Exp. Med.* 128: 1081, 1968.  
Persistence of Streptococcal group A antibody in patiens with Rheumatic Valvular Disease.
- 5.- Beachey, E.H., Alberti H., and Stollerman, G.H.: *J. of Immunology* 102:42, 1969.  
Delayed hypersensitivity to purified streptococcal M. protein in ginea pig and man.
- 6.- Beachey E.H. and Stollerman G.H., toxic effect of streptococcal protein M on platelets and polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 124: 351, 1971.
- 7.- Bernhard G.C. and Stollerman G.H., *J. Clin. Invest.* 38: 1942, 1959.  
Serum inhibition of streptococcal diphosphopyridine nucleotidase in uncomplicated streptococcal pharyngitis in rheumatic fever.
- 8.- Bernheimer, A.W., et. al *J. Exp. Med.*, 106:27, 1957.  
Diphosphopyridine nucleotidase as an extracellular product of streptococcal growth and its possible relationship to leukotoxicity.
- 9.- Brown, J.H. Monograph No. 9, New York Rockefeller Institute for medical Research E.U.A.
- 10.- Carlson, A.S. et. al. *J. Exp. Med.*, 106: 15, 1957.  
A streptococcal enzyme that acts specifically upon diphosphopyridine nucleotide: characterization of the enzyme and its separation from streptolysin O.
- 11.- Cole, R.N., and Holm J.J., *Science* 135:739, 1962  
Cell wall replication in *Streptococcus pyogenes*
- 12.- Coligan J.E. Schinitt, C.W. and Kindt. J.T., *J. of Immunology* 114 (6) 1975.  
Immunochemical and chemical studies on streptococcal group specific carbohydrates.
- 13.- Crowley N.S., *Gen. Microbiol* 4: 218, 1950.  
The degradation of starch by strains of group A streptococci having liberated antigens.
- 14.- Cunningham, M. and Beachey, H.E., *The J. of Immunology* 115 (4): 1002, 1975.  
Immunochemical properties of streptococcal M protein purified by isoelectric focusing.

- 15.- Cunningham C.M., Barsuman E.L. Watson D.W., Further Purification of group A streptococcal pyrogenic exotoxin and characterization of purified toxin. *Infect. Immun.* 14 (3), 767-75, 1976.
- 16.- Davis Bernard D., Renato Dubbelco. *Tratado de Microbiología*, Ed. Salvat pp 718-743, 1972.
- 17.- Dawson, M.H., et. al. *J. Infect. Dis.*, 62:138, 1938.  
Nature of the Muco-Polysacchoride of synovial fluid.
- 18.- Dietmar G. Brain, José Quintones Alma L. Luzzati, Lefkavits I. and Stonley E. Read *The J. Exp. Med.* 143:360, 1976, antibody responses of rabbit blood Lymphocytes in Kinetic clone size and clonotype anaepis in responses the Streptococcal of group poliza charide antigens.
- 19.- Dillon H.C. Jr. and Wannamaker L.W., *J. Exp. Med.* 121:351, 1965.  
Physical and Immunological differences among streptokinases
- 20.- Dohlman N.W., *Hippkrats* 48 (1): 89-90, 1977.  
Trombolytic therapy of thromboembolic occlusions in the area of the internal carotid artery.
- 21.- Dudding B.A., and Ayoub E.M., *J. Exp. Med.* 128:1081, 1968.  
Persistence of streptococcal group A antibody in patients with reumatic valvular disease.
- 22.- Duncan S.L. and Schegel; Effect of streptolysin O on erytrocite membranes: liposomes and lipid dispersions; *The J. of cell Biology* 67: 160, 1975.
- 23.- Duncan L.J., Manson L. characteristics of StreptolysinS hemolysis; *Infet. Imm.* 14 (1): 77, 1976.
- 24.- Edwin H. Beachey and Itzhak Ofek; *The J. of Exp. Med.* 143: 759, 1976.  
Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fibrilal 85: 305-32, 1947.
- 25.- Elliot S.D., *J. Exp. Med.* 85:305-32, 1947.  
An inactive precursor of streptococcal proteinase.
- 26.- Freimer H.E., M.D., *J. Exptl. Med.* 117:377, 1963.  
Studies of L forms and protoplasts of group A streptococci.
- 27.- G.H., *Stock Nature (London)* 192:434-435, 1972.  
