



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA EN  
AISLAMIENTOS FARÍNGEOS DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* DEL TIPO M1**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**PRESENTA**

**STEFANY MARTÍNEZ MENDIETA**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**AÑO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ**

**VOCAL:**               **Profesor: LUIS MANUEL PEREA MEJIA**

**SECRETARIO:**       **Profesor: GENARO JIMENEZ REYES**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: FRANCISCO JAVIER DIAZ GARCIA**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: KAREN FLORES MORENO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. 3ER PISO TORRE DE INVESTIGACIÓN. DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, FACULTAD DE MEDICINA. CIUDAD UNIVERSITARIA. UNAM. CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS DGAPA-PAPIIT IN221511 Y FM 066-2012.**

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_

**M. en C. Luis Manuel Perea Mejía**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

\_\_\_\_\_

**M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel**

**SUSTENTANTE (S):**

\_\_\_\_\_

**Stefany Martínez Mendieta**

## INDICE

Abreviaturas	1
1. Resumen	3
2. Hipótesis	4
3. Objetivos	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos particulares	4
4. Introducción	5
5. Antecedentes	7
5.1 <i>Streptococcus pyogenes</i>	7
5.2 Enfermedades faríngeas	8
5.2.1 Faringitis estreptocócica	9
5.2.1.1 Secuelas supurativas	9
5.2.1.1.1 Otitis media	9
5.2.1.1.2 Sinusitis	9
5.2.1.2 Secuelas no supurativas	10
5.2.1.2.1 Fiebre reumática	10
5.2.1.2.2 Glomerulonefritis	10
5.3 Enfermedades de piel y tejidos blandos	10
5.3.1 Pioderma	10
5.3.2 Erisipela	11
5.3.3 Celulitis	11
5.4 Enfermedades mediadas por toxinas	11
5.4.1 Fiebre escarlatina	11
5.4.2 Síndrome de choque tóxico	11
5.4.3 Fascitis necrosante	12
5.5 Factores de virulencia	12
5.5.1 Factores de superficie	13

5.5.1.1 Cápsula	13
5.5.1.2 Pared celular	13
5.5.1.2.1 Ácido lipoteicoico	14
5.5.1.2.2 Proteína M	14
5.5.1.2.3 Proteína de unión a fibronectina	16
5.5.1.2.4 Inhibidor estreptocócico del complemento	16
5.5.1.2.5 Factor de opacidad del suero	17
5.5.2 Factores extracelulares	17
5.5.2.1 Enzimas	17
5.5.2.1.1 Estreptoquinasa	17
5.5.2.1.2 Hialuronidasa	17
5.5.2.1.3 Desoxirribonucleasas	18
5.5.2.1.4 Peptidasa de C5a	18
5.5.2.2 Toxinas	18
5.5.2.2.1 Estreptolisina O	18
5.5.2.2.2 Estreptolisina S	18
5.5.2.2.3 Cistein-proteasa	18
5.5.2.2.4 Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas	19
5.5.2.3 Genes asociados a factores de virulencia	21
5.5.2.3.1 <i>speA</i>	21
5.5.2.3.2 <i>speC</i>	21
5.5.2.3.3 <i>speG</i>	22
5.5.2.3.4 <i>speH</i> y <i>speI</i>	22
5.5.2.3.5 <i>speJ</i>	22
5.5.2.3.6 <i>speK</i>	22
5.5.2.3.7 <i>speL</i>	23
5.5.2.3.8 <i>speM</i>	23
5.5.2.3.9 <i>ssa</i>	23

5.5.2.3.10 <i>smeZ</i>	23
5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa	24
6. Materiales y métodos	26
6.1 Reactivos y equipos utilizados	26
6.2 Selección de cepas	26
6.3 Controles (Cepas del Laboratorio de Biología Molecular y de Referencia del CDC)	27
6.4 Extracción de DNA	27
6.5 Estandarización y amplificación de los genes de virulencia por PCR	28
6.6 Identificación de los productos de PCR	33
7. Resultados y discusión	34
7.1 Cepas clínicas de exudado faríngeo EGA tipo M1 y su origen	34
7.2 Extracción de DNA	35
7.3 Frecuencia de genes asociados a la virulencia de <i>S. pyogenes</i> tipo M1	35
7.3.1 Gen <i>prtF</i>	36
7.3.2 Genes <i>speA</i> y <i>speC</i>	37
7.3.3 Gen <i>speB</i>	40
7.3.4 Genes <i>sic</i> y <i>sof</i>	41
7.3.5 Genes <i>speH</i> y <i>speI</i>	42
7.3.6 Genes <i>smeZ</i> , <i>speJ</i> y <i>speG</i>	43
7.3.7 Genes <i>speK</i> , <i>speL</i> , <i>speM</i> y <i>ssa</i>	44
7.4 Frecuencia de los perfiles de genes asociados a factores de virulencia	46
8. Conclusiones	49
9. Referencias	50
Anexo A	57

## ABREVIATURAS

AE	Buffer de elución
AL	Buffer de lisis
AS	Agar sangre
AW	Buffer de lavado
BHI	Infusión de Cerebro Corazón
cel	Células
CDC	Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAsas	Desoxirribonucleasas
dNTP	Dinucleótido trifosfatado
EGA	Estreptococo beta-hemolítico del grupo A
<i>emm</i>	Gen de la proteína M
F	Adelante (forwond)
H <sub>2</sub> O	Agua
kDa	Kilodalton
LTA	Ácido lipoteicóico
mg	Miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>prtF</i>	Gen de proteína de unión a fibronectina

R	Reversa (reverse)
rpm	Revoluciones por minuto
SAg	Superantígeno
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SIC	Inhibidor Estreptocócico de Complemento
SmeZ	Exotoxina mitogénica estreptocócica Z
SOF	Factor de Opacidad del Suero
Spe	Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas
TBE	Buffer tris-Boratos-EDTA
TCR	Receptor de Células T
TH	Todd-Hewitt
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TSS	Síndrome de Choque Tóxico
UV	Ultravioleta
V	Volts



## 1. RESUMEN

El presente estudio consistió en identificar los genes asociados a factores de virulencia de 140 aislamientos faríngeos de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1 obtenidas de diversas Instituciones de Salud.

Además, la proteína M representa uno de los principales factores de virulencia debido a su propiedad antifagocítica. De los más de 120 diferentes tipos M (proteína M) de *S. pyogenes*, el M1 es el más importante por la elevada frecuencia con que se aísla de cuadros faríngeos e invasivos; está relacionado con una amplia diversidad de infecciones agudas como: faringitis, pioderma, fiebre escarlatina, celulitis, fascitis necrosante y síndrome de choque tóxico estreptocócico; así como secuelas no supurativas: fiebre reumática y glomerulonefritis aguda pos-estreptocócica.

Se identificaron 15 genes que codifican para factores de virulencia como: toxinas, superantígenos, enzimas, adhesinas y proteínas que interfieren con la respuesta inmune por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los genes asociados a factores de virulencia que se buscaron son: *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *prtF*, *ssa*, *smeZ*, *sic* y *sof*.

Se obtuvieron 17 diferentes perfiles de genes de virulencia que permitieron comparar el potencial patogénico de este grupo de cepas con otros resultados ya publicados de *Streptococcus pyogenes* del tipo M1 obtenidos de muestras no invasivas e invasivas.

## **2. HIPÓTESIS**

Si las cepas analizadas de *S. pyogenes* son del tipo M1 y de origen faríngeo, entonces se esperan resultados similares respecto a la presencia o ausencia de genes que codifican para factores de virulencia.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Determinar la presencia de 15 genes asociados a factores de virulencia en 140 cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 de muestras faríngeas, obtenidas de diversas Instituciones de Salud.

### **3.2 Objetivos Particulares**

- Realizar la identificación de los genes: *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa*, *prtF*, *smeZ*, *sic* y *sof* por medio de la técnica molecular de la PCR en las 140 cepas de *S. pyogenes* del tipo M1.
- Conocer la frecuencia de los perfiles de virulencia de las 140 cepas analizadas de *S. pyogenes*.
- Analizar y comparar los resultados obtenidos con otros ya publicados de cepas de *S. pyogenes* tipo M1 de aislamientos faríngeos y no faríngeos.

#### 4. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Streptococcus* son cocos Gram (+), se agrupan en cadenas, debido a que se dividen en un plano y tienden a permanecer unidas. La longitud de las cadenas varía según la especie, desde dos hasta más de 30 células. Son inmóviles y no forman esporas.<sup>1,2</sup>

Más de 20 especies conforman el género, siendo de mayor importancia clínica para el ser humano: *Streptococcus pyogenes* como causa de la faringitis estreptocócica, puede conducir a la fiebre escarlatina, fiebre reumática y cardiopatía reumática. Debido a la capacidad que tiene para producir infecciones en los tejidos profundos se le dio el nombre de “bacteria carnívora”; *Streptococcus agalactiae* produce con mayor frecuencia septicemia en los recién nacidos; *Streptococcus pneumoniae* es el principal causante de neumonía y meningitis en niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años.<sup>1,2,3</sup>

Los estreptococos son anaerobios facultativos y crecen mejor en medios de cultivo enriquecidos en condiciones aerobias. Agar sangre es el medio que se utiliza con mayor frecuencia debido a que satisface sus requerimientos nutricionales y también sirve como un indicador de los patrones de hemólisis. Las colonias son pequeñas y es posible que se encuentren rodeadas por una zona donde se han hemolizado los eritrocitos suspendidos en el agar. Cuando la zona está clara se denomina beta-hemólisis; esta hemólisis es producida por dos hemolisinas, la estreptolisina S y la estreptolisina O. Los estreptococos son metabólicamente activos y degradan diversos carbohidratos, proteínas y aminoácidos. Se caracterizan por ser catalasa y oxidasa negativos.<sup>1</sup>

En el año 1903, la clasificación de los estreptococos comenzó a mostrar cierto orden cuando el investigador Hugo Schottmüller, determinó que los estreptococos producen dos tipos de hemólisis en placas de agar sangre.<sup>2</sup>

En el año 1919 el científico Brown describió y definió la acción hemolítica de los estreptococos en agar sangre de carnero, la cual es utilizada en la actualidad. Su clasificación es la siguiente <sup>3</sup>:

1. Alfa - hemólisis: una zona de destrucción parcial de eritrocitos de carnero alrededor de la colonia, acompañada por una coloración verdosa a café del medio.
2. Beta - hemólisis: una zona clara, incolora alrededor de la colonia, en la que los eritrocitos de la sangre de carnero han sufrido una hemólisis completa.
3. Gamma - hemólisis o no hemólisis: no hay actividad hemolítica aparente.

En el año 1932, la microbióloga Rebecca Lancefield demostró en los extractos de la pared celular de los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos la presencia de un antígeno superficial denominado carbohidrato C, dando una base taxonómica más sólida. Sus estudios formaron una clasificación por serogrupos de la A hasta la W. De todos estos, los grupos A, B, C, D y G son los que se aíslan con mayor frecuencia del hombre.<sup>1, 3</sup>

En la Tabla 1 se ilustra la clasificación de las principales especies de estreptococos por el tipo de hemólisis y las reacciones inmunológicas.

Nombre	Grupo de Lancefield	Hemólisis	Hábitat
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	Beta	Garganta, piel
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	Beta	Tracto genital femenino
<i>Streptococcus bovis</i>	D	No produce	Colon
<i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	C o G	Beta	Nasofaringe
<i>Streptococcus "viridans"</i> (grupo integrado por diferentes especies)	Algunas especies poseen sustancia específica de grupo y otras no	Alfa	Garganta, boca, intestino, genitales femeninos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No poseen sustancia específica de grupo	Alfa	Tracto respiratorio

Tabla 1. Clasificación de los principales estreptococos de importancia clínica <sup>4</sup>

## 5. ANTECEDENTES

### 5. 1 *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* (pyogenes significa “formador de pus”), a esta especie patógena también se le conoce como el estreptococo beta-hemolítico del grupo A (EGA). Es el agente etiológico de una amplia gama de enfermedades humanas que varían en su gravedad clínica, y son una causa importante de morbilidad y mortalidad humana.<sup>5, 6</sup> Causa más de 600 millones de infecciones en todo el mundo que resultan en más de 500,000 muertes al año aproximadamente.<sup>5</sup>

La patogenicidad de las cepas de *S. pyogenes* está ligada a la producción de diversos factores de virulencia tales como: toxinas, proteasas o DNAsas.<sup>7</sup>

Entre las enfermedades ocasionadas por *S. pyogenes* se incluyen: faringitis estreptocócica, fiebre escarlatina, impétigo, erisipela, celulitis, septicemia, síndrome de choque tóxico, fascitis necrosante y secuelas post-infecciosas como la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda.<sup>8, 9</sup>

*S. pyogenes* provoca una amplia gama de enfermedades supurativas como resultado del daño directo por el organismo y la actividad de las enzimas que secreta. Las secuelas no supurativas de la infección representan manifestaciones tardías provocadas por una respuesta autoinmunitaria. Las enfermedades mediadas por toxinas son provocadas por exotoxinas estreptocócicas secretadas al torrente sanguíneo, figura 1.<sup>10</sup>

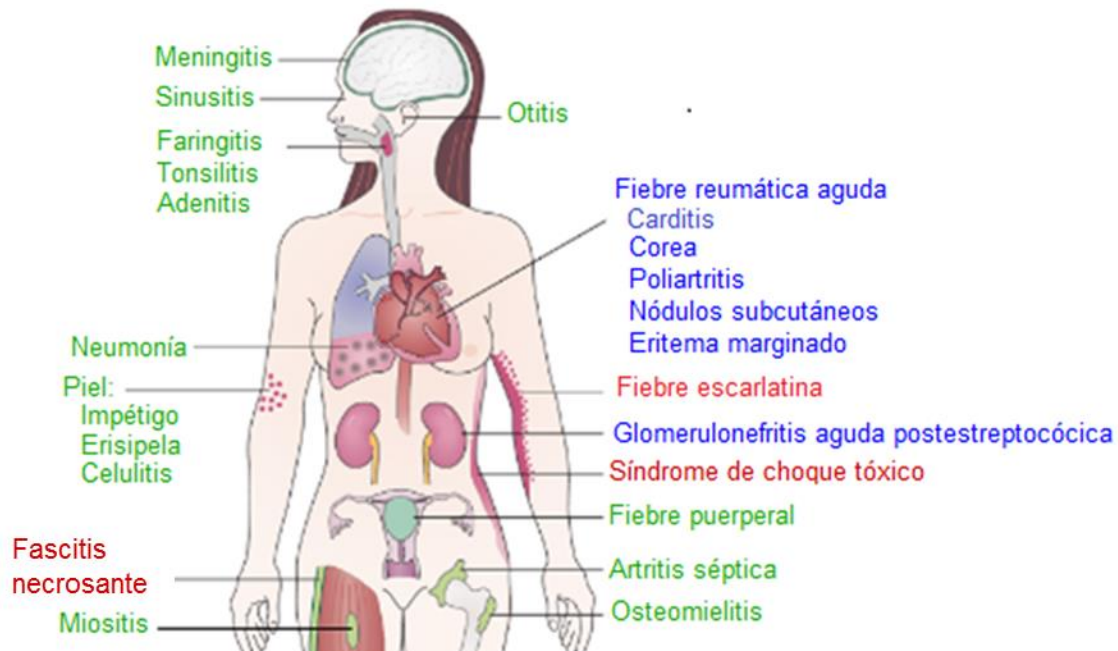


Figura 1. Enfermedades que provoca *S. pyogenes*. Enfermedades supurativas (letras en verde), enfermedades mediadas por toxinas (letras en rojo) y secuelas no supurativas (letras en azul).<sup>10</sup>

*S. pyogenes* puede producir enfermedades a través de tres mecanismos <sup>11</sup>:

- 1.- La invasión y propagación a través del tejido debido a las acciones combinadas de crecimiento bacteriano y respuesta inflamatoria.
- 2.- Las toxinas producidas por los estreptococos que se diseminan a otras áreas en el huésped y dañan a células susceptibles.
- 3.- Los antígenos estreptocócicos pueden tener mimetismo con las estructuras del huésped, y la infección desencadena una respuesta autoinmune que conduce al daño tisular.

