



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA EN
CEPAS INVASIVAS DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

EDGAR DANIEL TROCHE GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

2015



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: Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ
VOCAL: Profesora: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO
SECRETARIO: Profesor: LUIS MANUEL PEREA MEJÍA
1er. SUPLENTE: Profesor: JAVIER FERNÁNDEZ TORRES
2° SUPLENTE: Profesora: SILVIA KARINA GODÍNEZ PALMA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR. 3ER PISO TORRE DE INVESTIGACIÓN.
FACULTAD DE MEDICINA. UNAM. CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS DGAPA-PAPIIT
IN221511 Y FM 066-2012.**

ASESOR DEL TEMA

SUPERVISOR TÉCNICO

M en C. Luis Manuel Perea Mejía

M en C. Alma Edna Inzunza Montiel

SUSTENTANTE

Edgar Daniel Troche González

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	1
Resumen	3
1. Introducción	4
2. Antecedentes	7
2.1 Estreptococo del grupo A	7
2.2 Enfermedades no invasivas	7
2.2.1 Faringitis	7
2.2.2 Fiebre escarlatina	8
2.2.3 Impétigo	8
2.3 Secuelas autoinmunes no supurativas	8
2.3.1 Fiebre reumática aguda	8
2.3.2 Glomerulonefritis aguda post-estreptocócica	9
2.4 Enfermedades invasivas	9
2.4.1 Celulitis y Bacteriemia	10
2.4.2 Fascitis necrosante	10
2.4.3 Síndrome de shock tóxico estreptocócico	11
2.5 Mecanismos de patogenicidad	12
2.5.1 Adherencia	12
2.5.2 Colonización	12
2.5.3 Internalización	12
2.5.4 Invasión y Diseminación	13
2.5.5 Toxicidad sistémica	13
2.5.6 Resistencia a antibióticos	13
2.5.7 Transferencia horizontal de genes	14
2.6 Factores de virulencia	14
2.6.1 Proteína M	15
2.6.2 Cápsula de ácido hialurónico	16
2.6.3 C5a peptidasa	16
2.6.4 Estreptolisinas	16
2.6.5 Estreptoquinasa	17
2.6.6 Hialuronidasa	17
2.6.7 Desoxirribonucleasas	17
2.6.8 Proteínas de unión a fibronectina	17

2.6.9 Factor de opacidad del suero	18
2.6.10 Inhibidor estreptocócico del complemento	19
2.6.11 Cisteína proteasa	19
2.6.12 Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas	20
2.6.12.1 SpeA	22
2.6.12.2 SpeC	22
2.6.12.3 SpeG	22
2.6.12.4 SpeH	23
2.6.12.5 SpeI	23
2.6.12.6 SpeJ	23
2.6.12.7 SpeK	23
2.6.12.8 SpeL	24
2.6.12.9 SpeM	24
2.6.12.10 SSA	24
2.6.12.11 SmeZ	24
3. Justificación	26
4. Hipótesis	27
5. Objetivo general	27
5.1 Objetivos particulares	27
6. Materiales y métodos	28
6.1 Reactivos, materiales y equipos	28
6.2 Selección de muestras	29
6.3 Procesamiento de la muestra	29
6.4 Extracción del DNA	30
6.5 Estandarización de PCR y amplificación de genes	31
6.6 Tipificación de la proteína M	35
6.7 Identificación de los productos de la PCR	36
7. Resultados y discusión	38
7.1 Origen clínico de las cepas invasivas	38
7.2 Distribución de los tipos M	40
7.3 Susceptibilidad a antibióticos	45
7.4 Genes de virulencia en <i>S. pyogenes</i>	48
7.5 Análisis del gen <i>prtF</i>	48
7.6 Análisis del gen <i>sof</i>	50

7.7 Análisis del gen <i>sic</i>	52
7.8 Análisis del gen <i>speB</i>	53
7.9 Análisis de los genes <i>speG</i> , <i>speJ</i> y <i>smeZ</i>	54
7.10 Análisis del gen <i>speA</i>	56
7.11 Análisis del gen <i>speC</i>	57
7.12 Análisis de los genes <i>speH</i> y <i>speI</i>	60
7.13 Análisis de los genes <i>speK</i>	61
7.14 Análisis de los genes <i>speL</i> y <i>speM</i>	62
7.15 Análisis del gen <i>ssa</i>	63
7.16 Análisis de los perfiles de genes de virulencia	65
8. Conclusiones	70
9. Referencias	71
Anexo A	82
Anexo B	83

Lista de Abreviaturas

AE	Buffer de elución
AL	Buffer de lisis
AS	Agar Sangre
AW	Buffer de lavado
BHI	Infusión de Cerebro Corazón
CAMP	Prueba para identificar <i>Streptococcus agalactiae</i> nombrada por los investigadores Christie, Atkins, Munch-Petersen
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Dinucleótido trifosfatado
EGA	Estreptococo del Grupo A
<i>emm</i>	Gen de la proteína M
Fba, Sfb	Proteínas de unión a Fibronectina en <i>Streptococcus pyogenes</i>
IFN-γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IS	Secuencia de Inserción
LPXTG	Motivo de anclaje a la membrana formado por los aminoácidos Leucina-Prolina-X-Treonina-Glicina
MAC	Complejo de Ataque a la Membrana
Mga	Activador Multigen
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
mL	mililitro
mM	milimolar
MSCRAMM	Componentes de la Superficie Microbiana Reconocedores de Moléculas Adhesivas de la Matriz
NET	Trampa Extracelular de Neutrófilos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMN	Célula polimorfonuclear
PrfF	Proteína F

RD	Dominio repetido
rpm	Revoluciones por minuto
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
SAg	Superantígeno
SIC	Inhibidor Estreptocócico del Complemento
SmeZ	Exotoxina Mitogénica Estreptocócica
SOF	Factor de Opacidad Sérico
Spe	Exotoxina Pirogénica de Estreptococo
SSA	Superantígeno de Estreptococo
STSS	Síndrome de Shock Tóxico Estreptocócico
TBE	Buffer Tris-Boratos-EDTA
TCR	Receptor de Células T
TH	Todd-Hewitt
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UV	Ultravioleta
μ g	microgramo
μ L	microlitro

Resumen

Streptococcus pyogenes es considerado un importante patógeno para el humano al estar relacionado con cuadros clínicos de faringitis, fiebre escarlatina, impétigo, enfermedades invasivas como la fascitis necrosante, síndrome de shock tóxico estreptocócico y secuelas no supurativas como fiebre reumática aguda y glomerulonefritis aguda post-estreptocócica.

El reciente resurgimiento de casos invasivos por *S. pyogenes* ha dado lugar a que se realicen análisis epidemiológicos de las cepas aisladas para conocer los factores de virulencia que participan en la patogénesis, su asociación con el tipo de proteína M y su susceptibilidad a antibióticos. Entre los tipos M encontrados con mayor frecuencia en el mundo se encuentran M1, M3, M12 y M89 y se ha visto que su presencia puede variar en función de la zona geográfica.

En este trabajo se realizó el análisis de 125 cepas de *S. pyogenes* de origen invasivo provenientes de Clínicas y Hospitales en México determinando la distribución del tipo de gen *emm* e identificar mediante la PCR los genes asociados a factores de virulencia *sic*, *sof*, *prtF*, *speB* y los genes de exotoxinas pirogénicas, *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa* y *smeZ*, (junto con el estudio de la asociación entre los genes evaluados con el tipo de gen *emm*) y el cuadro clínico de origen mediante la obtención de perfiles de genes de virulencia. En el estudio se encontró que los tipos M más frecuentes fueron M1, M6, M12, M75 y M89, las cepas invasivas presentaron baja resistencia a antibióticos y la presencia de los genes de virulencia evidenció gran diversidad genética entre los aislamientos.

1. Introducción

El género *Streptococcus* es un grupo bacteriano heterogéneo de gran relevancia clínica. Los estreptococos mantienen características en común: son cocos Gram-positivos que se agrupan en pares o cadenas debido a la división celular realizada en un solo plano, miden aproximadamente 1 μm de diámetro, requieren CO_2 para su crecimiento, producen ácido láctico por fermentación y son nutricionalmente exigentes, por lo que son sembrados en base agar con peptona, soya triptica o caldo Todd-Hewitt.^{1,2,3} *Streptococcus pneumoniae* solamente forma diplococos.⁴ Las principales especies patógenas de *Streptococcus* son *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. pneumoniae* que colonizan principalmente a nivel de mucosas.^{1,4}

En 1874, Billroth describió por primera vez microorganismos en forma de cocos dispuestos en cadena, posteriormente se llevó a cabo la clasificación del género *Streptococcus* empleando pruebas bioquímicas, reacciones de hemólisis, pruebas serológicas y técnicas moleculares. De acuerdo a la clasificación de Kawamura *et al.* se reconocen 6 grupos filogenéticos del género *Streptococcus* representados en la Tabla 1.^{1,4}

Tabla 1. Grupos reconocidos entre algunas de las especies del género *Streptococcus*

Grupo filogenético	Especies	Grupo de Lancefield	Tipo de Hemólisis
Pirogénico	<i>S. pyogenes</i>	A	β
	<i>S. agalactiae</i>	B	β
	<i>S. dysgalactiae</i>	C y G	β
Mitis	<i>S. pneumoniae</i>		α
	<i>S. mitis</i>		α
	<i>S. oralis</i>	No identificado	α
	<i>S. sanguis</i>	H	α
Anginosus	<i>S. anginosus</i>	A, G, F	α o β
	<i>S. intermedius</i>		α
Salivarius	<i>S. salivarius</i>	K	No hemolítico
Bovis	<i>S. bovis</i>	D	α o no hemolítico
Mutans	<i>S. mutans</i>	No asignado	No hemolítico

Según el Manual Bergey de Bacteriología Determinativa, las colonias de estreptococos en agar sangre miden alrededor de 1 mm de diámetro, tienen

bordes redondeados y bien definidos, pueden ser opacas, brillantes, lisas, rugosas o de aspecto mucoso.⁵

Las colonias de *Streptococcus* pueden producir α -hemólisis, β -hemólisis o pueden ser no hemolíticas. Para evidenciar el efecto hemolítico se emplea sangre de carnero al 5% en base agar sangre.³ Cuando se observa una zona clara de varios mm de diámetro alrededor de las colonias en el agar se define como β -hemólisis y se debe a una lisis de los eritrocitos inducida por la estreptolisina S (soluble en suero) y estreptolisina O (lábil en oxígeno), este tipo de hemólisis es característica del grupo pirogénico. Si las colonias de estreptococo están rodeadas de una coloración verdosa es porque la hemoglobina fue oxidada por peróxido de hidrógeno a metahemoglobina, este fenómeno se denomina α -hemólisis y se debe a la estreptolisina O.⁴ La determinación del tipo de hemólisis es el paso inicial para la distinción de un estreptococo.

El sistema de clasificación serológica de estreptococos fue desarrollado por Rebecca Lancefield en 1932 y se basa en las diferencias antigénicas expresadas por el polisacárido específico o carbohidrato C localizado en la pared celular de las bacterias.^{6,7,8} El carbohidrato C es extraído y enfrentado con anticuerpos específicos para cada uno de los grupos de Lancefield.⁸ En *Streptococcus pneumoniae* y algunos α -hemolíticos el polisacárido no está presente. Hasta ahora se han llegado a identificar 21 grupos A-H y K-W. Actualmente se cuenta con kit comercial basado en reacción de co-aglutinación en látex.⁴

Los estreptococos α -hemolíticos y no hemolíticos son considerados comensales en el humano y pueden ser encontrados colonizando la cavidad oral, faringe, colon y superficies dentales, a excepción de *Streptococcus pneumoniae*.

En los aislamientos clínicos de estreptococos β -hemolíticos es importante conocer la especie, por lo que las pruebas de sensibilidad a bacitracina se emplean para identificar *Streptococcus pyogenes* y CAMP para *Streptococcus agalactiae* junto con la tipificación serológica. La prueba de sensibilidad a bacitracina consiste en aplicar un disco de bacitracina con 0.04U sobre un cultivo de estreptococo en agar

sangre o Muller-Hinton y observar un halo de sensibilidad a bacitracina. La prueba de CAMP se basa en evidenciar un efecto sinérgico de la hemólisis en agar sangre entre un péptido difusible producido por *Streptococcus agalactiae* y la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* que al entrar en contacto intensifica la hemólisis en la zona de coincidencia.³

2. Antecedentes

2.1 Estreptococo del grupo A

La especie *Streptococcus pyogenes* o estreptococo del grupo A (EGA) forma parte de los microorganismos patógenos extracelulares más comunes para el humano, es causante de una amplia variedad de infecciones.^{4,7} Entre las más comunes están: la faringitis, fiebre escarlatina e impétigo, pero también puede causar infecciones de carácter invasivo que ponen en riesgo la vida del paciente, como fascitis necrosante, sepsis puerperal y síndrome de shock tóxico estreptocócico (STSS por sus siglas en inglés).^{7,9,10,11,12} Rebecca Lancefield describió un sistema para tipificar a los EGA basado en las propiedades antigénicas de la proteína M, los clasificó serológicamente logrando identificar inicialmente 50 tipos M.^{7,13}

2.2 Enfermedades no invasivas

Los sitios que coloniza *S. pyogenes* con mayor frecuencia son las mucosas superficiales, garganta y piel. El tracto respiratorio superior es la vía de entrada más común para la bacteria.⁴ Los portadores asintomáticos son una fuente importante de transmisión de *S. pyogenes* y se presentan en mayor proporción en niños que en adultos.^{4,14}

2.2.1 Faringitis

Es la infección más común causada por EGA con más de 610 millones de casos anuales en el mundo.¹⁵ Es adquirida con mayor frecuencia por niños de 5 a 15 años.⁷ Clínicamente se manifiesta como un abrupto dolor de garganta, fiebre, malestar, dolor de cabeza e inflamación de la faringe de 2 a 4 días después del contacto con la bacteria. Es un proceso autolimitante donde los síntomas suelen desaparecer después de 3 ó 4 días aún cuando no hay tratamiento. Las complicaciones de la faringitis pueden presentarse si se desarrollan abscesos tonsilares ya que el microorganismo podría diseminarse a tejidos adyacentes o al torrente sanguíneo.

2.2.2 Fiebre escarlatina

En ocasiones la faringitis puede estar acompañada de fiebre escarlatina específicamente si las cepas de *S. pyogenes* producen exotoxinas pirogénicas como SpeA, que es responsable de las lesiones eritematosas de color rojo intenso, “lengua de fresa”, descamación de la piel y faringitis exudativa.⁹ Las lesiones eritematosas se presentan inicialmente en el pecho y se extienden hacia las extremidades después de 1 o 2 días de presentar faringitis.⁴

2.2.3 Impétigo

Es una infección altamente contagiosa limitada a la epidermis, caracterizada por pústulas que crecen y eventualmente se rompen, formando costras gruesas de color amarillo. Se presenta comúnmente en extremidades y cara, el contagio es por contacto directo con la piel y afecta con mayor frecuencia a niños en climas tropicales.⁹

2.3 Secuelas autoinmunes no supurativas

Posterior a una infección por *S. pyogenes* se puede desarrollar una enfermedad causada por reacciones inmunes de 1 a 5 semanas después de haber superado la infección por el sistema inmune o por tratamiento antimicrobiano.⁴

2.3.1 Fiebre reumática aguda

Es un síndrome inflamatorio mediado por una respuesta autoinmune humoral y celular que se presenta como una secuela tardía de una infección por *S. pyogenes*. Su identificación se basa en los criterios de Jones: inflamación de las articulaciones (artritis), inflamación del corazón (carditis que puede ser permanente con daño en las válvulas cardíacas) y síntomas neurológicos (corea de Sydenham) son las manifestaciones más comunes; el eritema marginado y nódulos subcutáneos son menos comunes.^{4,7,9} Se presenta producción de anticuerpos autoreactivos y poliespecíficos, así como de células T inducidas por reacción cruzada con componentes del EGA y de los tejidos del hospedero (miosina, tropomiosina, laminina y queratina).^{4,7}

La fiebre reumática aguda se presenta en su mayoría en niños es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad.^{9,15}

2.3.2 Glomerulonefritis aguda post-estreptocócica

Es un desorden renal asociado a infecciones en la piel mediado por reacción cruzada con antígenos glomerulares y de EGA, alteraciones del tejido glomerular por estreptoquinasa y activación del complemento en tejidos glomerulares, se presenta edema en cara y extremidades, hematuria, proteinuria, hipertensión, fiebre leve, bajos niveles de componentes del complemento en suero.^{4,9} Es más frecuente en niños de países en desarrollo y tiene una mortalidad en adultos del 1% aproximadamente.¹⁵

2.4 Enfermedades invasivas

Las enfermedades invasivas por *S. pyogenes* se presentan cuando la bacteria tiene la capacidad de romper la barrera epitelial y llegar a sitios estériles como sangre, fluido cerebroespinal, articulaciones, hueso, líquido sinovial y órganos.^{4,9,16} Tienen un alto índice de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, el 23% de los pacientes con complicaciones de enfermedad invasiva muere a los 7 días de la infección. Datos epidemiológicos han reportado que hay más casos fatales en países subdesarrollados y que los pacientes con enfermedades crónicas tienen mayor riesgo.^{9,15} El desarrollo de STSS por complicaciones de la infección aumenta la mortalidad hasta el 81% convirtiéndolo en una de las formas más severas de enfermedad invasiva junto con fascitis necrosante y sepsis neonatal.^{4,9} Desde mediados de la década de los años 80 se ha visto un incremento en enfermedades invasivas causadas por cepas de *S. pyogenes*,^{4,9,10,17} con relevancia en los tipos M1 y M3 que predominan en fascitis necrosante y STSS.^{10,11} En la Tabla 2 se representan las enfermedades por *S. pyogenes* y los tipos M asociados a la enfermedad. Hasta el 2005 se han reportado 663 000 nuevos casos al año en el mundo, lo que llevó al interés por estudiar a los EGA responsables de enfermedades invasivas.^{4,15}

Tabla 2. Prevalencia de tipos M en enfermedades invasivas, no invasivas y secuelas autoinmunes no supurativas^{9,11}

Enfermedad	Tipos M asociados
<i>No invasivas</i>	
Faringitis	1, 3, 5, 6, 12, 14, 17, 19, 24
Impétigo	33, 41, 42, 52, 53, 70
<i>Invasivas</i>	
Sepsis puerperal	28
Meningitis	1, 12
Fascitis necrosante	1, 3, 28
Síndrome de shock tóxico estreptocócico	1, 3
<i>Secuelas no supurativas</i>	
Fiebre reumática aguda	1, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 24, 27, 29, 30, 32, 41
Glomerulonefritis aguda post-estreptocócica	1, 4, 12, 49, 55, 57, 60

2.4.1 Celulitis y Bacteriemia

Son las infecciones invasivas más comunes causadas por *S. pyogenes* con una frecuencia del 20 al 40%. La celulitis se manifiesta en el tejido subcutáneo como enrojecimiento e inflamación de la piel asociado con dolor e hinchazón. La bacteriemia es la presencia de EGA en sangre y se caracteriza por fiebre alta, náuseas y vómito como resultado de una respuesta proinflamatoria. Se presenta más en casos de fascitis necrosante y STSS. Cuando *S. pyogenes* se encuentra en el torrente sanguíneo puede complicarse en endocarditis aguda causante de falla cardíaca.^{4,9}

2.4.2 Fascitis necrosante

Es de las infecciones invasivas más graves por EGA debido a su rápida evolución y propagación con capacidad de necrosis severa. La infección abarca la piel, tejido subcutáneo, tejido blando profundo y músculo. Se cree que factores de virulencia como la cisteína proteasa SpeB, fosfolipasa, enzimas activadas por neutrófilos y citocinas proinflamatorias están involucradas en la patogénesis, además puede estar acompañado de STSS.

2.4.3 Síndrome de shock tóxico estreptocócico

Se describió inicialmente como un síndrome parecido al síndrome de shock tóxico por *Staphylococcus aureus*. Los pacientes con alguna otra enfermedad invasiva, en particular con fascitis necrosante, pueden desarrollar STSS en respuesta a la liberación de superantígenos que se caracteriza por presentar fiebre, hipotensión repentina, dolor intenso en el sitio de la infección y falla multiorgánica acelerada.^{7,9} Las exotoxinas pirogénicas de estreptococo (Spe) son una familia de superantígenos que funcionan como potentes inmunoestimuladores capaces de unir células T y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II.¹² Los casos de STSS están más asociados a cepas de *S. pyogenes* que producen SpeA. La intervención de los superantígenos generan como resultado una producción masiva de citocinas, las cuales causan un daño generalizado en tejidos, trombosis intravascular diseminada y falla multiorgánica.⁹

A partir de los años 80's se han realizado estudios epidemiológicos para caracterizar las cepas aisladas de las infecciones invasivas por *S. pyogenes*. En la Tabla 3 se muestran los tipos M más frecuentes y los países donde se han identificado.

