



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Identificación de genes de virulencia de *Streptococcus pyogenes* en
aislamientos clínicos de Estreptococos beta hemolíticos de Grupo C y G
positivos al gen *emm*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

TANIA JACQUELINE LUNA HERNÁNDEZ

ASESOR: M. en C. Luis Manuel Perea Mejía

COASESOR: M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Identificación de genes de virulencia de *Streptococcus pyogenes* en aislamientos clínicos de Estreptococos betahemolíticos de Grupo C y G positivos al gen *emm*.

Que presenta la pasante: Tania Jaqueline Luna Hernández
Con número de cuenta: 309291970 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Enero de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea Ángela Becerril Osnaya	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	M. en C. Luis Manuel Perea Mejía	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

“Cuando una puerta de felicidad se cierra, otra se abre, pero muchas veces miramos tanto tiempo la puerta cerrada que no vemos la que se ha abierto para nosotros”.

Helen Keller

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de pertenecer a esta bella institución desde nivel bachillerato hasta finalmente forjarme como un profesionalista.

Siempre serás mi segunda casa.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C1, por haberme recibido con las puertas abiertas y brindarme momentos de alegría y felicidad que jamás olvidare.

A mi asesor el M. en C. Luis Manuel Perea Mejía, infinitamente gracias, por siempre creer en mí, por darme la oportunidad de realizar mi servicio social en el Laboratorio de Biología Molecular y culminar con este trabajo. Usted es como un segundo padre para mí, sin su apoyo nunca lo hubiera logrado.

A mi coasesor la M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel, por darme los ánimos para seguir adelante y concluir con este proyecto. Siempre atesorare dentro de mí sus enseñanzas en el laboratorio.

Gracias a mis amigos(a) de la Facultad por estar ahí cuando lo necesitaba, Eduardo, Maleny, Dan, Ariadna, Laura y Miguel. ¡Los quiero!

Y, por último, pero no menos importante gracias a mi suegra, la Sra. Lourdes Oviedo por aceptarme como otra hija y darme la mano cuando más lo necesitaba.

DEDICATORIAS

*” Son nuestras decisiones las que muestran quiénes
somos realmente, más que nuestras habilidades”.*

J. K. Rowling

Esta tesis va dedicada a las personas que más amo:

Mamá, gracias por ser una mujer fuerte y sacarme adelante, ahora que soy mamá te comprendo totalmente, y sé que no fue fácil. Te amo y sabes que siempre vamos a estar juntas, sin importar las circunstancias. Este es un paso que debía cumplir y faltan muchos más.

Papá, aunque estés lejos de mí, sabes que te llevo en mi pensamiento y cada consejo tuyo lo guardo en mi corazón.

Arturo, gordito mío, llevamos 12 años juntos, años en donde hemos pasado diferentes etapas de nuestra vida. Han sido tanto buenos como malos momentos, pero al final del día nuestros corazones siempre se buscan el uno al otro.

¡Te amo! y recuerda que... ¡I won't give up on you, so don't give up on me!

Arturito, hijo de mi alma, eres la razón de mi ser, desde tu llegada has sido la inspiración que le faltaba a mi vida, solo tú me conoces como nadie, después de todo tú conoces como late mi corazón por dentro. Esto es por ti y para ti.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. LISTA DE ABREVIATURAS	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Generalidades de los <i>Streptococcus spp.</i>	3
3.2. Clasificación de los <i>Streptococcus.</i>	3
3.2.1. <i>Streptococcus</i> del grupo A	4
3.2.2 <i>Streptococcus</i> del grupo B.....	5
3.2.3 Otros <i>Streptococcus spp.</i>	6
3.3. <i>Streptococcus</i> Grupo C y G	6
3.3.1. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	8
3.3.2. <i>Streptococcus equi</i>	9
3.3.3. <i>Streptococcus milleri</i>	10
3.4. Factores de virulencia	11
3.4.1. Proteínas de unión a fibronectina.	11
3.4.1.1. Proteína M.....	12
3.4.1.2. Proteína F	13
3.4.2. Sic (Proteína Estreptocócica Inhibitoria del complemento)	15
3.4.3. SOF (Factor de opacidad sérica)	15
3.4.4. Exotoxinas pirógenas estreptocócicas (Spe)	16
3.4.4.1. SmeZ.....	18
3.4.4.2. SpeA.....	19
3.4.4.3. SpeB.....	19
3.4.4.4. SpeC.....	20
3.4.4.5. SpeG	20
3.4.4.6. SpeH.....	21
3.4.4.7. SpeI	21
3.4.4.8. SpeJ	22
3.4.4.9. SpeK.....	22
3.4.4.10. SpeL.....	23

3.4.4.11. SpeM	23
3.4.4.12. Ssa	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPOTESIS	24
6. OBJETIVO GENERAL	25
6.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1. Selección de muestras y su manejo.....	27
7.2. Extracción de DNA	28
7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e identificación de genes de virulencia.....	29
7.4. Cortes de restricción y caracterización del gen <i>emm</i>	36
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS	38
8.1. Extracción de DNA	38
8.2. Amplificación del gen <i>emm</i> y determinación de los tipos M.....	38
8.3. Identificación de los genes de virulencia de <i>S. pyogenes</i> en <i>Streptococcus</i> de Grupo C y G.....	43
8.3.1. Gen <i>prtF</i>	44
8.3.2. Gen <i>sic/ sof</i>	46
8.3.3. Genes cromosómicos.....	48
8.3.3.1. Gen <i>speB</i>	48
8.3.3.2. Genes <i>smeZ</i> , <i>speG</i> y <i>speJ</i>	48
8.3.4. Genes adquiridos por fagos	50
8.3.4.1. Genes <i>speA</i> y <i>speC</i>	50
8.3.4.2. Genes <i>speH</i> y <i>speI</i>	52
8.3.4.3. Genes <i>speK</i> , <i>speL</i> , <i>speM</i> y <i>ssa</i>	54
8.4. Relación de los genes de virulencia de <i>S. pyogenes</i> en aislamientos de SGC y SGG con su tipo M.....	56
9. CONCLUSIONES.....	60
10. REFERENCIAS	61

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas no son tan frecuentes como las infecciones virales, pero suelen ser más graves. La mayoría de las veces cuando se adquiere una infección en las vías respiratorias es por *Streptococcus spp.* y estos pueden propagarse fácilmente en el aire, aerosoles, secreciones, así como en alimentos, bebidas y superficies inertes.

En el caso de los *Streptococcus* de Grupo C y G se reconocen como microbiota en el humano, encontrándose en vías respiratorias altas, en piel, en tracto gastrointestinal y genital femenino. Aunque hoy en día se ha visto que están implicados en infecciones mono y polimicrobianas a nivel de la piel y tejidos blandos, así como causales de faringitis, bacteriemia, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis, infecciones puerperales y meningitis.

Se ha descrito recientemente que algunas especies de *Streptococcus* del Grupo C y G comparten genes de virulencia con *Streptococcus pyogenes* los cuales tienen la capacidad de evadir la opsonización, la fagocitosis y adherirse e invadir las células epiteliales del hospedero y producir una variedad de toxinas y enzimas.

El presente trabajo tiene por objetivo la búsqueda de 15 genes de virulencia (*prtF*, *sic*, *smeZ*, *sof*, *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM* y *ssa*) en *Streptococcus* de grupos C y G que presentan el gen *emm* y su asociación al tipo M.

2. LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
AE	Buffer de Elusión
AL	Buffer de Lisis
AS	Agar Sangre
APC	Célula presentadora de antígeno
AW1	Buffer de Lavado 1
AW2	Buffer de Lavado 2
BHI	Caldo de Infusión Cerebro Corazón
C3b	C3b del complemento (opsonina)
CDC's	Centros para el control y prevención de enfermedades
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP`s	Desoxinucléotidos trifosfatos
<i>emm</i>	gen de la proteína M
Fn	Fibronectina
Ig	Inmunoglobulina
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Mm	Milimolar
ml	Mililitro
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polímerasa
PrtF	Proteína de Unión a Fibronectina
RFLP`s	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido Ribonucleico
SAg	Superantígeno
SIC	Inhibidor estreptocócico del complemento
SGA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
SGC	<i>Streptococcus</i> Grupo C
SGG	<i>Streptococcus</i> Grupo G
SmeZ	Exotoxina mitogénica estreptocócica
SOF	Factor de Opacidad Sérica
Spe	Exotoxina pirogénica estreptocócica
Ssa	Superantígeno de estreptococos
TAE	Amortiguador de Tris-Ácido Acético EDTA
TBE	Amortiguador de Tris-Boratos-EDTA
TCR	Receptores de Células T
TH	Todd-Hewitt
UV	Luz Ultravioleta

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades de los *Streptococcus spp.*

Dentro de la microbiota humana que coloniza las vías respiratorias, digestivas y genitourinarias hay muchas variedades de *Streptococcus*.

Son bacterias Gram positivas esféricas u ovoideas, forman cadenas cuando crecen en medios líquidos. Algunos *Streptococcus* asociados a infecciones del ser humano producen una zona de hemólisis completa (β) alrededor de la colonia bacteriana cuando se cultivan en agar con sangre de carnero al 5%.⁷⁸

Son anaerobios facultativos, aunque algunas cepas crecen mejor en condiciones anaerobias. Su crecimiento es estimulado por el CO₂, son homofermentadores, lo que significa que el único producto de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico sin producción de gas.

Los *Streptococcus* también son catalasa y oxidasa negativos, propiedades que, junto con la tinción de Gram, diferencia los *Streptococcus* de las especies de *Neisseria* y *Staphylococcus*.⁴¹

3.2. Clasificación de los *Streptococcus*.

Se ha basado en una serie de observaciones durante muchos años:

- a) Morfología de la colonia y reacciones hemolíticas en agar sangre
- b) Tipo de carbohidrato C y otros antígenos de la pared celular o capsulares
- c) Reacciones bioquímicas
- d) Resistencia a factores físicos y químicos¹²

En términos generales, tanto el grupo del carbohidrato C, como el tipo de hemólisis se determina cuando se identifica a un *Streptococcus*.

Rebecca Lancefield desarrolló en 1933 un sistema de clasificación serológica, que demuestra la presencia de antígenos específicos de grupo de tipo al carbohidrato C en extractos de la pared celular de los *Streptococcus* beta-hemolíticos, estableciendo una base más sólida de su taxonomía. Estos estudios formaron una clasificación por serogrupos. Antigénicamente existen actualmente 20 grupos con base en el carbohidrato C de la pared celular y son denominados de la A a la H y de la K a la V.^{53,67}

3.2.1. *Streptococcus* del grupo A

Streptococcus del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) causa infecciones purulentas como faringitis, fiebre escarlatina, pioderma, erisipela, celulitis, fascitis necrosante, síndrome de choque tóxico, infecciones de la piel y partes blandas. Produce por mecanismo inmunitario, fiebre reumática y glomerulonefritis.⁵⁷ Las infecciones cutáneas son producto de la proliferación de este microorganismo en la piel por contacto con otros individuos infectados.⁴⁷

El marco estructural básico de su pared celular contempla una capa de peptidoglicano, la cual tiene una composición parecida a la de otras bacterias grampositivas. En esta estructura se encuentra el carbohidrato específico de grupo (antígeno A de Lancefield), es un dímero N-acetilglucosamina y ramnosa.²⁰

Principalmente tiene tres proteínas importantes:

1. La proteína M que interfiere en la fagocitosis al bloquear la unión del componente C3b del complemento.
2. La proteína F la cual tiene el mecanismo de adherencia a las células del hospedador.
3. La proteína T que no contribuye a la patogenicidad.

Tiene en la superficie una peptidasa anti-C5a, esta serina proteasa inactiva C5a, molécula quimio atrayente de neutrófilos y fagocitos mononucleares.

Su cápsula de ácido hialurónico tiene propiedades antifagocíticas, por su similitud con el ácido hialurónico humano.⁷⁰

La virulencia de los *Streptococcus* del grupo A está determinada por la capacidad que tienen para evadir la opsonización y la fagocitosis, de adherirse a la superficie de las células del hospedador, invadir las células epiteliales y producir una variedad de toxinas y enzimas.

Las exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (Spe), son producidas por cepas lisogénicas. Se han descrito cuatro toxinas termolábiles inmunológicamente distintas (*SpeA*, *SpeB*, *SpeC* y *SpeF*), estas actúan como superantígenos e interaccionan con los macrófagos y linfocitos T cooperadores.

La Estreptolisina O es una hemolisina lábil al oxígeno capaz de lisar eritrocitos, leucocitos, plaquetas y células en cultivo. Esta guarda relación con las toxinas anteriormente descritas.

La Estreptolisina S es una hemolisina estable en presencia de oxígeno, no inmunogénica que puede lisar eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Se han descrito dos formas de Estreptocinasa (A y B), estas enzimas intervienen en la degradación del plasminógeno con la consiguiente liberación de la proteína plasmina, que a su vez se encarga de la degradación de fibrina y fibrinógeno. Por tanto, estas enzimas pueden lisar los coágulos de sangre y los depósitos de fibrina facilitando la rápida diseminación de *S. pyogenes* en los tejidos infectados.