## 5. 2 Enfermedades faríngeas

La vía de entrada más común de *S. pyogenes* es el tracto respiratorio superior, que suele ser el principal sitio de infección y también sirve como foco para otras infecciones. La propagación de la bacteria se da de persona a persona por gotas respiratorias (saliva y moco) o por contacto directo con heridas infectadas y llagas en la piel. Sin embargo, no todos los individuos colonizados por *S. pyogenes* en las vías respiratorias superiores desarrollan signos clínicos de la enfermedad.<sup>12</sup>

### **5.2.1 Faringitis estreptocócica**

*S. pyogenes* es la causa bacteriana más común de faringitis bacteriana en niños entre 5 y 15 años. La enfermedad se caracteriza por irritación aguda en la garganta, malestar general, fiebre y cefalea. La transmisión ocurre de persona a persona debido a las gotas expelidas por las personas infectadas durante la tos o estornudos. Es común que la enfermedad comprometa amígdalas, úvula y paladar blando, que se enrojecen, inflaman y se cubren con un exudado amarillento. En ocasiones, la infección se produce a nivel local y abscesos preamigdalinos o retrofaríngeos, otitis media y sinusitis aguda.<sup>1, 13</sup>

#### **5.2.1.1 Secuelas supurativas**

Una infección supurativa evoca una respuesta donde se forma pus, en la cual, las células combatientes iniciales y dominantes son los neutrófilos polimorfonucleares. La pus es material líquido que contiene gran número de células inflamatorias.<sup>1, 4</sup>

##### **5.2.1.1.1 Otitis media**

Se refiere a la inflamación del oído medio y se divide clínicamente en: otitis media aguda (líquido en el oído medio acompañado por signos y síntomas de infección aguda) y otitis media con derrame (líquido en el oído medio sin signos ni síntomas). Los síntomas son dolor ótico, hipoacusia, fiebre, irritabilidad, cefalea y en ocasiones náuseas y vomito; a veces hay secreción desde el conducto auditivo externo.<sup>4</sup>

##### **5.2.1.1.2 Sinusitis**

La mayoría de las infecciones sinusales son de origen viral y solo una pequeña proporción desarrolla una infección bacteriana secundaria. Se caracteriza por síntomas de resfriado persistente, secreción nasal, tos, fiebre, cefalea y a menudo dolor facial.<sup>4</sup>

### **5.2.1.2 Secuelas no supurativas**

Son manifestaciones de la infección post-estreptocócica donde no se forma pus. Se presenta una intensa reacción inflamatoria del sistema inmunitario ante la infección; la fiebre reumática y la glomerulonefritis son las secuelas post-infecciosas más importantes.<sup>10</sup>

#### **5.2.1.2.1 Fiebre reumática**

Es una enfermedad inflamatoria no supurativa que se caracteriza por fiebre, carditis, nódulos subcutáneos, corea y poliartritis migratoria. Puede aparecer de 1 a 4 semanas después de la faringitis estreptocócica. La artritis poliarticular es la manifestación más común, mientras que la carditis provoca daños permanentes, especialmente en las válvulas cardíacas.<sup>7, 10, 12</sup> A nivel clínico se observan agrandamiento cardíaco, soplos valvulares y derrames que reflejan daño en el endocardio, miocárdico y epicardio, que pueden causar insuficiencia cardíaca.<sup>1, 4</sup>

#### **5.2.1.2.2 Glomerulonefritis**

Es una enfermedad inflamatoria del glomérulo renal que se asocia con lesiones glomerulares difusas, hipertensión, hematuria y proteinuria. Puede aparecer a tan solo 10 días de la faringitis estreptocócica.<sup>4</sup> Las manifestaciones clínicas incluyen: orina de color café causada por hematuria, edema de la cara y las extremidades y congestión circulatoria causada por insuficiencia renal.<sup>12</sup>

## **5.3 Enfermedades de piel y tejidos blandos**

### **5.3.1 Pioderma**

Es una lesión que se caracteriza por maceración de la piel, en la cual se forma una pequeña vesícula (hasta 1cm) rodeada de un área eritematosa. La vesícula crece en un periodo de días, se convierte en pústula y finalmente se rompe para formar una costra amarillenta. Las lesiones aparecen en niños de 2 a 5 años sobre la superficie de la cara, brazos y piernas.<sup>1, 4, 14</sup>



### **5.3.2 Erisipela**

Es una infección del tejido cutáneo y subcutáneo que afecta principalmente la dermis, se manifiesta frecuentemente en niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años. Se caracteriza por un área extendida de eritema y edema que avanza con rapidez, bordes bien marcados, dolor y manifestaciones sistémicas que incluyen fiebre y linfadenopatía. La infección ocurre en el rostro, piel velluda, extremidades y es común el antecedente de faringitis estreptocócica.<sup>1, 4, 14</sup>

### **5.3.3 Celulitis**

Proceso infeccioso e inflamatorio de los tejidos blandos que se inicia en un sitio y se disemina progresivamente por los tejidos más laxos, en el tejido celular subcutáneo, y drena en forma tardía. Puede ser causada por diversas bacterias patógenas, pero las más comunes son *S. pyogenes* y *S. aureus*.<sup>1, 12</sup>

## **5.4 Enfermedades mediadas por toxinas**

### **5.4.1 Fiebre escarlatina**

Representa una complicación de la faringitis estreptocócica, ocasionada por la liberación de las exotoxinas pirogénicas A y C codificadas en bacteriófagos. Los primeros síntomas aparecen entre las 24 y 48 horas de iniciadas las manifestaciones clínicas de la faringitis (escalofríos, fiebre, dolor de garganta), comenzando la erupción de puntos rojos en el cuello, parte superior del tórax diseminándose posteriormente a las extremidades. Los primeros días, la lengua presenta un aspecto amarillento que es sustituido entre el 4o y 5o día por una intensa coloración roja ("lengua de fresa").<sup>12, 14</sup>

### **5.4.2 Síndrome de choque tóxico (TSS)**

Es el resultado de la liberación de toxinas estreptocócicas al torrente sanguíneo. Los signos clínicos incluyen: fiebre, malestar general, náuseas, vómito, diarrea, mareos, confusión y una erupción plana en grandes partes del cuerpo. Sin tratamiento, la enfermedad progresa a shock y falla multiorgánica. La exotoxina

pirogénica SpeA esta frecuentemente asociada con las cepas que causan este cuadro clínico.<sup>12, 15, 16</sup> Los pacientes con síntomas de faringitis ocasionalmente desarrollan TSS.<sup>12</sup>

#### **5.4.3 Fascitis necrosante**

Es una infección grave que ocurre en el tejido subcutáneo profundo, la cual es caracterizada por la destrucción masiva del músculo y grasa a lo largo de los planos faciales. El microorganismo se introduce al tejido a través de piel dañada (cortaduras menores o traumas, infecciones virales, quemaduras y cirugía), comienza con una evidencia de celulitis que posteriormente desencadena una gangrena con síntomas sistémicos. La toxicidad sistémica, la falla multiorgánica y la muerte (mortalidad excede el 50%) son características de la enfermedad, por lo que una terapia apropiada es requerida para prevenirla.<sup>14</sup>

#### **5.5 Factores de virulencia**

La patogénesis bacteriana abarca todos aquellos mecanismos bioquímicos y estructuras celulares, conocidos como factores de virulencia, por medio de los cuales las bacterias logran causar la enfermedad infecciosa.<sup>17, 18</sup> Estos factores están variablemente distribuidos entre las cepas de *S. pyogenes*.<sup>5</sup>

El perfil de factores de virulencia producido por una cepa de *S. pyogenes* determina el potencial patogénico de la misma, de tal modo que la presencia o ausencia de estos factores puedan utilizarse como método de diagnóstico y como una herramienta sencilla para evaluar el potencial patogénico de la bacteria.<sup>5</sup> En la figura 2 se muestran los diversos factores de virulencia que puede presentar *S. pyogenes*.

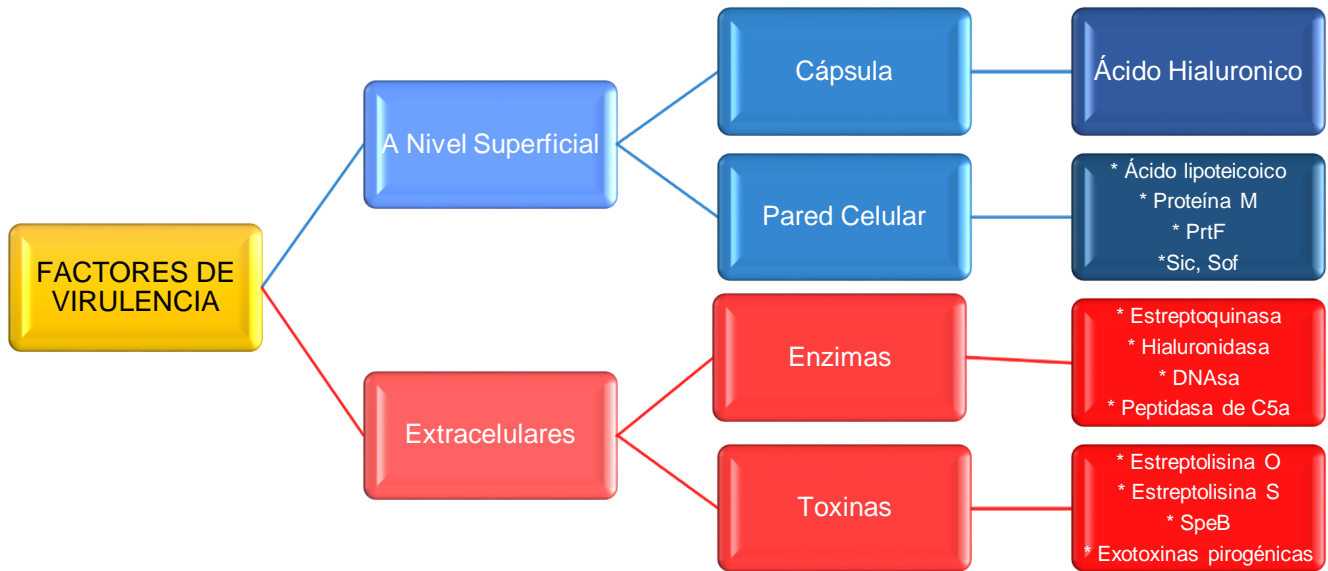


Figura 2. Factores de virulencia de *S. pyogenes*

### 5.5.1 Factores de superficie

Algunas de las estructuras de la superficie de la bacteria funcionan como adhesinas al epitelio faríngeo o dérmico, estas permiten a *S. pyogenes* colonizar e invadir al huésped, provocando el desarrollo de enfermedades infecciosas. Otras estructuras de superficie son protectores contra el sistema de defensa o desencadenan una respuesta inmunológica severa e inespecífica en el huésped humano.<sup>5, 19, 20</sup>

#### 5.5.1.1 Cápsula

La cápsula de *S. pyogenes* se compone de ácido hialurónico, es un polímero que está formado de unidades repetidas de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. Su función es ayudar a evitar la opsonización de *S. pyogenes* al ocultar sus propios antígenos superficiales.<sup>1, 21</sup>

#### 5.5.1.2 Pared celular

La pared celular de una bacteria desempeña numerosas funciones; la más importante es la protección de las estructuras celulares internas respecto a las fuerzas osmóticas y físicas que pueden existir alrededor de la bacteria.<sup>19</sup>

### 5.5.1.2.1 Ácido lipoteicoico (LTA)

Está compuesto por polímeros de fosfato de glicerol o fosfato de ribitol, con diversos azúcares y aminoácidos como constituyentes. Se adhiere a la fibronectina de las células epiteliales bucales humanas.<sup>1, 19</sup>

### 5.5.1.2.2 Proteína M

La proteína M es una proteína fibrilar de aproximadamente 500 aminoácidos de longitud.<sup>3, 10</sup> Está anclada en su extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de forma covalente a la membrana celular y el peptidoglucano. Tiene una estructura  $\alpha$ -helicoidal y un máximo de cuatro bloques (A-D) de distintas secuencias repetidas de aminoácidos, incluyendo la región amino-terminal hipervariable (A) que representa el epítipo para los anticuerpos tipo específicos, figura 3. Dos fibrillas de  $\alpha$ -hélice de la proteína M se enrollan en configuración de bobina en espiral, que se extiende más allá de la superficie bacteriana. La porción proximal de la molécula (C y D) enlaza al factor H (proteína de control de complemento) y la porción distal (B) retiene la capacidad de enlazarse con fibrinógeno (protege a la bacteria de la opsonización inespecífica por la vía alterna de complemento). Distinguiéndose de esta manera tres regiones: la porción C-terminal (altamente conservada), la región central (variable) y la región hipervariable Amino-terminal que es específica del serotipo M de *S. pyogenes*.<sup>10, 11, 22</sup>

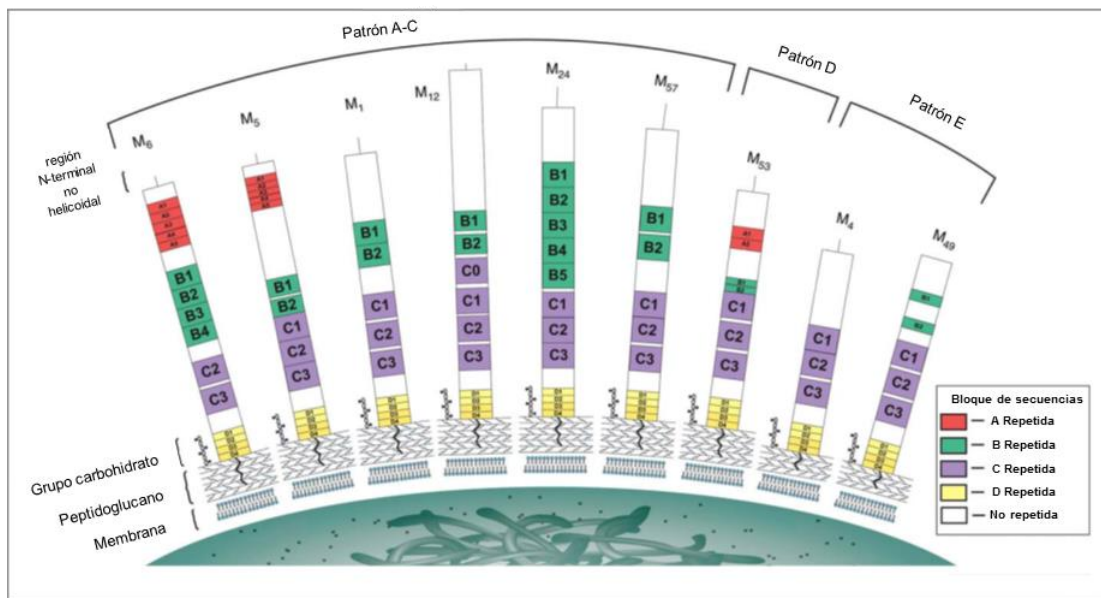


Figura 3. Representación esquemática de diferentes proteínas M maduras.<sup>22</sup>

Las principales funciones de la proteína M de *S. pyogenes* son: la capacidad de inhibir la fagocitosis en ausencia de anticuerpos opsonizantes, promover la adherencia al epitelio celular, la invasión intracelular y ayudar a la bacteria a superar la inmunidad innata del huésped para prevenir la activación del complemento.<sup>19, 23, 24</sup>

*S. pyogenes* puede ser tipificado con base a la variación de la proteína M dando más de 120 serotipos diferentes, identificados como tipo M (M1, M2, M3, etcétera).