Tabla 3. Frecuencias de los tipos M más prevalentes de cepas invasivas de *S. pyogenes* en estudios de distintos países^{16,17,18,19,20,21,22}

2007 Suecia	2010 Alemania	2007 Australia	2011 Túnez	2012 Brasil	2008 Grecia	2011-2012 Argentina (adultos) (niños)	
Tipo M (%)	Tipo M (%)	Tipo M (%)	Tipo M (%)	Tipo M (%)	Tipo M (%)	Tipo M (%)	Tipo M (%)
89 (15.7%)	1 (25%)	1 (24.6%)	1 (14.9%)	12 (21.4%)	1 (27%)	3 (18.2%)	1 (39.5%)
81 (14.5%)	28 (7%)	12 (18.2%)	76 (12.8%)	1 (14.3%)	12 (9%)	1 (15.2%)	12 (15.8%)
28 (13.9%)	3 (14%)	28 (15.5%)	18 (8.5%)	6 (14.3%)		12(9.1%)	6 (10.5%)
1 (11.9%)		4 (7.3%)		83 (14.3%)			
12 (6.3%)		75 (6.8%)					
77 (5.9%)							
4 (5.9%)							

2.5 Mecanismos de patogenicidad

La transmisión del EGA es por contacto directo con la piel, a través de secreciones nasales o por gotas de *flugge* de persona a persona, ya sea de pacientes enfermos o de portadores asintomáticos.^{2,4,9,2}

2.5.1 Adherencia

Es el paso inicial en el que la bacteria entra en contacto con la mucosa de la faringe y células epiteliales de la piel mediante interacciones de adhesinas e invasinas con células del hospedero.^{2,12} Este proceso comienza con una interacción débil seguida de una unión específica de alta afinidad,² fuertes interacciones electrostáticas y mecánicas para evitar que *S. pyogenes* sea eliminada por la saliva o moco.¹² Las adhesinas se pueden pegar a componentes de la matriz extracelular como laminina, colágeno, vitronectina y fibronectina.^{2,7} Entre las adhesinas más conocidas están el ácido lipoteicoico, la proteína M, proteínas de unión a fibronectina, cápsula de ácido hialurónico, proteínas de unión a colágeno y factor de opacidad del suero (SOF).^{2,9,10,12}

2.5.2 Colonización

El EGA forma agregados en el epitelio bucal o tonsilar para promover la formación de microcolonias.¹² La unión de componentes microbianos de superficie reconocedores de matriz extracelular adhesiva (MSCRAMM's por sus siglas en inglés), es un mecanismo utilizado comúnmente para la colonización. Las cepas de *S. pyogenes* presentan preferencia por infectar la faringe o la piel, este fenómeno es llamado tropismo tisular y está relacionado con el tipo M de la cepa.⁹

2.5.3 Internalización

S. pyogenes no está considerado como un patógeno intracelular pero se ha demostrado que tiene la capacidad de invadir células epiteliales del tracto respiratorio.²³ La expresión de las proteínas M y F (PrtF) está involucrada con una alta frecuencia de invasión e internalización en células epiteliales.^{7,12} La unión de MSCRAMM's con la integrina $\alpha 5\beta 1$ de las células del hospedero puede servir de puente para que se induzca un cambio conformacional del citoesqueleto y la bacteria entre a la célula epitelial por vía endocítica.^{7,9,12} La bacteria prolifera intracelularmente con ayuda de SpeB que destruye proteínas marcadoras para

autofagia.⁹ Cuando *S. pyogenes* ingresa a la epidermis se encuentra en un ambiente rico en O₂ que estimula la expresión de proteína PrtF y una vez que llega al estrato basal interactúa con células de Langerhans en una mayor concentración de CO₂ y se estimula la expresión de proteína M.¹²

2.5.4 Invasión y Diseminación

Se presenta un filtrado vascular en el sitio de la inflamación mediado por la interacción de la proteína M y fibrinógeno con la integrina β -2 de los neutrófilos, generando una respuesta inflamatoria masiva.¹⁰ La diseminación y resistencia a la fagocitosis se debe a las estreptolisinas, DNAsas, SpeB, cápsula de ácido hialurónico, inhibidor estreptocócico del complemento (SIC) y la proteína M.^{2,9,10,12} La proteína M resiste los péptidos antimicrobianos liberados por las trampas extracelulares de neutrófilos (NET's), mientras que la cápsula de ácido hialurónico y las DNAsas degradan las NET's.⁹

2.5.5 Toxicidad sistémica

Como se mencionó anteriormente, las enfermedades invasivas pueden estar acompañadas de STSS que se caracteriza por la producción de altos niveles de citocinas específicas como IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ y TNF- α , así como una sobreactivación de linfocitos T.^{9,12} La respuesta inmunológica se estimula por la liberación de exotoxinas pirogénicas de estreptococo que funcionan como superantígenos (también llamados factores mitogénicos).²

2.5.6 Resistencia a antibióticos

El tratamiento farmacológico de elección para infecciones por *S. pyogenes* es la Penicilina ya que continúa siendo susceptible a β -lactámicos. La Tetraciclina y macrólidos se emplean como segunda opción de tratamiento.⁹ La resistencia a Tetraciclina puede transmitirse por elementos móviles mediados por fagos y se ha reportado en hasta el 26% de aislamientos.¹¹ La resistencia a Eritromicina puede estar relacionada con el tipo M como se ha visto en los tipos M4, M6, M12 y M75,¹¹ la cual se ha reportado con frecuencias variables del 12 al 50% dependiendo de estudio y se ha visto que tiene mayor prevalencia en cepas no invasivas.^{17,24}

La resistencia a Eritromicina puede deberse a la presencia de genes *mefA* y *erm*. El gen *mefA* es predominante entre las cepas de *S. pyogenes* y el mecanismo de acción consiste en la modificación del flujo de la Eritromicina mediante una bomba que expulsa al antibiótico fuera de la célula.²⁵ Los genes *erm* codifican para metilasas que modifican el sitio blanco del macrólido por medio de la metilación de un residuo de adenina en la subunidad 23S del rRNA.^{9,26}

2.5.7 Transferencia horizontal de genes

En *S. pyogenes* se ha descrito que la transferencia horizontal de genes se lleva a cabo por medio de elementos móviles como transposones, secuencias de inserción y de bacteriófagos, como sucede con algunos genes de exotoxinas pirogénicas y genes de resistencia a antibióticos. Del 7 al 12% del genoma de la bacteria es DNA proveniente de este mecanismo, según estudios en los tipos M1, M3 y M18.^{12,25}

2.6 Factores de virulencia

Para entender mejor los mecanismos de patogenicidad de *S. pyogenes* se describen en la Figura 1 sus diversos factores de virulencia reconocidos.

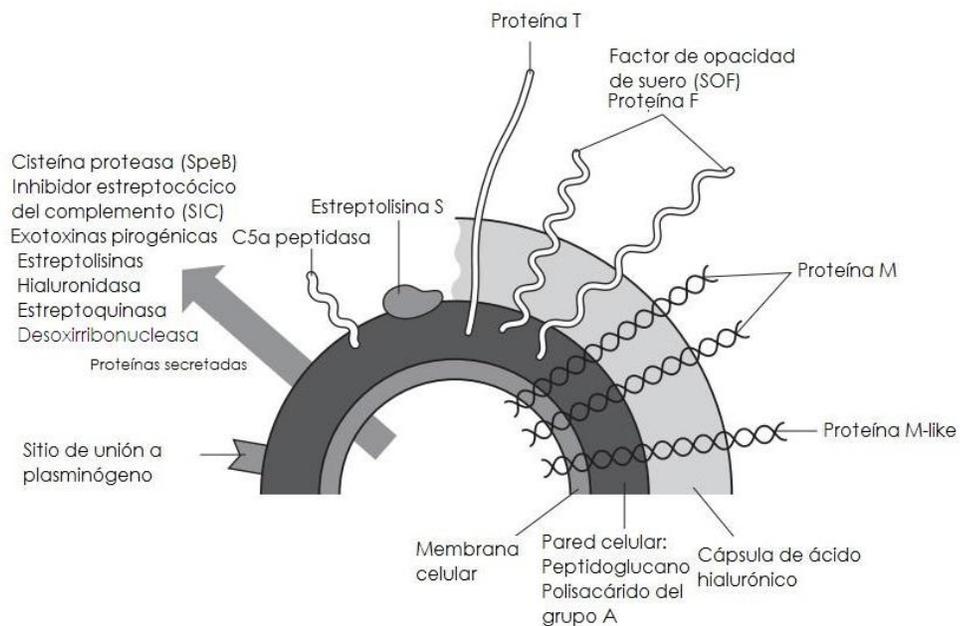


Figura 1. Factores de virulencia presentes en *S. pyogenes* (modificado de Kilian M.)⁴

2.6.1 Proteína M

Es el factor de virulencia de mayor importancia por: 1) su actividad antifagocítica en ausencia de anticuerpos opsonicos, 2) la interacción que presenta con numerosas proteínas del hospedero en el proceso de infección y 3) su variabilidad antigénica.^{11,12,27,28} Se encuentra en la capa externa del EGA que está formada por el complejo inmunogénico del polisacárido del grupo A.^{13,29}

Después de que la proteína M fuera descrita por Lancefield en 1927,¹¹ la estructura de la proteína M fue reportada por Fischetti en 1989, misma que se puede ver en la Figura 2.³⁰ La proteína M tiene disposición de α -hélice que forma un homodímero enrollado y flexible que se extiende desde la pared celular a la que se encuentra unida covalentemente por un motivo LPXTG, un pentapéptido característico de proteínas de superficie.^{7,9,27,30,31} En la estructura de la proteína M se distinguen tres regiones, la porción C-terminal es altamente conservada, la región central es variable y la región hipervariable N-terminal que es específica del serotipo M de EGA.^{7,9,31} La proteína M se caracteriza por presentar 4 bloques de aminoácidos repetidos representados como A, B, C y D, los cuales difieren en tamaño, en número de repetidos y en secuencia de aminoácidos entre tipos M.^{11,12,27}

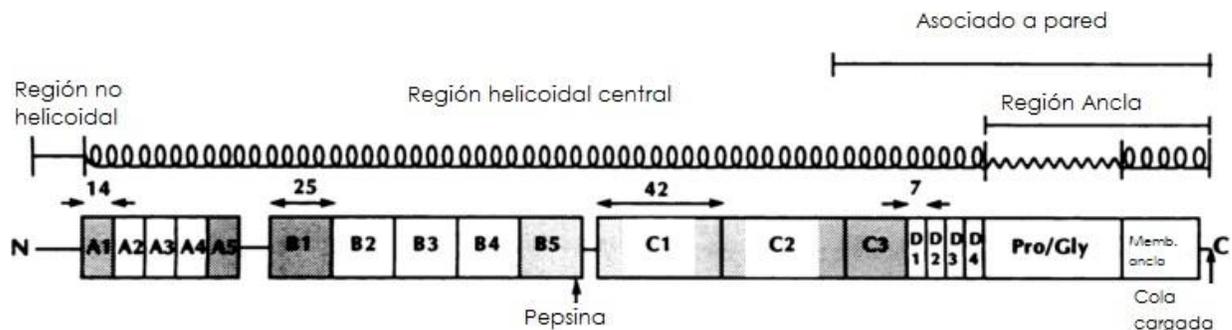


Figura 2. Representación de la proteína M6 descrita por Fischetti (modificado de Fischetti et al.)³⁰

La región N-terminal fue empleada en un principio por Lancefield para determinar serológicamente los tipos M,⁸ y actualmente mediante el estudio de la secuencia del gen *emm*, que codifica para la proteína M, se realiza la tipificación molecular de las cepas de *S. pyogenes* y ha dado lugar a que se conozcan hasta ahora más de 250 tipos M.^{7,11,12,27,32}

La variación antigénica de la proteína M le permite al EGA evadir el ataque de anticuerpos.²⁸ Dependiendo del tipo M puede unirse en mayor o menor grado a ligandos como plasmina, albúmina, IgA, IgG y factor H. La proteína M impide la fagocitosis por vía alterna del complemento al unirse al factor H (inhibidor de la vía clásica), al igual que la vía clásica cuando la proteína de unión a C4 se une a la región hipervariable.^{4,12,27,32}

2.6.2 Cápsula de ácido hialurónico

Está formada por un polímero de alto peso molecular que consiste de residuos alternados de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. Es otro factor de virulencia antifagocítico ya que interfiere en el reconocimiento por células polimorfonucleares (PMN), bloquea el acceso de anticuerpos, inhibe la formación del complemento y aumenta la sobrevivencia en NET's.^{9,12} Las cepas de *S. pyogenes* tienen diferentes grados de encapsulación, las que producen una mayor cantidad de cápsula desarrollan colonias con apariencia mucóide cuando se cultivan en agar sangre, este tipo de colonias se han observado con mayor frecuencia en aislamientos de infecciones invasivas.¹² La resistencia a la fagocitosis se relaciona con una mayor producción de cápsula junto con sobreproducción de proteína M. Esta combinación también puede estar involucrada en la resistencia a bacteriófagos.²⁹

2.6.3 C5a peptidasa

Es una proteína inmunogénica de 125 KDa con actividad proteolítica codificada por el gen *scpA*. Está presente en la superficie de todas las cepas de EGA y colabora en el mecanismo antifagocítico al cortar específicamente la quimiocina C5a en el sitio de unión de PMN.^{2,4,9,12}

2.6.4 Estreptolisinas

Son toxinas extracelulares que atacan directamente las células de defensa, las estreptolisinas S y O lisan eritrocitos, PMN y plaquetas al formar poros en su membrana celular.⁴ La estreptolisina O es inmunogénica y participa en la fiebre

reumática aguda, además promueve la resistencia a la fagocitosis al inducir apoptosis dependiente de caspasas en neutrófilos, macrófagos y células epiteliales.^{4,9} La estreptolisina S aumenta la resistencia a la fagocitosis al formar poros en la membrana de los neutrófilos y es posible que contribuya a la necrosis en tejidos.⁹

2.6.5 Estreptoquinasa

Se conoce también como fibrinolisisina y es expresada por todas las cepas de *S. pyogenes* como factor de diseminación ya que se une al plasminógeno del hospedero y es activado a plasmina lo que favorece la degradación de coágulos, dificulta la formación de fibrina y genera la diseminación de la infección en tejido blando.^{4,12}

2.6.6 Hialuronidasa

Degrada el ácido hialurónico en el tejido conectivo del hospedero, lo que facilita la diseminación de la infección hacia planos en la fascia. Son pocos los aislamientos de EGA que pueden secretar hialuronidasa activa debido a mutaciones en el gen que la codifica.⁴

2.6.7 Desoxirribonucleasas

Se distinguen cuatro tipos distintos de desoxirribonucleasas (DNAsas A, B, C y D), también llamadas estreptodornasas. Son enzimas antigénicamente diferentes, siendo la DNasa B la más común en *S. pyogenes*.⁴ Hidrolizan ácidos nucleicos que se vuelven viscosos al ser liberados por células dañadas y le permite al EGA diseminarse a través de los tejidos dañados.^{2,32}

2.6.8 Proteínas de unión a fibronectina

Son proteínas superficiales que participan en la adherencia a fibronectina (un dímero de glicoproteína que puede ser encontrado en su forma soluble en plasma y como parte de la matriz extracelular en su forma insoluble), internalización e invasión de células no fagocíticas en piel y garganta.^{12,33,34,35} Las proteínas más

estudiadas son PrtF1, SfbI,^{12,33} SOF/SfbII,^{9,33} PrtF2,^{34,36,37} FbaA, FbaB³⁷ y SfbX,³⁸ todas contienen repetidos de unión a fibronectina que se encuentran en la región C-terminal y pueden variar en tamaño y número.⁹ La expresión y distribución de estas proteínas se encuentra limitada a determinados tipos M.^{9,37} Se ha observado que las cepas más virulentas expresan una o más proteínas de unión a fibronectina.³⁶

La proteína PrtF es codificada por el gen *prtF*, es hasta ahora la proteína mejor estudiada y con mayor relación a los procesos de adherencia e internalización de EGA.³⁵ Contiene una secuencia señal N-terminal, dominios RD1 y RD2, un dominio no repetido de unión a fibronectina y la porción C-terminal que se encuentra anclada a la pared celular.³³ El equipo de LaPenta demostró que en la adhesión a fibronectina la unión de PrtF se lleva a cabo en la porción N-terminal de la fibronectina y posteriormente se dirige a un fragmento de 45 KDa que induce el proceso de internalización en las células del hospedero.^{23,33,38}

2.6.9 Factor de opacidad del suero (SOF)

Es una proteína extracelular con un tamaño de 110 KDa que está unida a la pared celular y es codificada por el gen *sof*. Tiene actividad enzimática, corta lipoproteínas de alta densidad, como la apoproteína A1 en el suero provocando opalescencia en el mismo.^{33,39} El SOF se encuentra hasta en el 50% de los casos clínicos de *S. pyogenes*.³⁵

Con la reacción de opacidad del suero y el patrón de aglutinación de la proteína T observados en los estudios de Maxted, se realizó la tipificación de cepas de *S. pyogenes* ya que el resultado correlaciona con el tipo M del EGA que la produce.^{40,41} El tipo M12 es la excepción al tener el gen *sof* pero carecer de la expresión de la opacificación del suero.³⁹

2.6.10 Inhibidor estreptocócico del complemento (SIC)

Es una proteína extracelular de 31 KDa codificada por el gen *sic*, el cual cuenta con más de 300 variantes alélicas en M1 y en M57.^{42,43} El SIC contribuye en la adherencia y colonización al unirse a factores del sistema inmune innato.^{9,12,44} Inactiva péptidos antimicrobianos como la catelicidina LL-37 producida por queratinocitos, células epiteliales en mucosa y neutrófilos.⁴⁵ SIC puede internalizarse en células epiteliales y PMN al paralizar el citoesqueleto de actina de ambas células mediante su unión específica al dominio de unión de ezrina y moesina.^{12,46}

La localización del gen *sic* en el genoma de M1 está relacionada a la secuencia de inserción IS1562.^{47,48} El gen *sic* puede estar ligado a elementos genéticos móviles al encontrarse localizado cerca de una transposasa *spy2009* que está ubicada río abajo del regulon *mga*.⁴⁹

2.6.11 Cisteína proteasa

SpeB es una de las proteasas de mayor importancia que posee *S. pyogenes*, es secretada como un zimógeno cuya activación autocatalítica lleva a la forma activa de una proteasa de 28 KDa capaz de cortar fibronectina, vitronectina, catelicidina LL-37, C3b y el precursor de IL-1 β .^{37,50} Activa metaloproteasas de matriz extracelular, evade la fagocitosis por opsoninas al cortar IgG y corta properdina la cual funciona como un regulador positivo para la activación de la vía alterna del complemento.⁵¹ El gen cromosómico *speB* codifica para la cisteína proteasa y es encontrado en más del 99% de las cepas de *S. pyogenes* con pocas variantes alélicas entre los tipos M.^{10,12,50,52} SpeB está relacionado con destrucción de tejido blando en pacientes con fascitis necrosante promovida por la degradación de vitronectina.^{52,53} La expresión de *speB* se ve afectada por mutaciones en los reguladores RopB y CovR/S ya que además de degradar proteínas del hospedero también puede degradar proteínas de la bacteria, lo que provocaría una disminución de sus propiedades antifagocíticas.^{52,54}

Aunque SpeB no es considerado como una exotoxina pirogénica o superantígeno, puede activar la liberación de citocinas y mimetizar la estimulación de células T inducida por superantígeno.⁵³

En la Figura 3 se muestran los factores de virulencia y sus mecanismos de interacción con el hospedero.

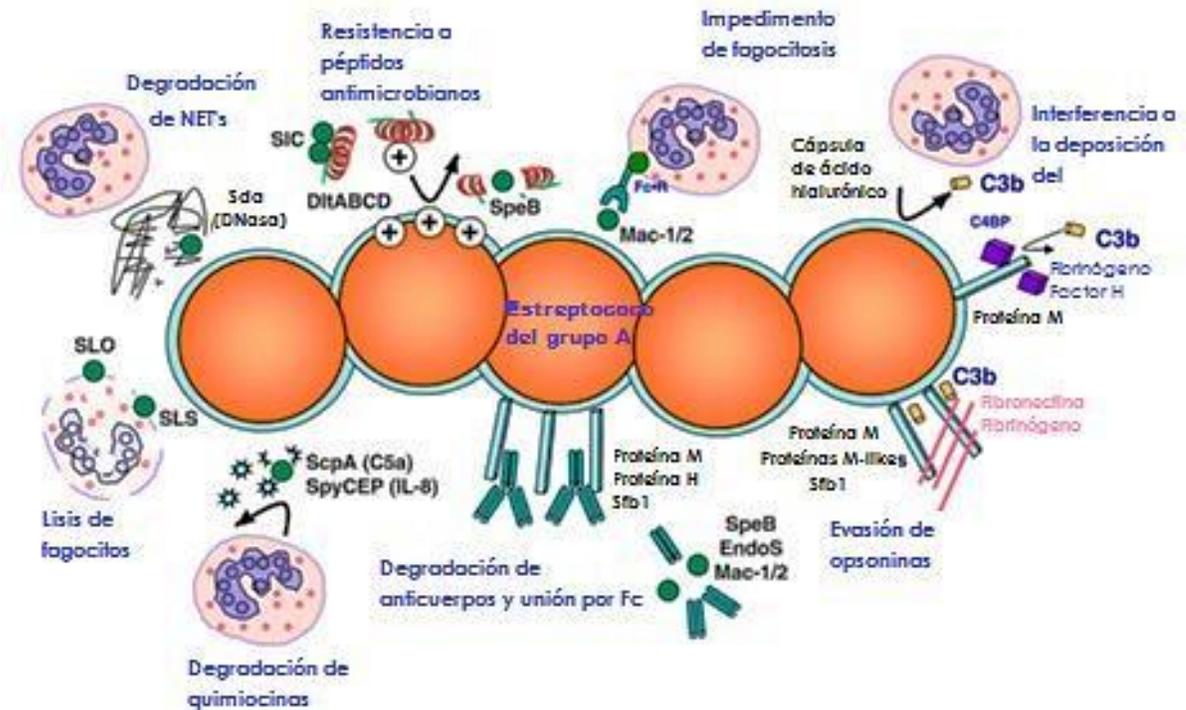


Figura 3. Factores de virulencia de *S. pyogenes* y su mecanismo para evadir el sistema inmune del hospedero (modificado de Walker M. et al.)⁹

2.6.12 Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas

El EGA produce distintas exotoxinas pirogénicas estreptocócicas o Spe de 24 a 28 KDa que están relacionadas entre sí y son factores de virulencia de gran importancia debido a su actividad como superantígenos (SAG's) al ser capaces de interactuar simultáneamente con la cadena α o β del MHC II y con la región variable V β del receptor de la célula T (TCR) sin procesamiento de antígeno (Figura 4). La estimulación de un gran número de células T lleva a la producción de citocinas en altos niveles que tiene como consecuencia fiebre y shock sistémico.^{12,55,56}

Las exotoxinas secretadas por *S. pyogenes* están relacionadas a las enterotoxinas de *S. aureus* posiblemente porque *S. aureus* y *S. pyogenes* vienen de un organismo ancestral común que ya contenía los genes de las toxinas.^{56,57,58}

Son muy virulentas y están involucradas en casos de fascitis necrosante y STSS relacionados con los tipos M1 y M3.^{55,59,60}

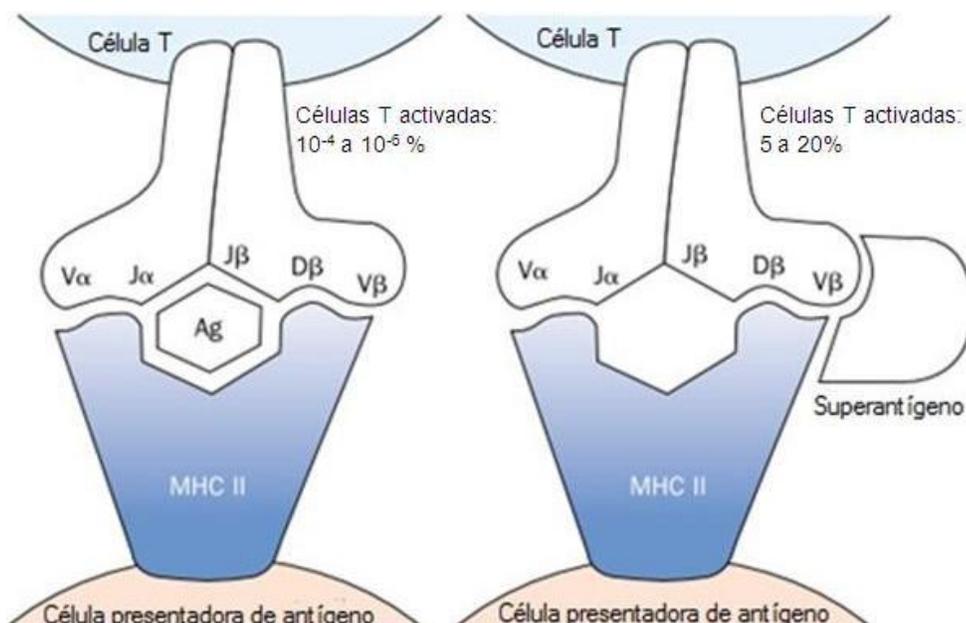


Figura 4. Interacción del MHC II y una célula T mediada por antígeno (izquierda) e inducida por superantígeno (derecha) (modificada de Bisno A. et al.)¹²

Se han reconocido actualmente 11 superantígenos en *S. pyogenes* los cuales son: superantígeno de estreptococo (SSA), exotoxina mitogénica de estreptococo (SmeZ) y las exotoxinas pirogénicas de estreptococo (SpeA, SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL y SpeM).^{19,55,61,62}