Finalmente se han descrito cuatro desoxirribonucleasas a nivel inmunológico (ADNasas A-D), estas enzimas despolimerizan el ácido desoxirribonucleico (ADN) en el pus, reduciendo la viscosidad del material del absceso y facilitando la diseminación de los microorganismos.⁵⁰

3.2.2 *Streptococcus* del grupo B

Streptococcus grupo B (*Streptococcus agalactiae*) fue originalmente reconocido como la causa de la sepsis puerperal. Se encuentra colonizando la vagina del más del 20 % de las mujeres sanas. Actualmente está asociado al desarrollo de septicemias, neumonías, meningitis en el recién nacido, así como algunas

enfermedades en el adulto como la celulitis, artritis, endometritis, bacteriemia e infecciones en heridas de piel.

Son agrupados en el esquema de tipificación de Lancefield usando antisueros específicos contra el carbohidrato B (compuesto de ramnosa, N-acetilglucosamina y galactosa). También pueden distinguirse inmunológicamente por el antígeno capsular específico, hasta ahora se han identificado nueve tipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII). El antígeno capsular específico es un factor clave de virulencia.⁵⁵

3.2.3 Otros *Streptococcus spp.*

Los *Streptococcus* no pertenecientes a los grupos A o B se asocian con enfermedades invasivas en lactantes, niños, adolescentes y adultos. Los síndromes clínicos más importantes son las infecciones de vías urinarias, las infecciones de vías respiratorias superiores e inferiores, las infecciones de piel, tejidos blandos, endocarditis, faringitis y meningitis.

En ocasiones presentan enfermedades similares a las causadas por los microorganismos patógenos del grupo A.⁴⁷

En los humanos los hábitats de los *Streptococcus* y los *Enterococcus* son la piel (*Streptococcus* de los grupos C, F y G) orofaringe (*Streptococcus* de los grupos B, C, F, G y el grupo de *Streptococcus mutans*), tubo digestivo (*Streptococcus* de los grupos B, C, F y G, bovis y especies de *Enterococcus*).⁷

Los grupos de *Streptococcus* C y G (*S. dysgalactiae*) son β -hemolíticos en placas de agar con sangre. El grupo de patógenos C/G comparten varios factores de virulencia con los SGA, incluidos la proteína M, adhesinas y estreptocinasa.²⁴

3.3. *Streptococcus* Grupo C y G

Se han considerado microbiota de la piel, faringe e intestino del humano. Recientemente, ha habido un número creciente de informes que implican SGC y

SGG en infecciones invasivas severas, tales como la fascitis necrotizante y el síndrome de choque tóxico.⁵⁸

Son bacterias β -hemolíticas que en ocasiones producen infecciones en humanos, similares a las ocasionadas por los *Streptococcus* del grupo A (faringitis, sinusitis, celulitis, neumonía, bacteriemia, artritis séptica y endocarditis). Asimismo, se ha reportado su causalidad en casos de septicemia puerperal, meningitis, absceso epidural, absceso intraabdominal, infecciones urinarias y septicemia neonatal.^{12,78}

El antígeno específico del grupo de Lancefield en *Streptococcus* del grupo C (SGC) es un polisacárido compuesto por hexosamina y ramnosa. Difiere del grupo A en que el determinante antigénico terminal del carbohidrato C en SGC es N-acetilgalactosamina en lugar de N-acetilglucosamina. Mientras que en el caso del grupo G tiene como único polisacárido la ramnosa.⁵⁰

Los *Streptococcus* del grupo C se pueden dividir en dos grupos morfológicos basados en el tamaño de la colonia como se muestra en la **Figura 1**.

Los SGC de colonias grandes (>5mm de diámetro) se asemejan a los *Streptococcus pyogenes* cuando se cultivan en placas de agar sangre e incluyen especies como *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus equi*. Tradicionalmente se encuentran como patógenos en animales y ocasionalmente en humanos.²⁹

La especie de *Streptococcus dysgalactiae* incluye actualmente dos subespecies, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* y *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Aislamientos de *Streptococcus* en humanos que llevan el antígeno del grupo G también son *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.⁴¹

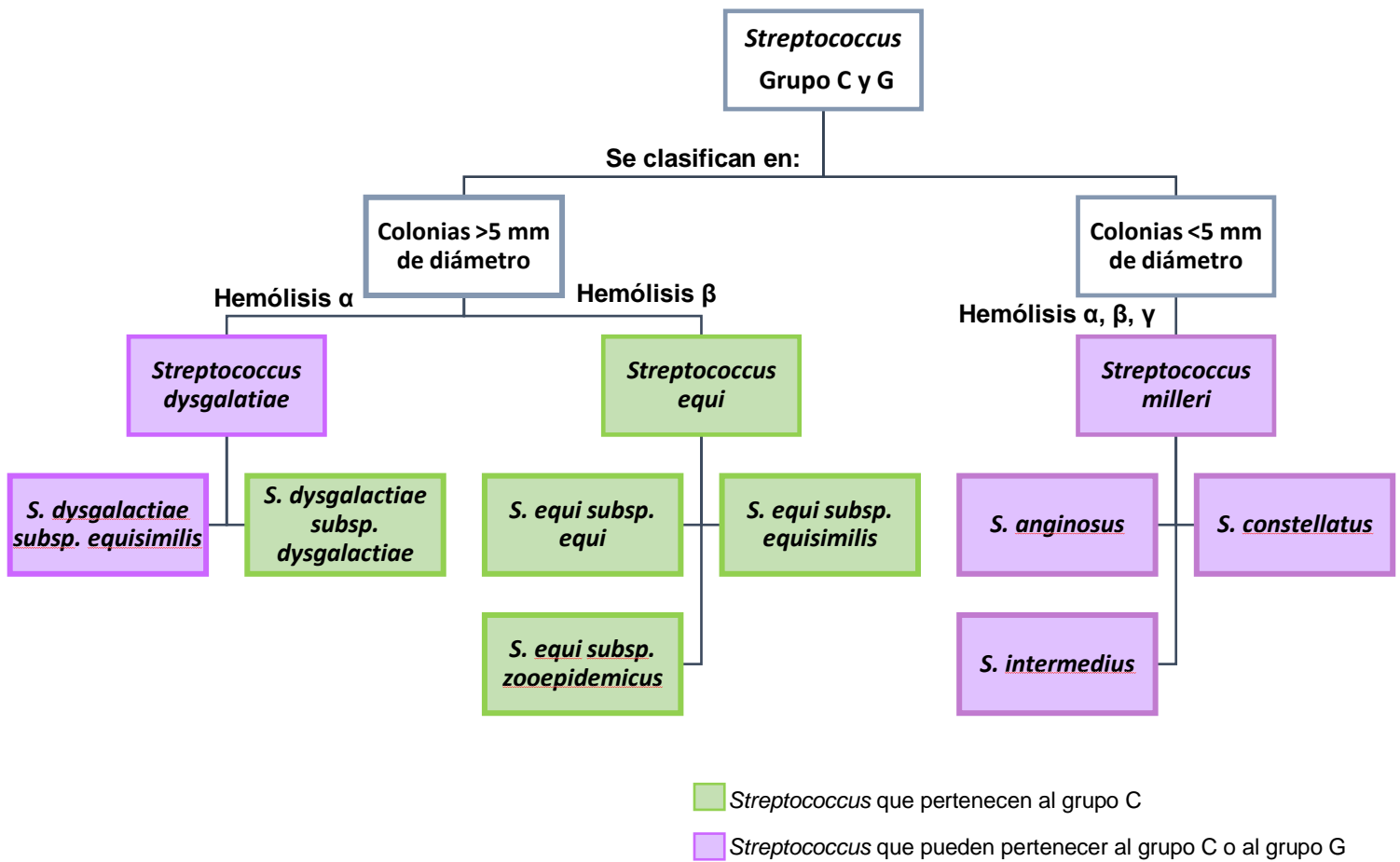
Streptococcus equi está clasificado en 3 subespecies: *equi*, *equisimilis* y *zooepidemicus*.

Las variantes de colonias pequeñas (<5 mm diámetro), que incluyen el grupo *Streptococcus milleri*, forman parte de la microbiota en cavidad bucal, tracto gastrointestinal y urinario de seres humanos.

Se clasifica en: *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*.

Pueden pertenecer al grupo Lancefield A, C, G, F o no agrupables. Al igual que pueden ser alfa, beta o no hemolíticos en agar sangre.^{18,29}

Figura 1. Clasificación de los *Streptococcus* Grupo C y G de acuerdo con su morfología.



3.3.1. *Streptococcus dysgalactiae*

Sus colonias en Agar Sangre son de 1mm, gris claro y tienen una zona hemolítica a las 24h a 37°C.¹⁴

Consta de dos subespecies:

- I. ***S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae***, son alfa hemolíticos pertenecen al Grupo C de Lancefield, en el sistema API (Perfil de Índice Analítico) se obtienen resultados variables para ADH (Arginina Deshidrolasa), fermentación de ribosa, trehalosa, almidón (AMD) y glucógeno dependiendo de la temperatura de incubación de 25°C ó 37°C.¹⁴
- II. ***S. dysgalactiae subsp. equisimilis***, son beta-hemolíticos y pueden tener el antígeno C, G o L, algunos presentan al antígeno A. No producen ácido a partir de sorbitol. La fermentación del glicógeno es una característica variable. Producen α -L-glutamato aminopeptidasa y β -D-galactosidasa.^{28,79}

3.3.2. *Streptococcus equi*

Es de especial interés porque estos *Streptococcus* causan infecciones en animales, pero también han sido aislados de humanos que cursan con un cuadro de faringitis.³⁶

Esta especie se distribuye en tres subespecies:

- i. ***Streptococcus equi subsp. equi*** el cual rara vez causa enfermedad en los humanos, afecta principalmente a los caballos. El microorganismo se transmite por las descargas purulentas de los animales afectados contaminando así el pasto, recipientes de alimento y bebederos. En cultivo de Agar Sangre forman colonias mucoides de color miel, con una amplia zona de hemólisis, una variedad atípica es menos virulenta y produce una apariencia color mate.¹⁶
- ii. ***Streptococcus equi subsp. equisimilis***, se ha aislado de las vías respiratorias superiores de los animales y puede causar enfermedades similares a las asociadas con *Streptococcus zooepidemicus*. Casi todas las cepas de animales fermentan el glucógeno y producen L-prolil-L-arginina aminopeptidasa, y ninguna de las cepas que infectan al humano lo hace.²⁹
- iii. ***Streptococcus equi subsp. zooepidemicus***, es de todos los *Streptococcus* del grupo C el más agresivo en el humano, se han descrito brotes de esta infección y esporádicos casos severos. La infección en el humano se da por

contacto estrecho con animales domésticos, por el consumo de leche no pasteurizada y por la ingesta de carne de cerdo.¹¹

3.3.3. *Streptococcus milleri*

En la literatura, a menudo se ha descrito a *S. milleri* parte del grupo G, aunque no ha sido aprobado su nombre oficial. Estos *Streptococcus* pueden residir de forma comensal en la cavidad oral humana, pero tienen cierta propensión a causar faringitis, bacteriemia e infecciones purulentas graves en el cuello profundo, en los tejidos blandos y en órganos internos como el cerebro, pulmones e hígado.⁶⁴

El grupo de *S. milleri* está constituido por:

- I. ***S. anginosus*** se caracteriza por formar colonias pequeñas y pueden tener antígenos de Lancefield, A, C, G o F. No cae claramente en la clasificación clásica de los estreptococos. A menudo son α -hemolíticos, pero pueden ser β o no hemolíticos.¹⁷ Son catalasa y oxidasa negativos, cocos fermentativos en cadenas que producen ácido y fosfatasa alcalina, arginina dihidrolasa, quimotripsina, esterasa (caprilato y lipasa), β -galactosidasa, leucina y valina arilamidasa y pirrolidonil arilamidasa. Las pruebas de rojo de metilo y bilis esculina son negativas. El crecimiento se produce entre 0 - 1.5% de cloruro de sodio.⁴
- II. ***S. intermedius*** habita en la cavidad oral humana y en el tracto superior respiratorio. Produce ácido a partir de glucosa y trehalosa, prácticamente todas las cepas producen hialuronidasa y ácido a partir de lactosa.²⁹
- III. ***S. constellatus*** se encuentra como microbiota gastrointestinal y orofaríngea, pero puede causar abscesos en la cavidad abdominal, en el tracto respiratorio inferior, tracto urogenital, sinusal y piel. Algunas veces ocasionan abscesos metastásicos en hígado, bazo y huesos.⁷⁷
Produce mayores cantidades de ácido láctico fermentando glucosa, maltosa y sucrosa. Es no fermentador de lactosa.⁸⁰

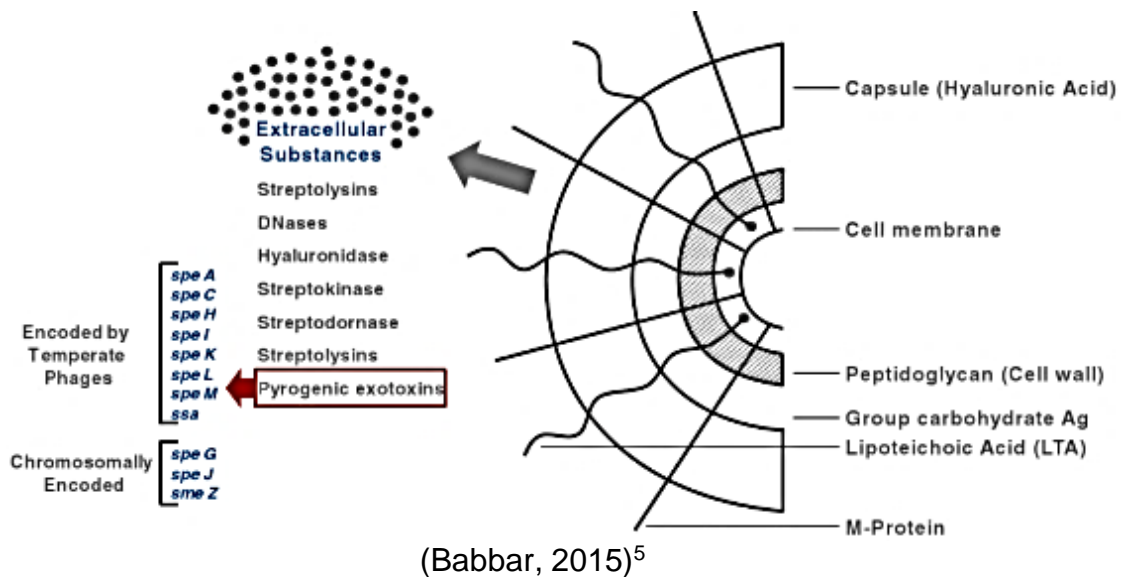
Se ha reportado que *S. intermedius* se aísla más frecuentemente en abscesos cerebrales y *S. anginosus* en sangre, tracto gastrointestinal, genitourinario y en tejidos blandos.¹⁵