La tipificación de la proteína M en *S. pyogenes* puede realizarse por métodos serológicos, aunque en la actualidad se utiliza una estrategia molecular que incluye la determinación de la secuencia o el análisis de los fragmentos de restricción de dicho gen del gen *emm* que codifica para la proteína M.<sup>25</sup>

El Laboratorio de Estreptococos de los CDC's con sede en Atlanta, EUA, estableció un protocolo de identificación del tipo M para cepas de *S. pyogenes*. A partir de la amplificación por la PCR del gen *emm*, se somete a una digestión enzimática con la endonucleasa *DdeI*. El número y tamaño de los fragmentos resultantes observados en el gel de agarosa, se relacionan con un tipo M específico, comparando con la cepa de referencia para el tipo M involucrado o se analiza la secuencia del gen *emm*.<sup>25</sup>

De esta forma se han podido establecer los tipos M más frecuentes asociados con enfermedades invasivas y no invasivas, esto se muestra en la tabla 2, donde se puede observar que las cepas del tipo M1 están asociadas principalmente a la faringitis, meningitis, fascitis necrosante y el síndrome de shock tóxico.<sup>26, 27, 28</sup>

Enfermedad	Tipos M asociados
No invasivas	
Faringitis	1, 3, 5, 6, 12, 14, 17, 19, 24
Impétigo	33, 41, 42, 52, 53, 70
Invasivas	
Sepsis puerperal	28
Meningitis	1, 12
Fascitis necrosante	1, 3, 28
Síndrome de shock tóxico	1, 3

Tabla 2. Tipos M de *S. pyogenes* asociados a enfermedades invasivas y no invasivas<sup>27, 28</sup>

Los tipos M1 y M12 de *S. pyogenes* son encontrados con mayor frecuencia en cepas invasivas, de acuerdo a lo reportado en distintos países, como se puede observar en la tabla 3.<sup>18, 29, 30, 31, 32, 33, 34</sup> Otras investigaciones de *S. pyogenes* muestran al serotipo M1 frecuentemente relacionado en casos de faringitis.<sup>35</sup>

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

Tabla 3. Frecuencias de los tipos M más prevalentes de cepas invasivas de *S. pyogenes* en estudios realizados en distintos países <sup>18, 29, 30, 31, 32, 33, 34</sup>

De tal manera que las cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 han sido tradicionalmente consideradas de importancia clínica por dos razones principales <sup>35</sup>:

- \* Primera: son responsables de causas frecuentes de enfermedades invasivas y no invasivas en seres humanos.
- \* Segunda: en los últimos años, hubo un aumento en la frecuencia y gravedad de infecciones producidas por esta bacteria a nivel intercontinental y M1 es uno de los serotipos asociados con esta variación de la enfermedad.

#### 5.5.1.2.3 Proteína de unión a fibronectina (Proteína F)

Es una glucoproteína situada en la superficie celular que promueve la entrada y colonización de *S. pyogenes* en las células humanas de piel y garganta, al favorecer la adherencia de la bacteria a la matriz extracelular de las células epiteliales humanas a través de la molécula de fibronectina. Esta proteína de superficie es codificada por el gen *prtF*.<sup>11, 20, 22, 36</sup>

#### 5.5.1.2.4 Inhibidor estreptocócico del complemento (SIC)

Es una proteína de 31kDa, codificada por el gen *sic* extracelular. Su presencia ayuda a la adherencia de la bacteria, favoreciendo la colonización en la mucosa e inhibiendo los componentes de la respuesta innata. Se une a C5b67 del complejo

de ataque de la membrana, afectando la función del complemento, inhibiendo así la lisis de las bacterias. Se encuentra principalmente en cepas del tipo M1.<sup>4, 23, 37</sup>

#### **5.5.1.2.5 Factor de Opacidad del Suero (SOF)**

Es una  $\alpha$ -lipoproteínasa extracelular capaz de opacificar los medios que contienen suero de mamífero, debido a que se une a la fibronectina y fibrinógeno. SOF es antigénico y tipo-específico contribuyendo a la invasión de células epiteliales. Se encuentra aproximadamente en el 50% de los tipos M de *S. pyogenes*.<sup>4, 38</sup>

### **5.5.2 Factores extracelulares**

Estos factores contribuyen a la invasión de tejidos y se asocian a cepas de *S. pyogenes* responsables de causar enfermedades como la fascitis necrosante y el síndrome del choque tóxico.<sup>19</sup>

#### **5.5.2.1 Enzimas**

La virulencia de algunas bacterias es facilitada por la producción de enzimas extracelulares, las funciones que pueden llevar a cabo son: promover su diseminación, interferir en la fagocitosis, inactivar antibióticos, inactivar anticuerpos y quimioatrayentes, entre otras.<sup>1, 17</sup>

##### **5.5.2.1.1 Estreptoquinasa**

También conocida como fibrinolisisina o estreptocinasa. Su función es hidrolizar los coágulos de fibrina y evitar la formación de las barreras de fibrina en la periferia de las lesiones estreptocócicas para favorecer su propagación.<sup>12</sup> Como resultado, la inflamación de los tejidos blandos por *S. pyogenes* es más difusa.<sup>4</sup>

##### **5.5.2.1.2 Hialuronidasa**

Su función es degradar el ácido hialurónico, sustancia fundamental del tejido conectivo del huésped. Esto conduce a la propagación de la infección, al ser un factor de diseminación a los tejidos adyacentes.<sup>4, 39</sup>

### **5.5.2.1.3 Desoxirribonucleasas (DNAsas)**

Son enzimas que actúan sobre el ácido desoxirribonucleico. Cuando se acumula DNA en las secreciones purulentas, produce un material viscoso que atrapa a las bacterias. Así las DNAsas actúan licuando dicho material, permitiendo la difusión de la bacteria. Se conocen cuatro tipos: A, B, C y D.<sup>39</sup>

### **5.5.2.1.4 Peptidasa de C5a**

Es una enzima de 125 kDa altamente específica que inhibe el factor C5a del complemento, interfiriendo en la quimiotaxis de los neutrófilos mediada por C5a.<sup>40</sup>

## **5.5.2.2 Toxinas**

*S. pyogenes* secreta toxinas que se difunden en el tejido circundante y a veces a nivel sistémico. Estas toxinas se unen a receptores celulares susceptibles en el huésped y desencadenan una respuesta inapropiada que contribuye a la patología clínica.<sup>41</sup>

### **5.5.2.2.1 Estreptolisina O**

Es una hemolisina que actúa sobre los eritrocitos, plaquetas y leucocitos humanos. Esta citotoxina forma poros transmembranales cuando se inserta en forma directa dentro de la membrana de las células. Es antigénica y se inactiva fácilmente con el oxígeno. Además es la principal toxina implicada en la fiebre reumática.<sup>1, 37, 42</sup>

### **5.5.2.2.2 Estreptolisina S**

Es una hemolisina que actúa sobre los eritrocitos, es soluble en suero, estable en presencia de oxígeno y no es inmunogénica. Es capaz de lisar eritrocitos, así como leucocitos y plaquetas tras contacto directo.<sup>39</sup>

### **5.5.2.2.3 Cistein-proteasa**

Es una proteína extracelular de 28 kDa altamente conservada que inicialmente se presenta como un zimógeno de 40 kDa, además se encuentra en todas las cepas



de *S. pyogenes*. Esta exotoxina se puede encontrar en tres variantes principales, *mSpeB1*, *mSpeB2* y *mSpeB3*.<sup>43</sup>

La exotoxina B estreptocócica escinde el precursor de la interleucina-1L y produce interleucina-1L biológicamente activa que media la inflamación y el choque toxico estreptocócico, contribuyendo a la liberación de citocinas. Facilita la diseminación bacteriana y la supervivencia, así como también induce inflamación durante las infecciones por *S. pyogenes*. Todas las cepas de *S. pyogenes* la producen, pero el grado de expresión varía de una cepa a otra. Está implicada en la patogénesis de la glomerulonefritis aguda post-estreptocócica.<sup>44, 45, 46, 47, 48</sup>

#### **5.5.2.2.4 Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (Spe)**

La mayoría de las cepas de *S. pyogenes* tienen la capacidad de producir una o más toxinas denominadas exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (Spe) debido a su capacidad para inducir fiebre.<sup>12</sup> Tienen pesos moleculares de 25 a 28 kDa y contienen sitios de unión a receptores de las células T y de unión a moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), así como un sitio de unión a zinc que media la unión de la exotoxina a las moléculas de clase II.<sup>4, 49</sup>

Las Spe son consideradas superantígenos, difieren en su especificidad de unión tanto en las cadenas de V $\beta$  de TCR como a las proteínas de CMH clase II, estas se reconocen como factores de virulencia importantes debido a su capacidad para inducir una respuesta inflamatoria exacerbada inespecífica en el huésped, debido a que estas moléculas son capaces de inducir proliferación de los linfocitos T del huésped, independientemente de su especificidad antigénica, al unirse a las moléculas de clase II del CMH. La activación de las células T por superantígenos bacterianos conduce a la liberación masiva de citocinas por monocitos y linfocitos humanos, tales como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF), interleucina-1, interleucina-6 e interferón  $\gamma$ , induciendo fiebre, daño tisular, falla multiorgánica y choque sistémico.<sup>4, 50, 51, 52</sup>

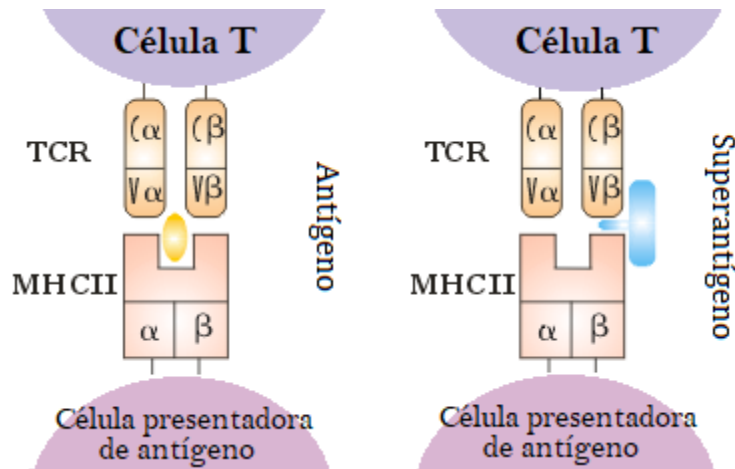


Figura 4.- Representación del reconocimiento de una molécula de clase II del CMH y un linfocito T mediada por un antígeno o superantígeno.<sup>4</sup>

En la última década, se hizo evidente el número de variantes (alelos) que existen para la mayoría de los genes que codifican superantígenos. Algunas de estas variantes han sido destacadas en publicaciones, mientras que otras solo se han registrado con la Base de Datos de Secuencia del Genoma (GenBank).

Entre estas exotoxinas, la proteína SpeA es responsable de la erupción en la fiebre escarlatina y también es uno de los principales factores de virulencia en la patogenia del Síndrome de choque tóxico estreptocócico.<sup>4</sup>

Un total de 11 superantígenos han sido identificados en *S. pyogenes*: exotoxina pirogénica estreptocócica (SPE): SpeA, SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, la exotoxina mitogénica estreptocócica (SME): SmeZ y un superantígeno estreptocócico: SSA. La mayoría de los genes que codifican para los superantígenos de *S. pyogenes* están asociados con bacteriófagos, a excepción de SpeG, SpeJ y SmeZ, estos se encuentran codificados a nivel cromosomal.<sup>46, 49, 52, 53, 54</sup>

### 5.5.2.3 Genes asociados a factores de virulencia

#### 5.5.2.3.1 *speA*

SpeA es una exotoxina pirogénica estreptocócica identificada en el año 1924, es codificada por el gen *speA* en el bacteriófago T12. SpeA está implicada en cuadros invasivos como la infección necrosante de tejidos blandos, la fiebre escarlatina y con el síndrome de shock tóxico provocado por *S. pyogenes* y *S. aureus*. Es un potente superantígeno que causa la proliferación de células T específicas portadoras de V $\beta$  con la consecuente liberación masiva de citoquinas que afectan de forma sistémica al individuo.<sup>35, 55, 56, 57</sup> Se han identificado cinco variantes alélicas del gen *speA*, entre las cuales el alelo *speA1* está distribuido en varias líneas clonales, el alelo *speA2* se encuentra constantemente en aislamientos del tipo M1 y *speA3* en aislamientos del tipo M3.<sup>58, 59</sup>

Este gen es encontrado principalmente en cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 y M3, asociadas a enfermedades invasivas. Adicionalmente la falta de la inmunidad hacia esta toxina se relaciona con cuadros clínicos más severos en el paciente.<sup>58</sup>

Un estudio del investigador Schlievert demostró que la vacuna experimental de SpeA es efectiva para proteger a los conejos de todos los síntomas de TSS, incluida la fascitis necrosante. Esto sugiere que aunque SpeA no es el único factor involucrado en el desarrollo de estas enfermedades, la inmunidad contra esta toxina es suficiente para evitar la invasión bacteriana en los tejidos más profundos. Sin embargo, se continúa la investigación de estas vacunas para su uso en humanos y así evitar complicaciones graves provocadas por *S. pyogenes*.<sup>60</sup>

#### 5.5.2.3.2 *speC*

Este gen codifica para la exotoxina SpeC, fue identificado en el año de 1960, tiene un tamaño de 24,354 pb. Se encuentra en un bacteriófago lisógeno integrado al genoma de *S. pyogenes*. Además se han descrito cinco alelos para el gen *speC* (*speC1* – *speC5*). SpeC representa la exotoxina más encontrada en cepas de *S. pyogenes* en diversos aislamientos clínicos. El gen *speC* se asocia

frecuentemente con cepas de serotipo M2, M4 y M6 y con menor frecuencia en cepas de serotipo M1, M3 y M49.<sup>11, 61, 62</sup>

#### **5.5.2.3.3 *speG***

Es un gen que se encuentra en el cromosoma bacteriano, codifica para la exotoxina SpeG. Sin embargo, hay estudios de aislamientos de *S. pyogenes* del tipo M4 y M77 que carecen del gen *speG*. Fue identificado mediante screening de la base genómica del tipo M1 en la Universidad de Oklahoma. Se ha encontrado que el gen *speG* es más prevalente en aislamientos no invasivos que en aislamientos de enfermedades invasivas, según un estudio de Japón.<sup>58, 63</sup>

#### **5.5.2.3.4 *speH* y *speI***

Los genes *speH* y *speI* codifican para las exotoxinas SpeH y SpeI respectivamente. Se localizan en el fago 370.2, por lo cual se considera que se encuentran juntos. En cepas de *S. pyogenes* estos genes se presentan con una frecuencia similar. Además, *speH* y *speI* poseen actividades superantigénicas con diferentes potenciales sobre subpoblaciones de células T.<sup>9, 58, 64</sup>

#### **5.5.2.3.5 *speJ***

El gen *speJ* fue identificado también en la Universidad de Oklahoma por el análisis de la secuencia del genoma de M1, codifica para la exotoxina SpeJ, se encuentra a nivel cromosomal y se considera que está presente en todas las cepas de *S. pyogenes*. Sin embargo, el gen *speJ* parece estar localizado en una región genómica inestable por lo que puede estar ausente en aislamientos de *S. pyogenes* de diversos linajes como se ha demostrado.<sup>33, 34</sup>

#### **5.5.2.3.6 *speK***

Este gen fue identificado en la secuencia genómica de la cepa MGAS315 del tipo M3 en el fago 315.4. La exotoxina *speK* muestra una actividad pirogénica y letalidad semejante a la toxina SpeA del síndrome de shock tóxico.<sup>65</sup>

#### **5.5.2.3.7 *speL***

El gen *speL* codifica para la exotoxina SpeL, se identificó en Japón mediante el análisis de las secuencias genómicas en cepas del serotipo M3 como parte del fago temperado  $\Phi$ NIH1.1. También ha sido encontrado en cepas del tipo M4, M22 y M89, de los cuales las cepas M89 fueron asociadas con fiebre reumática.<sup>64, 66</sup>