Los genes enlistados en la Tabla 4 corresponden a los 11 SAg's incluyendo su origen según lo reportado en la literatura.^{7,55,63,64,65}

Tabla 4. Genes de las 11 exotoxinas pirogénicas estreptocócicas reconocidas y su origen

Origen	Genes
Cromosómico	<i>speG, speJ</i> y <i>smeZ</i>
Fago	<i>speA, speC, speH, speI, speK, speL, speM</i> y <i>ssa</i>

2.6.12.1 SpeA

Es producida por la mayoría de las cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 y M3 que se han visto relacionados con casos de STSS, fiebre escarlatina y fiebre reumática aguda.^{66,67,68,69} Tiene dos dominios conservados, el C-terminal y N-terminal, en este último se encuentra el sitio de unión a la cadena α de MHC II, además presenta un sitio de unión a zinc entre los dos dominios.^{57,67} SpeA estimula preferentemente la región V β 12.4 y V β 14 del TCR.⁵⁶ El gen *speA* viene codificado en el genoma del fago T12 según Johnson *et al.*,⁶⁸ aunque también se ha descrito en el fago ϕ 49. Las cepas del tipo M1 presentan predominantemente el fago T12, mientras que el tipo M3 puede presentar T12, ϕ 49 o ambos.^{69,70} Existen 5 variantes alélicas para el gen *speA*, el alelo *speA1* está distribuido en varias líneas clonales, los alelos *speA2* en cepas del tipo M1 y *speA3* en el tipo M3 están más relacionados a casos de STSS. La actividad mitogénica y la afinidad de unión a MHC II de SpeA3 es mayor que la de SpeA1 y SpeA2.⁶⁵

2.6.12.2 SpeC

Es la exotoxina más encontrada en aislamientos clínicos.⁵⁸ Tiene preferencia por la cadena V β 2.1 del TCR, se une a una amplia variedad de moléculas de MHC II y se une a la cadena β en forma de dímero estabilizado por un segundo sitio de unión a zinc.⁵⁶ SpeC tiene el 93% de homología con SmeZ2, seguido de SpeJ y SpeG.⁵⁶ El gen *speC* está codificado en un bacteriófago denominado CS112 según la cepa CS112 de EGA utilizada por Goshorn y Schlievert⁷¹ o también llamado 370.1 al estar presente en la cepa SF370 del tipo M1 estudiado por Ferretti *et al.*⁴⁷

2.6.12.3 SpeG

Contiene una región de unión a zinc en la porción C-terminal, se une al MHC II con alta afinidad y la unión al TCR se presenta preferentemente en la región V β 2.1. El gen *speG* fue identificado mediante screening en la base genómica del tipo M1 en la Universidad de Oklahoma.⁷ Se considera como un gen cromosómico, sin embargo, los tipos M4 y M77 carecen del gen *speG*.^{55,63}

2.6.12.4 SpeH

Está más relacionada a las enterotoxinas de *S. aureus* y comparte características con las exotoxinas relacionadas a SpeC.⁵⁶ La unión a MHC II se lleva a cabo en la cadena β con mayor afinidad que SpeG pero menor a la de SmeZ y su interacción con los TCR se realiza preferentemente en la región V β 2.1 y V β 7.⁵⁶ El gen *speH* fue identificado junto con *speG*, *speJ* y *smeZ2* y está codificado en el fago 370.2.^{47,56}

2.6.12.5 SpeI

El gen *speI* fue identificado por el equipo de McLaughlin en la posición 5' del gen *speH* en la cepa M1 por lo que se considera que estos dos genes están juntos en el fago 370.2.⁷² En cepas de EGA, el gen *speI* presenta una frecuencia similar a la de *speH*.^{47,73} Tiene afinidad por la región V β 18 del TCR y se une al MHC II en la cadena β formando un dímero similar al de SpeC.⁷⁴

2.6.12.6 SpeJ

El gen *speJ* fue identificado junto con *speG* en la Universidad de Oklahoma y aunque se considera que está presente en todas las cepas de *S. pyogenes*,⁷³ se reportó que se ha estado perdiendo en los linajes y que la región en donde está presente el gen probablemente es un remanente de bacteriófago.^{49,63} SpeJ posee el motivo de unión a zinc, se une a la cadena β del MHC II y con gran afinidad a la cadena V β 2.1 de la célula T.

2.6.12.7 SpeK

El gen *speK* fue identificado en la secuencia genómica de la cepa MGAS315 del tipo M3 en el fago 315.4 y codifica para la exotoxina SpeK que tiene actividad pirogénica y letalidad similar a la toxina de síndrome de shock tóxico (TSST) que produce *S. aureus*. La estimulación de las células T está preferentemente dirigida a la región V β 1. No se había detectado la presencia del gen *speK* en cepas de M3 recuperadas antes de 1987 pero en aislamientos de años recientes se ha encontrado junto con la variante alélica *speA3*.⁷⁵

2.6.12.8 SpeL

El gen *speL* se localizó adyacente al gen *speK* en la secuencia genómica de la cepa MGAS315 del tipo M3 en el fago 315.4;⁷⁵ en la cepa MGAS8232 correspondiente al tipo M18 se encontró como parte de un fago⁷⁶ y diversas cepas del tipo M3 como parte del fago ϕ NIH1.1.⁷⁰ Se ha identificado en cepas de los tipos M4, M22 y el 73% del tipo M89 asociado con fiebre reumática. Tiene actividad similar a la de SpeC. Posee tres ligandos de unión a zinc para la unión a la cadena β del MHC II y presenta afinidad por la región V β 1.1, V β 5.1 y V β 23 del TCR.^{73,70,77}

2.6.12.9 SpeM

El gen *speM* está localizado adyacente a *speL* en un fago en la cepa M18, la exotoxina SpeM tiene similitud con SpeC pero su potencia es menor.^{76,77} Se une a la cadena β de MHC II y tiene afinidad predominante por V β 1.1 y V β 23 del TCR.^{73,77} Los genes *speL* y *speM* no siempre son detectados juntos como lo reporta Friães en aislamientos de EGA.⁶¹ Se ha propuesto que *speM* se ha perdido en el bacteriófago o que puede estar en un bacteriófago diferente al observar que *speL* es más frecuente que *speM*.⁷³

2.6.12.10 SSA

Tiene una secuencia con mayor similitud a SpeA, se une a la cadena α de MHC II en el dominio N-terminal y presenta especificidad por la región V β 5.1 del TCR.^{57,77} Su actividad mitogénica es equiparable a la de SpeK.⁷⁵ El gen *ssa* fue identificado en el genoma de la cepa MGAS315 del tipo M3 contenido en un fago T12-like llamado 315.2 que está insertado en el sitio de fijación para el fago T12 y se han reportado tres variantes alélicas para este gen.^{75,76,78}

2.6.12.11 SmeZ

Es un superantígeno con potente actividad mitogénica,^{64,65,79} el gen *smeZ* presenta un alto grado de polimorfismo con 50 variantes alélicas provenientes del mosaicismo genético.^{55,65} El alto grado de variación antigénica le provee al EGA

una ventaja significativa en el crecimiento al escapar de la neutralización por anticuerpos.⁶⁵ El gen *smeZ* está presente en la mayoría de las cepas de EGA excepto en M2.^{55,63} La variante SmeZ2 tiene como blanco la región V β 4 y V β 8 de la célula T y tiene mayor actividad mitogénica que SpeC y otras variantes de SmeZ.^{56,65}

El hecho de que *S. pyogenes* sea uno de los microorganismos patógenos con mayor prevalencia para el humano por su elevado porcentaje de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, ponen de manifiesto su importancia en la salud pública y la necesidad de realizar análisis moleculares para reconocer los factores de virulencia que contribuyen a la compleja patogenicidad de la bacteria.

La proteína M y los estreptocócicos asociados son considerados factores clave en la virulencia de *S. pyogenes* por lo que el conocimiento de su distribución en casos invasivos tiene un impacto epidemiológico ya que podría dar alguna correlación entre la manifestación clínica invasiva.

3. Justificación

Los factores de virulencia de *S. pyogenes* están asociados a la adherencia, colonización y diseminación, representando un factor importante en el desarrollo de enfermedades invasivas. Dado el reciente resurgimiento de las infecciones invasivas por *S. pyogenes* en países desarrollados y en vías de desarrollo, se tiene la necesidad de estudiar los aislamientos provenientes de casos invasivos presentados en México, es por esto que la relevancia del presente trabajo radica en identificar los genes de virulencia presentes en las cepas de este estudio lo que permitirá un mayor entendimiento a nivel molecular de su comportamiento invasivo.

4. Hipótesis

Los principales tipos M de *S. pyogenes* serán M1, M3, M12 y M89 por ser los que predominan a nivel mundial y estos tendrán un patrón específico de genes de virulencia.

5. Objetivo general

Determinar la presencia de genes asociados a factores de virulencia en cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de casos clínicos invasivos en distintas Instituciones de Salud Pública en México durante el período de 2001 a 2014.

5.1 Objetivos particulares

- Determinar el tipo M de cada cepa mediante el análisis de la secuencia del gen *emm*.
- Establecer la distribución de los tipos M relacionados con cuadros invasivos.
- Estandarizar las condiciones de amplificación de los genes *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *smeZ* y *ssa*.
- Identificar mediante PCR los genes asociados a factores de virulencia *emm*, *sic*, *sof*, *prtF*, *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *smeZ* y *ssa*.
- Determinar los perfiles de genes asociados con los diversos tipos M, así como su relación con la sensibilidad a antibióticos.
- Establecer el patrón de genes de virulencia y los tipos M más frecuentes aislados en cepas invasivas de *S. pyogenes*.

6. Materiales y métodos

6.1 Reactivos, materiales y equipos

<p>Para Microbiología:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Base de Agar Sangre (AS) BBL™ - Agar Müller-Hinton II (MH) BBL™ - Caldo Infusión de Cerebro Corazón (BHI) Bioxon® - Caldo Todd-Hewitt (TH) Bacto™ - Glicerol JT Baker® - Solución Salina Isotónica Estéril 0.9% - Kit Pastorex™ Strep de BIORAD® 	<p>Materiales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Puntas para micropipeta de 10, 200 y 1000 µL Axygen® - Tubos Eppendorf® de 200, 500 y 1500 µL Axygen® - Pipetas Pipetman Classic™ de 2, 10, 20, 100, 200 y 1000 µL Gilson® - Cajas Petri desechables
<p>Para extracción:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Buffer de Lisis - Lisozima Egg White Grado Ultrapuro Amresco® - Kit de extracción DNeasy Tissue Kit (250) de QIAGEN® (incluye: Proteinasa K 600 mAU/mL, AE, AL, AW1 y AW2) - Etanol absoluto 	
<p>Para PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Buffer A 10x Vivantis® - Buffer S 10x con MgCl₂ 17.5mM Vivantis® - MgCl₂ 50 mM Vivantis® - dNTP's 1.25 mM Fermentas® - Taq DNA polymerase 500U (5U/µL) Vivantis® - Primers para <i>emm</i> Genosys®; <i>prtF</i>, <i>sic</i>, <i>sof</i>, <i>speA</i>, <i>speB</i>, <i>speC</i> Biosynthesis®; <i>speG</i>, <i>speH</i>, <i>speI</i>, <i>speJ</i>, <i>speK</i>, <i>speL</i>, <i>speM</i>, <i>ssa</i> y <i>smeZ</i> Invitrogen® todos a 10µM - Dimetilsulfóxido (DMSO) Grado Molecular (1-10%) SIGMA® - Agua ultrapura 	<p>Equipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Balanza digital CS 200 Ohaus® - Block Heater Lab-Line® - Cámara digital DC290 Kodak - Centrifuga 1-15 Sigma® - Fuente de poder Powerpac 300 BIORAD® - Horno de Microondas Panasonic - Incubadora Inkubator 1000 Heidolph Instruments® - Jarras de anaerobiosis Oxoid® - Lámpara de luz UV MacroVue Uvis-20 Hoefer - Mini-Sub Cell GT y Wide Mini-Sub Cell GT BIORAD® - Software Kodak 1D 3.5v - Termociclador 9700 Applied Biosystems® - Vortex Vortex-Genie® 2 Scientific Industries, Inc.
<p>Para cortes de restricción:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enzima <i>DdeI</i> 500U (10U/µL) Fermentas® - Buffer Tango 10x con BSA Fermentas® - Enzima <i>HincII</i> 300U (10U/µL) Invitrogen® - Enzima <i>HaeIII</i> 2500U (10U/µL) Invitrogen® - Buffer React4 10x Invitrogen® 	
<p>Para electroforesis:</p> <ul style="list-style-type: none"> - GeneRuler 100 pb (0.5µg/µL) DNA Ladder Plus Fermentas® - Loading Dye Solution 6x Fermentas® - Agarosa Ultrapure™ Invitrogen® - Bromuro de etidio 10mg/mL Research Organics, Inc. - Buffer TBE 0.5x 	

6.2 Selección de muestras

Para el estudio se contó con 125 cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de casos clínicos provenientes de distintas entidades de salud en el país (Tabla 5). Las muestras se obtuvieron del banco de cepas del Laboratorio de Epidemiología Molecular en la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina, seleccionando aquellas que se aislaron de un caso clínico invasivo.

Tabla 5. Institutos de Salud en México

Entidad de salud pública	# cepas
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) conocido ahora como CENAVECE de la Secretaría de Salud	49
Instituto Nacional de Pediatría (INP) Secretaría de Salud	30
Laboratorio Estatal de Michoacán (LEM) Secretaría de Salud	14
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INC) Secretaría de Salud	6
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Secretaría de Salud	5
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (H20N) del ISSSTE	5
Hospital Hermosillo (H)	4
Hospital Morelia (M)	4
Hospital General Gonzalo Castañeda (HGGC) ISSSTE	3
Hospital General de México (HGM) Secretaría de Salud	2
Hospital Médica Sur (HMS) Privado	2
Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN) del IMSS	1

6.3 Procesamiento de la muestra

Las cepas recibidas en el laboratorio fueron sembradas en AS por estría radial incubando a 37°C en condiciones de microaerofilia por 24 horas para obtener colonias aisladas y determinar su pureza. Una vez que se verificó la pureza del cultivo y la presencia de β -hemólisis en AS, se realizó la prueba de Bacitracina y CAMP. Así mismo, se realizó una prueba serológica con kit comercial Pastorex™ Strep de BIORAD® para conocer el grupo de Lancefield correspondiente. Después de confirmarse la naturaleza de la cepa se procedió a inocular la cepa en viales con caldo BHI/glicerol al 15% y se congelaron a -70°C para su conservación.

Los datos de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas invasivas se tomaron de análisis previos realizados mediante la técnica de Kirby-Bauer en agar MH. Los antibióticos considerados en el estudio y los criterios del CLSI y de Kimura *et al.*⁸⁰ para la interpretación de los resultados están en la Tabla 6.

Tabla 6. Criterios para la interpretación de pruebas de susceptibilidad para *S. pyogenes*

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Tetraciclina (TET)	≤18	19-22	≥23
Eritromicina (ERI)	≤15	16-20	≥21
Penicilina (PEN)			≥24
Vancomicina (VA)			≥17
Levofloxacin (LEVO)	≤13	14-16	≥17
Cloranfenicol (CLOR)	≤17	18-20	≥21
Quinupristina-Dalfopristina (SYN)	≤15	16-18	≥19
Clindamicina (CLIN)	≤15	16-18	≥19
Oxacilina (OX)			≥17*
Ceftizoxima (ZOX)			≥29*
Ceftibuteno (CFT)			≥20*

*Kimura *et al.*

6.4 Extracción del DNA

Para la extracción de DNA de las cepas de *S. pyogenes* se usó el Kit comercial DNeasy Tissue (Qiagen).

Las cepas se cultivaron en AS por 24 horas, a partir de éste se inocularon de 3 a 4 colonias en caldo TH incubando de 18 a 24 horas a 37°C en agitación, ajustando la suspensión bacteriana a una concentración de 2×10^9 bacterias/mL.

Se tomó una alícuota de 1 mL de caldo y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 7500 rpm ($5000 \times g$) por 8 minutos y se decantó el sobrenadante salvando el paquete celular. Se agregó 180 µL de buffer de lisis con 20 mg/mL de lisozima y se agitó en vórtex, posteriormente se incubó a 37°C por 30 minutos.

Se agregaron 25 µL de proteinasa K (600 mAU/mL) y 200 µL de buffer AL para incubarlo a 70°C por 30 minutos, después se adicionó 200 µL de etanol absoluto frío y se agitó para transferir el contenido del tubo a una columna de extracción.

El contenido se centrifugó a 8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto, se descartó el sobrenadante, se adicionaron 500 µL del buffer de lavado AW1 y se centrifugó a 8000 rpm (6000 x g) para un segundo lavado con 500 µL de AW2. Se centrifugó a 13000 rpm (20000 x g) por 3 minutos, finalmente se agregaron 200 µL de buffer de elución AE, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por un 1 minuto para eluir y conservar el DNA en tubos Eppendorf a 4°C. Una vez obtenido el DNA, se corrió una muestra de 3 µL en gel de agarosa al 1.0% por electroforesis durante 30 minutos y se observaron los DNA's.

6.5 Estandarización de la PCR y amplificación de genes de virulencia

La amplificación de los genes se realizó por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como se representa en la Figura 4.



Figura 4. Esquema de la PCR utilizada para identificar los genes de virulencia. La técnica consistió en 3 fases: Inicial, Reacción y Final. *Las condiciones de reacción variaron de acuerdo con el gen de virulencia identificado (Ver tablas de cada gen).

Fase inicial: el DNA se sometió a una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos.

Fase de reacción: comprende 3 etapas por ciclo de reacción hasta completar 30 ciclos, las etapas son:

Desnaturalización, donde se llevó a cabo la separación de las cadenas de DNA a 94°C; Alineamiento, en la que los cebadores se alinaron a la cadena complementaria de DNA, la temperatura y el tiempo dependen del gen a

identificar; y la Elongación, cuando la *Taq* polimerasa identificó el cebador y amplificó el segmento específico del gen con la adición de desoxinucleótidos. La temperatura empleada fue de 72°C y su duración dependió del gen a amplificar. Una vez completados los ciclos de reacción, se pasó a la Fase final, que complementó la amplificación manteniéndose a 72°C durante 7 minutos y finalmente se llevó a 4°C al término de la reacción.

La amplificación de los genes *emm*, *prtF*, *speB*, *sic*, *sof*, *speA* y *speC* se realizó como prueba de rutina para las cepas de *S. pyogenes* bajo condiciones ya probadas en el laboratorio.

Tabla 7. Mezcla Maestra para el amplificado del gen *emm* (50 µL)

Reactivos	Volumen (µL)	Condiciones de reacción
Buffer A 10x	5.0	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00" <u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 00" 47°C por 1' 00" 72°C por 1' 20" <u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
dNTP's 1.25mM	8.0	
Cebador <i>emm</i> A 10mM	1.0	
Cebador <i>emm</i> B 10mM	1.0	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/µL	0.2	
MgCl ₂ 50mM	3.0	
DMSO	0.2	
H ₂ O ultrapura	30.6	
DNA	1.0	

La Mezcla Maestra de 50 µL se utilizó exclusivamente para amplificar el gen *emm* ya que se requiere este volumen para realizar el corte enzimático en su caracterización y la consecuente identificación del tipo M.

Tabla 8. Mezcla Maestra para el amplificado del gen *prtF* (15 µL)

Reactivos	Volumen (µL)	Condiciones de reacción
Buffer A 10x	1.5	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00" <u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 00" 60°C por 1' 00" 72°C por 1' 20" <u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
dNTP's 1.25mM	3.0	
Cebador <i>prtF</i> A 10mM	0.4	
Cebador <i>prtF</i> B 10mM	0.4	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/µL	0.06	
MgCl ₂ 50mM	2.0	
H ₂ O ultrapura	6.64	
DNA	1.0	

Tabla 9. Mezcla Maestra para el amplificado del gen *speB* (15 μ L)

Reactivos	Volumen (μ L)	Condiciones de reacción
Buffer A 10x	1.5	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00"
dNTP's 1.25mM	3.0	
Cebador <i>speB</i> A 10mM	0.4	<u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 20" 50°C por 1' 20" 72°C por 1' 40"
Cebador <i>speB</i> B 10mM	0.4	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ L	0.06	
MgCl ₂ 50mM	2.0	
H ₂ O ultrapura	6.64	<u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
DNA	1.0	

Tabla 10. Mezcla Maestra para el amplificado de los genes *sic/sof* (15 μ L)

Reactivos	Volumen (μ L)	Condiciones de reacción
Buffer A 10x	1.5	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00"
dNTP's 1.25mM	3.0	
Cebador <i>sic</i> A 10mM	0.4	<u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 00" 47°C por 1' 00" 72°C por 1' 20"
Cebador <i>sic</i> B 10mM	0.4	
Cebador <i>sof</i> A 10mM	0.4	
Cebador <i>sof</i> B 10mM	0.4	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ L	0.06	<u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
MgCl ₂ 50mM	2.0	
H ₂ O ultrapura	5.84	
DNA	1.0	

Tabla 11. Mezcla Maestra para el amplificado de los genes *speA/speC* (15 μ L)

Reactivos	Volumen (μ L)	Condiciones de reacción
Buffer A 10x	1.5	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00"
dNTP's 1.25mM	3.0	
Cebador <i>speA</i> A 10mM	0.4	<u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 00" 47°C por 1' 00" 72°C por 1' 20"
Cebador <i>speA</i> B 10mM	0.4	
Cebador <i>speC</i> A 10mM	0.4	
Cebador <i>speC</i> B 10mM	0.4	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ L	0.06	<u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
MgCl ₂ 50mM	2.0	
H ₂ O ultrapura	5.84	
DNA	1.0	

La estandarización de las condiciones de amplificación de los genes *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa* y *smeZ* consistió en diferentes temperaturas de alineamiento, volúmenes de la mezcla de reacción y la incorporación de dos o más pares de cebadores en la misma mezcla para hacer PCR's duales y múltiples.