3.4. Factores de virulencia

Los *Streptococcus* del Grupo C y G se han asociado recientemente con fiebre reumática aguda.²³

Al igual que los *Streptococcus* del grupo A, la adherencia y la invasión desempeñan un papel importante en la patogénesis de los *Streptococcus* grupo C y G. Son capaces de unirse a muchas proteínas del hospedero. Las proteínas de unión a la fibronectina y la proteína tipo M, así como diferentes enzimas y toxinas, son algunos factores de virulencia descritos para estos organismos.¹⁸(Figura 2)

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



3.4.1. Proteínas de unión a fibronectina.

La fibronectina (Fn) es una glucoproteína de 440 kDa presente en el plasma, en diversos fluidos corporales, en la matriz extracelular y la membrana basal del

hospedero, puede interactuar con los estreptococos, se considera un importante mediador de la adherencia.³⁰

Los *Streptococcus* generalmente se han considerado un patógeno extracelular. Sin embargo, se demostró que pueden invadir células epiteliales del hospedero a través de sus propias proteínas de unión a Fn. Al menos 11 proteínas de unión a Fn de *Streptococcus pyogenes* han sido identificadas, de los cuales hay dos tipos principales:

- ♣ Las proteínas F1 (PrtF1) / SfbI, Proteína F2 (PrtF2) / PFBP, FbaA (anteriormente Fba), FbaB, SfbII / Factor de opacidad de suero (SOF), SfbX y Fbp54 contienen respectivamente repeticiones de unión a Fn.
- ♣ La proteína M1, GAPDH / Plr, Shr y Scl1 las cuales no contienen repeticiones de unión a Fn.

Se ha descrito que las cepas de *S. pyogenes* altamente virulentas poseen una o más proteínas de unión a Fn.⁸¹

3.4.1.1. Proteína M

Fue la primera adhesina reportada en SGA y representa un factor de virulencia multifuncional. Gracias a las técnicas moleculares se han identificado más de 200 tipos M.

Es una molécula fibrilar enrollada en espiral similar en estructura a la miosina. Su extremo carboxilo terminal está anclado en el peptidoglucano de la pared celular y las regiones del extremo amino terminal se extienden más allá de la superficie. La especificidad de los múltiples serotipos de proteína M están determinados por variaciones en la secuencia de aminoácidos de la porción amino-terminal de la molécula.

Algunas proteínas M presentan propiedades de unión variada, la interacción con glicosaminoglucanos representa el mecanismo de adherencia más usado por sus diferentes serotipos.^{66,67}

Puesto que hay una diversidad, una persona puede desarrollar infecciones repetidas por *S. pyogenes* de diferentes tipos M.

Se ha encontrado la presencia de proteína M en *Streptococcus* del grupo G al igual que una homología en los genes que codifican para dicha proteína con los del grupo A y C.

Se sabe que la proteína M estimula la generación de anticuerpos opsonicos, y memoria inmunológica de larga duración.^{12,63} Esta proteína también protege al microorganismo contra la fagocitosis al bloquear la unión del componente C3b del complemento. Estas proteínas intervienen al unirse ya sea al fragmento Fc de los anticuerpos o a la Fn, que bloquea la activación del complemento por la vía alterna y reduce la cantidad de C3b unido.^{50,71}

Se subdivide en moléculas de clase I y de clase II.

- Las de clase I comparte los antígenos expuestos.
- Las de clase II carece de antígenos comunes expuestos.

La proteína M esta codificada por un complejo de más de 20 genes que componen la superfamilia de genes *emm*.⁵⁰

El gen *emm* comparte la misma localización cromosómica en todas las cepas secuenciadas hasta la fecha.

Se ha sugerido que puede representar una antigua isla de patogenicidad, que fue adquirida por una cepa ancestral de *Streptococcus* antes de la especiación de SGA.⁶³

3.4.1.2. Proteína F

Es una adhesina que se une a la Fn, es un polipéptido de aproximadamente 120kDa, que se expone en la superficie de la bacteria. Esta se distingue de la proteína M antifagocítica, ya que el gen que codifica para la proteína F (*prtF*) se obtuvo a partir de una cepa a la cual se eliminó el gen *emm*.³²

El arquetipo de unión a Fn Proteína F1 vinculado a SGA es codificado por el 90% de todos los SGA. Hasta la fecha se han descrito 34 distintos alelos de *prtF* 1, se piensa que han surgido en respuesta a presiones selectivas por parte del hospedero. La unión a Fn esta mediada por dos dominios C-terminales altamente conservados: una región repetitiva que contiene entre dos y seis repeticiones de unión a Fn y un dominio adyacente, no repetitivo. PrtF1 interactúa con el fragmento N-terminal de la molécula de Fn, inhibiendo la unión de fibrina y evitando el ensamblaje.⁷³

Una única proteína F1 puede unirse a varias moléculas de Fn dando como resultado un aumento significativo de Fn en la superficie de la célula SGA.

Además de su papel como una adhesina, también funciona como una proteína de evasión inmune. La unión de la proteína (por la región de repetición C-terminal) a la región Fc de las inmunoglobulinas G (IgG) del hospedero, impide el reconocimiento de SGA por la respuesta inmune adaptativa e inhibe la opsonización mediada de anticuerpos.

La Proteína F2 (gen *prtF2*) está presente en los aislados clínicos de SGA y representa la estrategia de invasión predominante de unión a Fn de cepas PrtF1 negativas. interactúa con un fragmento N-terminal de 30kDa de la molécula de Fn que es distinto del sitio de unión a PrtF1.⁸

Existen dos genotipos distintos que difieren totalmente en tamaño y estructura. *fb*a y *pf*bp fueron identificados independientemente y se pensó inicialmente que codificaban discretas proteínas de unión a Fn que poseen dominios de unión similares. Posteriormente, estos genes fueron asignados a la misma localización cromosómica, lo que indica que surgieron de un ancestro común, por tanto, representan distintas isoformas de una sola proteína. La importancia de esta diferencia en la estructura aún no se ha dilucidado. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que FbaB facilita la entrada invasiva de SGA a las células endoteliales humanas.⁸

3.4.2. Sic (Proteína Estreptocócica Inhibitoria del complemento)

El inhibidor estreptocócico del complemento (Sic) es una proteína extracelular de 31 kDa producida por algunas cepas altamente virulentas de *Streptococcus pyogenes*.

Es una proteína extracelular con 305 residuos de aminoácidos que inactiva el complejo de ataque de membrana del complemento. Sic solo se ha encontrado en tipos M1 y M57. El gen *sic* se encuentra en una región cromosomal en SGA de tipo M1, directamente adyacente al gen *emm*. Se demostró que, a través de este mecanismo, el organismo evade la destrucción por el complejo de ataque de membrana (C5-C9) generado por la vía alterna o clásica del complemento.⁷¹

Se ha informado que Sic inhibe las propiedades antimicrobianas de cuatro proteínas más del sistema inmune innato que se encuentra en la superficie de mucosas.

El primer estudio mostró que Sic se une al inhibidor de proteasas secretadas por leucocitos (SLPI) con alta afinidad, inhibiendo totalmente la capacidad de SLPI para eliminar SGA. También se demostró que se une a la lisozima, pero con menor afinidad, e inhibe las funciones antimicrobiana y catalítica de la lisozima humana. El segundo estudio mostró que Sic se une e inhibe la acción antimicrobiana de péptidos como la catelicidina LL-37 y la α -defensina humana HNP-1, moléculas que son parte central de la inmunidad innata en el huésped.¹

Es altamente inmunogénico y extremadamente variable, habiéndose registrado más de 300 variantes.²⁶

3.4.3. SOF (Factor de opacidad sérica)

Fue descrito por primera vez en 1938 por los australianos Ward y Rudd, como una sustancia producida por los *Streptococcus* del grupo A.⁶³

Sof es una proteína extracelular de alto peso molecular (100kDa) que opacifica el suero de mamíferos al interactuar con lipoproteínas de alta densidad.

El análisis de las secuencias de aminoácidos de Sof indica que se compone de dominios alternativos conservados, variables y un dominio C-terminal, este último contiene un péptido repetido en tándem que se une a la Fn y al fibrinógeno.

Hay aproximadamente 40 a 60% de homología entre Sof de diferentes serotipos de *S. pyogenes*.⁶³

Se encontró que Sof actuaba sobre una fracción de lipoproteína del suero y se propusieron diversas actividades enzimáticas para explicar su reacción de opacidad. Posteriormente, se encontró que es una hidrolasa, la cual induce la opacificación de suero por unión a lipoproteínas de alta densidad (HDLs), desplazando la apolipoproteína AI (apo AI) y alterando la estructura de HDL resultando la formación de grandes partículas lipídicas.

Se ha demostrado que aproximadamente la mitad de todos los tipos M conocidos en SGA producen Sof.

Sof es una proteína única que exhibe múltiples funciones incluyendo no sólo su capacidad de opacificar el suero, sino también de adhesina ya que tiene la capacidad de unirse a una variedad de proteínas del huésped, tales como fibronectina, fibrinógeno y fibulina-1.

El factor de opacidad se encontró inicialmente en SGA, pero recientemente también se ha detectado en los estreptococos del Grupo C y G, *S. dysgalactiae* y *S. equisimilis*. Específicamente Sof está asociado con los tipos M de SGA que se aíslan en la piel.⁷¹

3.4.4. Exotoxinas pirógenas estreptocócicas (Spe)

Funcionan como sAg's, la presentación de ellos y la activación de anticuerpos es un mecanismo complejo del hospedador para provocar una respuesta contra cualquier cuerpo extraño patógeno que podría dañarlo.⁵⁰

Los receptores específicos para el reconocimiento de sAg's, están situados en las superficies de las células T llamadas Receptores de células T (TCR) y en el

complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II). Generalmente, el superantígeno se escinde en el lisosoma en péptidos más pequeños y luego se muestra por las células presentadoras de antígeno (APC). Estos péptidos antigénicos finalmente interactúan / enlazan con células T que portan un TCR $\alpha\beta$ específico que tiene regiones constantes y variables: $V\beta$, $D\beta$, $J\beta$, $V\alpha$ y $J\alpha$.⁶³ **(Figura 3)**

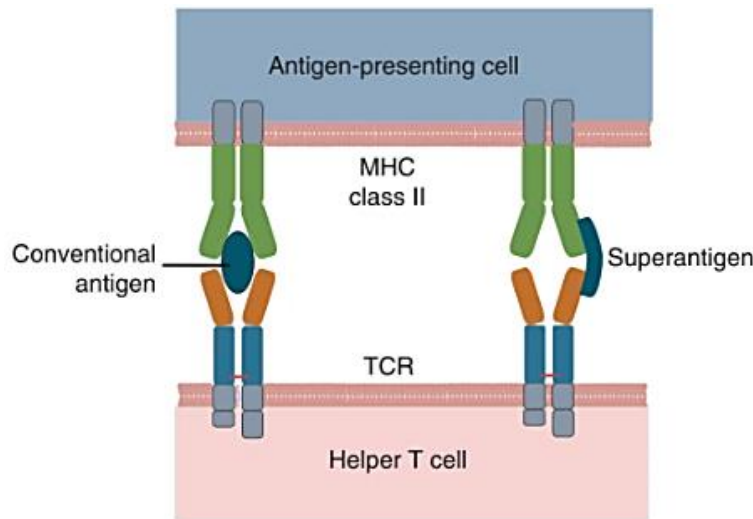


Figura 3. Diferencias en la unión a un TCR entre un péptido antigénico convencional que llena la cavidad entre las cadenas α y β , en comparación con un superantígeno que se une sólo a la cadena β . (Tizard, 2013)⁷⁴

Después de unirse a TCR específico, los péptidos inducen la transducción de señales y cambios bioquímicos en la célula T. Las células T activadas luego proliferan para generar subpoblaciones definidas de células T con regiones variables peculiares y son específicas de un péptido particular. A diferencia de los antígenos convencionales, los superantígenos pueden unirse y estimular una enorme subpoblación de células T a través de la región variable de la cadena β (elementos $V\beta$), la cual es diferente para cada exotoxina **(Tabla 1)**.⁶³

La unión de sAg's al receptor de células T desencadena cambios bioquímicos en la célula que conduce a la activación inespecífica de una cantidad excesiva de células T y liberación de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL6 e IL-8, interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, que median el choque y la lesión de los tejidos.⁵⁰

Tabla 1. V β específicos de los principales superantígenos de *Streptococcus* Grupo A

Superantígeno	Vβ Especifico
Exotoxinas Pirogénicas Estreptocócicas	
SpeA	2.1, 12.2, 14.1, 15.1
SpeC	2.1, 3.2, 12.5, 15.1
SpeG	2.1, 4.1, 6.9, 9.1, 12.3
SpeH	2.1, 7.3, 9.1, 23.1
SpeI	6.9, 9.1, 18.1, 22
SpeJ	2.1
SpeK/L	1.1, 5.1, 23.1
SpeL/M	1.1, 5.1, 23.1
SpeM	1.1, 5.1, 23.1
Superantígenos Estreptocócicos	
SSA	1.1, 3, 15
Exotoxina Mitogénica Estreptocócica Z	
SmeZ-1	2.1, 4.1, 7.3, 8.1
SmeZ-2	4.1, 8.1

(Reglinski & Sriskandan, 2015)⁶³

Varios estudios han informado que las Spe se correlaciona con los tipos *emm* y se asocian con las manifestaciones clínicas.^{5,12}

3.4.4.1. SmeZ

La exotoxina mitogénica estreptocócica (SmeZ), es el superantígeno bacteriano más potente hasta ahora descubierto, y el gen (*smeZ*) que lo codifica está casi presente en la mayoría de las cepas de SGA.