#### **5.5.2.3.8 *speM***

El gen *speM* codifica para la exotoxina SpeM, está localizado adyacente al gen *speL* en un fago en la cepa M18. Estos genes no siempre son identificados juntos. En una investigación realizada en Alemania entre 1997 y 2003 utilizando cepas de *S. pyogenes* se mostró que el gen *speM* se encontraba comúnmente en aislamientos de enfermedades invasivas en comparación con aislados no invasivos.<sup>34</sup>

#### **5.5.2.3.9 *ssa***

Este gen codifica para la exotoxina SSA fue descubierto por Mollick a principios del año 1990. Estudios previos demostraron que el gen *ssa* está ampliamente distribuido en *S. pyogenes* y encontrado en aproximadamente 12.5% de 80 linajes clonales distintos.<sup>67</sup> Se han identificado tres alelos de este gen en *S. pyogenes* (*ssa-1*, *ssa-2* y *ssa-3*), los cuales difieren por una sola sustitución en el codón 94. Cada uno de estos alelos está presente en clonas filogenéticamente diferentes que no han compartido un ancestro común reciente.<sup>58, 68</sup>

#### **5.5.2.3.10 *smeZ***

La exotoxina mitogénica estreptocócica Z (SmeZ) es un superantígeno descubierto originalmente por Kamezawa, con una potente actividad mitogénica. Es codificada por el gen *smeZ* que posee un alto grado de polimorfismo al tener aproximadamente 50 variantes alélicas, entre las cuales se han descubierto algunas no funcionales como: *smeZ6*, *smeZ19*, *smeZ23*, *smeZ31* y *smeZ59N*. Tiene un alto potencial de virulencia en TSS, donde la variante alélica más potente es *smeZ-2*.<sup>58, 69, 70</sup>

## 5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR es una técnica de Biología Molecular desarrollada por el Bioquímico Kary Mullis en la década de los ochenta. Su objetivo es obtener un gran número de copias idénticas de un fragmento de DNA original, como producto de amplificación.<sup>79</sup>

La técnica se fundamenta en la función de la DNA polimerasa para replicar las moléculas de DNA en condiciones cambiantes de temperatura separando las hebras recién formadas después de cada fase de replicación, permitiendo la unión de la polimerasa para un nuevo ciclo de replicación. Cada ensayo de la PCR requiere la presencia de DNA molde, primers, nucleótidos y DNA polimerasa.<sup>65, 66</sup>

La PCR consiste en 3 fases, estas se pueden observar en la figura 5 <sup>7, 72</sup>:

**I. FASE INICIAL:** Un ciclo en el cual se desnaturaliza el DNA a una temperatura de 94°C, durante 5 minutos.

**II. FASE DE REACCIÓN:** Son 30 ciclos, cada uno consta de 3 etapas:

- *Desnaturalización:* se abren las cadenas de la molécula de DNA a una temperatura de 94°C durante 50 segundos, debido a que es necesaria la separación de estas para que los primers puedan acceder a sus secuencias complementarias y unirse a ellas en la siguiente fase.

- *Alineamiento:* durante esta fase los primers se unen a su secuencia complementaria en el DNA molde. La temperatura varía dependiendo del gen que se desee amplificar.

- *Elongación:* los primers que se han unido a la cadena de DNA molde sirven como cebadores para que actúe la enzima Taq polimerasa e inicie la amplificación del segmento del gen deseado usando los desoxinucleótidos, esta etapa se realiza a una temperatura de 72°C durante un minuto con 20 segundos.

**III. FASE FINAL:** Un ciclo a 72°C durante 7 minutos para favorecer el complemento de la cadena del gen amplificado. Después se disminuye la temperatura a 4°C para finalizar la reacción.

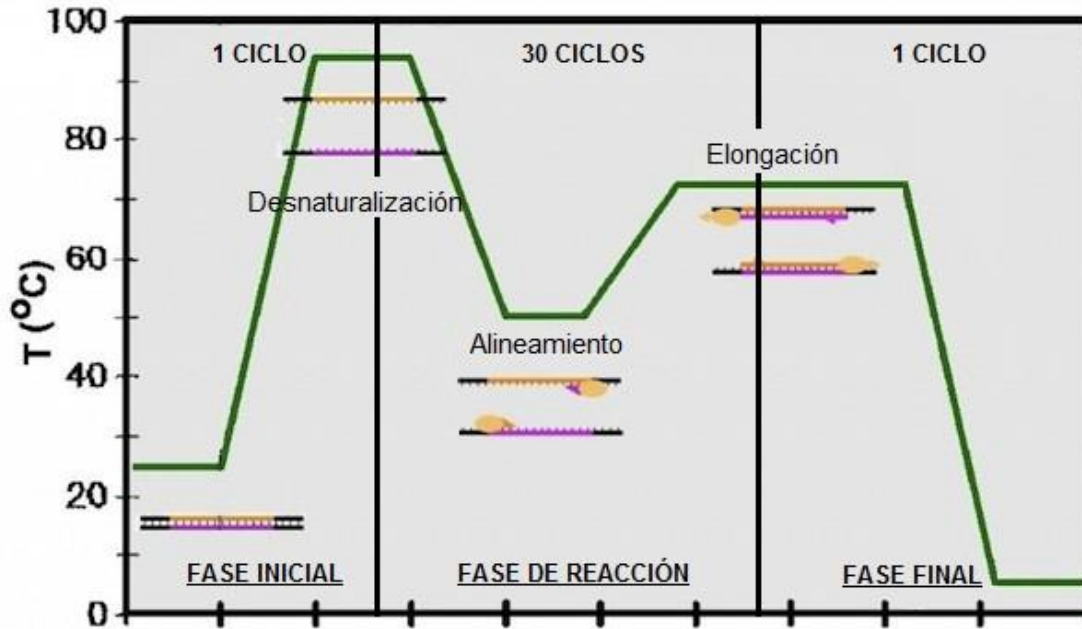


Figura 5: Esquema de PCR utilizada para amplificar fragmentos de DNA. <sup>66</sup>

Hay dos métodos principales para visualizar los productos de PCR <sup>65</sup>:

- 1) Tinción del producto de DNA amplificado con un colorante como Bromuro de Etidio, que se intercala entre las dos cadenas.
- 2) Marcando los primers o nucleótidos de la PCR con colorantes fluorescentes antes de la amplificación.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Reactivos y equipos utilizados

Reactivos
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>PARA EXTRACCIÓN DE DNA</b></li><li>• Buffer de Lisis</li><li>• Etanol absoluto a 4°C</li><li>• Kit de extracción DNeasy Tissue Kit (250) de QIAGEN® (incluye: Proteinasa K, AE, AL, AW1 y AW2)</li><li>• Lisozima Egg White Grado Ultrapuro Amresco® 20mg/ml</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>PARA PCR</b></li><li>• Agua Ultrapura SIGMA®</li><li>• Buffer A 10X Vivantis®</li><li>• Buffer S 10X con MgCl<sub>2</sub> 17.5mM Vivantis®</li><li>• dNTP's 1.25mM Fermentas®</li><li>• MgCl<sub>2</sub> 50mM Vivantis®</li><li>• 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.</li><li>• Dimetilsulfóxido (DMSO) Grado Molecular (1-10%) SIGMA®.</li><li>• Taq DNA polymerase 500U (5U/µL) Vivantis®.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>PARA ELECTROFORESIS</b></li><li>• Agarosa Ultrapure™ Invitrogen®</li><li>• Bromuro de Etidio 10 mg/mL Research Organics®</li><li>• Buffer TBE 0.5X</li><li>• GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder (0.5µg/µL) Fermentas®</li></ul>
Equipo
<ul style="list-style-type: none"><li>• Balanza digital CS 200 Ohaus®</li><li>• Cámara de Electroforesis Mini Sub-Cell GT (Bio-rad)®</li><li>• Cámara digital DC290 Kodak</li><li>• Centrifuga 1-15 Sigma®</li><li>• Horno de Microondas Panasonic</li><li>• Incubadora Inkubador 100 Heidolph Instruments®</li><li>• Lámpara de luz UV Lab-Tech®</li><li>• Termociclador 9700 Applied Biosystems®</li><li>• Software Kodak 1D 3.5v</li><li>• Vortex Genie2 (Scientific Industries)®</li><li>• Block Heater Lab-Line®</li><li>• Pipetas y puntas Axygen®</li><li>• Jarras de anaerobiosis Oxoid®</li><li>• Fuente de poder Power 300 BIORAD®</li></ul>
Medios de cultivo
<ul style="list-style-type: none"><li>• Base de Agar Sangre (AS) BBL™</li><li>• Caldo Infusión de Cerebro Corazón (BHI) Bioxon®</li><li>• Caldo Todd-Hewitt (TH) Bacto™</li><li>• Glicerol</li></ul>

### 6.2 Selección de cepas

De más de 2800 cepas de *Streptococcus* β-hemolíticos colectadas de diversos hospitales de México desde el año 2000 en el Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Salud Pública, Torre de Investigación de la Facultad de Medicina Ciudad Universitaria, se eligieron 140 cepas de *S. pyogenes* aisladas de muestras faríngeas e identificadas como tipo M1, por corte enzimático con *DdeI* y secuenciación del gen *emm*.



### 6.3 Controles (Cepas del Laboratorio de Biología Molecular y de Referencia del CDC)

Los controles utilizados en la PCR de cada gen se mencionan en la tabla 4, incluyendo los que se encuentran en el Laboratorio de Biología Molecular y la cepa de referencia proveniente del CDC, el cual corresponde a *S. pyogenes* del tipo M1.

# CEPA CONTROL	TIPO M	GEN
91	M1	<i>sic</i>
157	M12	<i>speH y spel</i>
238	M59	<i>sof</i>
274	M1	<i>speH y spel</i>
819	M1	<i>smeZ, speJ, speG</i>
968	M75	<i>speL, speK, speM</i>
988	M1	<i>smeZ, speJ, speG</i>
1029	M28	<i>prtF</i>
1144	M12	<i>speH y spel</i>
1167	M12	<i>prtF</i>
2670	M3	<i>speA y speC</i>
2759	M89	<i>ssa</i>
2779	M12	<i>speC</i>
2888	M89	<i>speB</i>
SS745	M1	<i>speA, speB, smeZ, speG, speJ, sic</i> (Cepa de Referencia CDC)

Tabla 4. Cepas utilizadas como controles y de referencia para cada gen de interés.

### 6.4 Extracción de DNA

La extracción del DNA de las cepas seleccionadas se realizó utilizando el Kit Comercial de DNeasy Tissue (Qiagen®) con el siguiente procedimiento:

Las cepas de *S. pyogenes* que se encontraban conservadas en caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI) con glicerol al 15% a -70°C se sembraron por aislamiento en medio de Agar Sangre (AS), incubándolas por 24 horas a una temperatura de 37°C. Al obtener colonias aisladas y puras, se tomaron 5 de ellas y se inocularon en 2mL de caldo Todd-Hewitt (TH), incubando a 37°C en agitación durante 24 horas (Inkubador 100) y ajustando a una concentración bacteriana de aproximadamente  $2 \times 10^9$  cel/mL.

Se transfirió 1mL del caldo bacteriano en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y conservando el paquete bacteriano, al cual se le agregó 180 µL de buffer de lisis más lisozima a una concentración final de 20 mg/mL. Se resuspendió por agitación en el vórtex GENIE-2 (Scientific Industries) e incubó durante 30 minutos a 37°C.

Se adicionó 25 µL de proteinasa K (600 mAU/mL) y 200 µL de Buffer AL (lisis), dejando incubar a 70°C durante 30 minutos, posteriormente se agregó 200 µL de etanol absoluto frío y se agitó con vórtex. Toda la mezcla fue transferida a la columna de extracción y centrifugada (Sigma®) a 8000 rpm durante 1 minuto. Para el primer lavado se agregó a la columna 500 µL de Buffer AW1 y centrifugando a 8000rpm por 1 minuto, descartando el sobrenadante y un segundo lavado con 500 µL de Buffer AW2 centrifugando a 12000 rpm durante 3 minutos. La columna de extracción se colocó dentro de un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 mL, finalmente se añadió a la columna 200 µL de Buffer AE (elución), dejando incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se colectó el DNA en el tubo y se conservó a 4°C.

Para valorar la calidad y cantidad de DNA obtenido, se cargó 3 µl de muestra de DNA en un gel de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio a una concentración final de 2µg/ml, utilizando una cámara de electroforesis (Mini Sub-Cell GT, Bio-rad) con Buffer TBE 0.5X. Se corrió a 80 volts durante 30 minutos. Para observar las bandas de DNA en el gel se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta (Lab-Tech).

### **6.5 Estandarización y amplificación de los genes de virulencia por PCR**

A cada una de las muestras de DNA se hizo la búsqueda de los 15 genes de interés: *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *prtF*, *ssa*, *smeZ*, *sic* y *sof*, utilizando la técnica de PCR.

Los primers utilizados para amplificar los genes de virulencia de interés se describen en la tabla 5.

Genes	Secuencia del primer	Tamaño del producto de PCR (pb)	Referencia
<i>speB</i>	F GTT GTC AGT GCA ACT AAC CGT R ATC TGT GTC TGA TGG ATA GCT T	1700	75
<i>prtF</i>	F GGG GGG TAC CTT TTC AGG AAA TAT GGT TGA GAC A R GGG GGG AAG CTT TCG CCG TTT CAC TGA AAC CAC TCA	200-600	36
<i>speA</i>	F ATG GAA AAC AAA AAA GTA TTG R TTA CTT GGT GTT AGG TAG CTT C	700	73
<i>speC</i>	F ACC TAT CAT CAA AGT GAC TAT AAG AAA GAC R CCC TTC ATT TGG TGA GTC AAA TAA GTC TAT TTG A	550	43
<i>speH</i>	F TCT ATC TGC ACA AGA GGT TTG TGA ATG TCC A R GCA TGC TAT TAA AGT CTC CAT TGC CAA AA	340	74
<i>speI</i>	F AAG GAA AAA TAA ATG AAG GTC CGC CAT R TCG CTT AAA GTA ATA CCT CCA TAT GAA TTC TTT	216	74
<i>sic</i>	F TAA GGA GAG GTC ACA AAC TA R TTA CGT TGC TGA TGG TGT AT	900	73
<i>sof</i>	F GTA TAA ACT TAG AAA GTT ATC TGT AGG R GGC CAT AAC ATC GGC ACC TTC GTC AAT T	600	76
<i>smeZ</i>	F GAA GTA GAT AAT AAT TCC CTT AGG R AGT CAA TTT CTA TAT CTA AAT GCC C	600	67
<i>speJ</i>	F GTT ATA ATA ATC TTT CAT GGG TAC GG R CTT TCA TGT TTA TTG CCA TTG ATC GC	540	67
<i>speG</i>	F GCT ATG GAA GTC AAT TAG CTT ATG CAG AT R TTA TGC GAA CAG CCT CAG AGG	400	74
<i>ssa</i>	F GTG CAC AAT TAT TAT CGA TTA GTG R GGT GAA CCT CTA TAG CTA TAG CTG AAG	722	67
<i>speL</i>	F TTA GGA TGG TTT CTG CGG AAG AGA C R TTC CTC TTT CTC GCC TGA GCC GTG	600	67
<i>speM</i>	F CTC TTT TAG CGG TAT CTG TTC R TGT GTA TCG CTT GCT CTA T	400	*
<i>speK</i>	F TAT CGC TTG CTC TAT ACA CTA CTG AGA GT R CCA AAC TGT AGT ATT TTC ATC CGT ATT AAA	230	74

Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación de los genes de virulencia estudiados.

\* Diseñado en Primer Select basado en la cepa MGAS8232

Se realizó la reacción de la PCR individual para los genes *speB* y *prtF*, tabla 6 y 7. PCR dual para los genes *speA/speC*, *speH/speI* y *sic/sof*, tabla 8, 9 y 10, respectivamente. PCR múltiple para los genes *smeZ/speJ/speG* y otra para *ssa/speL/speM/speK*, tabla 11 y 12 correspondientemente.