Extracellular esterase of group A streptococci
- 28.- Ginsburg Issac, *StreptolysinS in microbial toxins vol. 3 T.C. Montie, S. Kadis Academic Press New York* pp 69.

- 29.- Ginsburg I. Cell Bound Hemolysin in microbial toxin pp 110.  
Academic Press 1972.
- 30.- Ginsburg I. Intra cellular Hemolysin in microbial toxin pp 111.  
Academic Press, 1972.
- 31.- Giono C.S., Barraza, S.A., y Cosío A.H., Rev. Lat. Amer. Microbiol; 16:11, 1974.  
El estreptococo y la fiebre reumática.
- 32.- Glassner R. Dtsch; Med. Wochenschr 102 (13): 497-8 1977.  
Treatment of artery stenosis with low dose streptokinase.
- 33.- Goldstein I. et. al.; Nature 213:44, 1962.  
Immunological relationship between streptococcus A polysaccharide and the structural glyco-  
protein of heart valve.
- 34.- Good R.A., and Park B.H., Principles of modern Immunology IL ea and Febriger  
Philadelphia, pag.498, 1974.
- 35.- Griffith, F.J. Hyg., 26:542, 1934.  
The Serological classification of streptococcus pyogenes.
- 36.- Griffith, F.J., Hyg. 34:542, 1934 y 23: 1935.  
Serological classification of streptococcus pyogenes.
- 37.- Hayono, S., Infect. Immun. 15 (1) 30-4, 1977.  
Repetitive in Ic electrophoresis in a gar gel to the identific to the stereases antibody  
group A, B y C streptococci.
- 38.- Hayono, S., Infect. Immun 15 (1): 295-9, 1977.  
Distribution the stereases antibody streptococci, with fever Reumathic patient.
- 39.- Hill J., Infection and immunity 14 (3): 726, 1976.  
Purification and properties of streptococcal hyaluronate lyase.
- 40.- Hirsch G.H., and Church, A.B.; J. Exp. Med. 111:309, 1960.  
Studies power of phagocytic cell.
- 41.- Hirsch, J.G., and Church, A.B.; J. Exp. Med. 111:309, 1960.  
Biochem studies on the bactericidal power of phagocytic cell.
- 42.- Holbert S.P. Streptolisin O in microbial toxin vol. 3 T.C. Montie, S. Kadis and S.J.  
S.J. Ajl Editor Academic Press Inc., New York pp-69-68.
- 43.- Holbert P. Streptolisin O in microbial toxin vol. 3 T.C. Montie, S. Kadis and S.J.  
Ajl. Editor Academic Press Inc. New York pp u 9 - 68.
- 44.- AHN, J. and Cole, R.M. J. Bact. 83-85, 1962.  
Time and concentration relationships in the long-chain reaction of group A streptococci  
in homologous antiserum and improved method for evaluation of test results

- 45.- Jawetz, E. Melnick, Medical Microbiology 10 Ed. Lange Med. Pub. E.U.A. pp 166, 1972.
- 46.- Jawetz, Melnick y Adelberg, Microbiologia Médica 6a. Ed., Editorial El Manual Moderno, pp. 198-216, 1975.
- 47.- Kaplan M., J. Exp. Med. 119:643, 1964.  
Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens.
- 48.- Kaplan M.H., in current research on group A Streptococcus p. 139, excerta Médica Foundation New York 1968.
- 49.- Kaplan E.L. and Wannamaker W.L., Supression of the antiestreptolysin O response by cholesterol by lipid extracts of rabbit skin., J. of Exp. Med. 144:754, 1976.
- 50.- Kohner EM et al; Br. Med.J. 1 (6009): 550-3 1976.  
Streptokinase in central retinal vein occlusión: a Controlled clinical trial.
- 51.- Koch R. Utersuchungen Uber die Aetiologie der Wunden Fektions Krankeheiten BerlIn 1879.
- 52.- Krause M.R. and Mc Carty M.D.J. Exptl. Med., 114:127, 1961.  
Studies on the chemical structure of the Sreptococcal cell wall.
- 53.- Lancefield C.R., J. Exp. Med. 47:571, 1928.  
Serological differentiation of human and other group of hemolytic streptococci.
- 54.- Lancefield C.R.J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38:473, 1938.  
A microprecitin-technic for classifying hemolytic streptococci and improved method for producing antisera.