El gen que codifica SmeZ se identificó en la base de datos de DNA de *S. pyogenes* de la Universidad de Oklahoma ³⁸, *smeZ* demuestra la variación de 24 formas alélicas, tiene una estructura en mosaico, y codifica para la proteína altamente polimórfica que exhibe la variación antigénica. Aunque todavía no se dispone de datos clínicos que demuestren una asociación de SmeZ con las enfermedades de SGA, la prevalencia, potencia y variación antigénica mostrada por SmeZ sugieren que este puede tener una función importante en la patogénesis de la enfermedad estreptocócica.⁴⁸

3.4.4.2. SpeA

La exotoxina pirogénica estreptocócica A (SpeA), producida por *Streptococcus pyogenes*, está implicada en la patogénesis del síndrome de shock toxico estreptocócico (STSS), una enfermedad grave con un 30-60% de mortalidad y al desarrollo de la fiebre escarlatina.

El gen *speA* es transmitido por un bacteriófago, y la producción estable depende de la conversión lisogénica de una manera análoga a la producción de la toxina por *Corynebacterium diphtheriae*.

El control de su producción aún no se entiende, pero está establecido que la cantidad de SpeA producida por las cepas, varía drásticamente de una década a otra. Además, las mutaciones puntuales en el gen *speA* resultan en cambios dramáticos en la potencia de esta toxina.⁷¹

De las exotoxinas pirogénicas estreptocócicas, SpeA se ha caracterizado con mayor detalle. Hasta la fecha se han descrito cuatro alelos naturales de *speA* asociados a cepas de tipo M1 y M3. En particular *speA* 3 tiene una mayor afinidad por la unión de MHC clase II que los otros alelos, y se informa que es más mitogénico in vitro.^{63,45}

3.4.4.3. SpeB

SpeB (cisteín-proteasa estreptocócica, exotoxina estreptocócica B) es un factor de virulencia pirogénica y cardiotoxica codificada cromosómicamente por *S. pyogenes* cuya estructura cristalina ha sido determinada recientemente.³³

El gen *speB* es portado por todas las cepas de *S. pyogenes*, pero el grado de expresión varía de cepa a cepa. Se ha considerado que SpeB se produce como una pro-proteína secretada de 40 kDa, que se procesa posteriormente a la forma madura de 28 kDa.³³

Tiene un papel importante en la virulencia de *S. pyogenes* ya que tiene una especificidad indiscriminada, se ha demostrado que esta molécula degrada la matriz

extracelular, las citoquinas, las quimiocinas, los componentes del complemento, las inmunoglobulinas y los inhibidores de la proteasa sérica por nombrar sólo algunos de los sustratos conocidos. Además, regula otras proteínas estreptocócicas degradándolas o liberándolas de la superficie bacteriana.⁵²

Recientemente, demostró aumentar la capacidad de *S. pyogenes* para invadir células epiteliales de carcinoma alveolar humano.⁴⁴

3.4.4.4. SpeC

La exotoxina pirogénica C (SpeC) como SpeA es mediada por un bacteriófago y la expresión es también muy variable. Recientemente, los casos leves de escarlatina en Inglaterra y los Estados Unidos se han asociado con cepas positivas a esta exotoxina.⁷¹

El gen *speC* está aproximadamente en el 50% de los estreptococos del Grupo A, al igual que *speA*, se distribuye de forma desigual entre los tipos M. Por ejemplo, *speC* está presente en casi todos los SGA tipo M18, y es mucho menos común en las cepas M1 y M3.

Produce una proteína de 235 aminoácidos que se procesa a una proteína segregada de 208 residuos de 24,354 kDa de peso molecular, después de la eliminación de un péptido señal de 27 residuos.

SpeC carece del sitio de unión de baja afinidad típico de todos los superantígenos conocidos. Por lo tanto, la unión (en forma de dímero) con dos receptores de las MHC de clase II se encuentra mediado por una molécula de zinc.⁶⁵

3.4.4.5. SpeG

Hasta ahora, sólo unos pocos informes describen la mitogenicidad de la proteína SpeG. Su hallazgo en *Streptococcus* del grupo C y G muestran que las cepas tienen el potencial de producir sAg's y podría explicar su aislamiento de los pacientes con sepsis y choque tóxico.⁶⁸

SpeG recombinante de *S. pyogenes* se ha caracterizado como un potente sAg para el huésped humano.

Se cree que los genes superantigénicos *speG*, *speJ* y *smeZ* están cromosómicamente codificados. Sin embargo, *smeZ* y *speG* parecen haber realizado una transferencia horizontal entre especies (*S. pyogenes* y *Streptococcus* Grupo C y G).²¹

3.4.4.6. SpeH

Las exotoxinas pirogénicas SpeH y SpeI de *S. equi* son altamente homólogas a sus contrapartes SpeH y SpeI (> 98%) de *S. pyogenes*, indicando otra transferencia horizontal de genes entre esta especie a *S. equi* o viceversa.³

Curiosamente, ambos genes, no se encontraron estrechamente relacionados a *S. equi subsp. zooepidemicus* y se sugirió que la adquisición de estos genes podría ser un evento importante en la formación de la cepa más virulenta de *S. equi* de su antepasado.

El aumento de la expresión de SpeH observada durante la adherencia de la bacteria a las células faríngeas sugiere ser necesaria, o es un componente de un proceso de infección.⁵⁸

3.4.4.7. SpeI

Fue descrito por primera vez por McLaughlin et al., quién mapeó la localización del gen *speI* en una posición 5' del gen *speH* en la cepa tipo M1 de *S. pyogenes*, determinando que estos dos están juntos en el fago 370.2.⁴⁶

Las formas recombinantes de SpeI y SpeJ a concentraciones nanomolares, son estimuladores extremadamente potentes de linfocitos humanos, lo que confirma su papel como SAg.

SpeI y SpeJ se unen a la cadena β del MHC de clase II pero no a la cadena α .⁶⁰

Dentro de la familia de SAg's bacterianos, se ha clasificado como perteneciente a al grupo V, que se caracterizan por una extensión única, relativamente conservada, de alrededor 15 aminoácidos.¹³

3.4.4.8. SpeJ

SpeJ contiene sólo un residuo de cisteína, esta toxina no contiene una estructura de bucle de cistina que se ve en muchos SAg's. El gen *speJ* fue identificado junto con *speG* en la Universidad de Oklahoma, estudiando la secuencia del genoma de *S. pyogenes* tipo M1, se encuentra a nivel cromosomal y se considera que está presente en todas las cepas de SGA.⁵⁹ Se ha reportado que *speJ* se está perdiendo en los linajes y que la región donde está presente el gen probablemente sea un remanente de un bacteriófago.²⁷

SpeJ estimula un patrón único de células T humanas que llevan los subgrupos V β (2, 3,12,14 y 17). Esto indica que tiene mayor homología con SpeA, que estimula V β (2,12,14 y 15).⁴⁵

3.4.4.9. SpeK

Tiene actividad pirogénica y letal, semejante a SpeA en casos de STSS. Es codificada por el gen *speK*, se describió por primera vez en el serotipo M1. Este gen se denominó más tarde *spek-M1*. El nombre *speK* también se dio al gen designado como *speL*.⁵

Los aislados del tipo M3 contemporáneos presentan el fago en el cual está presente el gen, ya que este no estaba en cepas M3 recuperadas antes de 1987, fue identificado en la secuencia genómica de la cepa MGAS315 del tipo M3 en el fago 315.4.¹⁰

3.4.4.10. SpeL

Fue identificado en Japón después del análisis de DNA en cepas de *Streptococcus pyogenes* tipo M3.⁴³

La región C-terminal de la secuencia de aminoácidos deducida de el gen *speL* tiene una similitud de 48 y 46% con la toxina eritrogénica SpeC y el superantígeno SmeZ-2, respectivamente.

Estimula células T con V β (1.1, 5.1 y 23.1) con una dependencia de moléculas de MHC-II.³⁵

3.4.4.11. SpeM

Se une a MHC clase II exclusivamente en la cadena β a través de un complejo de unión a zinc. SpeM estimulan principalmente células T que expresan V β 1.1.⁵⁹. Es codificado por el gen *speM*, localizado en un fago adyacente al gen *speL* en SGA tipo M18, estos genes no siempre se identifican juntos.⁴³

3.4.4.12. Ssa

Es codificada por el gen *ssa* tiene un peso molecular de ~28kDa. Ssa estimula la proliferación de células T humanas que portan V β 1, V β 3, V β 5.2 y V β 15 en un MHC clase II-dependiente.⁶²

Se distribuye por toda la especie, entre 10 linajes clonales distintos. En muchos casos, estos linajes difieren filogenéticamente en el carácter cromosómico general, por lo tanto, no han compartido un ancestro común reciente.⁶²

4. JUSTIFICACIÓN.

Los *Streptococcus* del Grupo C y G, se han considerado microbiota de la piel, faringe e intestino humano, sin embargo, recientemente ha crecido el número de casos clínicos donde se habla de infecciones invasivas similares a las de *Streptococcus pyogenes* como; fascitis necrotizante, fiebre reumática, neumonía, síndrome de shock tóxico etc. Los factores de virulencia como las exotoxinas estreptocócicas y la proteína M contribuyen al desarrollo de estas enfermedades, facilitando la adherencia e invasión a la célula del hospedador.

Identificando la presencia de estos factores de virulencia en cepas de *Streptococcus* Grupo C y G obtendríamos un panorama general de cómo han evolucionado estas cepas a nivel molecular.

5. HIPOTESIS

La presencia de genes de virulencia de *Streptococcus pyogenes* en aislamientos clínicos de *Streptococcus* de grupo C y G está relacionada con la presencia del gen *emm* y el tipo M que presentan.

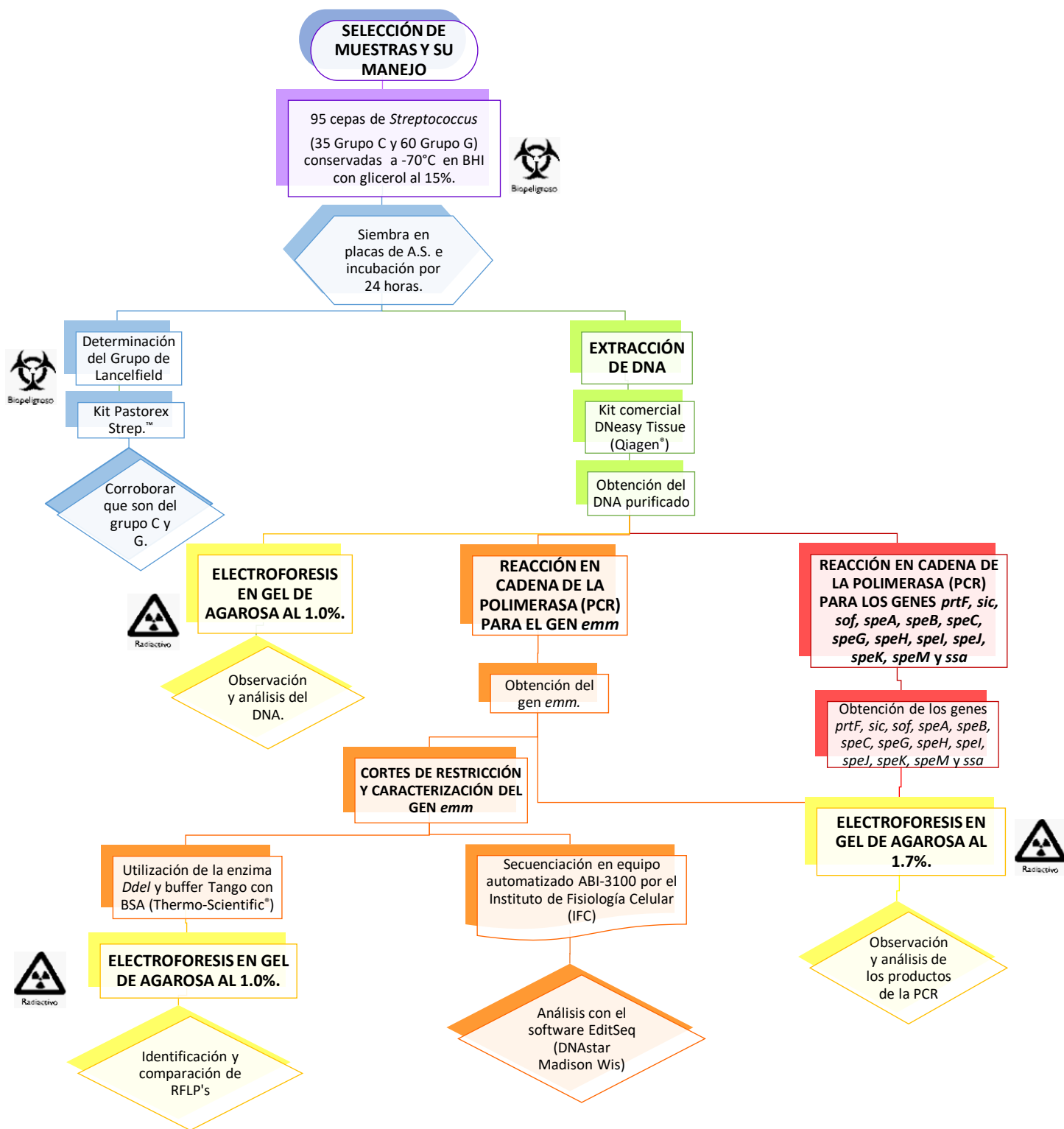
6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de los genes *prtF*, *sic*, *smeZ*, *sof*, *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM* y *ssa* en 95 aislamientos clínicos de *Streptococcus* beta-hemolíticos, 30 de grupo C y 65 de grupo G, con presencia del gen *emm*, realizando su identificación por la técnica de la PCR y su asociación al tipo M presente.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el tipo M de las cepas de grupo C y G mediante el análisis de restricción del gen *emm* obtenido por la PCR.
- Realizar la búsqueda de los genes *prtF*, *sic*, *smeZ*, *sof*, *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM* y *ssa* por medio de la técnica molecular la PCR en las cepas clínicas de *Streptococcus* grupo C y G.
- Identificar el gen o los genes de virulencia con mayor prevalencia en las cepas de *Streptococcus* Grupo C y G.
- Correlacionar la presencia de los genes de virulencia de *Streptococcus pyogenes* con los tipos M determinados en las cepas de *Streptococcus* de grupo C y G.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