Reactivos	Volumen $\mu\text{L}$ (Volumen total 15 $\mu\text{L}$ )
Buffer S 10X con $\text{MgCl}_2$ (Vivantis) ®	1.5
dNTP's 1.25mM (Fermentas) ®	2.5
Primer <i>speB</i> (F) 10mM	0.5
Primer <i>speB</i> (R) 10mM	0.5
Taq polimerasas 5U/ $\mu\text{L}$ (Vivantis) ®	0.06
DMSO (Sigma) ®	0.15
$\text{H}_2\text{O}$ ultrapura (Sigma) ®	8.79
DNA	1.0

Tabla 6. Mezcla de reactivos para amplificar el gen *speB*

Reactivos	Volumen $\mu\text{L}$ (Volumen total 15 $\mu\text{L}$ )
Buffer A 10X (Vivantis) ®	1.5
dNTP's 1.25mM (Fermentas) ®	3.0
$\text{MgCl}_2$ 50mM (Vivantis) ®	1.5
Primer <i>prtF</i> (F) 10mM	0.5
Primer <i>prtF</i> (R) 10mM	0.5
Taq polimerasas 5U/ $\mu\text{L}$ (Vivantis) ®	0.08
DMSO (Sigma) ®	0.15
$\text{H}_2\text{O}$ ultrapura (Sigma) ®	6.77
DNA	1.0

Tabla 7. Mezcla de reactivos para amplificar el gen *prtF*

Reactivos	Volumen $\mu\text{L}$ (Volumen total 15 $\mu\text{L}$ )
Buffer S 10X con $\text{MgCl}_2$ (Vivantis) ®	1.5
dNTP's 1.25mM (Fermentas) ®	3.0
Primer <i>speA</i> (F) 10mM	0.3
Primer <i>speA</i> (R) 10mM	0.3
Primer <i>speC</i> (F) 10mM	0.3
Primer <i>speC</i> (R) 10mM	0.3
Taq polimerasas 5U/ $\mu\text{L}$ (Vivantis) ®	0.06
$\text{H}_2\text{O}$ ultrapura (Sigma) ®	8.24
DNA	1.0

Tabla 8. Mezcla de reactivos para amplificar los genes *speA/speC*

Reactivos	Volumen $\mu\text{L}$ (Volumen total 15 $\mu\text{L}$ )
Buffer S 10X con $\text{MgCl}_2$ (Vivantis) ®	1.5
dNTP's 1.25mM (Fermentas) ®	2.5
Primer <i>speH</i> (F) 10mM	0.4
Primer <i>speH</i> (R) 10mM	0.4
Primer <i>speI</i> (F) 10mM	0.4
Primer <i>speI</i> (R) 10mM	0.4
Taq polimerasas 5U/ $\mu\text{L}$ (Vivantis) ®	0.1
H <sub>2</sub> O ultrapura (Sigma) ®	8.3
DNA	1.0

Tabla 9. Mezcla de reactivos para amplificar los genes *speH/speI*

Reactivos	Volumen $\mu\text{L}$ (Volumen total 15 $\mu\text{L}$ )
Buffer A 10X (Vivantis) ®	1.5
dNTP's 1.25mM (Fermentas) ®	3.0
$\text{MgCl}_2$ 50mM (Vivantis) ®	1.5
Primer <i>sic</i> (F) 10mM	0.4
Primer <i>sic</i> (R) 10mM	0.4
Primer <i>sof</i> (F) 10mM	0.4
Primer <i>sof</i> (R) 10mM	0.4
Taq polimerasas 5U/ $\mu\text{L}$ (Vivantis) ®	0.06
H <sub>2</sub> O ultrapura (Sigma) ®	6.34
DNA	1.0

Tabla 10. Mezcla de reactivos para amplificar los genes *sic/sof*

Reactivos	Volumen $\mu\text{L}$ (Volumen total 15 $\mu\text{L}$ )
Buffer A 10X (Vivantis) ®	1.5
dNTP's 1.25mM (Fermentas) ®	4.0
$\text{MgCl}_2$ 50mM (Vivantis) ®	1.5
Primer <i>smeZ</i> (F) 10mM	0.35
Primer <i>smeZ</i> (R) 10mM	0.35
Primer <i>speJ</i> (F) 10mM	0.35
Primer <i>speJ</i> (R) 10mM	0.35
Primer <i>speG</i> (F) 10mM	0.35
Primer <i>speG</i> (R) 10mM	0.35
Taq polimerasas 5U/ $\mu\text{L}$ (Vivantis) ®	0.1
H <sub>2</sub> O ultrapura (Sigma) ®	4.8
DNA	1.0

Tabla 11. Mezcla de reactivos para amplificar los genes *smeZ/speJ/speG*

Reactivos	Volumen $\mu\text{L}$ (Volumen total 15 $\mu\text{L}$ )
Buffer S 10X con $\text{MgCl}_2$ (Vivantis) ®	1.5
dNTP's 1.25mM (Fermentas) ®	3.5
Primer <i>ssa</i> (F) 10mM	0.4
Primer <i>ssa</i> (R) 10mM	0.4
Primer <i>speL</i> (F) 10mM	0.4
Primer <i>speL</i> (R) 10mM	0.4
Primer <i>speM</i> (F) 10mM	0.4
Primer <i>speM</i> (R) 10mM	0.4
Primer <i>speK</i> (F) 10mM	0.4
Primer <i>speK</i> (R) 10mM	0.4
Taq polimerasas 5U/ $\mu\text{L}$ (Vivantis) ®	0.1
$\text{H}_2\text{O}$ ultrapura (Sigma) ®	5.7
DNA	1.0

Tabla 12. Mezcla de reactivos para amplificar los genes *speK*/*speL*/*speM*/*ssa*

Realizada la mezcla de reactivos con los DNAs de cada una de las cepas estudiadas, se colocaron los tubos de cada muestra en el Termociclador (9700 Applied Biosystems®) para llevar a cabo la amplificación del gen de interés. Las condiciones de reacción se indican en la tabla 13.

Fase Inicial	Fase de reacción (30 ciclos)	Fase final
<b>Condiciones de las fases de reacción de la PCR del gen <i>prtF</i></b>		
<b>1 CICLO</b>	<b>30 CICLOS</b>	<b>1 CICLO</b>
94°C por 5'	94°C por 50" 60°C por 50" 72°C por 1'20"	72°C por 7'
<b>Condiciones de las fases de reacción de la PCR de los genes <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>, <i>sic</i> y <i>sof</i>.</b>		
<b>1 CICLO</b>	<b>30 CICLOS</b>	<b>1 CICLO</b>
94°C por 5'	94°C por 50" 47°C por 50" 72°C por 1'20"	72°C por 7'

Tabla 13. Condiciones de las fases de la técnica de la PCR para la amplificación de los genes investigados.

## **6.6 Identificación de los productos de PCR**

Para observar la amplificación de los genes de interés se realizó una electroforesis, usando gel de agarosa al 1.7% con Bromuro de Etidio (10 mg/mL), agregando 2  $\mu$ L por cada 100 mL de agarosa. Se cargó en cada pozo del gel 5  $\mu$ L de cada producto obtenido de la reacción de PCR, 5  $\mu$ L de la muestra control y 3  $\mu$ L del marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). El gel se introdujo en la cámara de electroforesis la cual contenía Buffer TBE 0.5X. Se corrió a 90V durante 45 minutos. El gel se colocó en un transiluminador de luz UV para observar e identificar las bandas presentes de acuerdo al peso molecular esperado para cada gen.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

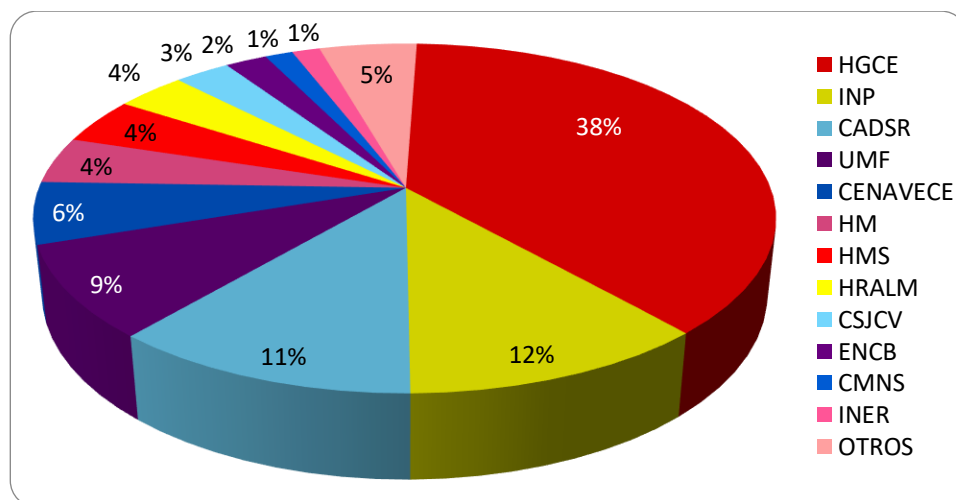
### 7.1 Cepas clínicas de exudado faríngeo EGA tipo M1 y su origen

Se eligieron 140 cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 aisladas de muestras faríngeas, la distribución de su procedencia se indica en la tabla 14.

Instituciones de Salud	Número de cepas de <i>S. pyogenes</i> tipo M1
Hospital "Gonzalo Castañeda Escobar" ISSSTE (HGCE)	53
Instituto Nacional de Pediatría (INP)	16
Centro de Apoyo Diagnóstico San Rafael ISSSTE (CADSR)	16
Unidad de Medicina Familiar 92 IMSS (UMF)	12
Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE)	8
Hospital Monterrey (HM)	6
Hospital Médica Sur (HMS)	6
Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos" ISSSTE (HRALM)	5
Centro de Salud "Dr. José Castro Villagrana" (CSJCV)	4
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB)	3
Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNS)	2
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria (INER)	2
Otros	7

Tabla 14. Instituciones de salud y su número de cepas de *S. pyogenes* tipo M1 seleccionadas

En la gráfica 1 se observa que la mayoría de las muestras seleccionadas provienen del Hospital "Gonzalo Castañeda Escobar" ISSSTE al aportar 53 cepas, seguidas del Instituto Nacional de Pediatría y el Centro de Apoyo Diagnóstico "San Rafael" ISSSTE, cada una con 16 cepas. Estas tres Instituciones representan a más del 60% de las cepas analizadas.



Gráfica1. Distribución de las cepas faríngeas de *S. pyogenes* del tipo M1 de acuerdo a la fuente de la Institución de Salud.



## 7.2 Extracción de DNA

Para verificar la pureza del DNA extraído de cada una de las cepas estudiadas con el Kit DNeasy Tissue de QIAGEN®, se realizó una electroforesis con agarosa al 1%, un ejemplo del resultado de una buena extracción se puede observar en la figura 6. Después de comprobar la pureza del DNA se realizaron las reacciones de la PCR para identificar los genes de virulencias presentes en cada cepa.

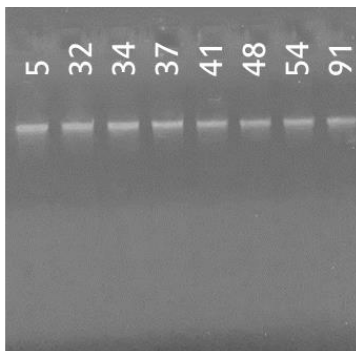


Figura 6. Gel de agarosa al 1% con DNA extraído de 8 cepas de *S. pyogenes*, usando el Kit DNeasy Tissue de QIAGEN®. Los números indican la clave de la cepa utilizada.

## 7.3 Frecuencia de genes asociados a la de virulencia de *S. pyogenes* tipo M1

En la tabla 15 se muestra la frecuencia de los 15 genes de virulencia identificados por medio de la técnica de la PCR individual, dual o múltiple en las 140 cepas de *S. pyogenes* analizadas. Se puede observar que los genes *speB*, *speG*, *speJ*, *smeZ* y *sic* se detectaron en el 100% de las cepas, mientras que el gen *speM* tuvo una frecuencia del 86.4%. En contraste, los genes *speL*, *ssa* y *sof* no fueron detectados en los aislamientos estudiados. Los genes *speH* y *speI*, se identificaron en un 20%; los genes *speC*, *speK*, *prtF* se encontraron en menos del 8.6%. Finalmente el gen *speA* tuvo una frecuencia del 86.4%, siendo este un factor de virulencia importante, debido a su reconocida participación en cuadros de fiebre escarlatina, fascitis necrosante y síndrome de choque tóxico.

Gen identificado	Aislamientos positivos	% Frecuencia
<i>prtF</i>	3	2.1
<i>speA</i>	121	86.4
<i>speB</i>	140	100
<i>speC</i>	12	8.6
<i>speG</i>	140	100
<i>speH</i>	28	20
<i>speI</i>	28	20
<i>speJ</i>	140	100
<i>speK</i>	3	2.1
<i>speL</i>	0	0
<i>speM</i>	122	87.1
<i>ssa</i>	0	0
<i>smeZ</i>	140	100
<i>sic</i>	140	100
<i>sof</i>	0	0

Tabla 15. Frecuencias de los genes asociados a factores de virulencia en 140 aislamientos de *S. pyogenes* M1.

### 7.3.1 Gen *prtF*

El gen *prtF* sólo se detectó en 3 cepas de *S. pyogenes* del tipo M1. En la figura 7 se puede observar que los productos de PCR para el gen *prtF* tienen diferente tamaño (pb), las cepas control #1029 y #1167, tienen un peso molecular de 250 pb y 500 pb respectivamente, la cepa positiva #731 posee un tamaño de 500 pb. Se ha reportado que este gen puede tener diferentes pesos moleculares ya que varía en el número de repeticiones en la región que codifican para el dominio RD2 de unión a fibronectina.<sup>36</sup>

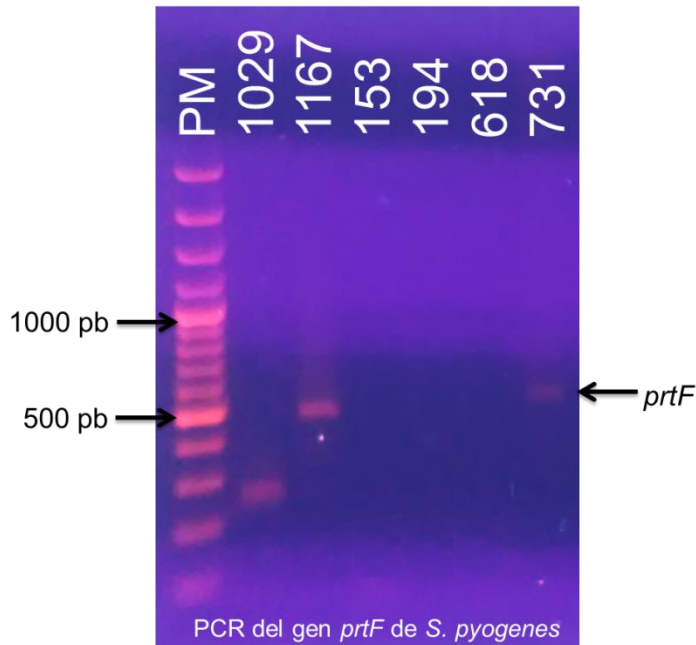


Figura 7. Gel de agarosa al 1.7% con los productos amplificados del gen *prtF*. Las cepas #1029 y #1167 son controles positivos para el gen, PM=Marcador de peso molecular 100 pb.

Las otras cepas en las que se detectó este gen, #197 y #734, mostraron un peso molecular de 500 pb. Además provenían de diferentes Instituciones de Salud: #197 del HRALM, #731 de CMNS y #734 del HGCE.