Tabla 12. Mezcla Maestra para el amplificado del gen *speJ* (15 μ L)

Reactivos	Volumen (μ L)	Condiciones de reacción
Buffer A 10x	1.5	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00" <u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 20" 55°C por 1' 20" 72°C por 1' 40" <u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
dNTP's 1.25mM	3.0	
Cebador <i>speJ</i> A 10mM	0.4	
Cebador <i>speJ</i> B 10mM	0.4	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ L	0.06	
MgCl ₂ 50mM	2.0	
H ₂ O ultrapura	6.64	
DNA	1.0	

Tabla 13. Mezcla Maestra para el amplificado de los genes *speG/smeZ* (30 μ L)

Reactivos	Volumen (μ L)	Condiciones de reacción
Buffer A 10x	3.0	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00" <u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 20" 47°C por 1' 20" 72°C por 1' 40" <u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
dNTP's 1.25mM	8.0	
Cebador <i>speG</i> A 10mM	0.8	
Cebador <i>speG</i> B 10mM	0.8	
Cebador <i>smeZ</i> A 10mM	0.8	
Cebador <i>smeZ</i> B 10mM	0.8	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ L	0.2	
MgCl ₂ 50mM	2.0	
H ₂ O ultrapura	12.6	
DNA	1.0	

Tabla 14. Mezcla Maestra para el amplificado de los genes *speH/speI* (15 μ L)

Reactivos	Volumen (μ L)	Condiciones de reacción
Buffer S 10x con MgCl ₂	1.5	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00" <u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 20" 47°C por 1' 20" 72°C por 1' 40" <u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
dNTP's 1.25mM	2.5	
Cebador <i>speH</i> A 10mM	0.4	
Cebador <i>speH</i> B 10mM	0.4	
Cebador <i>speI</i> A 10mM	0.4	
Cebador <i>speI</i> B 10mM	0.4	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ L	0.1	
H ₂ O ultrapura	8.3	
DNA	1.0	

Tabla 15. Mezcla Maestra para el amplificado de los genes *speK/speL/speM/ssa* (30 μ L)

Reactivos	Volumen (μ L)	Condiciones de reacción
Buffer A 10x	3.0	<u>Desnaturalización:</u> 94°C por 5' 00" <u>Alineamiento:</u> 94°C por 1' 20" 47°C por 1' 20" 72°C por 1' 40" <u>Elongación:</u> 72°C por 7' 00"
dNTP's 1.25mM	9.0	
Cebador <i>speK</i> A 10mM	0.8	
Cebador <i>speK</i> B 10mM	0.8	
Cebador <i>speL</i> A 10mM	0.8	
Cebador <i>speL</i> B 10mM	0.8	
Cebador <i>speM</i> A 10mM	0.8	
Cebador <i>speM</i> B 10mM	0.8	
Cebador <i>ssa</i> A 10mM	0.8	
Cebador <i>ssa</i> B 10mM	0.8	
<i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ L	0.2	
MgCl ₂ 50mM	2.5	
H ₂ O ultrapura	8.0	
DNA	1.0	

6.5 Tipificación de la proteína M

Para determinar el tipo M de la cepa se realizó la PCR del gen *emm* y se obtuvo el peso molecular del producto obtenido con el software Kodak 1D 3.5. Los resultados de la PCR de los genes *sic* y *sof* se utilizaron como de tamiz para caracterizar los tipos M, junto con el tamaño del gen *emm*.

Para saber el tipo M de cada cepa, se realizó el corte de restricción del gen *emm* con las enzimas *Ddel* y *HincII/HaeIII* (Tablas 16 y 17).

Tabla 16. Corte de restricción del gen *emm* con *Ddel*

Reactivos	Volumen (μ l)
Buffer Tango 10x	4.0
Enzima <i>Ddel</i>	0.2
Producto PCR <i>emm</i>	35.8

Tabla 17. Doble corte de restricción del gen *emm* con *HincII/HaeIII*

Reactivos	Volumen (μ l)
Buffer React4 10x	4.0
Enzima <i>HincII</i>	0.2
Enzima <i>HaeIII</i>	0.2
Producto PCR <i>emm</i>	35.6

El volumen final por muestra fue de 40 μL , se incubó por 24 horas a 37°C. Posteriormente, el corte de restricción se reveló siguiendo el proceso de Identificación de productos de la PCR. Se cargaron los 40 μL en un gel de agarosa al 2.0%, se realizó una electroforesis durante 60 minutos y se compararon los RFLP's obtenidos con los de cepas de referencia obtenidos de los CDC, con el fin de asignar el tipo M correspondiente.

6.7 Identificación de los productos de la PCR

El revelado de la PCR se realizó por la técnica de electroforesis en gel de agarosa. La concentración de agarosa en el gel dependió del gen identificado: para los genes *emm* y *speB* se preparó al 1.5% y para los genes *sic*, *sof*, *prtF*, *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa* y *smeZ* fue al 1.7%. A todos los geles se les incorporó 2 μL de bromuro de etidio a una concentración de 10mg/mL por cada 100mL de agarosa. El gel se colocó en la cámara Mini-Sub Cell GT con buffer TBE 0.5x, se cargaron las muestras con Loading Dye Solution 6x, controles positivos para cada gen y 3.5 μL de marcador de peso molecular de 100 pb (0.5 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$). Se ajustaron los parámetros en la fuente de poder a 90 V y 400 mA para electroforesis de 45 minutos. El gel de agarosa se observó en lámpara de luz UV para identificar los productos de la PCR de acuerdo al peso molecular esperado (Tabla 18) y se capturó en el fotodocumentador Kodak para su almacenamiento y análisis posterior.

Tabla 18. Cebadores utilizados para amplificar los genes de virulencia

Cebador	Secuencia	Tamaño del producto amplificado (pb)	Referencia
emm	F GGG AAT TCT ATT SGC TTA GAA AAT TAA	800-2000	81
	R GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT		
prtF	F GGG GGG TAC CTT TTC AGG AAA TAT GGT TGA GAC A	200-600	82
	R GGG GGG AAG CTT TCG CCG TTT CAC TGA AAC CAC TCA		
speB	F GTT GTC AGT GCA ACT AAC CGT	1700	50
	R ATC TGT GTC TGA TGG ATA GCT T		
speJ	F GTT ATA ATA ATC TTT CAT GGG TAC GG	540	83
	R CTT TCA TGT TTA TTG CCA TTG ATC GC		
sic	F TAA GGA GAG GTC ACA AAC TA	900	84
	R TTA CGT TGC TGA TGG TGT AT		
sof	F GTA TAA ACT TAG AAA GTT ATC TGT AGG	600	85
	R GGC CAT AAC ATC GGC ACC TTC GTC AAT T		
speA	F ATG GAA AAC AAT AAA AAA GTA TTG	700	84
	R TTA CTT GGT GTT AGG TAG CTT C		
speC	F ACC TAT CAT CAA AGT GAC TAT AAG AAA GAC	550	86
	R CCC TTC ATT TGG TGA GTC AAA TAA GTC TAT TTG A		
speG	F GCT ATG GAA GTC AAT TAG CTT ATG CAG AT	400	60
	R TTA TGC GAA CAG CCT CAG AGG		
smeZ	F GAA GTA GAT AAT AAT TCC CTT CTA AGG	600	83
	R AGT CAA TTT CTA TAT CTA AAT GCC C		
speH	F TCT ATC TGC ACA AGA GGT TTG TGA ATG TCC A	340	60
	R GCA TGC TAT TAA AGT CTC CAT TGC CAA AA		
speI	F AAG GAA AAA TAA ATG AAG GTC CGC CAT	216	60
	R TCG CTT AAA GTA ATA CCT CCA TAT GAA TTC TTT		
speK	F TAT CGC TTG CTC TAT ACA CTA CTG AGA GT	230	60
	R CCA AAC TGT AGT ATT TTC ATC CGT ATT AAA		
speL	F TTA GGA TGG TTT CTG CGG AAG AGA C	600	83
	R TTC CTC TTT CTC GCC TGA GCC GTG		
speM	F CTC TTT TAG CGG TAT CTG TTC	400	Diseñado en Primer Select basado en la cepa MGAS8232
	R TGT GTA TCG CTT GCT CTA T		
ssa	F GTG CAC AAT TAT TAT CGA TTA GTG	722	83
	R GGT GAA CCT CTA TAG CTA TAG CTG AAG		

F: Forward; R: Reverse

7. Resultados y discusión

7.1 Origen clínico de las cepas invasivas

Las 125 cepas de *Streptococcus pyogenes* analizadas provenían de casos clínicos de infecciones invasivas, en 68 de los casos se conoció su origen de aislamiento y se encuentran enlistados en la Tabla 19.

Tabla 19. Origen de aislamiento de las cepas invasivas de *Streptococcus pyogenes*

Origen de aislamiento	Muestras
Secreción	23
Hemocultivo	17
Vía respiratoria baja	7
Absceso	6
Piel	5
Urocultivo	4
Expectoración	3
Úlcera	2
Líquido cefalorraquídeo	1
Otras invasivas	57

Las 57 cepas restantes se incluyeron en el estudio ya que casos invasivos, 51 cepas provenían del INDRE y de las otras 6 cepas solamente se obtuvo la información presentada en la Tabla 20.

Tabla 20. Información disponible para las cepas que no provienen del INDRE

Clave cepa	Información disponible	Hospital
185	Síndrome doloroso abdominal	HGM
561	Biopsia	INP
566	Aspiración	INP
610	Glomerulonefritis aguda	HGGC
2464	Globo ocular	H20N
2753	Defunción de paciente masculino	LEM

De las 68 cepas de *S. pyogenes* donde se conoció el origen específico de la muestra donde se realizó el aislamiento, las muestras de secreciones y hemocultivos representaron las principales fuentes de aislamiento con el 34% y 26%, respectivamente.

En la Tabla 19 se observa la diversidad de muestras donde se aisló *S. pyogenes* lo cual muestra la variedad de infecciones que puede ocasionar, como ejemplo se tienen 2 casos de sepsis, 1 de sepsis neonatal, 1 de síndrome de shock tóxico por estreptococo, 3 de celulitis necrosante y 5 de fascitis necrosante. Se hace evidente la presencia de *S. pyogenes* en México como causante de enfermedades invasivas.

En la Figura 5 se muestra la distribución de los aislamientos de *S. pyogenes* de acuerdo a la entidad de salud. Cabe destacar que la mayoría de las cepas provienen de 3 institutos principalmente, el INDRE aporta 49 cepas (equivalente al 39%), el INP tiene 30 cepas provenientes de pacientes pediátricos (24%) y el LEM con 14 cepas (11%). El INDRE realiza vigilancia epidemiológica en todo el país y se desconoce el estado donde surgió el aislamiento invasivo de EGA. El 14% corresponde únicamente a la población del estado de Michoacán. Las 4 cepas de EGA que provienen del Hospital de Hermosillo fueron aislamientos de fascitis necrosante, convirtiéndose en el principal sitio en México con presencia de este cuadro clínico con 4 de 5 casos.

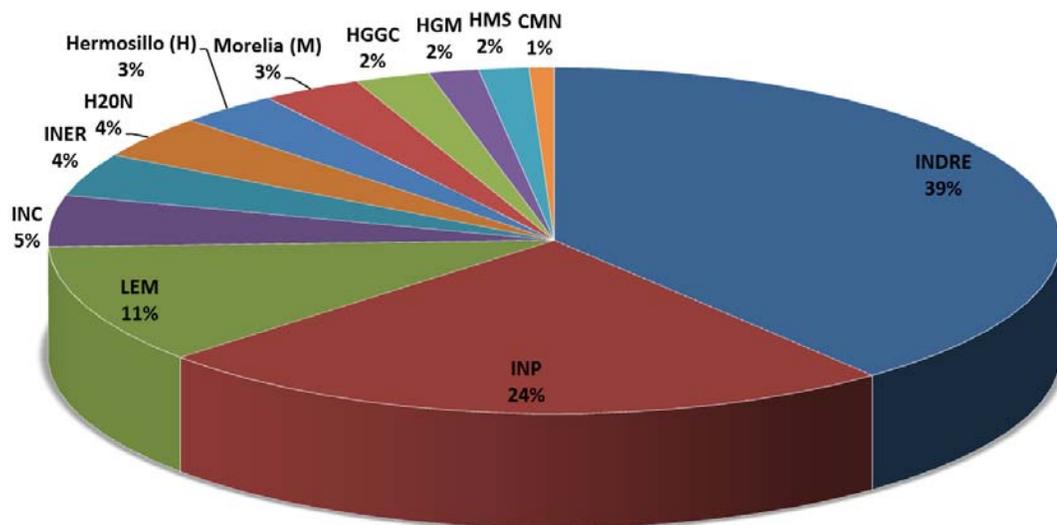


Figura 5. Distribución de los aislamientos clínicos de *S. pyogenes* recolectados de institutos de salud en el período 2001–2014

En la Figura 6 se muestran solo cepas aisladas a partir de secreciones y hemocultivos y el Hospital o Instituto donde fueron aisladas las cepas.

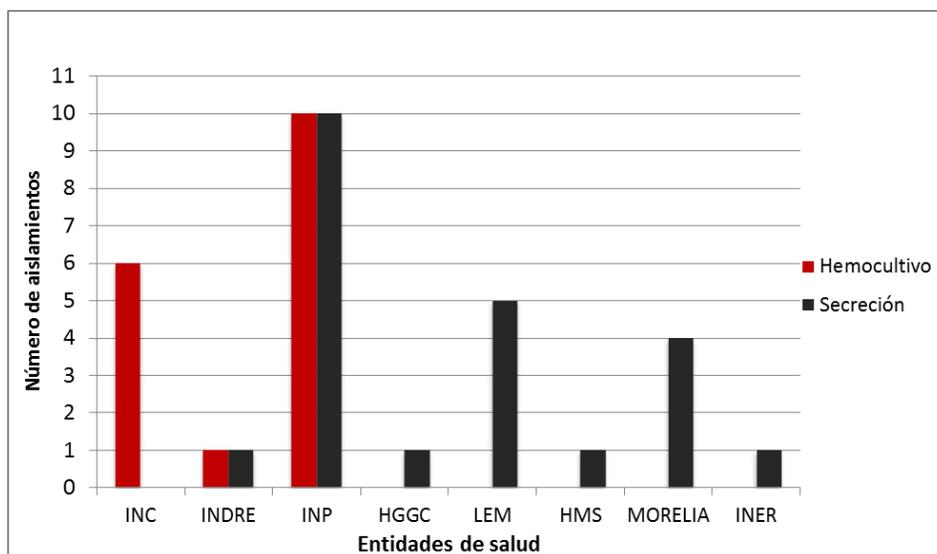


Figura 6. Distribución de los aislamientos de *S. pyogenes* a partir de hemocultivos y secreciones

En la figura anterior se observa que 20 de las 30 cepas del INP corresponden a las muestras de hemocultivos y secreciones con 10 de cada uno. La mayoría de las cepas aisladas de secreción (19/23) se encuentran repartidas en el INP (10), LEM (5) y Hospital de Morelia (4). Las 4 cepas restantes se obtuvieron del INDRE, HGGC, HMS e INER, con una cepa por cada hospital. El INP y el INC fueron los principales institutos con cepas aisladas de hemocultivos, ya que de las 17 cepas recolectadas, 10 están en el INP, 6 en el INC y 1 en INDRE. Cabe señalar que los 6 aislamientos obtenidos del INC corresponden a hemocultivos.

7.2 Distribución de los tipos M

La caracterización genética de las cepas de *S. pyogenes* se realizó a partir de la extracción del DNA, comenzando con el análisis del gen *emm* para la identificación del tipo M. El DNA extraído observado en gel de agarosa al 1.0% determinó rendimiento de la extracción y la pureza del DNA al observarse únicamente una banda como en el ejemplo de la Figura 7. La identificación del producto de PCR del gen *emm* se realizó con base en el peso molecular esperado del gen de acuerdo a los cebadores utilizados que se muestran en la Tabla 18.

En la Figura 8 se observa el producto de la PCR para el gen *emm*, los diversos tamaños de producto van de los 1100 a los 1500 pb aproximadamente. Estos

resultados se explican debido a la diversidad de tamaño que existe en el gen *emm* ya que la proteína M que codifica muestra una hipervariabilidad en la región N-terminal y en el número de secuencias de repetición presentes.^{7,11,12,27}



Figura 7. Fotografía del DNA extraído de 10 cepas de *S. pyogenes* separado en gel de agarosa al 1.0%

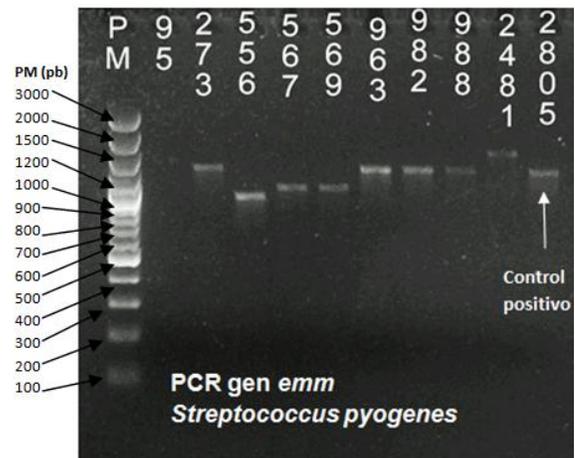


Figura 8. Fotografía de los productos de la PCR del gen *emm* en gel de agarosa al 1.5%. PM - marcador de peso molecular

Para la determinación del tipo M se analizaron los RFLP's presentes en las fotografías de la Figura 9 que fueron comparados con los de cepas de referencia de los CDC para asignar el tipo M a cada cepa.

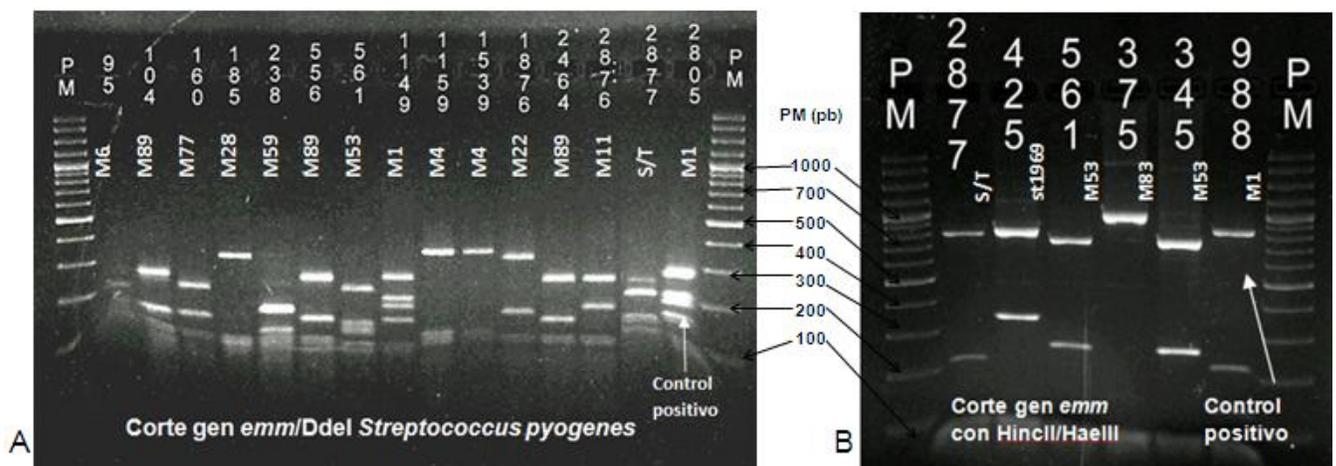


Figura 9. Fotografías representativas de los cortes de restricción del producto de la PCR del gen *emm* (RFLP's) en gel de agarosa al 2.0%. A. Corte de restricción con la enzima *DdeI*. B. Corte de restricción con las enzimas *HincII/HaeIII*. PM - marcador de peso molecular.

En este estudio se encontraron 24 diferentes tipos M en las 125 cepas de *S. pyogenes*. Los tipos M1, M12, M6, M75 y M89 fueron los predominantes al representar el 60.8% del total de las cepas. En la Tabla 21 se muestra la frecuencia de los 24 tipos M encontrados.

Tabla 21. Frecuencias de los tipos M de *S. pyogenes* aislados de cuadros invasivos

Tipo M	n	%
1	30	24.0
12	15	12.0
6	11	8.8
75	10	8.0
89	10	8.0
22	7	5.6
3	6	4.8
2	5	4.0
28	5	4.0
59	5	4.0
4	3	2.4
11	3	2.4
43	2	1.6
60	2	1.6
49-1	2	1.6
65	1	0.8
78	1	0.8
87	1	0.8
41-2	1	0.8
77	1	0.8
53	1	0.8
stG485	1	0.8
stG839	1	0.8
S/T	1	0.8

} Tipos M predominantes
60.8%

En la Figura 10 se representan los 24 tipos M diferentes en las 125 cepas. El tipo M de la cepa 2877 no pudo ser identificado, por lo que se denominará como “sin tipificar” (S/T). Esto podría ser debido a que se trata de un tipo M aun no reportado en la colección de cepas de referencia del CDC o se puede deber a un tipo M conocido que presenta alguna variación en su secuencia, lo que daría como resultado un patrón de corte distinto a lo que se esperaría.

El primer lugar lo ocupa el tipo M1 con el 24% de los casos al igual que en otros estudios como se muestra en la Tabla 3 con frecuencias que van del 12 al 27%, representa el tipo M de mayor relevancia en cuanto a enfermedades invasivas se refiere.^{9,16,19,22} En un estudio en Argentina con pacientes pediátricos el tipo M1 se reportó en un 40%,²¹ por lo que la frecuencia en este estudio también resulta de importancia dada la asociación de M1 con diferentes factores de virulencia.^{12,42,69}

El tipo M12 ocupa el segundo lugar en frecuencia con el 12% en nuestro estudio. Los estudios en Grecia,¹⁷ Suecia,¹⁸ Brasil²² y Japón²⁴ muestran resultados parecidos para M12 con prevalencia del 9 al 21%, inclusive M12 ha llegado a superar a M1 en frecuencia.

El tipo M6 ocupa el tercer lugar con el 8.8% de los casos seguido de M75 con el 8%. Estos tipos M no se han reportado en frecuencias elevadas, en países como Portugal,⁶³ Japón,²⁴ Holanda⁶⁶ y Brasil⁸⁷ tienen una prevalencia del 6 al 11%, similar a la de este estudio.

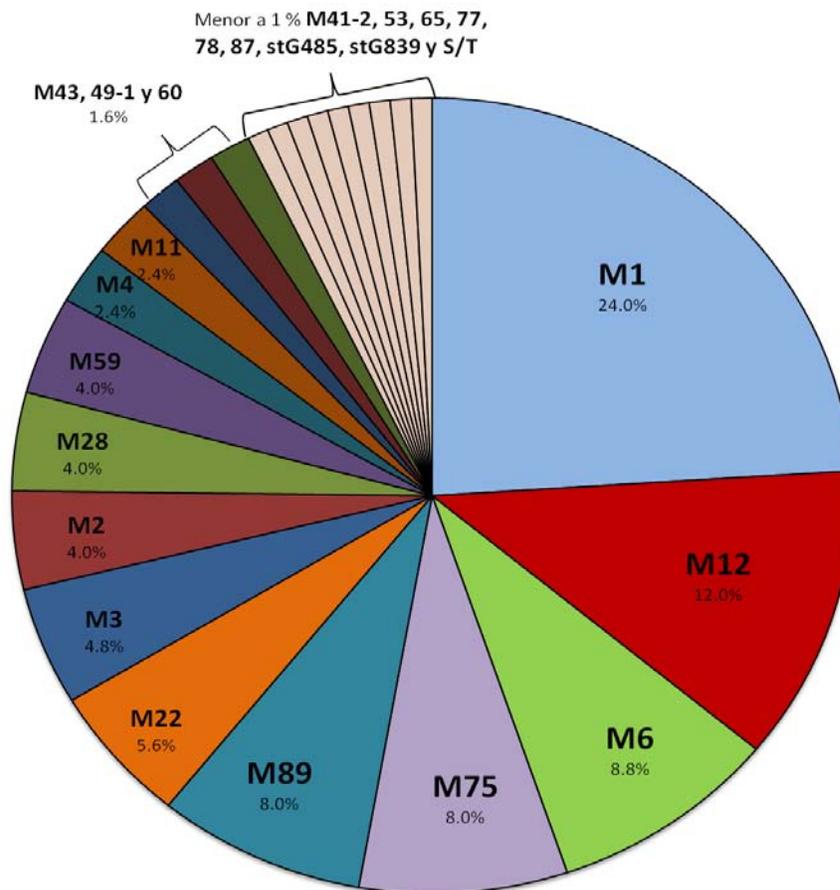


Figura 10. Distribución de los 24 tipos M identificados de *S. pyogenes*

El tipo M89 es el quinto lugar con el 8% de los aislamientos. Estudios en Suecia,¹⁸ Portugal⁶³ y República Checa⁸⁸ han reportado un incremento en la prevalencia de M89 sobre otros tipos M tanto en casos invasivos como en no invasivos.