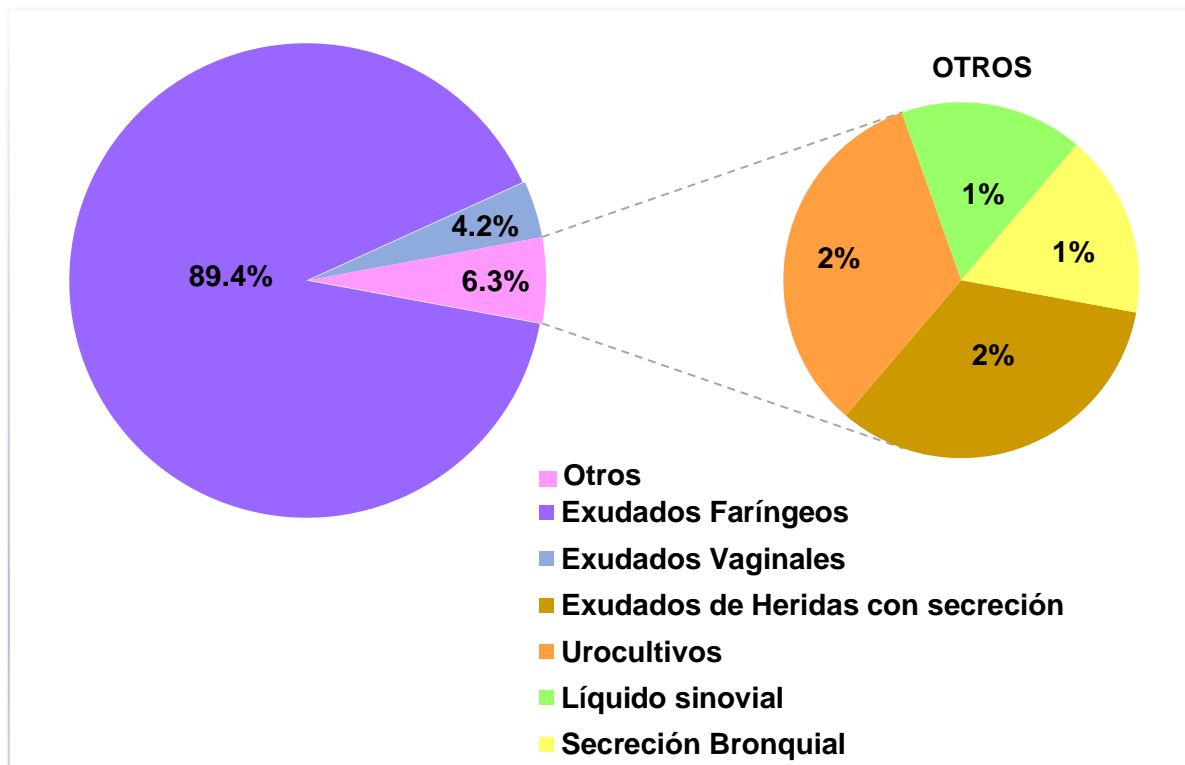


7.1. Selección de las muestras y su manejo

El laboratorio de Biología Molecular de la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina cuenta con 2,900 aislamientos clínicos de *Streptococcus* beta-hemolíticos que provienen de diferentes Instituciones de Salud Pública, para este estudio se seleccionaron cepas de *Streptococcus* pertenecientes a los grupos C y G, que presentan el gen *emm*. En total se manejaron 95 cepas, 35 del grupo C y 60 del grupo G.

La distribución de las cepas se hizo con base al origen clínico de las muestras (Figura 4).

Figura 4. Distribución del origen clínico de las cepas estudiadas



Ochenta y cinco muestras (89.4%) son de exudados faríngeos, 4 (4.2%) pertenecen a exudados vaginales y 6 (6.3%) están clasificadas con la etiqueta de “otros” por su bajo número, ya que pertenecen a distintos orígenes como; exudados de heridas, secreción bronquial, líquido sinovial y urocultivo.

Las cepas se mantienen conservadas a una temperatura de -70°C en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) (BBL®) con glicerol al 15%, las cepas seleccionadas se sembraron por estría cruzada en placas de Agar Sangre al 5% (BBL®). También se realizó la determinación del grupo de Lancefield, para la cual se utilizó el kit Pastorex Strep™ (Bio Rad®), esto nos permitió corroborar que las cepas pertenecían al Grupo C o G.

7.2. Extracción de DNA

Para la realización de la extracción de DNA en las 95 cepas de *Streptococcus* Grupo C y G, se usó el kit comercial DNeasy Tissue (Qiagen®).

Las cepas conservadas a una temperatura de -70°C en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) se descongelaron para su posterior siembra en placas de AS y se incubaron durante 24 horas, a partir de estos aislamientos se obtuvieron de 3 a 5 colonias de cada una de las cepas a estudiar y se inocularon en 2 mL de caldo Todd-Hewith (TH) (Difco®), incubando de 18 a 24 horas a 37°C en agitación, y se ajustó la suspensión bacteriana a una concentración de 2×10^9 células /mL.

Para cada muestra se tomó una alícuota de 1 mL de caldo bacteriano y se transfirió a uno tubo Eppendorf de 1.5 mL, enseguida se centrifugó a 7,500 rpm durante 10 minutos (Sigma®), descartando el sobrenadante y recuperando el paquete de células bacterianas. Se agregó 180 μL de buffer de lisis enzimática con 20 mg/mL de lisozima (Amresco®) y se agitó en Vórtex 2 Genie (Scientific Industries®), posteriormente se incubó a 37°C por 30 minutos (Heldolph Unimax 1010®).

Transcurrido el tiempo se adicionó 25 μL de proteinasa K (600 mAU/mL) y 200 μL de buffer AL, agitando e incubando a 70°C durante 30 minutos en Multi Blok Heater (Lab-Line®), después se agregó 200 μL de etanol absoluto frío y se agito en el vórtex.

La mezcla de cada una de las muestras se transfirió a una columna de extracción y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 minuto, descartando el sobrenadante, posteriormente se agregó a la columna 500 μL de buffer de lavado AW₁

centrifugando a 8,000 rpm durante 1 minuto descartando el sobrenadante, un segundo lavado con 500 µL de buffer AW₂ centrifugando a 12,000 rpm por 3 minutos. Finalmente se transfirió la columna de extracción a un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 mL y se agregó a la columna 200 µL de buffer de elución AE, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8,000 rpm un minuto, obteniendo el DNA en los tubos Eppendorf y conservándolos a 4°C.

Una vez obtenidos los DNA's, se evaluó la calidad y cantidad, observando por electroforesis usando 3 µL de DNA en un gel de agarosa (Invitrogen®) al 1.0 %, en TBE buffer 0.5x (TRIS-Boratos-EDTA) en la cámara de electroforesis MiniSub-Cell de Bio Rad® a un voltaje de 85v durante 30 minutos. El revelador fue Bromuro de Etidio 10mg/mL (Search Organic®).

El gel de Agarosa se observó en un transiluminador de luz UV (Lab-Tech®) para visualizar los DNA's.

7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e identificación de genes de virulencia.

Una vez obtenidos los DNAs de las cepas se procedió a realizar la técnica de PCR para identificar los genes *emm*, *prtF*, *sic*, *smeZ*, *sof*, *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM* y *ssa*, los primers utilizados para la amplificación de estos genes son los mismos que se utilizan para su detección en *Streptococcus pyogenes*. **(Tabla 2)**

Las condiciones tanto físicas como químicas para llevar a cabo esta técnica se encuentran estandarizadas en el laboratorio de Biología Molecular para las cepas de *Streptococcus pyogenes*, por lo tanto, se usó la misma metodología para las cepas del Grupo C y G.

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación de los genes de virulencia

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

F: Forward; R: Reverse

Para cada amplificación se utilizó una mezcla maestra diferente como se muestra a continuación:

Tabla 3 Mezcla de reacción para amplificar el gen *emm*. Vol. Final 50µL

PCR del gen <i>Emm</i>	
Reactivos	Volumen (µL)
Buffer 10x (Roche®)	5.0
dNTP's 1.25mM (Sigma®)	8.0
Primer <i>emm</i> _(F) 10µM	1.0
Primer <i>emm</i> _(R) 10µM	1.0
Taq Polimerasa 5U/µL (Roche ®)	0.2
DMSO (Sigma®)	0.2
H ₂ O ultra pura	33.6
DNA	1.0

Controles de *Streptococcus pyogenes*

- Cepa No. 2805
- Cepa No. 2807

Tabla 4. Mezcla de reacción para amplificar el gen *prtF*. Vol. Final 15µL

PCR del gen <i>prtF</i>	
Reactivos	Volumen (µL)
Buffer A 10x (Vivantis®)	1.5
MgCl ₂ 50mM	1.0
dNTP's 1.25mM(Sigma®)	3.0
Primer <i>prtF</i> _(F) 10µM	0.4
Primer <i>prtF</i> _(R) 10µM	0.4
Taq Polimerasa 5U/µL (Vivantis®)	0.08
DMSO (Sigma®)	0.1
H ₂ O ultra pura	7.52
DNA	1.0

Controles de *Streptococcus pyogenes*

- Cepa No. 1155
- Cepa No. 1163

Tabla 5. Mezcla de reacción para amplificar los genes *sic/sof*. Vol. Final 15µL

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer S 10x (Vivantis®)	1.5
dNTP's 1.25mM(Sigma®)	3.0
Primer <i>sic</i> _(F) 10µM	0.4
Primer <i>sic</i> _(R) 10µM	0.4
Primer <i>sof</i> _(F) 10µM	0.4
Primer <i>sof</i> _(R) 10µM	0.4
Taq Polimerasa 5U/µL (Vivantis®)	0.07
H ₂ O ultra pura	7.83
DNA	1.0

Controles de *Streptococcus pyogenes*

- Cepa No. 2366
- Cepa No. 2536

Tabla 6. Mezcla de reacción para amplificar los genes *speA/speC*. Vol. Final 15µL

PCR dual genes <i>speA/speC</i>	
Reactivos	Volumen (µL)
Buffer S 10x (Vivantis®)	1.5
dNTP's 1.25mM (Sigma®)	3.0
Primer <i>speA</i> _(F) 10µM	0.3
Primer <i>speA</i> _(R) 10µM	0.3
Primer <i>speC</i> _(F) 10µM	0.3
Primer <i>speC</i> _(R) 10µM	0.3
Taq Polimerasa 5U/µL (Vivantis®.)	0.06
H ₂ O ultra pura	8.24
DNA	1.0

Controles de *Streptococcus pyogenes*

- Cepa No. 2455
- Cepa No. 2776

Tabla 7. Mezcla de reacción para amplificar el gen *speB*. Vol. Final 15µL

PCR del gen <i>speB</i>	
Reactivos	Volumen (µL)
Buffer A 10x (Vivantis®)	1.5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTP's 1.25mM(Sigma®)	5.0
Primer <i>speB</i> _(F) 10µM	0.5
Primer <i>speB</i> _(R) 10µM	0.5
Taq Polimerasa 5U/µL (Vivantis®)	0.06
DMSO	0.15
H ₂ O ultra pura	4.79
DNA	1.0

Control de *Streptococcus pyogenes*

- Cepa No. 1338

Tabla 8. Mezcla de reacción para amplificar los genes *speH/speI*. Vol. Final 15µL