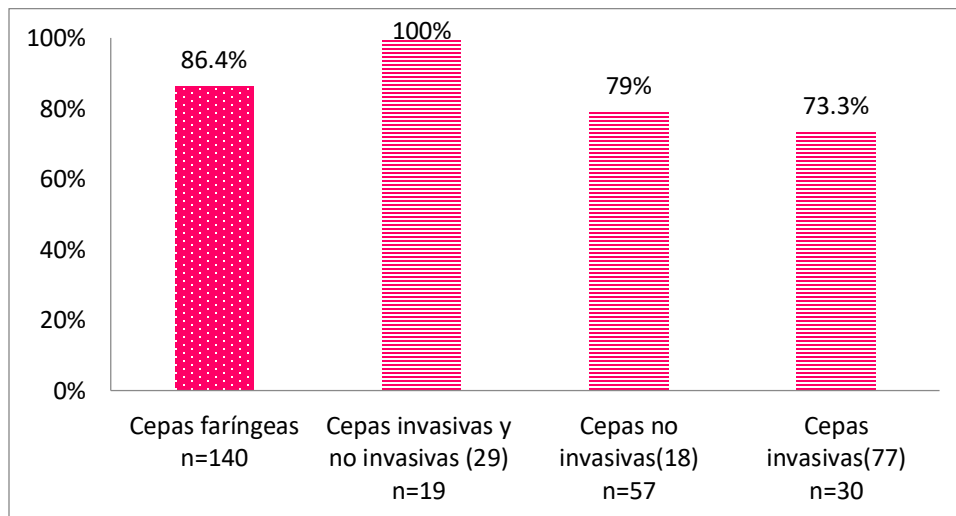
Cabe mencionar que en ningún estudio previo se había reportado la presencia del gen *prtF* en aislamientos del tipo M1, lo cual demuestra que este tipo M sí puede presentar este gen que se asocia a la adherencia e invasión celular. Lo anterior hace que estos 3 aislamientos del tipo M1 tengan que ser investigados a mayor profundidad para conocer el origen filogenético de los mismos, ya que los tres aislamientos tienen perfiles diferentes entre sí, por la presencia o ausencia de los genes *speA*, *speC*, *speH*, *speI* y *speM*.<sup>36, 77</sup>

### 7.3.2 Gen *speA* y *speC*

El gen *speA* se detectó en 121 cepas del tipo M1 de *S. pyogenes*, este factor de virulencia se encuentra en el fago T12, por lo cual en algunos aislamientos no se encuentra este gen, existiendo frecuencias variables entre las bacterias del tipo M1. El gen *speA* tiene importancia clínica, debido a que las cepas que lo producen están relacionadas con el síndrome de choque tóxico, la fiebre escarlatina y otras

enfermedades severas, siendo los tipos M1 y M3 de *S. pyogenes* quienes principalmente las producen. Estudios recientes han evidenciado la existencia de distintos alelos del gen *speA* e incluso se ha relacionado la presencia de algunos de ellos, específicamente *speA2* y *speA3*, en cepas responsables de los cuadros clínicos más severos. Mientras que la detección del gen *speA* en cepas provenientes de cuadros no invasivos podría indicar diferencias genéticas entre las cepas, dadas por la presencia de alelos del gen *speA* distintos a los relacionados con cuadros severos.<sup>56, 78, 79</sup>

En la gráfica 2 se compara la frecuencia del gen *speA* de esta investigación con otros trabajos previamente reportados de cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 en casos invasivos y no invasivos. Se puede observar que las frecuencias del gen *speA* son similares, independientemente del origen clínico de la cepa y del número de muestras, presentándose en una frecuencia mayor al 70%.



Gráfica 2. Comparación de la frecuencia del gen *speA* en cepas de *S. pyogenes* del tipo M1, utilizando resultados ya publicados.<sup>18, 29, 77</sup>

La frecuencia del gen *speC* fue del 8.6%, identificándose sólo en 12 cepas. No se encontró este gen en todas las cepas del tipo M1 debido a que está a nivel de fagos, al igual que el gen *speA*. En la figura 8 se observa un ejemplo de la amplificación del gen *speA* y del gen *speC*, los cuales tienen un tamaño aproximado de 700 pb y 550 pb, correspondientemente.

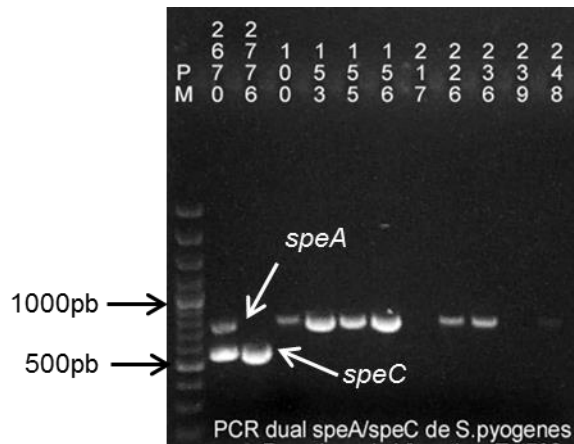
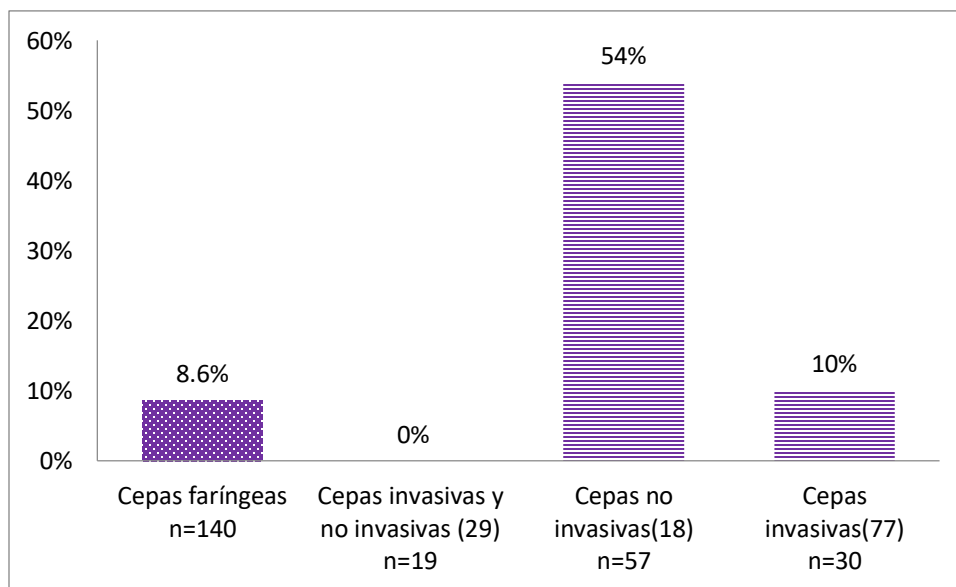


Figura 8. Gel de agarosa al 1.7% con los productos de amplificación de los genes *speA* (700 pb) y *speC* (550 pb). La cepa #2670 es control para ambos genes y la cepa #2776 para *speC*, PM=Marcador de peso molecular 100 pb.

En la gráfica 3 se muestra una comparación de la frecuencia del gen *speC*, con otros trabajos de investigación. Se observa diferencia entre los estudios comparados, lo que puede deberse a que el gen *speC* se localiza en fagos y a que varía el número de cepas analizadas.



Gráfica 3. Comparación de la frecuencia del gen *speC* en cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 con estudios ya publicados.<sup>18, 29, 77</sup>

De acuerdo a lo reportado previamente, es común que las cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 presenten alguno de los dos genes, siendo raras aquellas que tienen ambos genes y aún más raras las que no tienen alguno. En la gráfica 2 y 3 no se

puede realizar este análisis, ya que no todas las referencias proporcionan información suficiente para determinar si las cepas positivas para *speA*, fueron las mismas que presentaron el gen *speC*.

Sin embargo, en las investigaciones realizadas en el Laboratorio de Biología Molecular de cepas faríngeas y cepas invasivas, se cuenta con la información suficiente para determinar si las cepas con el gen *speC* pertenecen al grupo de cepas que fueron positivas para el gen *speA*. En la tabla 16, se puede observar que las frecuencias encontradas en ambas investigaciones son similares. Además, de acuerdo a lo esperado se identificó la presencia del gen *speA* con una frecuencia del 80%. En contraste, se identificaron los dos genes con un porcentaje del 6%, la ausencia de ambos genes entre un 11 y 23% y la identificación sólo del gen *speC* fue del 2.1 y 3.3% de las cepas analizadas, resultados diferentes a los reportados en otras investigaciones.

Genes		Muestras faríngeas del tipo M1		Muestras invasivas del tipo M1 <sup>77</sup>	
		n	% Frecuencia	n	% Frecuencia
<b>speA (+)</b>	<b>speC (+)</b>	9	6.4	2	6.7
<b>speA (+)</b>	<b>speC (-)</b>	112	80.0	20	66.7
<b>speA (-)</b>	<b>speC (+)</b>	3	2.1	1	3.3
<b>speA (-)</b>	<b>speC (-)</b>	16	11.5	7	23.3

Tabla 16. Comparación de la presencia de los genes *speA* y *speC* en cepas de *S. pyogenes* del tipo M1.

La importancia de la presencia conjunta de estos dos factores de virulencia ha sido mencionada en algunos casos clínicos como el presentado en el año 2015, en el fallecimiento de una niña de 3 años con fascitis necrosante en la pierna causada por *S. pyogenes* y *S. aureus*, donde se demostró la presencia de los genes de las exotoxinas *speA*, *speB* y *speC*.<sup>80</sup>

### 7.3.3 Gen *speB*

El gen *speB* ubicado en el cromosoma codifica para una cisteína proteasa, es un gen altamente conservado y constitutivo en cepas de *S. pyogenes*. La cisteína proteasa es un factor de virulencia importante, ya que degrada las proteínas de la matriz extracelular del huésped, activa la interleucina-1 $\beta$  y libera fragmentos de

proteínas de la superficie de *S. pyogenes* favoreciendo la propagación y supervivencia bacteriana.<sup>44, 45</sup>

El gen *speB* se detectó en las 140 cepas, es decir en el 100% de los aislamientos analizados. Observando los mismos resultados que en otros estudios, en los cuales *speB* es portado en todas las cepas de *S. pyogenes*.<sup>29, 45, 77</sup> En la figura 9 se muestra la amplificación del gen *speB* por medio de la técnica de PCR con un tamaño de 1700 pb.

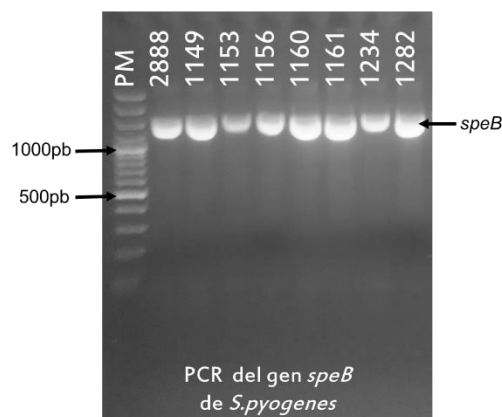


Figura 9. Gel de agarosa al 1.7% con productos amplificados del gen *speB* (1700 pb). La cepa #2888 es el control positivo para el gen, PM=Marcador de peso molecular.

### 7.3.4 Genes *sic* y *sof*

El gen *sic* codifica para la proteína SIC que ayuda a *S. pyogenes* a adherirse a las células epiteliales humanas, colonizar la mucosa e inhibir los componentes de la respuesta inmune innata, siendo casi exclusiva su detección en *S. pyogenes* del serotipo M1, mientras que las cepas de otros tipos M carecen de este gen; por lo cual, la amplificación del gen *sic* por la PCR ayuda a la identificación de cepas del tipo M1.<sup>77, 78, 81</sup> El gen *sof* que codifica para la proteína SOF es un factor de opacidad del suero, el cual no se encontró en las cepas del tipo M1 analizadas; en contraste, el gen *sic* estuvo presente en el 100% de los aislamientos seleccionados, lo cual concuerda con los resultados reportados. En la figura 10, se observan los productos de esta PCR dual, el gen *sic* y gen *sof* con un tamaño de 900 pb y 600 pb, respectivamente.

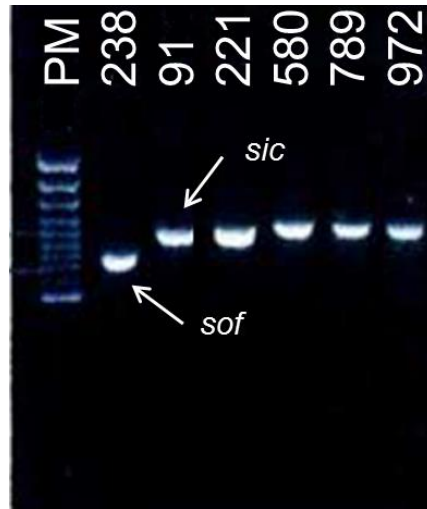


Figura 10. Gel de agarosa al 1.7% con los productos de amplificación de PCR dual de los genes *sic* (900 pb) y *sof* (600pb). La cepa #91 es control positivo para el gen *sic* y la cepa #238 para el gen *sof*, PM=Marcador de peso molecular 100 pb.

### 7.3.5 Genes *speH* y *speI*

Los genes *speH* y *speI* se identificaron en 28 cepas, que corresponden al 20%. Estos genes fueron hallados de manera conjunta en las mismas cepas, coincidiendo su localización en el mismo fago. Existen publicaciones donde estos genes no se identificaron con la misma frecuencia, aunque cabe señalar que en estos reportes las cepas de *S. pyogenes* corresponden a diferentes tipos M.<sup>14, 77</sup> En la figura 11 se muestra un ejemplo de los genes *speH* y *speI* en un gel de agarosa después de realizar una PCR dual.

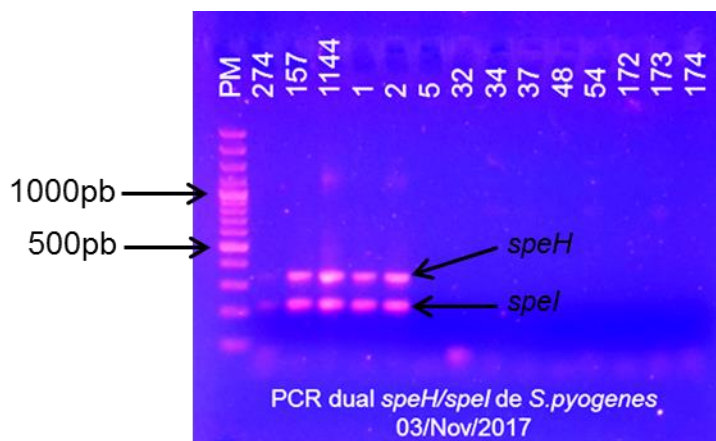


Figura 11. Gel de agarosa al 1.7% con los productos de amplificación de PCR dual de los genes *speI* (216 pb) y *speH* (340 pb). Las cepas #157, #274 y #1144 son controles positivos para ambos genes, PM=Marcador de peso molecular 100 pb.



Se comparó la presencia de estos genes en cepas de origen faríngeo y no faríngeo del tipo M1 y se puede observar que tienen la misma frecuencia del 20% aunque se utilizaron diferente número de muestras, además de que se encontraron ambos genes en las mismas cepas, tabla 17. Por lo tanto, no hay diferencia entre los resultados obtenidos y los ya publicados. Confirmando que en los aislamientos del tipo M1 estos genes se encuentran en la misma frecuencia y su localización debe ser en el mismo fago a diferencia de otros tipos M.<sup>14, 77</sup>

Muestras	Cepas positivas <i>speH / speI</i>	% Frecuencia
Faríngeas	n= 28 / 140	20
Invasivas <sup>77</sup>	n= 6 / 30	20

Tabla 17. Comparación de la frecuencia de los genes *speH* y *speI* de *S. pyogenes* del tipo M1, utilizando resultados ya publicados.<sup>77</sup>

### 7.3.6 Genes *smeZ*, *speJ* y *speG*

Para la identificación de estos genes se realizó un PCR múltiple. Los genes *smeZ*, *speJ* y *speG* se identificaron en el 100% de las cepas analizadas, siendo un resultado esperado ya que son genes localizados a nivel cromosomal, y por ende se espera encontrar en todas las cepas de *S. pyogenes*. En la figura 12 se muestra el resultado de una PCR múltiple en la cual se identificaron los tres genes.