La similitud en frecuencias de los tipos M1, M12, M6, M75 y M89 con otros países, indica que se pueden aislar con mayor frecuencia a nivel mundial independientemente de la zona geográfica. En nuestro estudio, las cepas de los tipos M3 y M28 estuvieron por debajo del 5% a diferencia de otros países en donde M3 y M28 se han detectado con frecuencias de hasta el 18%.^{16,18,19,21,89}

En la Figura 11 se representa cómo se distribuyen los 5 principales tipos M que representan el 60.8% de las cepas durante el período de estudio. Los años que no se registran en la gráfica es porque no hubo cepas de los tipos M prevalentes.

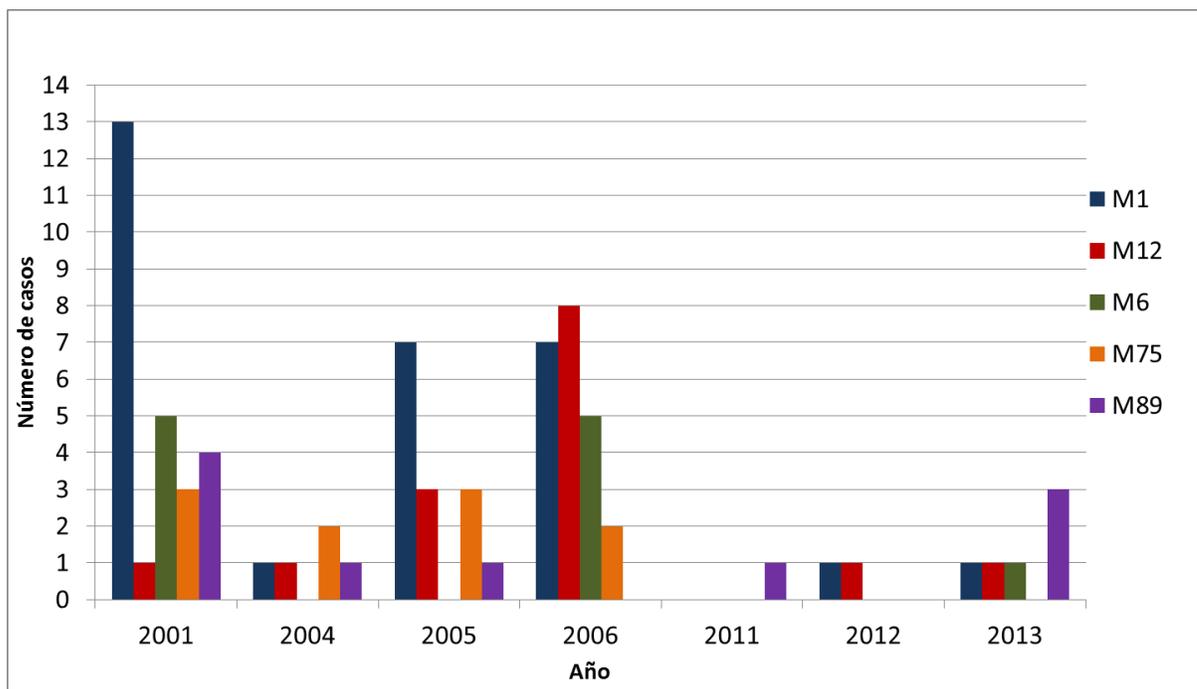


Figura 11. Número de casos de los tipos M predominantes en el período 2001–2013

El mayor número de aislamientos para M1 se presentaron en el 2001 y en el 2006 pero estuvo presente hasta el 2013 con un caso reportado. El tipo M12 ha estado presente durante los 12 años que comprende el estudio, se observa un aumento gradual en su frecuencia desde 2001 hasta 2006, año en que superó en casos

invasivos a M1. Los 11 aislamientos de M6 se recibieron en lapsos con más de 5 años de separación, sugiriendo algún tipo de brote de clonas invasivas pero que no logran prevalecer en la población similar a las fluctuaciones reportadas en la distribución de los tipos M entre dos períodos de tiempo posiblemente ligado a la pérdida y adquisición de genes de virulencia.^{63,90,91} El tipo M75 fue encontrado hasta el año 2006 y actualmente ya no se ha tenido reporte,⁹² probablemente por la misma explicación como en M6. La mayoría de los casos de M89 se presentaron en 2001 y hasta el 2013 se observa un aumento respecto a los demás tipos M como se mencionó anteriormente para otros estudios.

Con estos datos se observa que M1, M12 y M89 predominan en distintos países, esto puede deberse a similitudes en los factores genéticos de dichos tipos M, lo cual les permite diseminarse. La asociación de los factores de virulencia podría causar un aumento o disminución en el número de casos invasivos durante un período de tiempo determinado.^{63,91}

7.3 Susceptibilidad a antibióticos

De los resultados tomados de las pruebas de susceptibilidad a los 11 antibióticos de la Tabla 6 se obtuvo que 34 cepas invasivas de *S. pyogenes* (27.2%) presentaron resistencia a uno o más antibióticos, 88 cepas (70.4%) fueron susceptibles a todos y 2 casos que equivalen al 1.6% fueron considerados con susceptibilidad intermedia. Esta proporción se representa en la Figura 12, la cual muestra evidencia que el EGA continúa siendo susceptible a antibióticos en porcentaje considerable, mismo que da una alta probabilidad de combatir la infección siempre y cuando sea diagnosticada antes de que se presenten complicaciones severas.

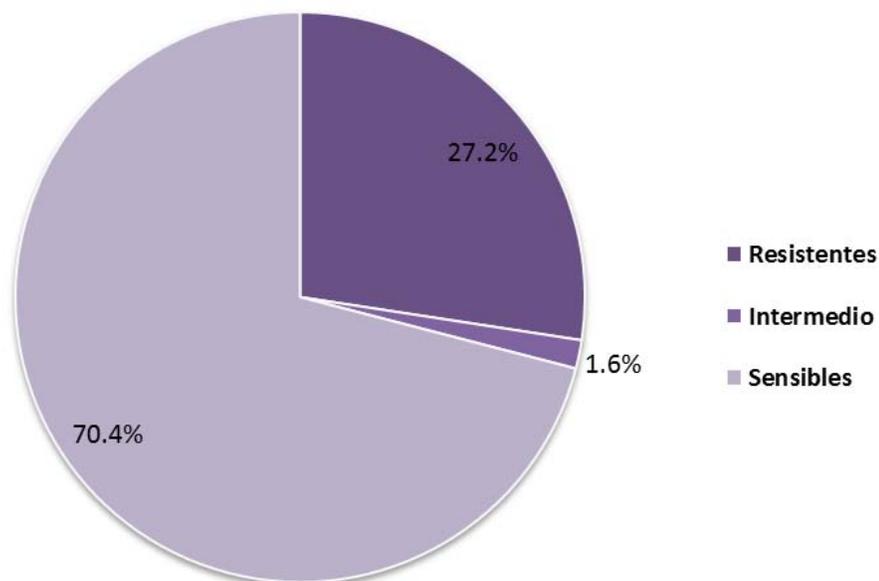


Figura 12. Porcentaje de resistencia en cepas invasivas de *S. pyogenes*

En la Tabla 22 se muestran los porcentajes de resistencia a antibióticos. Para Ceftibuteno, Ceftizoxima y Oxacilina se consideraron los valores arbitrarios propuestos por Kimura *et al.* para determinar cepas de baja susceptibilidad,⁸⁰ en nuestro estudio se utilizó el término resistente para homogeneizarlo con lo de los otros antibióticos. Dicho lo anterior, las cepas analizadas presentaron resistencia a 6 antibióticos, el mayor porcentaje se presentó para Ceftibuteno. La frecuencia de resistencia a Tetraciclina y Eritromicina fue menor de lo que reporta la literatura que va del 12 al 50%.^{11,24}

Tabla 22. Frecuencia de resistencia antimicrobiana en cepas de *S. pyogenes*

Antibiótico	n	% Resistencia
Ceftibuteno	15	12.1
Ceftizoxima	9	7.3
Tetraciclina	8	6.5
Eritromicina	7	5.6
Vancomicina	3	2.4
Oxacilina	1	0.8

La 34 cepas resistentes se distribuyen en 16 tipos M de EGA como se indica en la Tabla 23.

Tabla 23. Relación de resistencia antimicrobiana y los tipos M asociados de las cepas de *S. pyogenes*

Antibiótico	Tipo M (n)
Ceftibuteno	1(5), 2(1), 11(2), 65(1)
Ceftizoxima	1(1), 12(1), 77(1)
Tetraciclina	6(1), 28(1), 41-2(1), 49,1(1), 53(1), 59(1), stG485(1)
Eritromicina	28(1), 75(6)
Vancomicina	89(1)
Ceftibuteno+Ceftizoxima	1(3), 2(2)
Tetraciclina+Vancomicina	59(1)
Ceftibuteno+Ceftizoxima+Oxacilina+Vancomicina	1(1)

Una cepa del tipo M6 y la cepa S/T se consideraron con susceptibilidad intermedia a Levofloxacina. Dos cepas M1 presentaron susceptibilidad intermedia, una para Levofloxacina y la otra para Cloranfenicol pero se agruparon en las cepas resistentes.

El 33% de las cepas M1 fueron resistentes con 10 de los 34 casos, de los cuales 4 cepas fueron resistentes a más de un antimicrobiano. Este resultado también se presentó en la cepa M59 que fue resistente a 2 antibióticos, lo cual también concuerda con otros estudios que mencionan que esto no es tan frecuente.^{17,93}

El 60% de las cepas M75 presentaron resistencia a Eritromicina, estas cepas tienen el gen *mefA* que da la resistencia a macrólidos.²⁵ Esta relación coincide con otros análisis donde M4, M6, M12 y M75 presentan correlación con la resistencia a macrólidos.¹¹ 6 de los 7 casos de resistencia a Eritromicina son M75, la otra cepa pertenece al tipo M28 que presenta el gen *ermTR* y también le confiere resistencia a este antibiótico.²⁶ Por otro lado, las 8 cepas resistentes a Tetraciclina distribuidas entre 7 diferentes tipos M muestra que no hay una relación clara entre tipo M y resistencia, como también se ha encontrado en otros estudios para este antibiótico.^{17,93}

7.4 Genes de virulencia en *S. pyogenes*

La Tabla 24 enlista todos los genes de virulencia encontrados en las 125 cepas estudiadas y ordenadas de acuerdo a su frecuencia, en resumen se observa que los genes cromosómicos *speB*, *speG*, *speJ* y *smeZ* están en porcentajes elevados (>95%), siendo *speJ* el de menor prevalencia (72%). Para los genes asociados a fagos el porcentaje va del 10.4% al 56.8%. Los genes *sof*, *speC* y *prtF* presentaron una frecuencia similar (56%, 56.8% y 59.2%, respectivamente) y tienen relación con los tipos M, finalmente el gen *sic* únicamente estuvo presente en M1. Las frecuencias de los genes de virulencia para los 24 tipos M se presentan en el Anexo A.

Tabla 24. Genes de virulencia en orden de frecuencia

Genes	% Frecuencia
<i>speG</i>	100
<i>speB</i>	98.4
<i>smeZ</i>	95.2
<i>speJ</i>	72
<i>prtF</i>	59.2
<i>speC</i>	56.8
<i>sof</i>	56
<i>speM</i>	55.2
<i>speH</i>	52.8
<i>speI</i>	52.8
<i>speK</i>	26.4
<i>speA</i>	25.6
<i>sic</i>	24
<i>speL</i>	14.4
<i>ssa</i>	10.4

7.5 Análisis del gen *prtF*

La presencia del gen *prtF* en los aislamientos invasivos de *S. pyogenes* mostró amplificados de 150, 250, 350, 450 y 550 pb como se muestra en la Figura 13. La diferencia entre los tamaños de los productos de la PCR del gen *prtF* se debe a fragmentos repetidos de 111 pb en la región que codifica para el dominio RD2, el cual puede tener hasta 5 fragmentos de 111 pb cada uno y uno más de 96 pb.⁸²

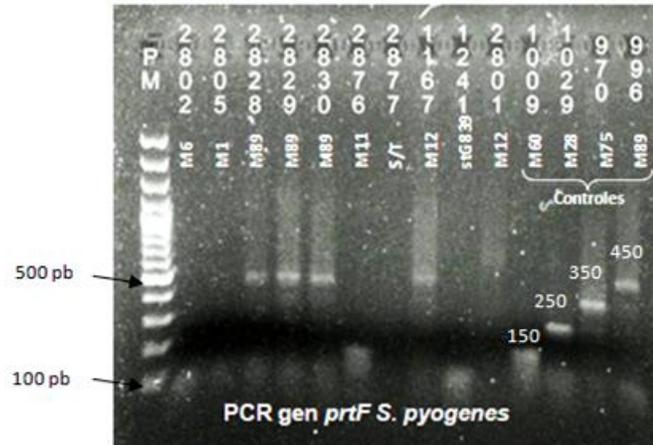


Figura 13. Fotografía de los productos de la PCR del gen *prtF* en gel de agarosa al 1.7%

En este estudio 16 de los 24 tipos M tuvieron el gen *prtF* correspondiendo al 59.2% de todos los casos invasivos. La presencia del gen *prtF* se encontró en todos los aislamientos de los tipos M de la Tabla 25, a excepción de los tipos M6 y M28 donde se encontró en 91% y 60%, respectivamente. Los aislamientos de los tipos M1, M2, M3, M43, M49-1, M53, stG839 y S/T no tuvieron *prtF*.

Esto indica que el gen *prtF* se encuentra distribuido preferentemente en determinados tipos M, demostrando que las cepas invasivas presentan diversidad genética que podría conferirle la capacidad de causar la amplia variedad de casos clínicos.

Tabla 25. Frecuencia del gen *prtF* entre los 16 tipos M donde fue identificado

Tipo M (n)	% <i>prtF</i> (n)	Tipo M (n)	% <i>prtF</i> (n)
12 (15)	100 (15)	11 (3)	100 (3)
6 (11)	91 (10)	60 (2)	100 (2)
75 (10)	100 (10)	65 (1)	100 (1)
89 (10)	100 (10)	77 (1)	100 (1)
22 (7)	100 (7)	78 (1)	100 (1)
59 (5)	100 (5)	87 (1)	100 (1)
28 (5)	60 (3)	41-2 (1)	100 (1)
4 (3)	100 (3)	stG485 (1)	100 (1)

Los tipos M que no tienen el gen *prtF* coinciden con un estudio anterior,⁸² sin embargo, en Japón se encontró que la mayoría los tipos M de *S. pyogenes*

poseen *prtF*.²⁴ Es posible que no todas las cepas del mismo tipo M presenten el gen debido a modificaciones en la región que codifica para el dominio RD2 en la porción que regula el gen *prtF*.⁹⁴ Cabe también destacar que 45 de las 51 cepas sin *prtF* (88%) tampoco tienen el gen *sof*, aunque no hay antecedentes de una dependencia entre estos genes. Los tipos M que no presentaron el gen *prtF* se ha visto que se unen a fibronectina por otro tipo de proteínas.^{34,38}

La relación entre el tamaño de los productos de PCR, el tipo M y el número de aislamientos (n) se observa en la Tabla 26. La mayoría de los tipos M presentaron un solo tamaño del gen *prtF*, en los tipos M4, M12, M22 y M59 existen por lo menos 2 tamaños diferentes. El número de repetidos en el dominio RD2 no se relaciona con un tipo M en particular pero resulta interesante que 8 tipos M sí fueron consistentes en el tamaño del producto de PCR.

Tabla 26. Tamaño del gen *prtF* y su relación con el tipo M en *S. pyogenes*

Tamaño <i>prtF</i> en pb (n)	Tipo M (n)
550 (4)	12 (4)
450 (23)	6 (5), 12 (10), 22 (2), 89 (6)
350 (11)	22 (3), 59 (2), 75 (6)
250 (5)	4 (1), 28 (3), 59 (1)
150 (6)	4 (1), 11 (1), 22 (1), 60 (1), 78 (1), 87 (1)

7.6 Análisis del gen *sof*

La presencia del gen *sof* que codifica para el factor de opacidad sérico se ha empleado tradicionalmente como un criterio de escrutinio en la caracterización del tipo M en cepas de *S. pyogenes*.^{11,40,41} En la Figura 14 se observa el resultado de la PCR dual para los genes *sic/sof*, el cual muestra el producto del gen *sof* con el tamaño aproximado de 700 pb. Este resultado fue considerado como un criterio para conocer el tipo M de la cepa, dado que se tienen identificados los tipos M que producen SOF. El 56% de las cepas analizadas portaron el gen *sof*, esta distribución se representa en la Figura 15. Las cepas de los tipos M1, M3, M41-2, M43, M53, stG839 y S/T no presentaron el gen *sof*.

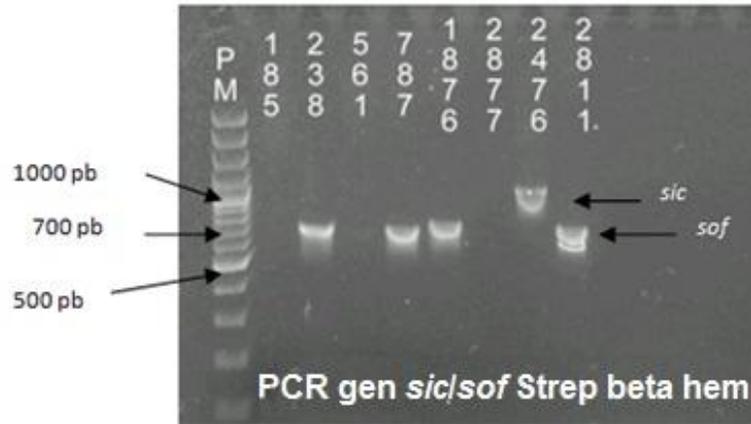


Figura 14. Fotografía de los productos de la PCR dual de los genes *sic/sof* en gel de agarosa al 1.7%

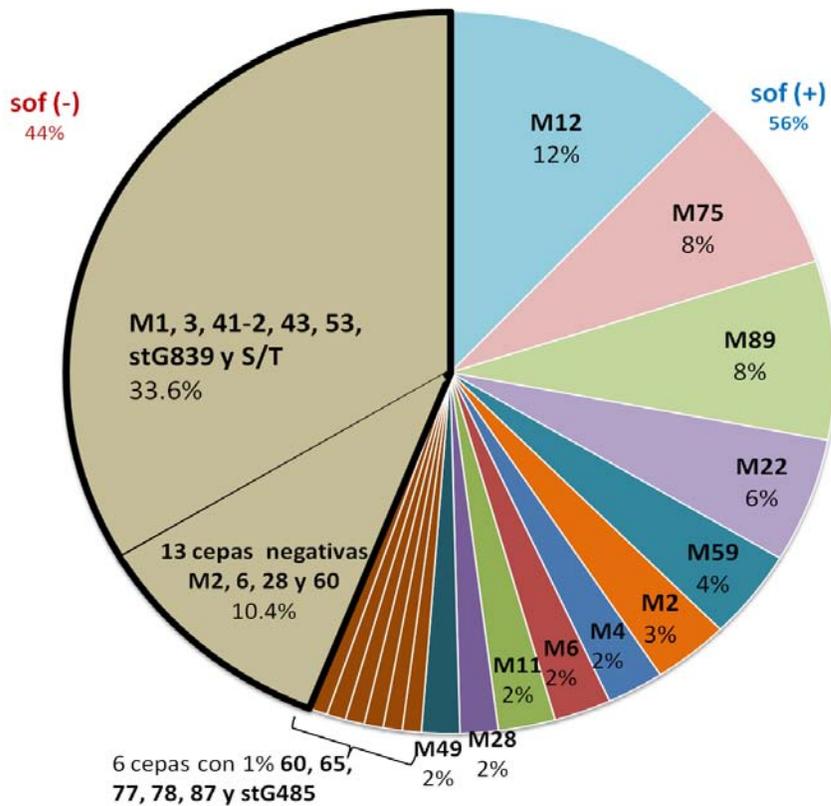


Figura 15. Resultados del gen *sof* en porcentaje por tipos M

El gen *sof* se identificó en 17 tipos M, de los cuales 13 se identificaron en todas las cepas y se enlistan en la Tabla 27. Se observa que el factor de opacidad sérico está ligado a determinados tipos M como se ha reportado en la literatura.^{40,41}

Tabla 27. Frecuencia del gen *sof* entre los 17 tipos M de *S. pyogenes*

Tipo M (n)	% <i>sof</i> (n)	Tipo M (n)	% <i>sof</i> (n)	Tipo M (n)	% <i>sof</i> (n)
12 (15)	100 (15)	4 (3)	100 (3)	stG485 (1)	100 (1)
75 (10)	100 (10)	49-1 (2)	100 (2)	2 (5)	80 (4)
89 (10)	100 (10)	65 (1)	100 (1)	28 (5)	60 (3)
22 (7)	100 (7)	77 (1)	100 (1)	60 (2)	50 (1)
59 (5)	100 (5)	78 (1)	100 (1)	6 (11)	18.2 (2)
11 (3)	100 (3)	87 (1)	100 (1)		

Al identificar el gen *sof* en una gran variedad de tipos M incluyendo algunos de los más prevalentes como M12, M75 y M89, muestra la importancia que tiene el SOF como factor de virulencia por su reconocido papel en la adherencia y colonización de otros tejidos.

7.7 Análisis del gen *sic*

El gen *sic* tiene un tamaño aproximado de 900 pb como se observa en la Figura 14. De las 125 cepas invasivas todas las cepas del tipo M1 lo tuvieron, tal como se menciona en la literatura, este es un gen que se ha encontrado sólo en cepas de los tipos M1 y M57.^{43,44} SIC tiene una amplia gama de mecanismos para evadir el sistema inmune innato, inhibe el MAC y proteínas antimicrobianas, su participación en la adherencia a tejidos epiteliales y colonización de mucosas, indica su importancia en casos invasivos además de que se ha descrito que *sic* es sobreexpresado al inicio de infecciones invasivas por M1.⁴² La combinación de SIC con otros factores de virulencia propios de *S. pyogenes* como la cápsula de ácido hialurónico y estreptolisina O le confieren una ventaja adicional al tipo M1 (sobre otros tipos M) para lograr diseminarse con éxito en el organismo.

Con lo discutido hasta ahora se ha observado que los tipos M presentan diversidad entre sí, destacando el tipo M1 donde la ausencia de los genes *prtF* y *sof* podría estar compensada con la presencia del gen *sic*. Además de los factores de virulencia mencionados anteriormente, los EGA poseen exotoxinas pirogénicas y el estudio de sus genes en conjunto con los ya analizados podrían explicar el comportamiento en la frecuencia de los tipos M y posiblemente alguna relación con los casos clínicos de donde provienen.

7.8 Análisis del gen *speB*

La proteína SpeB es un factor de virulencia importante de *S. pyogenes* y se discute aparte ya que como tal no es una exotoxina pirogénica, es una cisteína proteasa con capacidad de degradar diversas proteínas tanto en el hospedero como en la bacteria misma.