PCR dual genes <i>speH/speI</i>	
Reactivos	Volumen (µL)
Buffer S 10x (Vivantis®)	1.5
dNTP's 1.25mM (Sigma®)	2.5
Primer <i>speH</i> _(F) 10µM	0.4
Primer <i>speH</i> _(R) 10µM	0.4
Primer <i>speI</i> _(F) 10µM	0.4
Primer <i>speI</i> _(R) 10µM	0.4
Taq Polimerasa 5U/µL (Vivantis®)	0.1
H ₂ O ultra pura	8.3
DNA	1.0

Controles de *Streptococcus pyogenes*

- Cepa No. 2610
- Cepa No. 2612

Tabla 9. Mezcla de reacción para amplificar los genes *smeZ/speJ/speG*. Vol. Final 15µL

PCR múltiple genes <i>smeZ/speJ/speG</i>	
Reactivos	Volumen (µL)
Buffer A 10x (Vivantis®)	1.5
MgCl₂ 50mM	1.5
dNTP's 1.25mM(Sigma®)	4.0
Primer <i>smeZ</i>_(F) 10µM	0.4
Primer <i>smeZ</i>_(R) 10µM	0.4
Primer <i>speJ</i>_(F) 10µM	0.4
Primer <i>smeJ</i>_(R) 10µM	0.4
Primer <i>speZ</i>_(F) 10µM	0.4
Primer <i>smeZ</i>_(R) 10µM	0.4
Taq Polimerasa 5U/µL (Vivantis®)	0.1
H₂O ultra pura	4.5
DNA	1.0

Controles de *Streptococcus pyogenes*

- Cepa No. 2522
- Cepa No. 2805

Tabla 10. Mezcla de reacción para amplificar los genes *ssa/speK/speL/speM*. Vol. Final 15µL

PCR múltiple genes <i>ssa/speK/speL/speM</i>	
Reactivos	Volumen (µL)
Buffer A 10x (Vivantis®)	1.5
MgCl₂ 50mM	1.5
dNTP's 1.25mM(Sigma®)	3.5
Primer <i>ssa</i>_(F) 10µM	0.4
Primer <i>ssa</i>_(R) 10µM	0.4
Primer <i>speK</i>_(F) 10µM	0.4
Primer <i>smeK</i>_(R) 10µM	0.4
Primer <i>speL</i>_(F) 10µM	0.4
Primer <i>smeL</i>_(R) 10µM	0.4
Primer <i>speM</i>_(F) 10µM	0.4
Primer <i>smeM</i>_(R) 10µM	0.4
Taq Polimerasa 5U/µL (Vivantis®)	0.1
H₂O ultra pura	4.2
DNA	1.0

Controles de *Streptococcus pyogenes*

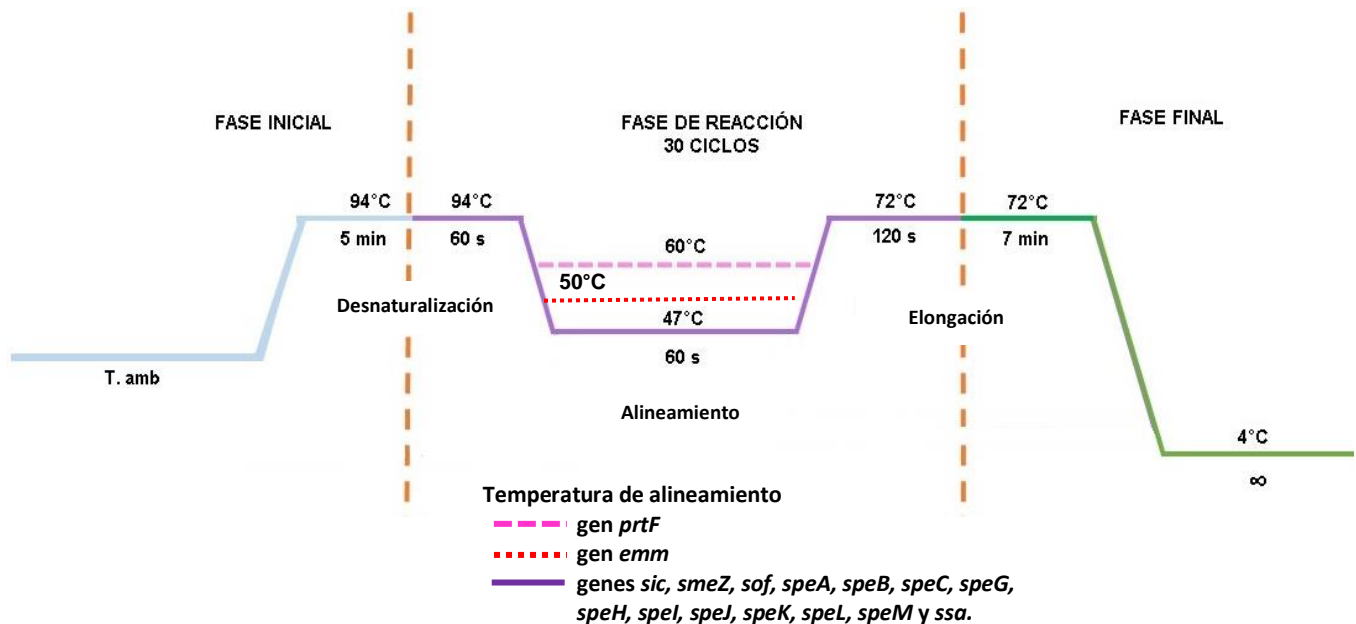
- Cepa No. 2455
- Cepa No. 2776
- Cepa No. 2815

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp System 9700 (Applied Biosystems®), la mayoría de las muestras utilizaron el mismo protocolo para su amplificación, la única diferencia fue la temperatura de alineamiento, esto en función de los primers utilizados.

La reacción de PCR que se programó en el termociclador consistió en 3 fases: **(Figura 5).**

- I. La FASE INICIAL es la desnaturalización del DNA a una temperatura a 94°C y consta de un ciclo de 5 minutos.
- II. La FASE DE REACCIÓN de 30 ciclos comprende 3 etapas por ciclo:
 - a. Desnaturalización; separación de las dos cadenas que forman la molécula de DNA blanco, para lo cual se debe calentar el DNA a 94°C por 60 segundos.
 - b. Alineamiento; La temperatura de alineamiento varía en función del gen de virulencia que se desea identificar, consiguiendo que cada primer se alinee de forma específica a la secuencia complementaria dentro de la cadena de DNA (60 segundos).
 - c. Elongación; Es el último paso y consiste en síntesis (replicación) de la cadena de DNA complementaria por acción de la *Taq* polimerasa, a partir de la extensión del extremo 5' de cada *primer*. A una temperatura de 72°C y un tiempo aproximado de 120 segundos.
- III. La FASE FINAL sirve para complementar los productos amplificados a 72°C por 7 minutos y posteriormente se disminuyó la temperatura a 4°C para detener la reacción.

Figura 5. Técnica de PCR realizada para la identificación de genes de virulencia



La observación de los productos de PCR se realizó con la técnica de electroforesis utilizando agarosa (Thermo-Scientific®) a una concentración de 1.7%. Por cada 100 ml de agarosa se le adiciono 2µL de Bromuro de Etidio 10mg/mL (Search Organic®) como revelador. Se corrió el gel en la cámara de Electroforesis MiniSub-Cell (Bio Rad®) con buffer TBE 0.5x, se cargaron 5µL de cada muestra junto con el colorante azul de bromofenol, cada conjunto de muestras tuvo se corrió con los controles respectivos para cada gen y un marcador de 100 pb 0.5µg (Thermo-Scientific®).

Se ajustaron los parámetros en la fuente de poder a 85v y 400mA durante 45 minutos. El gel de Agarosa se observó en transiluminador de luz UV (Lab Tech®) y se capturó la imagen en el fotodocumentador EDAS290 (Kodak®) para su análisis posterior.

7.4. Cortes de restricción y caracterización del gen *emm*.

Este proceso se llevó a cabo obteniendo los productos de PCR del gen *emm*, determinando el tamaño molecular del producto obtenido con el software Kodak 1D 3.5.

El corte enzimático se llevó a cabo utilizando la enzima *Ddel*. Esta enzima corta el DNA cuando reconoce la secuencia 5' C↓TNAG-3' (donde N puede ser cualquiera de los cuatro nucleótidos comunes).

Se realizó una mezcla maestra para poder distribuirla en cada muestra, como se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 11. Mezcla de reacción para la digestión enzimática con *Ddel* en productos del gen *emm* Vol. Final 40µL

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer Tango 10x	4.0
Enzima <i>Ddel</i>	0.2
Producto de PCR del gen <i>emm</i>	35.8

Las muestras se incubaron a 37°C durante 18Hrs.

Para observar los cortes de restricción se cargaron los 40µL en un gel de Agarosa al 2.3% (Ultrapure Invitrogen®) con Br de Etidio 0.2µg/ml %, realizando una electroforesis en la cámara MiniSub-Cell (Bio Rad®), utilizando un voltaje de 70V por 120 minutos.

Se identificaron los RFLP's obtenidos, comparándolos con los RFLP's de las cepas de referencia del CDC, con el fin de asignar el tipo de M correspondiente.

Las cepas que no se lograron identificar por medio del corte de restricción se enviaron como productos purificados del gen *emm* al Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM, donde se secuenciaron en un equipo automatizado ABI-3100 de Applied Biosystems.

El archivo electrónico de la secuencia enviado por el IFC se analizó con el software EditSeq (DNASTar Madison Wis), el cual nos dio la secuencia de nucleótidos. Teniendo la secuencia del gen *emm* se accedió a la página web del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) *Streptococcus pyogenes*, en el apartado de [Blast-*emm* & *emm* databases](#) se introdujo la secuencia y en unos minutos se obtuvo el análisis Blast de la secuencia enviada la cual es comparada con la base de secuencias que se tiene para la identificación del gen *emm*.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1. Extracción de DNA

Para llevar a cabo la amplificación del gen *emm* de las cepas de *Streptococcus* Grupo C y G fue necesario realizar el aislamiento de DNA de cada una de ellas. De acuerdo con el manual del Kit DNeasy Tissue de QIAGEN®, el procedimiento que se utilizó está diseñado para brindar una alta pureza y concentración de DNA pudiendo conservarse a temperaturas entre -25°C y -15°C para un uso posterior.

Se procedió a correr las muestras en un gel de agarosa al 1% para observar el rendimiento obtenido durante la extracción y su pureza demostrada al observar solamente una banda, como ejemplo se muestra la **Figura 6**.

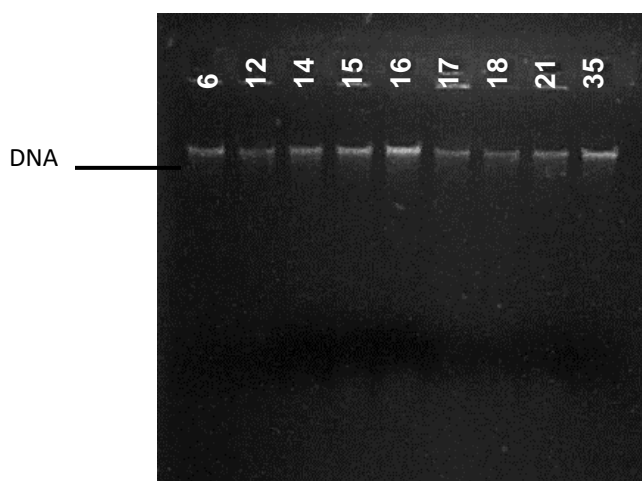


Figura 6. Corrimiento electroforético de DNA de *Streptococcus* de Grupo C y G en gel de agarosa al 1.0%.

8.2. Amplificación del gen *emm* y determinación de los tipos M

Se llevo a cabo siguiendo la técnica de PCR utilizada en el laboratorio para *Streptococcus* del Grupo A.

Realizada la amplificación del gen *emm* se observaron variaciones en el peso molecular que fueron desde 875pb hasta 1811pb. (**Figura 7**).

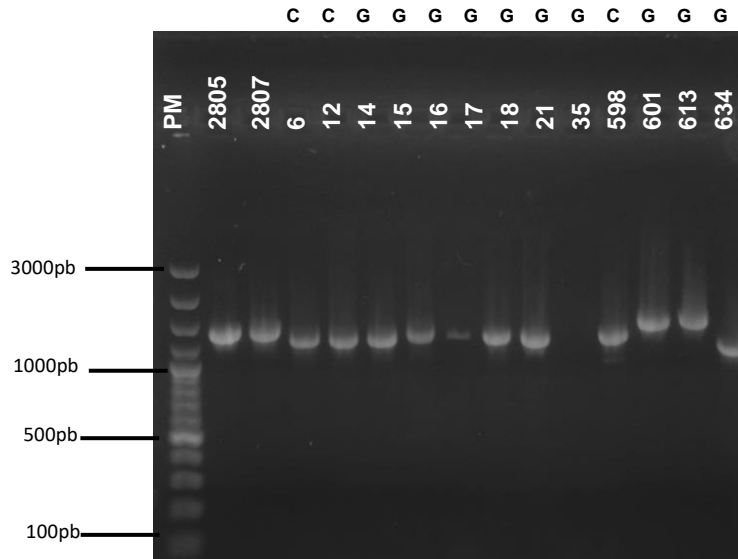


Figura 7. Amplificación del gen *emm* obtenidos por PCR. En el primer carril PM: Marador 100 pb (Thermo-Scientific®), en el segundo y tercer carril controles positivos de *Streptococcus pyogenes*, los demás carriles (4-16) pertenecen a las muestras estudiadas de *Streptococcus* de Grupo C (4, 5 y 13) y G (6-12 y 14-16). Los números indican la cepa con la cual se trabajó.