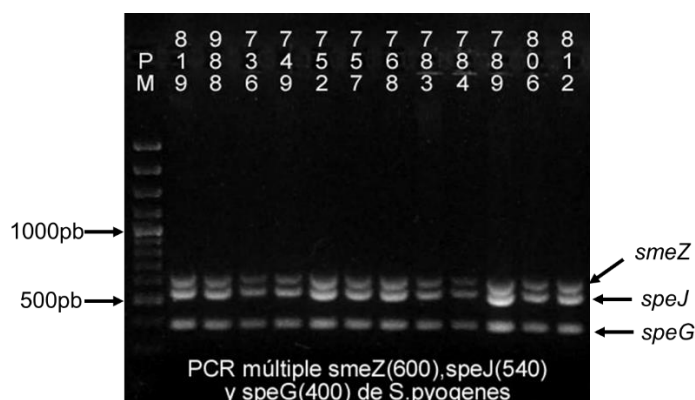
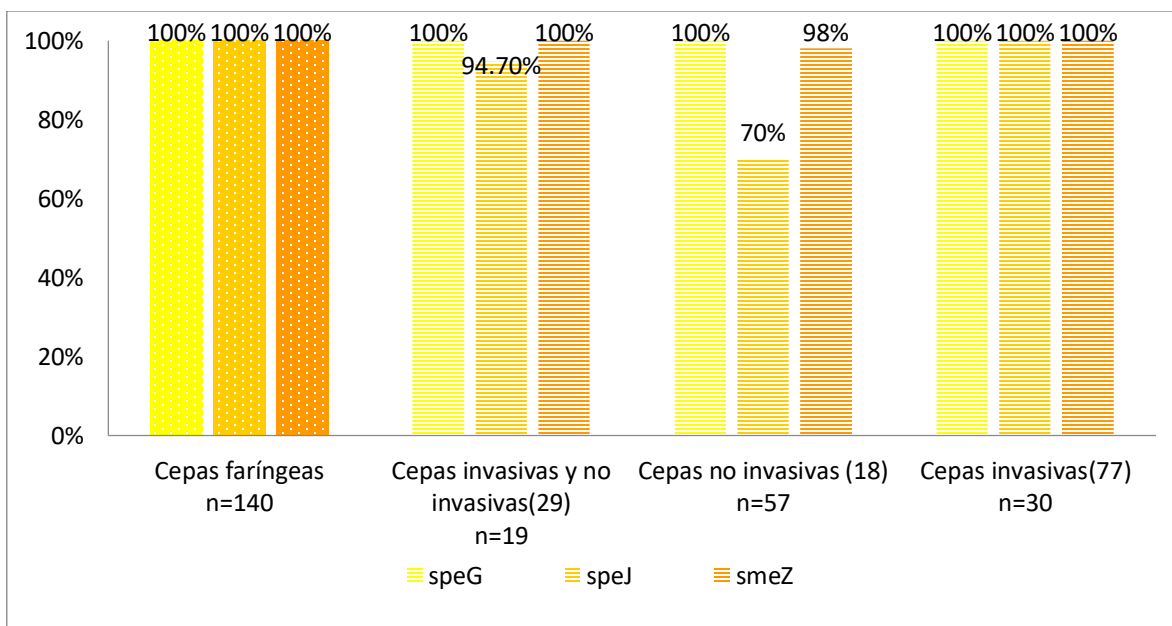


Figura 12. Gel de agarosa al 1.7% con los productos de amplificación de una PCR múltiple de los genes *smeZ* (600 pb), *speJ* (540 pb) y *speG* (400 pb). Las cepas #819 y #988 son controles positivos para estos genes, PM=Marcador de peso molecular 100 pb.

En la gráfica 4 se realizó una comparación de los resultados obtenidos para los genes *smeZ*, *speJ* y *speG* con otras investigaciones, en la cual se pueden observar frecuencias elevadas en la mayoría de estos genes. En el trabajo previo realizado en el Laboratorio de Biología Molecular con cepas M1 invasivas también se encontraron los genes en todas las cepas.<sup>77</sup> En otros trabajos publicados, las explicaciones de porque no se identificó el gen *speJ* en todas las cepas, van desde posibles variaciones alélicas que impiden el alineamiento del primer o la presencia de elementos móviles que pueden favorecer la perdida de los genes en estas cepas.<sup>58</sup>



Gráfica 4. Comparación de la frecuencia de los genes *speG*, *speJ* y *smeZ* de *S. pyogenes* del tipo M1, con resultados ya publicados.<sup>18, 29, 77</sup>

### 7.3.7 Genes *speK*, *speL*, *speM* y *ssa*

Para la identificación de estos genes se realizó una PCR múltiple. El gen *speK* esta localizado en fagos, se identificó solo en 3 aislamientos provenientes de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, representando el 2.1%, siendo un resultado esperado ya que se ha reportado con muy baja frecuencia (menor al 3%) en cepas del tipo M1. En contraste, este gen muestra una elevada presencia en cepas de *S. pyogenes* del tipo M3, M6 y M46 con más de 90% de frecuencia.<sup>77, 82,</sup>

Los genes *speL* y *ssa* no fueron detectados en las cepas analizadas, resultados similares a los reportados en otras investigaciones. En los tipos M3 y M4 se ha reportado una frecuencia mayor del 80% para el gen *ssa*; mientras que el gen *speL* se reporta en cepas del tipo M22 y M75 en más del 50%. Adicionalmente, las frecuencias de estos genes parecen ser variables y actualmente se ha observado su presencia en diferentes tipos M que antes no lo presentaban.<sup>14, 77, 83</sup>

El gen *speM* se identificó en 122 cepas, mostrando una elevada frecuencia correspondiente el 87.1%. Otros estudios han reportado que este gen se encuentra con una frecuencia mayor al 80% en cepas del tipo M1, M12 y M89.<sup>29, 67</sup> Además, una investigación realizada en E.U.A, encontró una fuerte relación entre los aislamientos del tipo M18 asociados con fiebre reumática aguda y la presencia de este gen, en el 100% de las cepas analizadas.<sup>58, 77</sup>

En la figura 13 se observa el resultado de los productos amplificados de PCR múltiple que se utilizó para identificar los genes *speK*, *speL*, *speM* y *ssa*.

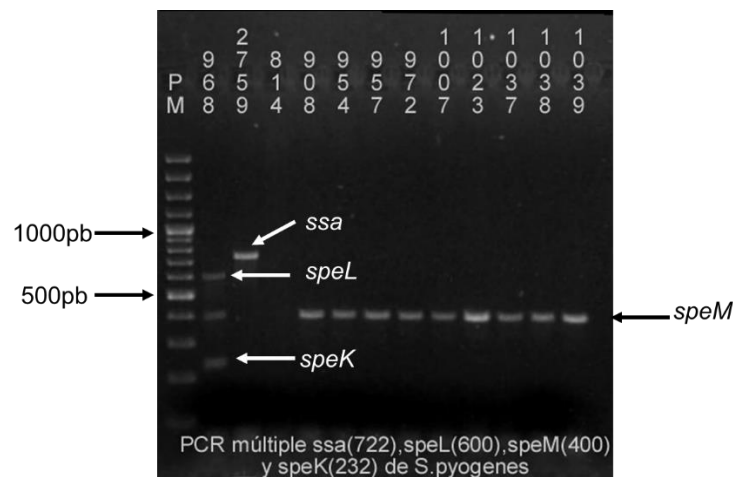
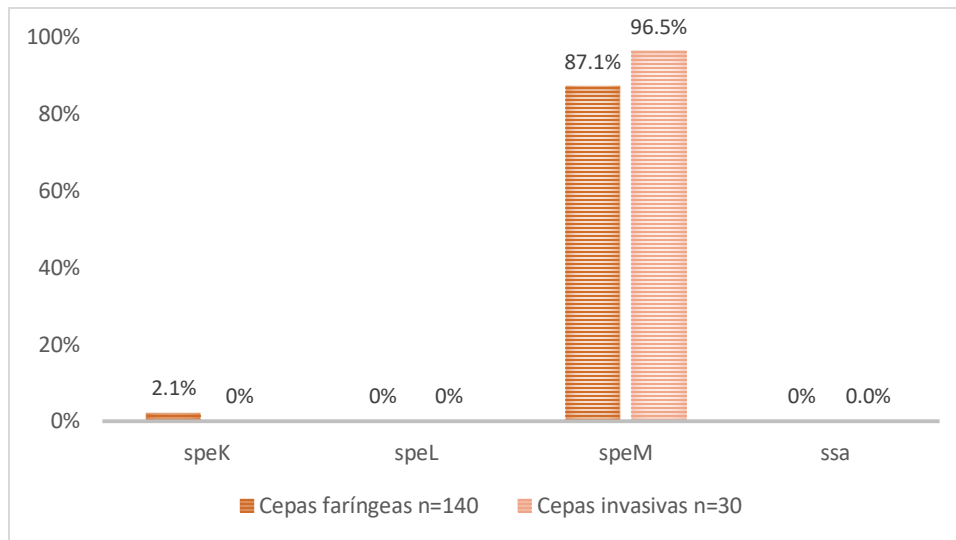


Figura 13. Gel de agarosa al 1.7% con los productos de amplificación de PCR múltiple de los genes *speK* (230 pb), *speM* (400 pb), *speL*(600 pb) y *ssa* (722 pb). La cepa #968 es el control positivo para *speL*, *speK* y *speM* y la cepa #2759 para el gen *ssa*, PM=Marcador de peso molecular 100 pb.

Como se puede analizar en la gráfica 5, no existe una diferencia significativa entre los resultados provenientes de cepas de origen faríngeo y cepas invasivas de *S. pyogenes* del tipo M1 provenientes del Laboratorio de Biología Molecular, aunque se trabajó un número diferente de muestras.



Gráfica 5. Comparación de la frecuencia de los genes *speK*, *speL*, *speM* y *ssa* de *S. pyogenes* del tipo M1 en aislamientos del Laboratorio de Biología Molecular.<sup>77</sup>

#### 7.4 Frecuencia de los perfiles de genes asociados a factores de virulencia

Con la identificación de diferentes perfiles de genes asociados a factores de virulencia en las cepas de *S. pyogenes*, se demuestra que existe una diversidad genética entre las cepas del tipo M1 y de origen faríngeo. De tal manera que la presencia de alguno(s) de estos genes pueden favorecer la colonización, la evasión de la respuesta inmune e infección, permitiendo que este microorganismo sobreviva por más tiempo dentro del huésped.

La presencia o ausencia de los 15 genes asociados a factores de virulencia evaluados, nos permitió identificar 17 perfiles de genes en las 140 cepas de *S. pyogenes* del tipo M1. Los perfiles fueron asignados arbitrariamente, basados solo en la frecuencia de aislamientos que lo presentan.

En la tabla 18 se observa que en el perfil 1 se agruparon 83 de las 140 cepas representando un 59.3%. En el segundo perfil se agruparon 17 cepas con una frecuencia del 12.1%, notándose que solo varía la presencia de los genes *speH* y *speI* con respecto al perfil 1. Sin embargo, las principales diferencias entre los 15 perfiles restantes con respecto a estos dos primeros se deben a la ausencia de los genes *speA* y *speM* o a la presencia de los genes *speC*, *speH* y *speI*; y en menor frecuencia la presencia del gen *prtF* y *speK*, los cuales solo se encontraron en

3 diferentes cepas cada uno. Adicionalmente, la cepa de referencia del CDC de *S. pyogenes* del tipo M1 se agrupó en el perfil 3, diferenciándose del perfil predominante (perfil1) solo por la ausencia del gen *speM*.

Perfil	<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>smeZ</i>	<i>ssa</i>	<i>sic</i>	<i>sof</i>	% Frecuencia (n)
1	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	59.3 (83)
2	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	12.1 (17)
3	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	7.2 (10)
4	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	7.2 (10)
5	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	3.6 (5)
6	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	2.2 (3)
7	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	1.4 (2)
8	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	0.7 (1)
9	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	0.7 (1)
10	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	0.7 (1)
11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	0.7 (1)
12	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	0.7 (1)
13	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	0.7 (1)
14	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	0.7 (1)
15	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	0.7 (1)
16	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	0.7 (1)
17	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	0.7 (1)

Tabla 18. Perfiles de los genes asociados a factores de virulencia en cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 de origen faríngeo. Las celdas con fondo rojo representan las diferencias que tienen los perfiles del #2 al #17 en comparación con el perfil #1 predominante.

Se realizó una comparación entre los 5 perfiles más frecuentes de genes asociados a factores de virulencia (equivalen al 89% de los aislamientos analizados) y los reportados previamente en el Laboratorio de Biología Molecular con cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 obtenidas de cepas invasivas (corresponden al 77.6%).<sup>77</sup> Se puede observar en la tabla 19 que en ambas investigaciones el perfil 1 es el más frecuente con un porcentaje mayor al 50%. La frecuencia de estos 5 perfiles es similar a pesar de que los aislamientos provengan de diversas muestras clínicas y exista diferencia en el número de cepas analizadas en cada investigación.

Perfil	% Frecuencia (n=140)	% Frecuencia (n=30)
	Cepas faríngeas del tipo M1	Cepas invasivas del tipo M1 <sup>77</sup>
1	59.3	53.3
2	12.1	10
3	7.2	6.7
4	7.2	16.6
5	3.6	0

Tabla 19. Comparación de los 5 perfiles más frecuentes de los genes asociados a factores de virulencia en cepas de *S. pyogenes* del tipo M1.

En *S. pyogenes* se han descrito una gran cantidad de factores de virulencia, sin embargo no todos son encontrados simultáneamente en los aislamientos. Algunos han sido asociados con su presencia en cuadros clínicos específicos y otros con algún tipo M en particular.

A través de la técnica de la PCR logramos demostrar la presencia de genes asociados a la virulencia de la bacteria. En este estudio no se demuestra la expresión de los factores de virulencia que codifican. Al poseer la información genética convierte a las cepas de *S. pyogenes* en potenciales productoras de toxinas (SpeA, SpeB, SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, SSA y SmeZ).

En este trabajo describimos los principales perfiles de los genes asociados a factores de virulencia en *S. pyogenes* del tipo M1, se observa que no hay diferencias entre aislamientos faríngeos o no faríngeos. El tipo M1 representa dentro de *S. pyogenes* el tipo M más importante de la especie. De tal manera que la presencia de estos genes representan una marca distintiva que indica un potencial de patogenicidad importante en las cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 independientemente del origen clínico en el que hayan sido aisladas.

## 8. CONCLUSIONES

Los genes asociados a factores de virulencia que se encontraron con mayor frecuencia en cepas de origen faríngeo de *S. pyogenes* del tipo M1 fueron: *speA*, *speB*, *speG*, *speJ*, *speM*, *smeZ* y *sic*.

El gen *speA* se identificó en el 86.4% de las cepas estudiadas, estando asociado al tipo M1, destacando este gen por su reconocido papel en cuadros de fiebre escarlatina y enfermedades invasivas severas.

La identificación de los genes *speK* y *prtF* en 3 diferentes cepas demuestra la adquisición de genes de virulencia que no han sido reportados en el tipo M1 de *S. pyogenes*.

La presencia de 17 perfiles de genes asociados a factores de virulencia demuestra la diversidad genética que tiene el tipo M1 de *S. pyogenes*.

Los perfiles de genes de virulencia más frecuentes encontrados en aislamientos faríngeos corresponden con los reportados por aislamientos no faríngeos, mostrando el mismo potencial patogénico de *S. pyogenes* del tipo M1 independientemente de su localización.