- 55.- Lheninger L.A., Biochemistry 2a. Ed. The molecular Basis of cell structure and funtion, worth Publisher, Inc. pp. 271 y 654.
- 56.- Li Koibong; J. Bact., 69:326, 1955.  
In vitro variation in group A streptococci with special reference to streptolysin formation.
- 57.- Lily C. Yang, Pandu R. Soprey Masako K. Withner and Eugene N. Fox;  
The J. of Exp. Med. 146 (2): 344, 1977.
- 58.- Mattman, L.H., and Mattman P.E. m Arch. Inter. Med., 115: 315, 1965.  
L forms of streptococcus faecalis in septicemia.



- 59.- Maxted, W.R., J. Clin. Pathol 6:224, 1953.  
Use of bacitracin for identifying group A haemolytic Streptococci.
- 60.- McCarty M., J. Exp. Med., 88:181, 1948.  
The occurrence of nucleases in culture filtrates, of group A hemolytic streptococci.
- 61.- McCarty, J. Exp. Med. 96:55-568, 1952 y 96:569-580.  
The lysis of group A streptococci by extracellular enzymes streptomycetes albus.
- 62.- McCarty M.; New J. Exp. Med. 108:311-323, 1958.  
Further studies on the chemical basis for the serological specificity of groups streptococcal carbohydrate.
- 63.- McCarty M.; Rheumatic Fever, A Symposium Minneapolis University of Minnesota Press 1952.
- 64.- McCarty M.; Bacterial and Mycotic Infection of man, Dubos and Hirsch eds. 1965.
- 65.- Meyer K., Federation Proc. 17:1075, 1958.  
Mucopolysaccharides of bone.
- 66.- Miller Glenn A., Urban J.J. Robert W.; Infect. Immun. 13 (5): 1408, 1976.  
Effects of streptococcal lipoteichoic acid on host responses in mice.
- 67.- Miller G.A. et. al., Am Heart J, 93 (5): 568-74, 1977.  
Pulmonary embolectomy, heparin acid streptokinase; their place in treatment of acute massive pulmonary embolism.
- 68.- Niemann H. et. al. Acta Pathol Microbiol Scan (B) 84 (3): 145-53, 1976.  
Streptococcal bacteriophage 1212-born hyaluronidase and its characterization as a lyase (Ec 4,1,9a.1).
- 69.- Nowlan, S.D., and Eibel, R.H., J. Bact., 94-291, 1967.  
Group Q streptococci I.- Ecology serology physiology and relation to establish interococci II nutritional characteristics in growth relation to thymine.
- 70.- Oberley D.T. and Duncan J.L., Streptolysin O induced alterations in rabbit erythrocyte membrane polypeptides. Biochemical and biophysical Research Communications 48 (6): 1339, 1972.
- 71.- Ogburn, C.A., et. al J. Immun., 89:396, 1958.  
Production and partial purification of a protein produced by steady-state cultivation of B hemolytic streptococcus.
- 72.- Onkelius E.M., W. Jouniau, M. and Lontie, R., Immunol 16:35, 1969.  
Glutaraldehyde as a coupling reagent in passive hemagglutination.
- 73.- Pasteur L. Bull Acad. Nat. Med. 18:260-271, 1879.
- 74.- Phyllis S., Shony, S., Bernheime, A.W., J. Bacteriol 122 (2): 599-601, 1975.  
Purification and properties of streptococcal nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase.

75. - Quinn, R.W., and Singh K.P., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 95:290, 1957.  
Antigenicity of chondroitinsulfate.
76. - Revici Emanuel; Ger. Offen 2-444,652, 1975.  
Hyaluronidase and Histamine use in the solvents.
77. - Robert, W., Infect. Imm 13 (6): 1585, 1976. Immunogenicity of purified and carrier complexed streptococcal lipoteichoic acid local treatments.
78. - Rotta J. et. al. J. Bact. 89: 1581, 1965.  
Isolation of L form group A streptococci exposed to bacitracin
79. - Schmidt, W.C., J. Exptl. Med. 95:105-118, 1952. Study on its preparation group A streptococcus polysaccharide chemical composition and cellular localization after intravenous infectus into mice.
80. - Schwab, H.J. and Ohanian S.H., J. of Bacteriology 94 (5): 1347, 1967.  
Degradation of streptococcal cell wall antigens in vivo.
81. - Seastone, C.V., J. Exptl. Med. 70:347, 1939. Mucoïd polysaccharide in Hemolytic streptococci of human origin.