Bisno & et al. mostró que la proteína M se puede encontrar principalmente en aislamientos de *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* de pacientes con faringitis aguda. Se ha confirmado recientemente que las proteínas tipo M de los *Streptococcus* del Grupo C participan en la patogénesis de la fiebre reumática en algunas regiones geográficas como el Norte de Australia.⁴⁰

La determinación del tipo M se realizó tomando en cuenta dos características: 1) el tamaño molecular del amplificado del gen *emm* y 2) el análisis de los RFLP's obtenidos en la digestión enzimática del producto del gen *emm* con la enzima *Ddel* (**Figura 8**). Los patrones resultantes se compararon con los patrones de cepas de referencia de los CDCs realizados en el laboratorio de Biología de molecular de Salud Pública, tanto para cepas de referencia de los grupos de *Streptococcus* del grupo A como de *Streptococcus* del Grupo C y G.

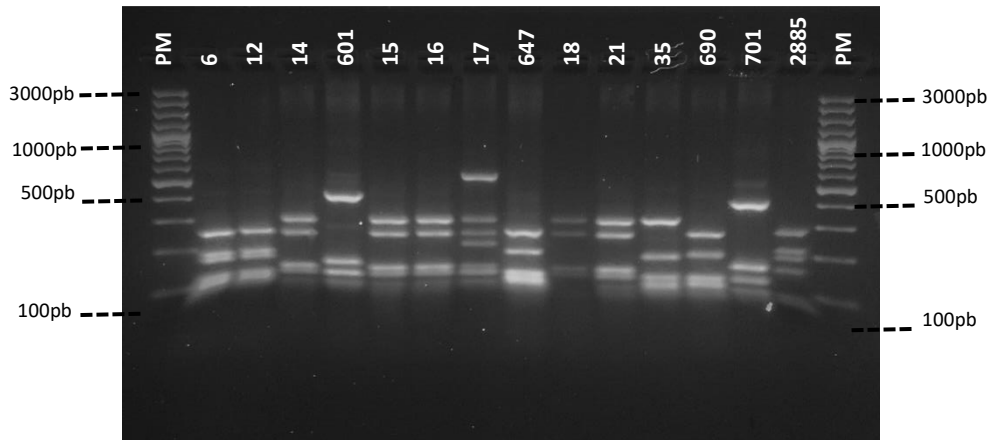


Figura 8. Carriles (2-14) cortes de restricción de los productos de PCR del gen *emm* en cepas de *Streptococcus* de Grupo C y G con la enzima *DdeI*. En el primer y último carril PM: Marcador 100 pb (Thermo-Scientific®). Los números indican la cepa con la cual se trabajó.

En la **Tabla 12** se puede apreciar que se encontraron 25 diferentes tipos M en 95 cepas de *Streptococcus* de Grupo C y G, fueron ordenados según su frecuencia.

Se determino el tamaño de pares de bases promedio de el gen *emm* amplificado, para cada uno de los tipos M.

Los 10 tipos M más frecuentes fueron stG485 (13.6%), stG653.0 (10.5%), stG840.0 (10.5%), stC36 (7.3%), stC5345 (7.3%), stG6792 (7.3%), stC839 (7.3%), stG480 (5.2%), stG643 (4.2%) y stG2574.0 (4.2%). Representando el 77.4% del total de cepas.

Algunos tipos M se encontraron solo en cepas de grupo C o G y otros en ambos, como se muestra en la **Figura 9**.

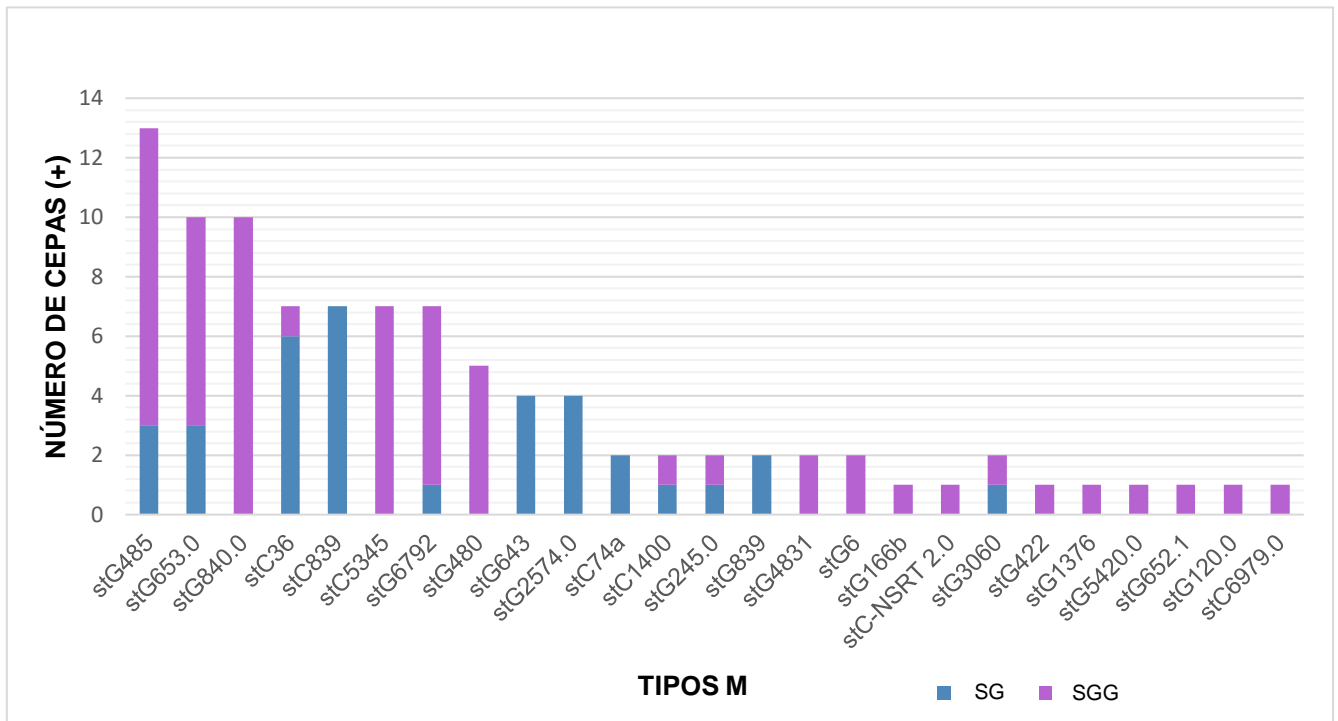
13 tipos M se encontraron solo en cepas de *Streptococcus* del Grupo G y 5 tipos M en cepas de grupo C.

Tabla 12. Tipos de proteína M encontrados en *Streptococcus* de Grupo G y C

Tipo M	Peso molecular (pb) gen <i>emm</i>	Grupo		Total
		C	G	
stG485	±1626.6	3	10	13
stG653.0	±1403.3	3	7	10
stG840.0	±1317.4		10	10
stC36	±1364.1	6	1	7
stC839	±1454.2	7		7
stC5345	±1260.2		7	7
stG6792	±1392.5	1	6	7
stG480	±1419.7		5	5
stG643	±1014.1	4		4
stG2574.0	±1542.2	4		4
stC74a	±1500	2		2
stC1400	±1250	1	1	2
stG245.0	±1306.5	1	1	2
stG839	±1575	2		2
stG4831	±1425		2	2
stG6	±1470		2	2
stG166b	1360		1	1
stC-NSRT 2.0	1574		1	1
stG3060	1153	1		1
stG422	106		1	1
stC1376	1921		1	1
stG5420.0	1587		1	1
stG652.1	1277.4		1	1
stG120.0	1407		1	1
stC6979.0	1200		1	1
Total		35	60	95

Los tipos M stC36, stC74a.0, stG166b.0, stG245.0, stG422, stG480, stG485, stG840, stG5420.0 y stG6792 coinciden con los resultados obtenidos por un estudio en Israel donde se examinaron solo cepas del Grupo G provenientes de personas con índices altos de bacteriemia en proceso de celulitis¹⁹, mientras que las cepas aquí trabajadas fueron de pacientes con un diagnóstico de faringitis aguda.

Figura 9. Distribución de los 25 tipos M encontrados en cepas de *Streptococcus* Grupo C y G



La frecuencia en que se encuentran los genes *emm* en *Streptococcus* del Grupo C y G, varía de acuerdo con la zona geográfica que se estudie.

En el norte de Europa se estudiaron los casos de mortalidad por bacteriemia causada por *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* encontrando una mayor asociación a los tipos M stG643, stC6979, stG166b, stG11, stC74a, stG10, stG245, stG507-1, stG840, stC9431, stG652, stG2078, stG62647, stC839.0 y stCK401 que son poco comunes en comparación con los tipos M comunes destacando a **stG6, stG245, stG480 y stG485.0**, explicando que esto puede deberse a una respuesta humoral previa. Mientras que a los tipos M comunes se les asocio con manifestación de celulitis e infecciones de piel y tejidos.⁶¹

En el presente trabajo los tipos **stG6, stG245, stG485.0** se identificaron en cepas de Grupo C y G, aumentando la posibilidad de encontrarse frecuentemente.

El tipo **stG485.0** que se encontró con mayor frecuencia en este estudio, ha sido aislado frecuentemente en Japón de cepas asociadas a infecciones invasivas, junto con los tipos stG6792 y stG2078, mientras que stG10, **stG6** y **stC36** se observan principalmente en casos no invasivos.³¹

8.3. Identificación de los genes de virulencia de *S. pyogenes* en *Streptococcus* de Grupo C y G.

Sesenta cepas de los 95 estudiadas mostraron poseer al menos un gen de virulencia de los 15 genes estudiados, mientras que en 35 cepas no se observó la amplificación de ninguno de los genes estudiados.

En la **Tabla 13** se puede observar el número de cepas que dieron positivo a estos genes y el tipo M que encontrado. El gen que se identificó con mayor frecuencia fue *prtF* con 49.4%, seguido por *speI* (18.9%), *speH* (14.7%) y *speM* (12.6%).

Tabla 13 Relación de los diferentes genes de virulencia con el tipo M encontrado.

Genes	No. de cepas	Tipos de M
<i>prtF</i>	47	<i>stC1400, stC36, stC5345, stC6792, stC6979, stC74a, stC839, stG120, stG245, stG2574, stG3060, stG480, stG4831, stG6, stG653, stG840, stG5345.</i>
<i>speI</i>	18	<i>stC36, stC839, stG2574, stG653, stG6792, stG840, stG5345.</i>
<i>speH</i>	14	<i>stC36, stC839, stG4831, stG653, stG6792, stG840.</i>
<i>speM</i>	12	<i>stC36, stG485, stG653, stG6792, stG839, stG840.</i>
<i>speC</i>	7	<i>stC36, stC839, stG653, stG6792, stG5345.</i>
<i>speG</i>	7	<i>stC36, stC839, stG653, stG6792, stG840, stG5345.</i>
<i>speL</i>	7	<i>stC36, stC5345, stG485, stG6792</i>
<i>speK</i>	3	<i>stC36, stG6792</i>
<i>smeZ</i>	2	<i>stC839, stG6792</i>
<i>Sof</i>	1	<i>stG6792</i>
<i>speB</i>	1	<i>stG6792</i>

Los genes *smeZ*, *speB*, *speC*, *speG*, *speK*, *speL* y *sof* se detectaron en <10% de las cepas. Mientras que los genes *sic*, *speA*, *speJ* y *ssa* no fueron identificados en este estudio.

Asimismo, se muestra la relación que tienen los genes de virulencia con los tipos M y el número de cepas en las que se encontraron.

8.3.1. Gen *prtF*

De las 95 cepas estudiadas, 47 mostraron la presencia del gen *prtF* (11 son *Streptococcus* grupo C y 36 grupo G).

Como se muestra en la **Figura 10**, tanto en los controles utilizados como en las muestras positivas se observaron amplificados de distinto peso molecular.