## 9. REFERENCIAS

- 1.- Ryan KJ, Ray CG. *Sherris Microbiología Médica*. 5ª Edición. Editorial Mc Graw Hill. 2010. México. Pág. 271, 342, 350-355.
- 2.- Stevens LD, Kaplan LE. *Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis*. Oxford University Press, Inc. New York. 2000. Pág. 1-6.
- 3.- Baron Samuel. *Medical Microbiology*. 4ª Edición. University of Texas Medical Branch. Galveston, Texas. Capítulo 13. 1996.
- 4.- Winn WC, Allen SD, Janda WM, et al. *Koneman. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas a color*. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2008. Buenos Aires. Pág. 7, 417, 644-646, 689.
- 5.- Borek AL, Obszanska K, Hryniewicz W, et al. Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiplex PCR. *Virulence*. 2012; 3(6):529–533.
- 6.- Ingraham JL, Ingraham CA, Prentiss H. *Introduction to microbiology*. Editorial Reverté, S.A. España. 1998. Pág. 525-527.
- 7.- Forbes BA, Sham DF, Weissfeld AS. *Diagnóstico microbiológico*. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2009. Buenos Aires. Pág. 265-268.
- 8.- Brown EJ. The molecular basis of streptococcal toxic syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2004; 350(20):2093-2094.
- 9.- Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 2001; 98(8): 4658-4663.
- 10.- Engleberg NC, DiRita VJ, Dermody TS. *Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease*. 5ta Edición. Editorial Lippincott Williams Wilkins. 2013. Estados Unidos. Pág. 161-168.
- 11.- Groisman EA. *Principles of Caterial Pathogenesis*. Academic Press. Orlando, Florida. 2001. Pág. 717, 719, 740-742.
- 12.- Kilian, M. *Streptococcus and enterococcus*. In *Medical Microbiology*, Elsevier. 17ª Edición. 2007. Pág. 178-193.
- 13.- Chang H, Shen X, Huang G, et al. Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from Chinese children with pharyngitis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011; 69(2):117-122.
- 14.- Molina LJ, Manjarrez ZE. *Microbiología, bacteriología y virología*. 2ª Edición. Editorial Mendes. 2015. México. Pág. 178-179.



- 15.- Stevens DL. Streptococcal Toxic-Shock Syndrome: Spectrum of Disease, Pathogenesis, and New Concepts in Treatment. *Emerging Infectious Disease*. 1995; 1(3):69-78.
- 16.- Musser JM, Hauser AR, Kim MH, et al. *Streptococcus pyogenes* causing toxic shock-like syndrome and other invasive disease: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1991; 88(7): 2668-2672.
- 17.- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997; 61(2):136–169.
- 18.- Darenberg J, Luca-Harari B, Jasir A, et al. Molecular and clinical characteristics of invasive group A streptococcal infection in Sweden. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 45(4):450-458.
- 19.- Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *The Lancet Infectious Diseases*. 2003; 3(4):191-200.
- 20.- Ma X, Kikuta H, Ishiguro N, et al. Association of the *prtF1* gene (encoding fibronectin-binding protein F1) and the *sic* gene (encoding the streptococcal inhibitor of complement) with *emm* types of group A streptococci isolated from Japanese children with pharyngitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(10):3835-3837.
- 21.- Chiang-Ni C, Wu JJ. Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2008; 107(9):677-685.
- 22.- Hotomi M, Billal DS, Togawa A, et al. Distribution of fibronectin-binding protein genes (*prtF1* and *prtF2*) and streptococcal pyrogenic exotoxin genes (*spe*) among *Streptococcus pyogenes* in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2009; 15(6): 367–373.
- 23.- McMillan DJ, Dreze PA, Vu T, et al. Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013; 19(5):E222-E229.
- 24.- Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M Protein: a highly versatile molecule. *Trends in Microbiology*. 2010; 18(6):275–282.
- 25.- Centers for Disease Control and Prevention. Streptococcus laboratory home, 2018 Available at: <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/index.html> Accessed 15 Junio 2018.
- 26.- Pence MA, Cogen AL, Cole JN, et al. Streptococcal inhibitor of complement promotes innate immune resistance phenotypes of invasive M1T1 group A *Streptococcus*. *Journal of Innate Immunity*. 2010; 2(6):587–595.

- 27.- Walker MJ, et al. Disease Manifestations and Pathogenic Mechanisms of Group A *Streptococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014; 27(2): 264-301.
- 28.- 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.
- 29.- Rogers S, Commons R, Danchin MH, et al. Strain prevalence, rather than innate virulence potential, is the major factor responsible for an increase in serious group A *Streptococcus* infections. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007; 195(11):1625–1633.
- 30.- Imohl M, Reinert RR, Ocklenburg, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* Disease in Germany during 2003-2007. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2010; 58(3): 389-396.
- 31.- Stathi A, Papaparas J, Zachariadou L, et al. Prevalence of *emm* Types 1 and 12 from Invasive *Streptococcus pyogenes* Disease in Greece-Results of Enhanced Surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14(8): 808-812.
- 32.- Hraoui M, Doloy A, Samir E, et al. Epidemiological Markers of *Streptococcus pyogenes* Strains in Tunisia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011; 17(1): 63-68.
- 33.- 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.
- 34.- De Almada Torres RS, Fedalto LE, de Almeida Torres RF, et al. Group A *Streptococcus* Meningitis in Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2012; 32(2):1.
- 35.- Musser JM, Kapur V, Szeto J, et al. Genetic diversity and relationships among *Streptococcus pyogenes* strains expressing serotype M1 protein: recent intercontinental spread of a subclone causing episodes of invasive disease. *Infection and Immunity*. 1995; 63(3):994–1003.
- 36.- Natanson S, Sela S, Moses A, et al. Distribution of fibronectin-binding proteins among group A streptococci of different M types. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995; 171(4):871–878.
- 37.- Matsumoto M, Hoe NP, Liu M, et al. Intrahost sequence variation in the streptococcal inhibitor complement gene in human patients with pharyngitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003; 187(4): 604-612.
- 38.- Green NM, Zhang S, Porcella SF, et al. Genome sequence of a serotype M28 strain of group A *streptococcus*: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005; 192(5):760-770.

- 39.- Romero CR. *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2007. México. Pág. 699-707.
- 40.- Cleary P, Prabu U, Dale J, et al. Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infection and Immunity*. 1992; 60(12):5219-5223.
- 41.- Chatellier S, Ihendyane N, Kansal RG, et al. A. Genetic relatedness and superantigen expression in group A *streptococcus* serotype M1 isolates from patients with severe and non severe invasive diseases. *Infection and Immunity*. 2000; 68(6):3523-3534.
- 42.- Alouf JE. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxins). *Pharmacology y Therapeutics*.1980; 11(3): 661-717.
- 43.- Yu CE, Ferreti JJ. Frequency of the erythrogenic toxin B and C genes (*speB* and *speC*) among clinical isolates of group A streptococci. *Infection and Immunity*. 1991; 59(1):211-215.
- 44.- Lukomski S, Burns Jr. EH, Wyde PR, et al. Genetic inactivation of an extracellular cysteine protease (SpeB) expressed by *Streptococcus pyogenes* decreases resistance to phagocytosis and dissemination to organs. *Infection and Immunity*. 1998; 66(2):771–776.
- 45.- Hytonen J, Haataja S, Gerlach D, et al. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with strep adhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Molecular Microbiology*. 2001; 39(2):512-519.
- 46.- Eriksson A, Norgren M. The superantigenic activity of streptococcal pyrogenic exotoxin B is independent of the protease activity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1999; 25(4):355-263.
- 47.- Friaes, A. Pinto R, Costa CS, et al. Superantigen gene complement of *Streptococcus pyogenes* – relationship with other typing methods and short-term stability. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012; 32(1):115–125.
- 48.- Ensenberger MG, Annis DS, Mosher DF. Actions of the functional upstream domain of protein F1 of *Streptococcus pyogenes* on the conformation of fibronectin. *Biophysical Chemistry*. 2004; 112(2-3):201–207.
- 49.- McMillan DJ, Geffers R, Buer J, et al. Variations in the distribution of genes encoding virulence and extracellular proteins in group A *streptococcus* are largely restricted to eleven genomic loci. *Microbes and Infection*. 2006; 9(3):259-270.

- 50.- Friães A, Lopes JP, Melo-Cristino J, et al. Changes in *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease in Portugal: evidence for superantigen gene loss and acquisition. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013; 303(8):505–513.
- 51.- Cue D, Lam H, Cleary PP. Genetic dissection of the *Streptococcus pyogenes* M1 protein: Regions involved in fibronectin binding and intracellular invasion. *Microbial Pathogenesis*. 2001; 31(5): 231–242.
- 52.- Lintges M, Linden M, Hilgers RD, et al. Superantigen genes are more important than the *emm* type for the invasiveness of group A *Streptococcus* infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010; 202(1):20–28.
- 53.- Commons R, Rogers S, Gooding T, et al. Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with *emm* types. *Journal of Medical Microbiology*. 2008; 57(10):1238-1246.
- 54.- Meisal R, Andreasson IK, Hoiby EA, et al. *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: *emm* types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(3): 842–851.
- 55.- Sriskandan S, Unnikrishnan M, Krausz T, Cohen J. Molecular analysis of the role of streptococcal pyrogenic exotoxin A (SPEA) in invasive soft-tissue infection resulting from *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology*. 1999; 33(4):778-790.
- 56.- Ulloa MT, Giglio MS, Porte L, et al. Detection of pyrogenic exotoxin SpeA, SpeB and SpeC genes in Chilean streptococci isolates and their association with clinical manifestations. *Revista Médica de Chile*. 2000; 128(1):27-34.
- 57.- Yu CE, Ferretti JJ. Molecular epidemiologic analysis of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene (*speA*) in clinical *Streptococcus pyogenes* strains. *Infection and Immunity*. 1989; 57(12):3715-3719.
- 58.- Commons RJ, Smeesters PR, Proft T, et al. Streptococcal superantigens: categorization and clinical associations. *Trends in Molecular Medicine*. 2014; 20:48–62.
- 59.- Proft T, Moffatt SL, Weller KD, et al. The streptococcal superantigen SMEZ exhibits wide allelic variation, mosaic structure, and significant antigenic variation. *Journal of Experimental Medicine*. 2000; 191(10):1765-1776.
- 60.- Roggiani M, Stoehr JA, Olmsted SB, et al. Toxoids of Streptococcal Pyrogenic Exotoxin A Are Protective in Rabbit Models of Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *Infection and Immunity*. 2000; 68(9): 5011-5017.

- 61.- Denny FW. History of Haemolytic Streptococci and Associated diseases. In Streptococcal Infections. Clinical aspects, Microbiology and molecular pathogenesis. Oxford University Press. 2000. Pág: 1-2.
- 62.- Goshorn SC, Schlievert PM. Nucleotide sequence of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. Infection and Immunity. 1988; 56(9):2518-2520.
- 63.- Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clinical Microbiology Reviews. 2000; 13(3): 470-511.
- 64.- Ikebe T, Wada A, Inagaki Y, et al. Dissemination of the phage-associated novel superantigen gene *speL* in recent invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* M3/T3 isolates in Japan. Infection and Immunity. 2002; 70(6):3227-3233.
- 65.- Mullis KB. El origen inusual de la reacción en cadena de la polimerasa. Científico americano. 1990; 262 (4): 56-61.
- 66.- Venegas López María Consuelo. *Guías para el laboratorio de Bacteriología. Facultad de Ciencias.* Departamento de Ciencias Biológicas. Primera Edición. 2015. Colombia. Pág. 136–137.
- 67.- Igwe EI, Shewmaker PL, Facklam RR, et al. Identification of superantigen genes *speM*, *ssa*, and *smeZ* in invasive strains of beta-hemolytic group C and G streptococci recovered from humans. FEMS Microbiology Letters. 2003; 229(2):259-264.
- 68.- Reda KB, Kapur V, Goela D, et al. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of *ssa* within *Streptococcus pyogenes*. Infection and Immunity. 1996; 64:1161–1165.
- 69.- Maripuu L, Eriksson A, Norgren M. Superantigen gene profile diversity among clinical group A streptococcal isolates. FEMS Medical Microbiology and Immunology. 2008; 54(2):236–244.
- 70.- Sriskandan S, Faulkner L, Hopkins P. *Streptococcus pyogenes*: Insight into the function of the streptococcal superantigens. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007; 39: 12-19.
71. Panduro AC. *Biología molecular en la clínica.* 2ª Edición. Editorial Mc Graw Hill. 2010. México. Pág: 33-36.
- 72.- Nelson K, Schlievert PM, Selander RK, et al. Characterization and clonal distribution of four alleles of the *speA* gene encoding pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin) in *Streptococcus pyogenes*. The Journal of Experimental Medicine. 1991; 174(5): 1271-1274.

- 73.- Perea Mejia LM, Stockbauer KE, Pan X, et al. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(12):3220–3224.
- 74.- Lintges M, Arlt S, Uciechowski P, et al. A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens of *Streptococcus pyogenes* identifies a strain without superantigen activity. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007; 297(6): 471-478.
- 75.- Kapur V, Topouzis S, Majesky MW, et al. A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microbial Pathogenesis*. 1993; 15:327–346.
- 76.- Beall B, Gherardi G, Lovgren M, 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.
- 77.- Troche González Edgar Daniel. Identificación de genes asociados a factores de virulencia en cepas invasivas de *Streptococcus pyogenes*. México, D.F. 2015. Tesis (Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo). UNAM.
- 78.- Hoe N, Nakashima K, Grigsby D, et al. Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *streptococcus* strains. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 1999; 5(2):254–263.
- 79.- Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M Protein: a highly versatile molecule. *Trends in Microbiology*. 2010; 18(6):275–282.
- 80.- Galeano F, Sanabria G, Lovera D, et al. Caracterización molecular de caso fatal por *Streptococcus pyogenes*. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*. 2015; 10(2): 26-30.
- 81.- Hoe NP, Vuopio-Varkila J, Vaara M, et al. Distribution of streptococcal inhibitor of complement variants in pharyngitis and invasive isolates in an epidemic of serotype M1 group A *Streptococcus* infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001; 183(4): 633-639.
- 82.- Smoot LM, McCormick JK, Smoot JC., et al. Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *Streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks. *Infection and Immunity*. 2002; 70:7095-7104.
- 83.- McMillan DJ, Geffers R, Buer J, et al. Variations in the distribution of genes encoding virulence and extracellular proteins in group A *streptococcus* are largely restricted to eleven genomic loci. *Microbes and Infection*. 2007; 9(3):259-270.

**ANEXO A. Perfiles de genes de virulencia para las 140 cepas de *S. pyogenes* del tipo M1 de aislamientos faríngeos.**

Cepa	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speB</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>smeZ</i>	<i>speG</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>prtF</i>
1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
32	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
34	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
37	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
41	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
48	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
54	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
91	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
100	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
153	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
158	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
172	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
173	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
174	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
175	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
186	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
194	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
195	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
197	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
198	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
200	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
206	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
208	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
217	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
221	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
226	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
236	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
239	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
245	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
257	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
263	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
264	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
283	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
295	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
300	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
557	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
576	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
580	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
583	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
584	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
585	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
599	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
618	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
642	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
673	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
718	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
719	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
724	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Cepa	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speB</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>smeZ</i>	<i>speG</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>prtF</i>
728	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
731	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
734	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
736	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
749	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
752	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
757	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
768	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
776	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
783	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
784	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
789	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
806	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
812	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
813	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
814	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
816	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
817	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
827	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
847	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
859	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
867	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
869	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
875	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
893	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
898	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
901	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
904	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
906	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
908	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
954	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
955	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
957	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
972	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
986	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1007	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1022	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1023	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1031	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1037	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1038	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1063	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1072	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1075	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1149	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1153	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
1156	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
1160	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
1161	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1185	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1193	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1195	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1234	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-



<b>Сера</b>	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speB</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>smeZ</i>	<i>speG</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>ssa</i>	<i>prtF</i>
1282	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1338	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
1355	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
1388	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1418	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
1490	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1721	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
1802	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2474	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2475	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2476	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2482	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2494	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2499	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2501	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2514	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2518	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2522	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2523	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2526	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2527	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2538	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2611	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2617	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2646	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2648	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2651	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2742	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2747	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2834	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2835	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2841	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2848	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2859	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2867	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2868	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2885	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-