82. - Seastone, C.V., J. Exptl. Med. 77:21, 1943.  
Mucoïd polysaccharide in Hemolytic streptococci of human origin.
83. - Shany, S.A., W. Bernheimer: Evidence for membranes cholesterol as the common site binding for cereolysin O and saponin; Mol Cell Biochem 3: 179, 1974.
84. - Singer S.J., and G.L. Nicholson; Science 175: 720, 1972; the fluid mosaic model of this structure of cell membranes.
85. - Slade, H.D., Streptococcal Infections, New York Colombia University Press, 1944.
86. - Sprince, H. and Wooley, P.W., J. Exp. Med., 80:213, 1944. Relation of a new growth factor required by hemolytic streptococci to growth phenomena in other bacteria.
87. - Stock, et. al., Nature 192:434, 1961. Extracellular esterase of group A streptococci.
88. - Stock, G.H. and Lynn, Immunol 102: 856-869, 1969.  
Extracellular esterases of streptococci and distribution of specific antibodies in human.
89. - Stricker E.M., Zigimond H.J., J. Comp. Physiol Psychol 86 (6): 1973, 1974.  
Utilition of hyaluronidase with penilycin in mastitis.
90. - Stollerman, G.H. and Easted , R.J., Exp. Med. 106:345, 1957, 112:671, 1960.  
Evaluation of the long chain reaction as a means of delectiong type specific antibody the group A streptococci.
91. - Swanson J. and Gotschlich C.M., J. Exp. Med. 8:245, 1973.  
Electron microscropic studies on streptococci.

- 92.- Swanson J. and Gotschlic E.C., J. Exp. Med. 130: 1063, 1969.  
Electron Microscopic studies on streptococci.
- 93.- Taranta A.H., Wood., A.R., Feinstein R. Amn. Intern. Med. 60 (Suppl. 5):47, 1964.  
Rheumatic fever in children and adolescents. A long term epidemiology study of subsequent proflixis streptococcal infections and clinical sequelae.
- 94.- Tillet W.S. and Garner R.L., J. Exp. Med. 58:485, 1933.  
Febrinolytic activity of hemolytic streptococci.
- 95.- Vande Rijn, S.B. Zabriskie, and McCarty; The J. of Exp. Med. 143:759, 1976.  
Group A streptococcal antigens cross-reactive anti-body isolation and characterization.
- 96.- Wahl, R.H., Drachs, G., and Cayeux P., Ann. Inst. Pasteur 106:1135, 1966.  
Immunologiques sur les antigenes proteiques basiques specifiques et non specifiques de type de streptococcus pyogenes.
- 97.- Wannamaker W.L., M.D., J. Exp.: Med. 107:785, 1958.  
The differentiation of three distinct desoxiribonucleases of group A streptococci.
- 98.- Wannamaker W.L. and Walid Yamineh; J. Exp. Med., 126:475, 1967. Streptococcal Nucleasas.
- 99.- Wannamaker, L.W. and Matsen J.M. Streptococci and Streptococcal Diseases Academic Press, 1972.
- 100.- Wannamaker W.L., and J.M. Matsen M.D., Streptococcal Diseases, Academic Press, New and London 1972, pp. 215-215-216.
- 101.- Watsnabe N.J., pn Heart J. 17 (5): 580-91, 1973.  
Anti hyaluronidase level in children with rheumatic fever and other streptococcal infection.
- 102.- Watson D.W., and Yoon Bern Kim. Eritrogenic toxins, in microbial Toxin pp 173. Academic Press 1972 Science 96:277, 1942.
- 103.- Wells, W.F., et. al., Effect of humidity on beta streptococci atomized into air. Science 96: 277, 1942.
- 104.- Widdowson, J.P., Maxted W.R., and Pinney A.M., J. Hyg. 69:553, 1971.  
Relation between M-antigen and opocity factor in group A streptococci.
- 105.- Witheir M.K. and Eugene N. Fox, Infect. Immun. 15 (1): 104-8, 1977.  
Homologous y heterologo protetion in mice vaccines M protein the streptococci group A.
- 106.-Zabrieskie J.B., Advances in Immunology, 7:147, 1967.  
Mimetic Relationships between group A streptococci and mammalian tissues.
- 107.-Zinsser, Microbiología, 2a. Ed. Edit. Hispanoamericana, Cap. XXII y XXIV, p.229 1975.