El gen *speB* se identificó con un tamaño en el producto de PCR de aproximadamente 1700 pb apreciable en la Figura 16. Este gen estuvo presente en el 98.4% de las 125 cepas invasivas, solo en dos aislamientos (uno del tipo M6 y otro del tipo stG839) no se detectó el gen. Se considera a este gen como constitutivo ya que se encuentra prácticamente en todas las cepas de *S. pyogenes*; en diversos estudios se ha identificado en más del 99% de los aislamientos,^{50,52} dato que resulta muy parecido a lo encontrado en este estudio.

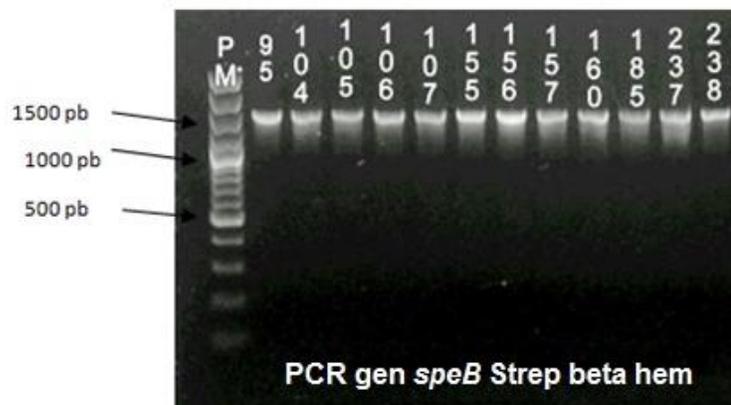


Figura 16. Fotografía de los productos de la PCR correspondiente al gen *speB* en gel de agarosa al 1.5%

Otras investigaciones han reportado cepas de los tipos M11 y M82 que carecen de *speB*.^{50,95} Así mismo, se han encontrado variantes alélicas para *speB* que se encuentran relacionados con cada tipo M.⁵⁰ La presencia de este gen en todos los aislamientos le da un potencial de invasividad considerando la acción de la proteína SpeB sobre el hospedero, sin embargo, existe controversia en la participación de SpeB en la severidad de la enfermedad causada por *S. pyogenes*, mientras que algunos autores encuentran una relación inversamente proporcional entre la severidad de la infección con la cantidad secretada de SpeB,⁵² otros autores han afirmado que la proteína es necesaria para la infección invasiva.^{37,51}

7.9 Análisis de los genes *speG*, *speJ* y *smeZ*

La búsqueda de los genes de los superantígenos *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa* y *smeZ* se realizó empleando una PCR individual, dual y múltiple según haya sido el caso. En las Figuras de la 17a a la 17d se muestran los productos de la PCR de cada gen identificado de acuerdo a su peso molecular. La distribución de los genes se representa en la Figura 18. Los genes cromosómicos *speG*, *speJ* y *smeZ* ocupan los tres primeros lugares, *speG* con 100%, *smeZ* con 95.2% y *speJ* con el 72% de los aislamientos. Para fines prácticos se describirán los resultados de estos 3 genes en primer lugar y posteriormente el resto de los genes de las exotoxinas pirogénicas.

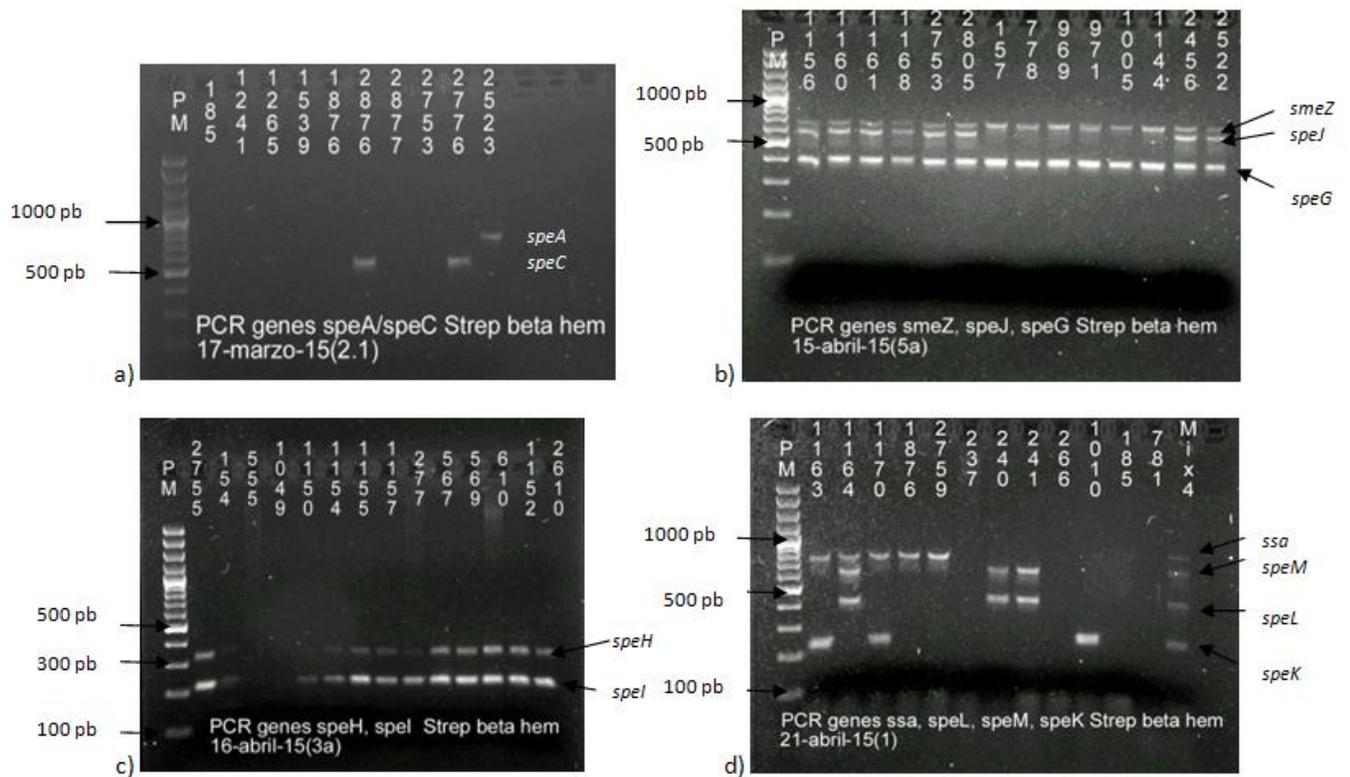


Figura 17. Fotografías de los productos de la PCR de los genes de exotoxinas en gel de agarosa al 1.7% a) Genes *speA* y *speC* en PCR dual. b) Genes cromosómicos *smeZ*, *speJ* y *speG* en PCR múltiple, se puede apreciar la ausencia de *speJ* en algunas cepas. c) Genes *speH* y *speI* en PCR dual con resultados positivo para ambos, excepto en las cepas 555 y 1049. d) Genes *ssa*, *speM*, *speL* y *speK* junto con Mix4 como control positivo en PCR múltiple.

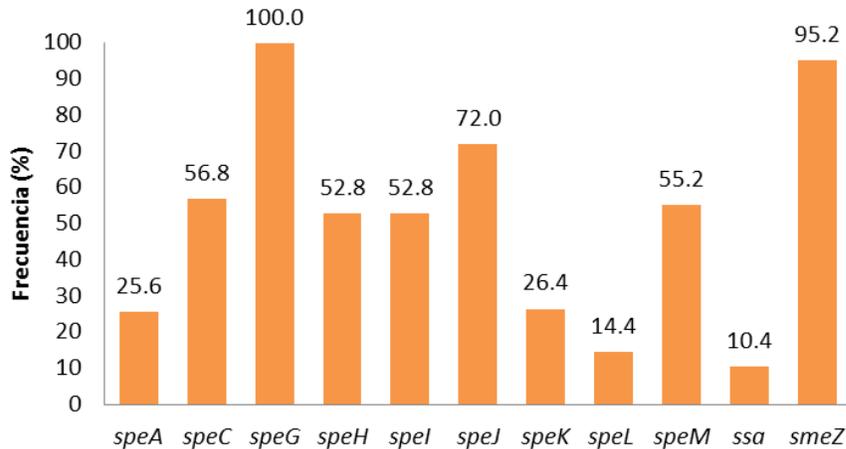


Figura 18. Frecuencia de los genes de superantígenos en cepas invasivas de *S. pyogenes*

Los resultados de este estudio para *speG* y *smeZ* (100% y 95.2%, respectivamente) son muy parecidos a los reportados por Proft *et al.*⁶⁵ en Nueva Zelanda donde fueron identificados en más del 95% de las cepas y los identificados en Portugal y China con más del 98% y 87% de las cepas, respectivamente.^{63,91} También se ha descrito que los tipos M4 y M77 carecen de *speG*.⁵⁵ Por lo tanto, es evidente que *smeZ* y *speG* estarán presentes en frecuencias elevadas sin importar la región geográfica del aislamiento.

Al ser un gen cromosómico, la presencia del gen *speJ* se ha identificado en todas las cepas en algunos estudios, aunque también hay trabajos que lo reportan en niveles bajos del 30 al 45%.^{90,96} En este estudio se encontró en una frecuencia intermedia con el 72% de los aislamientos positivos. Se especula que este gen es remanente de un fago presente en todos los linajes y su localización cercana a elementos móviles en algunas cepas ha favorecido su pérdida.^{49,63,97}

En la Tabla 28 se muestra la frecuencia de *speJ* con relación a los tipos M que tuvieron más del 50% de resultados positivos, se destaca que todas las cepas de los tipos M1, M28, M49 y M75 tuvieron *speJ*, sugiriendo que en algunos tipos M el gen muestra una elevada estabilidad que pueda incrementar la patogenicidad de estos tipos M. Además puede favorecerse la adquisición del fago, como se reportó

en un estudio con cepas de EGA donde el tipo M interfiere con la adquisición de bacteriófagos de virulencia.²⁹

Tabla 28. Relación de tipos M y su frecuencia del gen *speJ* en *S. pyogenes*

Tipo M (n)	% <i>speJ</i> (n)
1 (30)	100 (30)
28 (5)	100 (5)
49-1 (2)	100 (2)
75 (10)	100 (10)
6 (11)	81.8 (9)
12 (15)	86.7 (13)
11 (3)	66.7 (2)
59 (5)	60 (3)
60 (2)	50 (1)
89 (10)	50 (5)

Menos del 50% de las cepas de los tipos M2, M3 y M22 presentaron *speJ*, los tipos M41-2, M53, M78, M87 y stG485 con un aislamiento cada uno fueron positivos para *speJ*.

El gen *smeZ* se identificó en el 95.2% de los aislamientos, con excepción de las 5 cepas del tipo M2 y en la cepa del tipo stG839. Por otra parte, se ha reportado en Suecia y Portugal que cepas de los tipos M2, M81, M84 y st106M no poseen el gen *smeZ*.^{18,55,63} Al considerarse un gen constitutivo, es posible que el gen se haya escindido en clonas ancestrales de estos tipos M o que nunca haya estado presente. El bajo número de aislamientos de estos tipos M provocó que la frecuencia de *smeZ* sea elevada en la mayoría de los estudios realizados.

7.10 Análisis del gen *speA*

La proteína SpeA es una de las toxinas más estudiadas por su papel como superantígeno y su asociación con cepas responsables de fiebre escarlatina e infecciones severas por *S. pyogenes*.

Se detectó en el 25.6% de las cepas invasivas analizadas con frecuencias elevadas en los tipos M1 (73%) y M3 (100%) y bajas en los tipos M6 y M22 (18.2% y 14.3% de los casos, respectivamente) como se describe en la Tabla 29. Los cuatro tipos M que forman el 25.6% son los mismos que otros autores han encontrado por lo que la relación entre *speA* con el tipo M es muy constante.

El porcentaje del gen *speA* reportado en otros estudios varía del 24% al 88%. En los tipos M1, M3 y M6 la frecuencia de *speA* llega hasta el 100% de las cepas y siendo el tipo M1 el más relacionado a casos invasivos en algunos estudios.^{20,66,98}

Tabla 29. Relación del gen *speA* en aislamientos invasivos de *S. pyogenes*

Tipo M (n)	% <i>speA</i> (n)
3 (6)	100 (6)
1 (30)	73 (22)
6 (11)	18.2 (2)
22 (7)	14.3 (1)

Este gen se encuentra muy relacionado a los tipos M1 y M3, los más importantes en infecciones invasivas debido a que están ligados a STSS, y se piensa que la asociación *speA-speB* y *speA-smeZ* le confiere mayor capacidad invasiva.^{59,65,66,99}

El conjunto de genes *speA*, *speG*, *speJ* y *smeZ* observado en M1 parece estar involucrado en infecciones invasivas severas como STSS,^{63,100} tomando esto en cuenta se podría decir que el 73% de las cepas M1 y el 100% de las cepas M3 cumplen con la combinación de genes que le conferirían un potencial más agresivo. En este estudio 3 de 5 casos de fascitis necrosante incluyen una cepa del tipo M1 (819) y dos cepas de M3 (1019 y 1020), es probable que en estos tipos M existan aquellas variantes alélicas de *speA* o de *smeZ* que tienen mayor actividad mitogénica reportada, como lo es el alelo *speA3* relacionado con M3.⁶⁵

7.11 Análisis del gen *speC*

El gen *speC* se identificó en el 56.8% de los casos invasivos abarcando prácticamente todos los tipos M con excepción de M43, M78, M87, stG839 y S/T. Los tipos M89, M2, M11 y M60 presentaron *speC* en todos los aislamientos.

En la Tabla 30 solo ejemplifica los 12 tipos M con más del 50% de las cepas positivas para el gen *speC*.

Tabla 30. Relación de los tipos M con cepas invasivas positivas para el *speC*

Tipo M (n)	% <i>speC</i> (n)
89 (10)	100 (10)
2 (5)	100 (5)
11 (3)	100 (3)
60 (2)	100 (2)
75 (10)	90 (9)
6 (11)	81.8 (9)
59 (5)	80 (4)
12 (15)	66.7 (10)
4 (3)	66.7 (2)
28 (5)	60 (3)
3 (6)	50 (3)
49 (2)	50 (1)

La frecuencia de *speC* en los tipos M1 y M22 fue menor al 50%, los tipos M41-2, M53, M65, M77 y M87 con un aislamiento cada uno presentaron el gen *speC*.

En este estudio *speC* fue el gen no cromosómico con mayor frecuencia con el 56.8% de los aislamientos, al igual que en países como Dinamarca, China y Polonia donde *speC* ocupa el primer lugar en frecuencia respecto a otros genes provenientes de fagos con hasta el 88.9% de las cepas de EGA.^{91,93,101} La frecuencia de *speC* en los tipos M4, M6, M12 y M28 es similar a la de otros autores que lo han reportado del 60 al 82%. Sin embargo, las frecuencias obtenidas de *speC* para los tipos M1 y M89 contrastan con lo reportado en Suecia donde se encontraron con frecuencias de 73% y 43%, respectivamente, mientras que en este estudio el tipo M1 tuvo el 10% y M89 el 100%.^{90,98,101}

La diversidad de porcentajes entre diferentes tipos M demuestra los efectos de la transferencia horizontal que se puede presentar dentro de un tipo M o entre distintos tipos M, aumentando la virulencia de *S. pyogenes*.

En la Tabla 31 se comparan los resultados de los genes *prtF* y *speC*. Se muestra que existe una relación en el 77% de las cepas al tener ambos genes. En la literatura también se han observado aislamientos que poseen *speC* y genes de proteínas de unión a fibronectina.²⁴

Tabla 31. Porcentaje y número de cepas con gen *prtF* y gen *speC*

Relación <i>prtF</i> - <i>speC</i>	
	% <i>speC</i> (+)
% <i>prtF</i> (+)	77 (57/74)
	% <i>speC</i> (-)
59.2 (74/125)	23 (17/74)

Como se mencionó anteriormente, los genes *sof* y *prtF* parecen estar ligados en la mayoría de los tipos M y ahora se quiere evidenciar la relación entre *speC* y *prtF* con el tipo M. Para ello se muestra la Figura 19 en donde es posible apreciar una fuerte asociación de estos genes en 57 cepas distribuidas en 14 de los 16 tipos M que tuvieron *prtF*, incluidos los tipos M predominantes con excepción de M1. Esta correlación sobresale ya que es hasta ahora la única en reportarse entre proteínas de unión a fibronectina y exotoxinas pirogénicas, que de acuerdo a este estudio podría indicar la posibilidad de que esta asociación esté involucrada en la invasividad. Cabe mencionar que la relación de ambos genes no es específica para cepas con *prtF* ya que hay aislamientos con *speC* sin *prtF*.

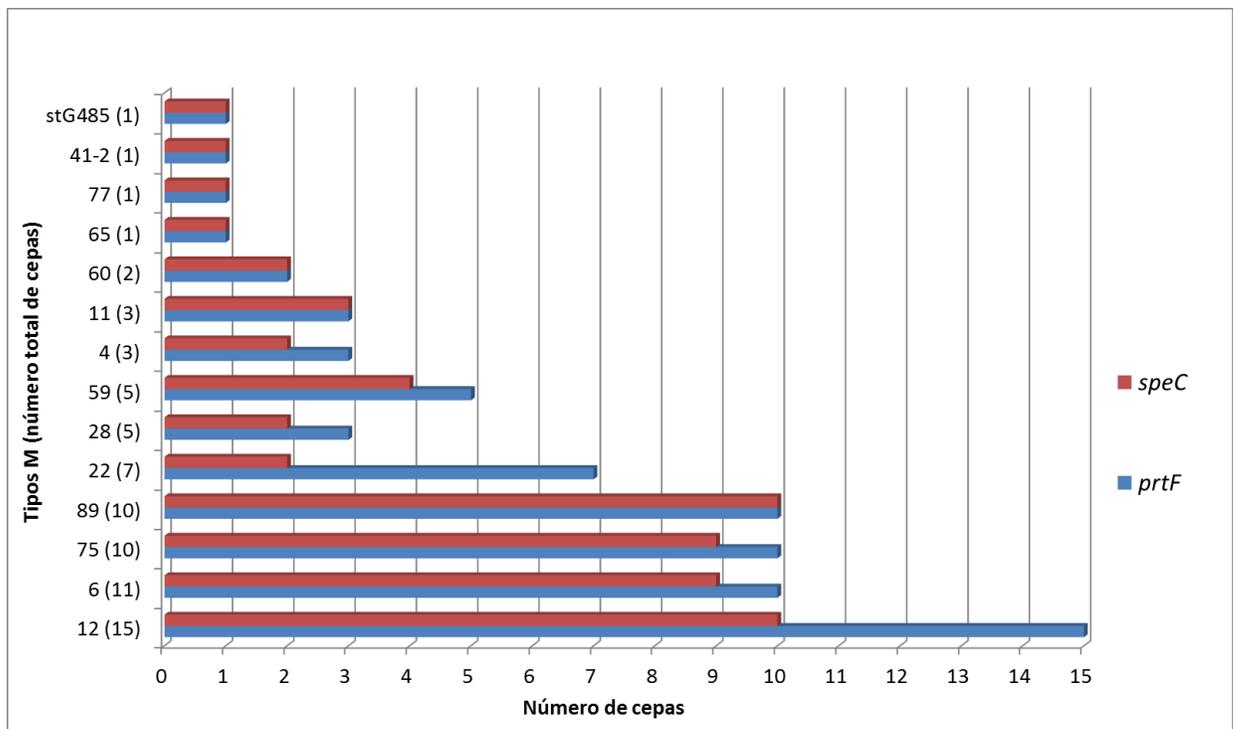


Figura 19. Relación de los genes *speC* y *prtF* con el tipo M

La elevada frecuencia de *speC* se debe a su amplia distribución en *S. pyogenes*, considerándose un factor de virulencia que en algunos estudios está asociado al incremento en la patogenicidad de M28.⁶³

Aunque no se ha encontrado evidencia de que SpeC esté asociado con alguna enfermedad invasiva específica, su ha ido aumentando como en algunos casos de sepsis SpeC podría estar involucrado.⁶⁶ Por otro lado, se ha descrito que en los casos de STSS hay un predominio de perfiles con *speB* + *speC* y *speA* + *speB*.⁹³

Entre las cepas estudiadas, el segundo perfil coincide con las cepas 1019 y 1020 correspondientes a M3 y que fueron obtenidas de fascitis necrosante. El perfil *speB* + *speC* está presente en un caso de sepsis neonatal por M12 (cepa 2755), en una cepa M59 (1265) aislada en un caso de fascitis necrosante, en un caso de celulitis necrosante por M89 (2828) y en uno de STSS también por M89 (2829). Las combinaciones de *speB-speC* y *speA-speB* están presentes en los casos más graves de infección invasivas y pueden ser importantes en el desarrollo de la enfermedad, pero se deben tomar en cuenta el papel que pueden tener los demás genes de virulencia para un mayor análisis y una relación más detallada.

7.12 Análisis de los genes *speH* y *speI*

Los genes *speH* y *speI* están dentro del mismo bacteriófago denominado 370.2 y han sido detectados juntos en algunos estudios,^{47,73,72} sin embargo, hay estudios donde muestran que relación se está perdiendo ya que las frecuencias de *speH* son diferentes a *speI*.^{73,91} En este estudio se encontró la misma frecuencia para ambos genes (52.8%), indicando que tienen alta prevalencia en cepas invasivas ya que 18 de los 24 tipos M tuvieron resultados positivos para *speH* y 17 para *speI*. En la Tabla 32 se muestran únicamente los 9 tipos M con más del 40% de cepas positivas para estos genes. La frecuencia coincide para *speH* y *speI* teniendo dos excepciones, la primera se debe a las 3 cepas del tipo M11 que solo presentaron *speH* y la segunda en el tipo M22 con 3 cepas que solo tuvieron *speI*.

Tabla 32. Relación de los genes *speH* y *speI* en cepas de *S. pyogenes*

Tipo M (n)	% <i>speH/speI</i> (n)	% <i>speH</i> o <i>speI</i> (n)
12 (15)	100 (15)	
75 (10)	100 (10)	
11 (3)	0	100 (3 solo <i>speH</i>)
59 (5)	80 (4)	
2 (5)	60 (3)	
6 (11)	54 (6)	
3 (6)	50 (3)	
22 (7)	14.3 (1)	42.9 (3 solo <i>speI</i>)
89 (10)	40 (4)	

Los aislamientos de los tipos M1 y M28 presentaron *speH/speI* en menos del 40%. Los tipos M41-2, M43, M49-1, M53, M60, M65 y M87 con menos de dos cepas.

Todas las cepas M12 presentaron los genes *speH* y *speI*, concordando con lo mencionado en la literatura donde estos genes se identifican predominantemente en M12.^{66,101} En este estudio también se encontró en M75 en los mismos niveles. En países como Nueva Zelanda, Suecia y China se han reportado frecuencias del 14 al 34% para *speH* y del 5 al 29% para *speI*.^{73,100,101} Esta información ejemplifica la diversidad que se presenta en la frecuencia de estos genes, *speH* es más prevalente que *speI* y no siempre son encontrados juntos a pesar de tener un origen común. Aunque no se tiene una relación para *speH* y *speI* con algún padecimiento específico, el hecho de que se empiecen a presentar como genes individuales refleja otro aspecto en la diversidad genética de EGA que puede participar en el aumento de la capacidad invasiva.

7.13 Análisis del gen *speK*

El gen *speK* se identificó en el 26.4% de las cepas invasivas y en la Tabla 33 se enlistan los tipos M con más de dos cepas positivas para *speK*. En los tipos M3 y M43 todas las cepas fueron positivas, seguido de M6 con el 91%, M89 con 40% y M22 con 29%.

En este estudio la frecuencia del gen *speK* parece ser relativamente baja a comparación de otros estudios, como en Suecia que tiene un 26% y en China donde se ha encontrado solo un 3.2%.^{97,100} Esto se debe a la baja frecuencia de los tipos M asociados con *speK*.

Tabla 33. Frecuencia del gen *speK* en cepas de *S. pyogenes*

Tipo M (n)	% <i>speK</i> (n)
3 (6)	100 (6)
43 (2)	100 (2)
6 (11)	91 (10)
89 (10)	40 (4)
22 (7)	29 (2)

Para M2, M12, M49, M53, M59, M60, M75, M78 y S/T solo una cepa fue positiva para *speK*.

La elevada frecuencia de *speK* en los tipos M3 y M6 también se ha encontrado en otros análisis y se podría pensar que hay tipos M con mayor tendencia a adquirir este gen.⁴⁹ Cabe mencionar que el tipo M3 ya se ha asociado con el genotipo *speA3* y *speK*, lo cual podría confirmar un aumento de virulencia en M3 debido a la adquisición horizontal de genes asociados con fagos.⁷⁵

7.14 Análisis de los genes *speL* y *speM*

Los genes *speL* y *speM* son genes de exotoxinas que se encuentran a menudo relacionados y con una frecuencia similar en aislamientos de *S. pyogenes*, en especial en cepas del tipo M18 donde fueron identificados por primera vez en el bacteriófago 8232.3.⁷⁶ En el 55.2% de los casos se identificó *speM*, siendo el segundo gen relacionado con bacteriófagos más frecuente después de *speC*. De acuerdo a la Tabla 34 el tipo M75 tiene el gen *speM* en todos sus aislamientos, seguido de M1, M12 y M89 con más del 80%, M2 y M22 con el 40 y 42.9%, respectivamente y en M59 se identificó *speM* en el 20% de los aislamientos.

Dado que los genes *speL* y *speM* se han encontrado adyacentes en el mismo bacteriófago, se esperaban resultados similares, no obstante, la presencia de ambos genes se encontró en los tipos M2, M22, M59 y M75, pero no se encontró el gen *speL* en los tipos M1, M12, M89 y en stG839, donde solo se identificó a *speM*. La frecuencia de *speL* fue de 14.4%, la cual es significativamente más baja respecto a la de *speM* debido a que M1, M12 y M89 tienen frecuencias elevadas en el estudio.

Tabla 34. Frecuencia de los genes *speL* y *speM*

Tipo M (n)	% <i>speM</i> (n)	% <i>speL</i> (n)
75 (10)	100 (10)	100 (10)
1 (30)	96.7 (29)	0
12 (15)	86.7 (13)	0
89 (10)	80 (8)	0
22 (7)	42.9 (3)	42.9 (3)
2 (5)	40 (2)	40 (2)
59 (5)	20 (1)	20 (1)

Las cepas M41-2, M65 y stG839 solo cuentan con un aislamiento con *speM*.

Se puede decir que se encontraron dos genotipos: uno con los genes *speL* y *speM* y otro solo con *speM*, además la frecuencia de *speM* siempre será mayor a la de *speL*. En otros estudios se ha descrito que *speL* está entre el 1.6 y 11% de las cepas y que *speM* ha alcanzado el 24%.^{97,100}

En los tipos M1, M12 y M89 de este estudio se tuvo elevada presencia de *speM*, dato que no se ha encontrado en otros estudios para estos tipos M.^{19,83} Cabe resaltar que ninguna cepa de M3 presentó *speL* a pesar de que el fago que codifica para *speL* también se encontró un estudio genómico del tipo M3.^{70,75} La importancia de *speL* y *speM* se ha resaltado en casos de fiebre reumática causadas por M3 y M18.⁸³

7.15 Análisis del gen *ssa*

El gen *ssa* ocupó el último lugar de los genes de virulencia analizados, identificándose en solo 13 cepas que equivalen al 10.4%. Todas las cepas del tipo M4, M22, M41-2, M78 y M87 presentaron este gen. Se aprecia una relación evidente de los tipos M4 y M22 con el gen *ssa*, la frecuencia del gen *ssa* se refleja por la baja prevalencia en la que se encuentran los tipos M que los contiene, por lo que puede considerarse un factor de virulencia exclusivo en estos tipos M.

En otros análisis *ssa* se ha encontrado en M1, M2, M28 y preferentemente en M3 y M4 con el 100% y 83% de los casos, respectivamente.^{66,90,98} Su prevalencia es muy variable y se ha observado que está presentándose en tipos M que antes no lo tenían, como el caso de aislamientos recientes de tipos M1 y M12, además de una tendencia a presentarse en casos invasivos más que en los no invasivos.⁴⁹ Este gen junto con *speA*, *speJ*, *smeZ* y otros factores de virulencia podría brindar una ventaja debido a su potencial mitogénico en los tipos M1 y M3 que son los más prevalentes en casos invasivos a nivel mundial.

En la Tabla 35 se muestran los resultados de los diferentes tipos M que se asociaron con algún gen de exotoxinas analizados, se observa que los genes *speA*, *speL*, *speM* y *ssa* están presentes en un número reducido de tipos M identificados en este estudio. Estos genes podrían dar diferente capacidad invasiva a los tipos M que lo presentan.

Los genes *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *smeZ* están presentes en tipos M con un mayor número de cepas (más de 10), convirtiéndose en genes con mayor relevancia en este estudio. Al estar mayormente distribuidos en las cepas analizadas de *S. pyogenes*, se podría pensar en un efecto sinérgico que aumentaría la virulencia de estos tipos M.

Tabla 35. Relación de los genes de exotoxinas presentes en todos los aislamientos de los diferentes tipos M.

Gen	Tipos M	Número de cepas
<i>speA</i>	3	6
<i>speC</i>	2, 11, 28, 60	15
<i>speG</i>	Todos	125
<i>speH</i>	11, 12, 49, 60, 75	32
<i>speI</i>	12, 49, 60, 75	29
<i>speJ</i>	1, 28, 49, 75	47
<i>speK</i>	3, 6, 43	19
<i>speL</i>	75	10
<i>speM</i>	75	10
<i>ssa</i>	4, 22	10
<i>smeZ</i>	Todos excepto M2	120

7.16 Análisis de los perfiles de genes de virulencia

Una vez descritos los genes identificados en forma individual y mencionadas algunas relaciones con algunos tipos M, se realizó un análisis de los genes de virulencia entre los tipos M más prevalentes, analizar su origen clínico y su relación con enfermedades invasivas.

Se obtuvieron 70 perfiles de factores de virulencia para las 125 cepas invasivas. En la Tabla 29 se muestran los perfiles correspondientes a los 5 tipos M más prevalentes en este estudio: M1, M12, M6, M75 y M89. En este grupo de tipos M correspondiente al 60.8% de los aislamientos invasivos de EGA se encontraron 30 de los 70 perfiles observados.

La gran cantidad de perfiles refleja una muestra de la diversidad genética que presentan las cepas *S. pyogenes* en sus genes de virulencia. La existencia de más de un perfil para un mismo tipo M muestra que la transferencia horizontal de elementos móviles y modificaciones dentro del DNA se da en cepas del mismo tipo M, además los perfiles no se comparten entre los tipos M1, M12, M6, M75 y M89.

Tabla 36. Perfiles de genes de virulencia de los 5 tipos M de mayor prevalencia

Tipo M (Número de cepas/Total de cepas)	Perfil	<i>sic</i>	<i>sof</i>	<i>prtF</i>	<i>speA</i>	<i>speB</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>	Total de genes de virulencia
1 (16/30)	1	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	7
1 (5/30)	2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	6
1 (3/30)	3	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	9
1 (2/30)	4	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	8
1 (2/30)	5	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	8
1 (1/30)	6	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	9
1 (1/30)	7	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	6
12 (7/15)	8	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	10
12 (3/15)	9	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	9
12 (1/15)	10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	12
12 (1/15)	11	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	9
12 (1/15)	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	9
12 (1/15)	13	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	8
12 (1/15)	14	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	8
6 (4/11)	15	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	9
6 (2/11)	16	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	10
6 (1/11)	17	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	7
6 (1/11)	18	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	6
6 (1/11)	19	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	6
6 (1/11)	20	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	4
6 (1/11)	21	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	7
75 (8/10)	22	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	11
75 (1/10)	23	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	12
75 (1/10)	24	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	10
89 (3/10)	25	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	8
89 (3/10)	26	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	7
89 (1/10)	27	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	11
89 (1/10)	28	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	10
89 (1/10)	29	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	10
89 (1/10)	30	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	9

Para el tipo M1 se obtuvieron 7 perfiles diferentes, el más frecuente fue el perfil número 1 con 16 cepas que representa el 53% de los casos invasivos por M1. El número total de genes de virulencia para este perfil fue de 7 y la combinación de los genes *speA*, *speB*, *speG*, *speJ*, *speM*, *smeZ* y *sic* es la más representativa para este tipo M.

En la literatura, el perfil *speA2*, *speG*, *speJ*, *smeZ* y *speB* se ha reportado en casos severos de invasividad por cepas del tipo M1,¹⁰² en la mayoría de los estudios coinciden en que *speA* es el único gen asociado a fagos presente en M1 y que junto a *speG*, *speJ* y *smeZ-1* conforma el perfil que representa aproximadamente el 90% de las cepas.^{19,55,66,100,103} Este dato sugiere que la virulencia de M1 puede estar relacionada con la combinación de estos 7 genes y que no es necesario un número elevado de genes de virulencia para la capacidad invasiva que lo ha colocado en los primeros lugares de prevalencia a nivel mundial. Las diferencias entre los perfiles de M1 se observaron en 5 genes (*speA*, *speC*, *speH*, *speI* y *speM*).

El tipo M12 está representado por 7 perfiles, donde el perfil 8 mostrado en la Tabla 29 es el representativo de este tipo M con el 47% de los aislamientos y tiene un total de 10 genes que incluyen *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speM*, *smeZ*, *speB*, *sof* y *prtF*. En la literatura se ha reportado que *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ* y *smeZ-3* conforman el perfil encontrado en la mayoría de las cepas M12.^{19,55,91,100}

M12 es el segundo tipo M más prevalente en este estudio y a diferencia de M1 posee una mayor cantidad de genes de virulencia. En este caso, la combinación de determinados genes podría ser el principal factor para su elevada frecuencia, dado que las cepas del tipo M12 no poseen *speA* pero sí contienen los genes de proteína de unión a fibronectina (*sof* y *prtF*). Las diferencias entre los perfiles de M12 se observaron en 5 genes (*speA*, *speC*, *speJ*, *speK* y *speM*).

Hay 7 perfiles que representan a M6, el perfil 15 contiene 9 genes que son *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *smeZ*, *speB* y *prtF* y predomina con el 36% de las cepas. El perfil 16 le sigue en frecuencia con 18% y es idéntico al perfil 15 con la diferencia de que también incluye el gen *speA*. Se ha reportado que *smeZ-1* y *speA* están presentes en M6 causantes de STSS, demostrando la relación de estos genes en casos invasivos severos.^{66,100} Los genes *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speK* y el alelo *smeZ-1* conforman el perfil de M6 más frecuente según lo reportado en artículos y es una combinación similar al perfil de M1.^{55,103} Las diferencias entre los perfiles de M6 se observaron en 9 genes (*sof*, *prtF*, *speA*, *speB*, *speC*, *speH*, *speI*, *speJ* y *speK*).

En el caso de M75 se observa una alta homogeneidad entre las cepas con solo 3 perfiles diferentes. El perfil 22 fue más frecuente con el 80% de los aislamientos y contiene 11 genes: *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *smeZ*, *speB*, *sof* y *prtF*. Este perfil de virulencia es el más frecuente en cepas invasivas para solo un tipo M, una cepa tiene adicionalmente *speK* y en otra cepa le falta *speC*, (perfiles 23 y 24). Este tipo M es el que tuvo más genes dentro de sus perfiles, los genes *speG*, *speL*, *speM* y *smeZ* coinciden con la literatura en la mayoría de los casos.^{19,55} Esta combinación de genes no tiene correlación con algún

padecimiento específico, no obstante en otros análisis se relaciona en casos de sepsis y en este estudio el perfil 22 está relacionado con un caso de glomerulonefritis aguda y otra de celulitis.¹⁰⁰ Cabe recordar que el tipo M75 ocupa el 8% de las cepas de este estudio pero en otros estudios ya no figura dentro de los tipos M más frecuentes debido a que actualmente ya no se han encontrado casos de M75,⁹² lo cual remarca la premisa de que una mayor prevalencia no está relacionada con un número elevado de genes. La diferencia entre los perfiles de M75 se observaron en 2 genes (*speC* y *speK*).

En el tipo M89 se encontraron 6 diferentes perfiles, dos de ellos lo tuvieron el 30% de las cepas. Los genes presentados con mayor frecuencia fueron *speC*, *speG*, *speJ*, *speM*, *smeZ*, *speB*, *prtF* y *sof*. Esta información coincide con los perfiles de M89 de la literatura, los cuales contienen *speC*, *speG* y *smeZ-13* que están relacionados con casos de sepsis.^{64,100} El hecho de que M89 contenga una baja cantidad de genes en los perfiles 25 y 26, respecto a los perfiles 27 a 30, sugiere una vez más que la combinación de genes en particular puede elevar la invasividad y la prevalencia del tipo M, tomando en cuenta que M89 se ha reportado con mayor frecuencia actualmente. La diferencia entre los perfiles de M89 se observaron en 5 genes (*speH*, *speI*, *speJ*, *speK* y *speM*).

Los perfiles de virulencia restantes presentados en el Anexo B también muestran diversidad para cada tipo M. En M2 todas las cepas tuvieron diferentes perfiles, los genes *speC*, *speG*, *speH* y *speI* fueron los más frecuentes y todas carecieron de *smeZ*. En el caso del tipo M3, 2 de las 6 cepas comparten el mismo perfil con los genes *speA*, *speG*, *speK*, *smeZ* y *speB*, esta es una combinación de genes encontrada particularmente en el tipo M3, lo que podría llevarlo a predominar en casos de STSS como M1.^{55,91,95,100} La diferencia que destaca entre los tipos M22 y M28 es que *ssa* está presente únicamente en las cepas de M22.

Se hallaron perfiles compartidos en 2 de 3 cepas M4, en 2 de 3 del tipo M11 y 2 de 5 cepas del tipo M59. El perfil 12 que corresponde a M12 (cepa 1148) es el único perteneciente a tipos M prevalentes que se comparte con una cepa M28 (781) y con dos cepas M59 (238 y 1265).

Los resultados de cada cepa mostraron diferencias entre los perfiles cuando se consideraron los genes que codifican para superantígenos. En este estudio con cepas invasivas la diferenciación entre tipos M se vuelve aún más evidente con la adición de los genes *sic*, *sof* y *prtF* como parte del análisis.

Se encontró una estrecha relación entre el tipo M y el perfil de genes de virulencia en todos los aislamientos, en algunos casos se asociaron con los casos clínicos, sin embargo, no se encontró una relación entre los perfiles de genes de virulencia, tipos M y origen clínico en este estudio. El tipo M89 destaca en este aspecto ya que de las 10 cepas, 3 están presentes en hemocultivo y 4 en secreción.

Finalmente se puede decir que este es el primer estudio epidemiológico realizado en México donde se analizan aislamientos invasivos de EGA y sus factores de virulencia que determinan los patrones representativos en los principales tipos M. En los aislamientos de los tipos M más frecuentes se reconoció que la prevalencia y capacidad de invasión podrían depender del perfil de genes. No hay que dejar de lado que existe variación genética dentro de un mismo tipo M debido a la transferencia horizontal de genes, la presencia de elementos móviles, la selección de clones en el hospedero y otros factores que les permite aumentar su virulencia y mantenerla durante largos períodos de tiempo.

8. Conclusiones

Las muestras de hemocultivo y de secreciones son las principales fuentes de obtención de *S. pyogenes* invasivos en el estudio.

El tipo M1 representa el principal tipo M de *S. pyogenes* encontrado en cepas invasivas, seguido de los tipos M12, M6, M75 y M89.

Todas las cepas son sensibles a Penicilina, sin embargo, el 27.2% mostró resistencia a algún otro antibiótico, aunado a esto, las cepas resistentes a Eritromicina se asociaron con el tipo M75.

Los genes de virulencia *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK* y *smeZ* se identificaron en la mayoría de las cepas independientemente del tipo M, mientras que los genes *sic*, *sof*, *prtF*, *speA*, *speL*, *speM* y *ssa* se encontraron asociados a determinados tipos M.

Se encontraron diferentes perfiles de genes entre cepas de un mismo tipo M, demostrando la diversidad genética de las cepas.

La virulencia de las cepas es multifactorial al comprender genes de adhesión, colonización e invasión al hospedero.

9. Referencias

1. Hardie, J. M.; Whiley, R. A. Classification and Overview of the Genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Appl. Microbiol.* **1997**, 83 (S1), 1S–11S.
2. Caparon, M. Pathogenic Mechanisms in Streptococcal Diseases. In *Principles of Bacterial Pathogenesis*; Academic Press, 2001; pp 717–749.
3. Koneman, E.; et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas En Color*, 6th ed.; Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, 2008; pp 613, 676, 682.
4. Kilian, M. *Streptococcus* and *Enterococcus*. In *Diseases of poultry*; Thayer, S. G., Waltman, W. D., Wages, D. P., Eds.; 2008; pp 900–908.
5. Breed, R. S.; Murray, E. G.; Smith, N. R. Genus II *Streptococcus*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*; Baltimore, Williams & Williams Co., 1957; pp 508–512.
6. Denny F. W. History of Haemolytic Streptococci and Associated Diseases. In *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*; Stevens, D., Kaplan, E., Eds.; Oxford University Press: Oxford, 2000; pp 1–2.
7. Cunningham, M. W. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, 13 (3), 470–511.
8. Lancefield, R. C. A Serological Differentiation Of Human And Other Groups Of Hemolytic Streptococci. (*From Hosp. Rockefeller Inst. Med. Res.*) **1932**, No. 1, 571–595.
9. Walker, M. J.; et al. Disease Manifestations and Pathogenic Mechanisms of Group A *Streptococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, 27 (2), 264–301.
10. Tart, A. H.; Walker, M. J.; Musser, J. M. New Understanding of the Group A *Streptococcus* Pathogenesis Cycle. *Trends Microbiol.* **2007**, 15 (7), 318–325.
11. Metzgar, D.; Zampolli, A. The M Protein of Group A *Streptococcus* is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. *Virulence* **2011**, 2 (5), 402–412.

12. Bisno, A. L.; Brito, M. O.; Collins, C. M. Molecular Basis of Group A Streptococcal Virulence. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, 3 (4), 191–200.
13. Facklam, R. F.; et al. Extension of the Lancefield Classification for Group A Streptococci by Addition of 22 New M Protein Gene Sequence Types from Clinical Isolates: *emm103* to *emm124*. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, 34 (1), 28–38.
14. Kreikemeyer, B.; McIver, K. S.; Podbielski, A. Virulence Factor Regulation and Regulatory Networks in *Streptococcus pyogenes* and Their Impact on Pathogen-Host Interactions. *Trends Microbiol.* **2003**, 11 (5), 224–232.
15. Carapetis, J. R.; Steer, a C.; Mulholland, E. K.; Weber, M. The Global Burden of Group A *Streptococcus* Disease. *Lancet Infect. Dis.* **2005**, 5 (11), 685–694.
16. Imöhl, M.; Reinert, R. R.; Ocklenburg, C.; Van Der Linden, M. Epidemiology of Invasive *Streptococcus pyogenes* Disease in Germany during 2003-2007. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2010**, 58 (3), 389–396.
17. Stathi, A.; et al. Prevalence of *emm* Types 1 and 12 from Invasive *Streptococcus pyogenes* Disease in Greece-Results of Enhanced Surveillance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, 14 (8), 808–812.
18. Darenberg, J.; et al. Molecular and Clinical Characteristics of Invasive Group A Streptococcal Infection in Sweden. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, 45 (4), 450–458.
19. Rogers, S.; et al. Strain Prevalence, rather than Innate Virulence Potential, Is the Major Factor Responsible for an Increase in Serious Group A *Streptococcus* Infections. *J. Infect. Dis.* **2007**, 195 (11), 1625–1633.
20. Hraoui, M.; et al. Epidemiological Markers of *Streptococcus pyogenes* Strains in Tunisia. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, 17 (1), 63–68.
21. Traverso, F.; et al. Invasive Infections due to Group A Streptococci in Argentina (2011 – 2012). *Book of Abstracts*, XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases; Buenos Aires, Argentina, 2014.

22. De Almeida Torres, R. S. L.; Fedalto, L. E.; de Almeida Torres, R. F.; Steer, A. C.; Smeesters, P. R. Group A *Streptococcus* Meningitis in Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2012**, *32* (2), 1.
23. LaPenta, D.; Rubens, C.; Chi, E.; Cleary, P. P. Group A Streptococci Efficiently Invade Human Respiratory Epithelial Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (25), 12115–12119.
24. Hotomi, M.; et al. Distribution of Fibronectin-Binding Protein Genes (*prtF1* and *prtF2*) and Streptococcal Pyrogenic Exotoxin Genes (*spe*) among *Streptococcus pyogenes* in Japan. *J. Infect. Chemother.* **2009**, *15* (6), 367–373.
25. Ardanuy, C.; et al. Distribution of Subclasses *mefA* and *mefE* of the *mefA* Gene among Clinical Isolates of Macrolide-Resistant (M-Phenotype) *Streptococcus pneumoniae*, Viridans Group Streptococci, and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (2), 827–829.
26. Seppälä, H.; Skurnik, M.; Soini, H.; Roberts, M. C.; Huovinen, P. A Novel Erythromycin Resistance Methylase Gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42* (2), 257–262.
27. Smeesters, P. R.; McMillan, D. J.; Sriprakash, K. S. The Streptococcal M Protein: A Highly Versatile Molecule. *Trends Microbiol.* **2010**, *18* (6), 275–282.
28. Lannergrd, J.; et al. The Hypervariable Region of *Streptococcus pyogenes* M Protein Escapes Antibody Attack by Antigenic Variation and Weak Immunogenicity. *Cell Host Microbe* **2011**, *10* (2), 147–157.
29. Cleary, P. P.; Johnson, Z. Possible Dual Function of M Protein: Resistance to Bacteriophage A25 and Resistance to Phagocytosis by Human Leukocytes. *Infect. Immun.* **1977**, *16* (1), 280–292.
30. Fischetti, V. A. Streptococcal M Protein: Molecular Design and Biological Behavior. *Clin. Microbiol. Rev.* **1989**, *2* (3), 285–314.
31. McMillan, D. J.; et al. Updated Model of Group A *Streptococcus* M Proteins Based on a Comprehensive Worldwide Study. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, *19* (5), E222–E229.

32. Oehmcke, S.; Shannon, O.; Mörgelin, M.; Herwald, H. Streptococcal M Proteins and Their Role as Virulence Determinants. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411* (17-18), 1172–1180.
33. Schwarz-Linek, U.; Höök, M.; Potts, J. R. Fibronectin-Binding Proteins of Gram-Positive Cocci. *Microbes Infect.* **2006**, *8* (8), 2291–2298.
34. Gorton, D.; Norton, R.; Layton, R.; Smith, H.; Ketheesan, N. Presence of Fibronectin-Binding Protein Gene *prtF2* in Invasive Group A Streptococci in Tropical Australia Is Associated with Increased Internalisation Efficiency. *Microbes Infect.* **2005**, *7* (3), 421–426.
35. Ensenberger, M. G.; Annis, D. S.; Mosher, D. F. Actions of the Functional Upstream Domain of Protein F1 of *Streptococcus pyogenes* on the Conformation of Fibronectin. *Biophys. Chem.* **2004**, *112* (2-3 Spec. Iss.), 201–207.
36. Edwards, M. L.; Fagan, P. K.; Currie, B. J.; Sriprakash, K. S. The Fibronectin-Binding Capacity and Host Cell Adherence of *Streptococcus pyogenes* Strains Are Discordant with Each Other. *Microbes Infect.* **2004**, *6* (13), 1156–1162.
37. Terao, Y. The Virulence Factors and Pathogenic Mechanisms of *Streptococcus pyogenes*. *J. Oral Biosci.* **2012**, *54* (2), 96–100.
38. Kreikemeyer, B.; Klenk, M.; Podbielski, A. The Intracellular Status of *Streptococcus pyogenes*: Role of Extracellular Matrix-Binding Proteins and Their Regulation. *Int. J. Med. Microbiol.* **2004**, *294* (2-3), 177–188.
39. Jeng, A.; et al. Molecular Genetic Analysis of a Group A *Streptococcus* Operon Encoding Serum Opacity Factor and a Novel Fibronectin-Binding Protein, SfbX. *J. Bacteriol.* **2003**, *185* (4), 1208–1217.
40. Maxted, W. R.; Widdowson, P.; Fraser, A. M.; Ball, L. Y. N. C.; Bassett, D. C. J. The Use of Serum Opacity Reaction in the Typing of Group-A Streptococci. *J. Med. Microbiol.* **1973**, *6*, 83–90.
41. Johnson, D. R.; Kaplan, E. L. A Review of the Correlation of T-Agglutination Patterns and M-Protein Typing and Opacity Factor Production in the Identification of Group A Streptococci. *J. Med. Microbiol.* **1993**, *38* (5), 311–315.

42. Pence, M. A.; et al. Streptococcal Inhibitor of Complement Promotes Innate Immune Resistance Phenotypes of Invasive M1T1 Group A *Streptococcus*. *J. Innate Immun.* **2010**, 2 (6), 587–595.
43. Åkesson, P.; Sjöholm, A. G.; Björck, L. Protein SIC, a Novel Extracellular Protein of *Streptococcus pyogenes* Interfering with Complement Function. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (2), 1081–1088.
44. Fernie-King, B. A.; et al. Streptococcal Inhibitor of Complement (SIC) Inhibits the Membrane Attack Complex by Preventing Uptake of C5b-9 onto Cell Membranes. *Immunology* **2001**, 103 (3), 390–398.
45. Frick, I. M.; Åkesson, P.; Rasmussen, M.; Schmidtchen, A.; Björck, L. SIC, a Secreted Protein of *Streptococcus pyogenes* That Inactivates Antibacterial Peptides. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (19), 16561–16566.
46. Hoe, N. P.; et al. Insight into the molecular basis of pathogen abundance group A *Streptococcus* inhibitor of complement inhibits bacterial adherence and internalization into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, 99 (11), 7646–7651.
47. Ferretti, J. J.; et al. Complete Genome Sequence of an M1 Strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2001**, 98 (8), 4658–4663.
48. Berge, A.; Rasmussen, M.; Björck, L. Identification of an Insertion Sequence Located in a Region Encoding Virulence Factors of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **1998**, 66 (7), 3449–3453.
49. McMillan, D. J.; et al. Variations in the Distribution of Genes Encoding Virulence and Extracellular Proteins in Group A *Streptococcus* are Largely Restricted to 11 Genomic Loci. *Microbes Infect.* **2007**, 9 (3), 259–270.
50. Kapur, V.; et al. Conserved *Streptococcus pyogenes* Extracellular Cysteine Protease Cleaves Human Fibronectin and Degrades Vitronectin. *Microb. Pathog.* **1993**, 15, 327–346.
51. Tsao, N.; et al. Streptococcal Pyrogenic Exotoxin B Cleaves Properdin and Inhibits Complement-Mediated Opsonophagocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 339 (3), 779–784.

52. Kansal, R. G.; McGeer, A.; Low, D. E.; Norrby-Teglund, A.; Kotb, M. Inverse Relation between Disease Severity and Expression of the Streptococcal Cysteine Protease, SpeB, among Clonal M1T1 Isolates Recovered from Invasive Group A Streptococcal Infection Cases. *Infect. Immun.* **2000**, *68* (11), 6362–6369.
53. Eriksson, A.; Norgren, M. The Superantigenic Activity of Streptococcal Pyrogenic Exotoxin B Is Independent of the Protease Activity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1999**, *25* (4), 355–363.
54. Hollands, A.; et al. A Naturally Occurring Mutation in *ropB* Suppresses SpeB Expression and Reduces M1T1 Group A Streptococcal Systemic Virulence. *PLoS One* **2008**, *3* (12), 1–8.
55. Friães, A.; Pinto, F. R.; Silva-Costa, C.; Ramirez, M.; Melo-Cristino, J. Superantigen Gene Complement of *Streptococcus pyogenes* - Relationship with Other Typing Methods and Short-Term Stability. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *32* (1), 115–125.
56. Proft, B. T.; Moffatt, S. L.; Berkahn, C. J.; Fraser, J. D. Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J. Exp. Med.* **1999**, *189* (1), 89–101.
57. Alouf, J. E.; Müller-Alouf, H. Staphylococcal and Streptococcal Superantigens: Molecular, Biological and Clinical Aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* **2003**, *292* (7-8), 429–440.
58. Goshorn, S. C.; Schlievert, P. M. Nucleotide Sequence of Streptococcal Pyrogenic Exotoxin Type C. *J. Bacteriol.* **1988**, *56* (9), 2518–2520.
59. Hauser, A. R.; Stevens, D. L.; Kaplan, E. L.; Schlievert, P. M. Molecular Analysis of Pyrogenic Exotoxins from *Streptococcus pyogenes* Isolates Associated with Toxic Shock-like Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **1991**, *29* (8), 1562–1567.
60. Lintges, M.; et al. A New Closed-Tube Multiplex Real-Time PCR to Detect Eleven Superantigens of *Streptococcus pyogenes* Identifies a Strain without Superantigen Activity. *Int. J. Med. Microbiol.* **2007**, *297* (6), 471–478.

61. Friães, A.; Pinto, F. R.; 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.
62. Sriskandan, S.; Faulkner, L.; Hopkins, P. *Streptococcus pyogenes*: Insight into the Function of the Streptococcal Superantigens. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39* (1), 12–19.
63. Friães, A.; Lopes, J. P.; Melo-Cristino, J.; Ramirez, M. Changes in *Streptococcus pyogenes* Causing Invasive Disease in Portugal: Evidence for Superantigen Gene Loss and Acquisition. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, *303* (8), 505–513.
64. Russell, H. H.; Sriskandan, S. Superantigens SPEA and SMEZ Do Not Affect Secretome Expression in *Streptococcus pyogenes*. *Microb. Pathog.* **2008**, *44* (6), 537–543.
65. Proft, T.; et al. The Streptococcal Superantigen SMEZ Exhibits Wide Allelic Variation, Mosaic Structure, and Significant Antigenic Variation. *J. Exp. Med.* **2000**, *191* (10), 1765–1776.
66. Vlamincx, B. J.; et al. Site-Specific Manifestations of Invasive Group A Streptococcal Disease: Type Distribution and Corresponding Patterns of Virulence Determinants. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41* (11), 4941–4949.
67. Baker, M.; Gutman, D. M.; Papageorgiou, A. C.; Collins, C. M.; Acharya, K. R. Structural Features of a Zinc Binding Site in the Superantigen Streptococcal Pyrogenic Exotoxin A (SpeA1): Implications for MHC Class II Recognition. *Protein Sci.* **2001**, *10* (6), 1268–1273.
68. Johnson, L. P.; Tomai, M. A.; Schlievert, P. M. Bacteriophage Involvement in the Group A Streptococcal Pyrogenic Exotoxin A Production. *J. Bacteriol.* **1986**, *166* (2), 623–627.
69. Yu, C. E.; Ferretti, J. J. Molecular Characterization of New Group A Streptococcal Bacteriophages Containing the Gene for Streptococcal Erythrogenic Toxin A (*speA*). *MGG Mol. Gen. Genet.* **1991**, *231* (1), 161–168.

70. Ikebe, T.; et al. Dissemination of the Phage-Associated Novel Superantigen Gene *speL* in Recent Invasive and Noninvasive *Streptococcus pyogenes* M3/T3 Isolates in Japan. *Infect. Immun.* **2002**, *70* (6), 3227–3233.
71. Goshorn, S. C.; Schlievert, P. M. Bacteriophage Association of Streptococcal Pyrogenic Exotoxin Type C. *J. Bacteriol.* **1989**, *171* (6), 3068–3073.
72. McLaughlin, R. L.; Sezate, S.; Ferretti, J. Molecular Characterization of Genes Encoding Streptococcal Erythrogenic Toxin-like Proteins SPE-H and SPE-I. XIV. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Nueva Zelanda, 1999.
73. Proft, T.; Webb, P. D.; Handley, V.; Fraser, D.; Fraser, J. D. Two Novel Superantigens Found in Both Group A and Group C *Streptococcus*. *Infect. Immun.* **2003**, *71* (3), 1361–1369.
74. Proft, T.; Arcus, V. L.; Handley, V.; Baker, E. N.; Fraser, J. D. Immunological and Biochemical Characterization of Streptococcal Pyrogenic Exotoxins I and J (SPE-I and SPE-J) from *Streptococcus pyogenes*. *J. Immunol.* **2001**, *166* (11), 6711–6719.
75. Beres, S. B.; et al. Genome Sequence of a Serotype M3 Strain of Group A *Streptococcus*: Phage-Encoded Toxins, the High-Virulence Phenotype, and Clone Emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (15), 10078–10083.
76. Smoot, J. C.; et al. 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.
77. Smoot, L. M.; et al. Characterization of Two Novel Pyrogenic Toxin Superantigens Made by an Acute Rheumatic Fever Clone of *Streptococcus pyogenes* Associated with Multiple Disease Outbreaks. *Infect. Immun.* **2002**, *70* (12), 7095–7104.
78. Reda, K. B.; et al. Phylogenetic Distribution of Streptococcal Superantigen SSA Allelic Variants Provides Evidence for Horizontal Transfer of *ssa* within *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **1996**, *64* (4), 1161–1165.

79. Kamezawa, Y.; et al. Streptococcal Mitogenic Exotoxin Z, a Novel Acidic Superantigenic Toxin Produced by a T1 Strain of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **1997**, *65* (9), 3828–3833.
80. Kimura, K.; et al. Practical Disk Diffusion Test for Detecting Group B *Streptococcus* with Reduced Penicillin Susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47* (12), 4154–4157.
81. Whatmore, A. M.; Kehoe, M. A. Horizontal Gene Transfer in the Evolution of Group A Streptococcal *emm*-like Genes: Gene Mosaics and Variation in Vir Regulons. *Mol. Microbiol.* **1994**, *11* (2), 363–374.
82. Natanson, S.; et al. Distribution of Fibronectin-Binding Proteins among Group A Streptococci of Different M Types. *J. Infect. Dis.* **1995**, *171* (4), 871–878.
83. Igwe, E. I.; Shewmaker, P. L.; Facklam, R. R.; Farley, M. M.; Van Beneden, C.; Beall, B. Identification of Superantigen Genes *speM*, *ssa*, and *smeZ* in Invasive Strains of Beta-Hemolytic Group C and G Streptococci Recovered from Humans. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *229* (2), 259–264.
84. Perea-Mejia, L. M.; Stockbauer, K. E.; Pan, X.; Cravioto, A.; Musser, J. M. Characterization of Group A *Streptococcus* Strains Recovered from Mexican Children with Pharyngitis by Automated DNA Sequencing of Virulence-Related Gene (*sic*) Encoding a Complement-Inhibiting Protein. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *35* (12), 3220–3224.
85. Beall, B.; et al. *emm* and *sof* Gene Sequence Variation in Relation to Serological Typing of Opacity-Factor-Positive Group A Streptococci. *Microbiology* **2000**, *146* (5), 1195–1209.
86. Yu, C. E.; Ferretti, J. J. Frequency of the Erythrogenic Toxin B and C Genes (*speB* and *speC*) among Clinical Isolates of Group A Streptococci. *Infect. Immun.* **1991**, *59* (1), 211–215.
87. Torres, R.; et al. Molecular Epidemiology of Invasive Group A *Streptococcus* in Paraná, Brazil. *Book of Abstracts*, XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Buenos Aires, Argentina, 2014.

88. Kozakova, J.; Lzicarova, D.; Krizova, P. Invasive *Streptococcus pyogenes* Analyzed in the National Reference Laboratory for Streptococcal Infections, Prague, Czech Republic in the Period 2012 – 2013. *Book of Abstracts*, XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Buenos Aires, Argentina, 2014.
89. Dmitriev, A.; Glushkova, E.; Nosik, A.; Dmitrieva, N.; Kleumenov, D.; Lipatov, K.; Briko, N. Invasive *Streptococcus pyogenes* Infections of the Soft Tissues in Moscow, Russia. *Book of Abstracts*, XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases Buenos Aires, Argentina 2014.
90. Ekelund, K.; et al. Variations in *emm* Type among Group A Streptococcal Isolates Causing Invasive or Noninvasive Infections in a Nationwide Study. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43* (7), 3101–3109.
91. Ma, Y.; et al. Characterization of *emm* Types and Superantigens of *Streptococcus pyogenes* Isolates from Children during Two Sampling Periods. *Epidemiol. Infect.* **2009**, *137* (10), 1414–1419.
92. Santiago-Cruz, N. Análisis de la Resistencia a Eritromicina en Cepas Clínicas de *Streptococcus pyogenes*, Tesis de licenciatura QFB. UNAM, 2015.
93. 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.
94. Podbielski, A.; Woischnik, M.; Leonard, B.; Schmidt, K. H. Characterization of *Nra*, a Global Negative Regulator Gene in Group A Streptococci. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31* (4), 1051–1064.
95. Meisal, R.; et al. *Streptococcus pyogenes* Isolates Causing Severe Infections in Norway in 2006 to 2007: *emm* Types, Multilocus Sequence Types, and Superantigen Profiles. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48* (3), 842–851.
96. Proft, T.; Sriskandan, S.; Yang, L.; Fraser, J. D. Superantigens and Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9* (10), 1211–1218.
97. Chang, H.; et al. Molecular Analysis of *Streptococcus pyogenes* Strains Isolated from Chinese Children with Pharyngitis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *69* (2), 117–122.

98. Murakami, J.; et al. Distribution of *emm* Genotypes and Superantigen Genes of *Streptococcus pyogenes* Isolated in Japan, 1994-9. *Epidemiol. Infect.* **2002**, *128* (3), 397–404.
99. Hsueh, P. R.; et al. Invasive Group A Streptococcal Disease in Taiwan Is Not Associated with the Presence of Streptococcal Pyrogenic Exotoxin Genes. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *26* (3), 584–589.
100. Maripuu, L.; Eriksson, A.; Norgren, M. Superantigen Gene Profile Diversity among Clinical Group A Streptococcal Isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2008**, *54* (2), 236–244.
101. Ekelund, K.; Skinhøj, P.; Madsen, J.; Konradsen, H. B. Reemergence of *emm1* and a Changed Superantigen Profile for Group A Streptococci Causing Invasive Infections: Results from a Nationwide Study. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43* (4), 1789–1796.
102. Chatellier, S.; et al. Genetic Relatedness and Superantigen Expression in Group A *Streptococcus* Serotype M1 Isolates from Patients with Severe and Nonsevere Invasive Diseases. *Infect. Immun.* **2000**, *68* (6), 3523–3534.
103. Descheemaeker, P.; Van Loock, F.; Hauchecorne, M.; Vandamme, P.; Goossens, H. Molecular Characterisation of Group A Streptococci from Invasive and Non-Invasive Disease Episodes in Belgium during 1993-1994. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49* (5), 467–471.

Anexo A. Frecuencias de los genes de virulencia estudiados para cada tipo M en cepas invasivas de *S. pyogenes*

Tipo M (n)	<i>sic</i>	<i>sof</i>	<i>prtF</i>	<i>speA</i>	<i>speB</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speJ</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
1 (30)	100 (30)	0	0	73.3 (22)	100 (30)	10 (3)	100 (30)	100 (30)	20 (6)	20 (6)	0	0	96.7 (29)	0	100 (30)
12 (15)	0	100 (15)	100 (15)	6.7 (1)	100 (15)	66.7 (10)	100 (15)	86.7 (13)	100 (15)	100 (15)	6.7 (1)	0	86.7 (13)	0	100 (15)
6 (11)	0	18.2 (2)	90.9 (11)	18.2 (2)	90.9 (10)	81.8 (9)	100 (11)	81.8 (9)	54.5 (6)	54.5 (6)	90.9 (10)	0	0	0	100 (11)
75 (10)	0	100 (10)	100 (10)	0	100 (10)	90 (9)	100 (10)	100 (10)	100 (10)	100 (10)	10 (1)	100 (10)	100 (10)	0	100 (10)
89 (10)	0	100 (10)	100 (10)	0	100 (10)	100 (10)	100 (10)	50 (5)	40 (4)	40 (4)	40 (4)	0	80 (8)	0	100 (10)
22 (7)	0	100 (7)	100 (7)	14.3 (1)	100 (7)	28.6 (2)	100 (7)	42.9 (3)	14.3 (1)	57.1 (4)	28.6 (2)	42.9 (3)	42.9 (3)	100 (7)	100 (7)
3 (6)	0	0	0	100 (6)	100 (6)	50 (3)	100 (6)	16.7 (1)	50 (3)	50 (3)	100 (6)	0	0	0	100 (6)
2 (5)	0	80 (4)	0	0	100 (5)	100 (5)	100 (5)	20 (1)	60 (3)	60 (3)	20 (1)	40 (2)	40 (2)	0	0
28 (5)	0	60 (3)	60 (3)	0	100 (5)	60 (3)	100 (5)	100 (5)	20 (1)	20 (1)	0	0	0	0	100 (5)
59 (5)	0	100 (5)	100 (5)	0	100 (5)	80 (4)	100 (5)	60 (3)	80 (4)	80 (4)	20 (1)	20 (1)	20 (1)	0	100 (5)
4 (3)	0	100 (3)	100 (3)	0	100 (3)	66.7 (2)	100 (3)	0	0	0	0	0	0	100 (3)	100 (3)
11 (3)	0	100 (3)	100 (3)	0	100 (3)	100 (3)	100 (3)	66.7 (2)	100 (3)	0	0	0	0	0	100 (3)
43 (2)	0	0	0	0	100 (2)	0	100 (2)	0	100 (2)	100 (2)	100 (2)	0	0	0	100 (2)
49-1 (2)	0	100 (2)	0	0	100 (2)	50 (1)	100 (2)	100 (2)	100 (2)	100 (2)	50 (1)	0	0	0	100 (2)
60 (2)	0	50 (1)	100 (2)	0	100 (2)	100 (2)	100 (2)	50 (1)	100 (2)	100 (2)	50 (1)	0	0	0	100 (2)
41-2 (1)	0	0	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
53 (1)	0	0	0	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	0	0	0	100 (1)
65 (1)	0	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)
77 (1)	0	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)	0	0	0	0	0	0	0	100 (1)
78 (1)	0	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	0	0	100 (1)	0	0	100 (1)	100 (1)
87 (1)	0	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	0	0	0	100 (1)	100 (1)
stG485 (1)	0	100 (1)	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	0	0	0	0	0	0	100 (1)
stG839 (1)	0	0	0	0	0	0	100 (1)	0	0	0	0	0	100 (1)	0	0
S/T (1)	0	0	0	0	100 (1)	0	100 (1)	0	0	0	100 (1)	0	0	0	100 (1)

Anexo B. Perfiles de genes de virulencia para las 125 cepas invasivas de *S. pyogenes*

Clave	Tipo M	<i>sic</i>	<i>sof</i>	<i>prtF</i>	<i>speA</i>	<i>speB</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speJ</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>	Resistencia
272	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
974	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
975	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
977	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
982	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
988	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
1004	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
1143	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
1149	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
1153	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
1160	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
1168	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
156	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
249	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
565	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
2753	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
819	1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
963	1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
255	1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
260	1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
2805	1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
274	1	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1156	1	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
155	1	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1161	1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
262	1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
250	1	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
290	1	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
273	1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
248	1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
266	2	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
1010	2	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
240	2	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	
237	2	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
241	2	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
1019	3	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
1138	3	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
1165	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
1142	3	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	
967	3	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
1020	3	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	
1159	4	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
568	4	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
1539	4	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	

Clave	Tipo M	sic	sof	prtF	speA	speB	speC	speG	speJ	speH	speI	speK	speL	speM	ssa	smeZ	Resistencia
1150	6	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
1157	6	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
154	6	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
105	6	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
1154	6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Tetraciclina
1155	6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Tetraciclina
1049	6	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
107	6	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
95	6	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
555	6	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
2802	6	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
251	11	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
2876	11	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
252	11	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	
969	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1144	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1151	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1162	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1167	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
157	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
2755	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1152	12	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1169	12	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
778	12	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
1005	12	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
1146	12	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
971	12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
1148*	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
2801	12	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
1170	22	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
2759	22	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	
1163	22	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
1164	22	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
1876	22	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
106	22	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	
1139	22	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
781*	28	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
1166**	28	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
1145	28	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	Tetraciclina
1029	28	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
185	28	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	Eritromicina
2754***	43	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
2756***	43	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
586	41-2	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	Tetraciclina

Clave	Tipo M	sic	sof	prtF	speA	speB	speC	speG	speJ	speH	speI	speK	speL	speM	ssa	smeZ	Resistencia
275	49-1	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
554	49-1	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	Tetraciclina
561	53	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Tetraciclina
1265*	59	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	Tetraciclina y Vancomicina
238*	59	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
1511	59	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
2757	59	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	
562	59	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	Tetraciclina
276	60	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
1009	60	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	
244	65	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
277	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
970	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	Eritromicina
1008	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
1140	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	Eritromicina
1147	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	Eritromicina
567	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	Eritromicina
569	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	Eritromicina
610	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
968	75	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
774	75	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	Eritromicina
160	77	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
966	78	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
1070	87	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
556	89	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
2829	89	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
2830	89	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
996	89	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	Vancomicina
2464	89	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
2828	89	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
559	89	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
560	89	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
787	89	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	
104	89	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
566**	stG485	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	Tetraciclina
1241	stG839	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
2877***	S/T	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	

Perfiles compartidos:

*Las cepas 1148 (M12), 781 (M28), 238 y 1265 (M59)

**Las cepas 1168 (M8) y 566 (stG485)

***Las cepas 2754, 2756 (M43) y 2877 (S/T)