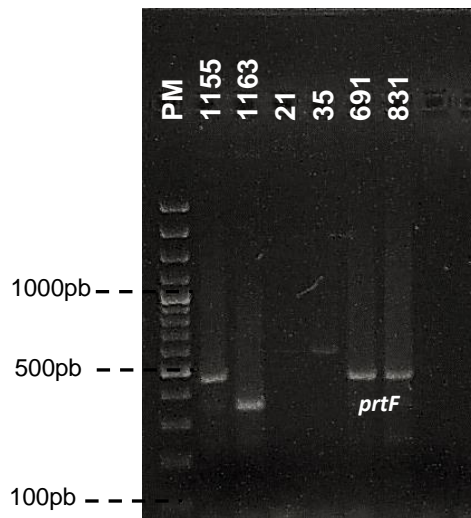
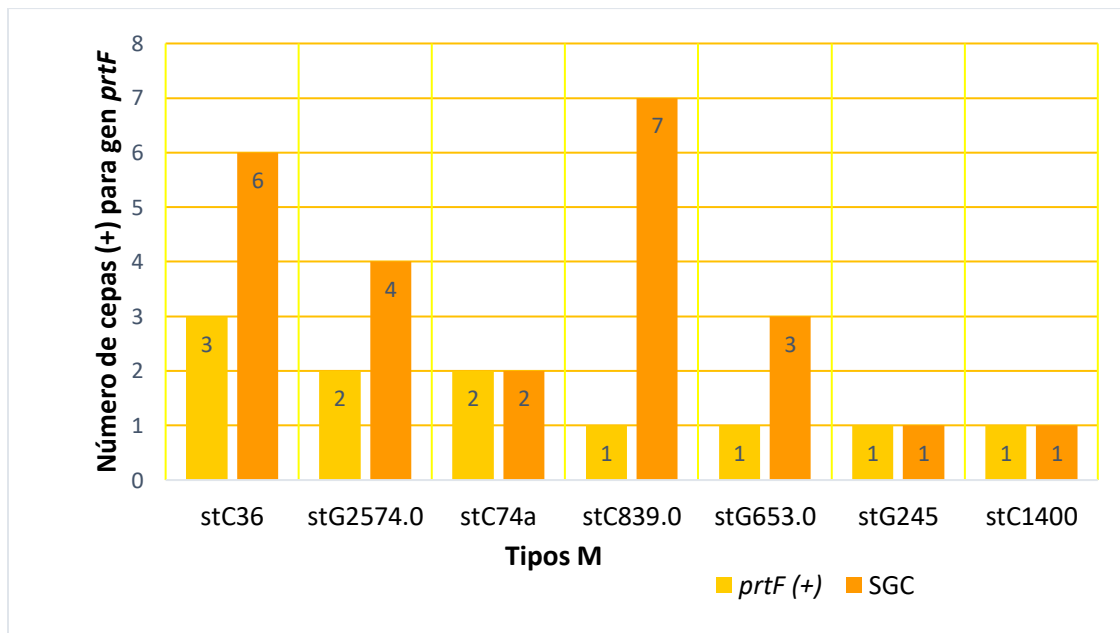


Figura 10. Productos de PCR del gen *prtF* en gel de agarosa al 1.7%. En el primer carril PM: Marcador 100 pb (Thermo-Scientific®), en el segundo y tercer carril los controles positivos de *Streptococcus pyogenes*, carriles (4-7) pertenecen a las muestras.

La proteína F muestra una variación en el peso molecular por un dominio de repetición (RD2) que se encuentra adyacente al extremo C-terminal de unión con la célula. Este consiste en hasta 6 tipos diferentes de repeticiones entre 32-44 aminoácidos y se considera que media la unión a Fn.⁵⁴

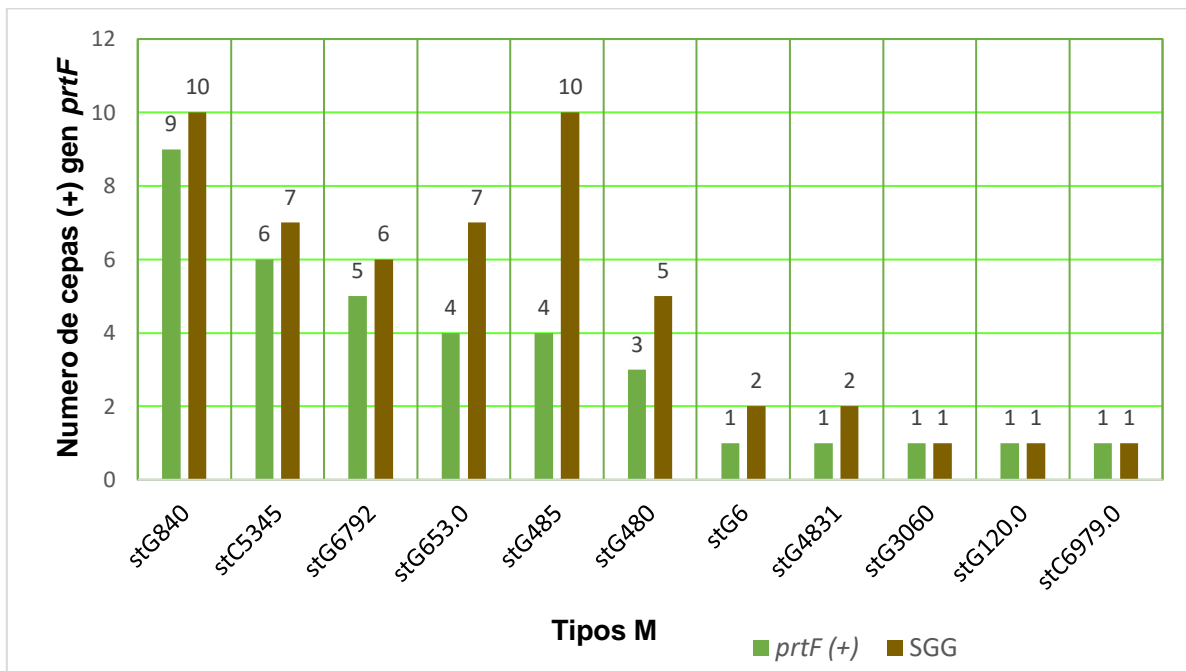
En cepas de grupo C se observó una relación entre la frecuencia en que se encuentra el gen y el tipo M que presenta, resultando *stC36*, *stG2574*, *stC74a*, *stC839.0*, *stG653.0*, *stG245* y *stC1400* los tipos M con mayor número de amplificados. (Figura 12).

Figura 12. Frecuencia del gen *prtF* en cepas de *Streptococcus* Grupo C con tipo M específico.



Se amplificó el gen *prtF* en las cepas de *Streptococcus* Grupo G de tipo M *stG840*, *stC5345*, *stG6792*, *stG653.0*, *stG485*, *stG480*, *stG6*, *stG4831*, *stG3060*, *stG120.0* y *stC6979.0* (Figura 13).

Figura 13. Frecuencia del gen *prtF* en cepas de *Streptococcus* Grupo G con tipo M específico



El 60% de cepas de *Streptococcus* del Grupo G dio positivo a *prtF* a comparación del grupo C con un 31%.

Los tipos M del Grupo G tuvieron una mayor relación con el gen *prtF*, es decir al menos el 50% de cada tipo M demostró tener el gen (a excepción de stG485 con 40%). Esto podría hablar acerca de una asociación entre tipo M y el gen *prtF*, para el caso de *Streptococcus* del Grupo G.

Aun no existen estudios que reporten el comportamiento del gen *prtF* en cepas de *Streptococcus* de Grupo C y G, por lo cual sería un tema en el cual valdría la pena estudiar la relación que tienen los distintos pesos moleculares del *prtF* con el tipo M que las cepas presentan y observar si estas siguen un patrón de bandeo.

8.3.2. Gen *sic/ sof*

La proteína SIC inhibe la lisis mediada por el complemento y /o la actividad de ciertos péptidos antimicrobianos (AMP). Se ha reportado presente en dos tipos M

de *S. pyogenes* (M1 y M57).¹ Recientemente se ha descubierto un gen ortólogo al gen *sic* llamado *sicG* en *S. dysgalactiae subsp. equisimilis*.⁶⁹

En este estudio no hubo ninguna cepa que amplificara el gen *sic*, sin embargo, existe un registro en el laboratorio de biología molecular, donde se identificó el gen en la cepa de referencia tipo M stG480 (SS1609), donde el análisis de su secuencia reveló indicar tener el alelo *sic1.63*.

En cuanto al gen *sof* este se identificó en una de las 6 cepas tipo M stG6792 (#601) en *Streptococcus* de grupo G (**Figura 14**). Cabe destacar que esta cepa fue positiva a 11 de los 15 genes de virulencia estudiados.

Investigaciones han reportado una menor presencia de este gen en *Streptococcus* de Grupo C (*S. equi*) que en *Streptococcus* de Grupo G (*S. dysgalactiae*, *S. anginosus*, *S. canis*) con una homología del 31-38% con la proteína SOF de *S. pyogenes*.²²

Sería de interés comparar la secuencia del gen *sof* de la cepa positiva con las reportadas en el estudio de Courtney & Pownall 2010.²²

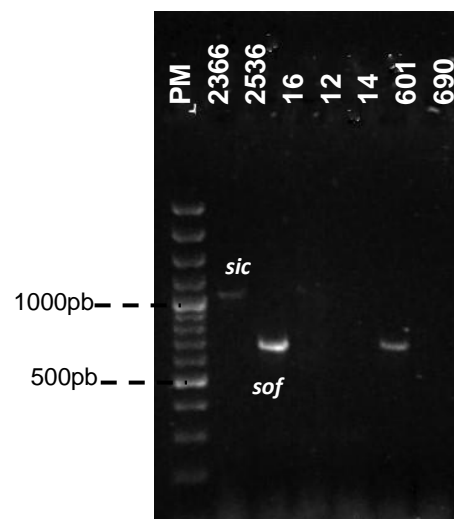


Figura 14. Productos de PCR dual de los genes *sic/sof* en gel agarosa al 1.7%. Primer carril PM: Marcador 100 pb (Thermo-Scientific®), segundo y tercer carril son controles positivos de *Streptococcus pyogenes*, carriles (4-8) son muestras, siendo solo positiva para el gen *sof* la n=601.

Se ha reconocido al tipo M stG6792 importante en Francia debido a que es una cepa invasiva y prevalente mientras que en Japón se ha implicado en cuatro de once casos de mortalidad por secuelas postinfección.³⁹

8.3.3. Genes cromosómicos.

8.3.3.1. Gen *speB*

El gen *speB* solo se encontró en una cepa (#601) de SGG tipo M stG6792. Se ha reportado que su expresión esta modulada por varios reguladores globales de la transcripción y está estrechamente coordinada con la expresión varios de genes.⁵²

Aun no existen reportes sobre la existencia del gen *speB* en *Streptococcus* del Grupo C y G, por lo cual este sería el primer hallazgo de este gen en una cepa de SGG.

8.3.3.2. Genes *smeZ*, *speG* y *speJ*.

Los genes de los sAg's de *S. pyogenes* se asocian generalmente con bacteriófagos, con excepción de *smeZ*, *speG* y *speJ*, los cuales están codificados cromosómicamente. Sin embargo, el gen *speJ* parece estar ubicado en una región cromosómica inestable y está ausente en varios aislamientos de *S. pyogenes*. Se especula que el gen *speJ* se adquirió de un fago, se incorporó al genoma y posteriormente se perdió en algunas clonas descendientes de *S. pyogenes*.²⁷

La identificación de estos genes se realizó por medio de una PCR múltiple dando como positivo *smeZ* en dos cepas (601 y 762) y *speG* en 7 cepas (**Figura 15**).

El gen *smeZ* se encontró en 2 aislamientos de SGG (tipos M: stC 839.0 y stG6792).

Mientras que *speG* dio positivo para dos cepas de SGC (tipos M: stC36, stC839.0) y cinco en cepas de SGG (tipos M: stG653.0, stG840.0, stG5345 y stG6792).

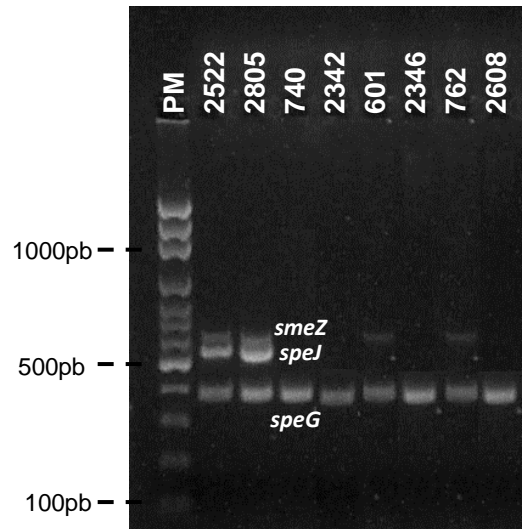


Figura 15. Productos de PCR múltiple de los genes *smeZ*, *speG* y *speJ* en gel agarosa al 1.7%. Primer carril PM: Marcador 100 pb (Thermo-Scientific®), segundo y tercer carril son controles positivos de *Streptococcus pyogenes*, carriles (4-9) son muestras positivas a los distintos genes.

Podemos observar que solo 2 cepas de SGG tipo M: stC 839.0 (#762) y tipo M stG6792 (#601) mostraron la presencia de ambos genes.

Si bien no hay muchos estudios acerca de la búsqueda de estos genes en SGC y SGG, hay reportes en Atlanta donde se realizó una identificación de diversos alelos del gen *smeZ* en cepas de *Streptococcus* Grupo C y G, encontrando 4 cepas positivas de 21 exploradas; *smeZ25*(stG1389), *smeZ17*(stG245), *smeZ2*(stG480 y stG2078).³⁴ Ningún de estos tipo M coinciden con nuestros resultados, pero son un ejemplo de que posiblemente con el tiempo exista mayor cantidad de cepas que presenten el gen *smeZ* en SGC y SGG.

De acuerdo con los datos obtenidos podemos hablar de que no existe una relación entre el grupo de *Streptococcus* (C o G).

Sachse & et al. identificaron un gen que codifica una proteína similar a SpeG (*speG^{dys}*) en 15 cepas de las 24 de SGC y SGG investigadas.⁶⁸

Recientemente se ha identificado *speG* en cepas de *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* con tipo M stG62647, pero se ha dado a conocer que este gen no confiere actividad superantigénica, por lo cual no tiene correlación con la gravedad de la enfermedad.⁵¹ En un futuro se podría comparar las cepas aquí presentadas que dieron positivas a *speG* con su actividad superantigénica y hacer una correlación con el tipo M.

8.3.4. Genes adquiridos por fagos

8.3.4.1. Genes *speA* y *speC*

El gen *speA* no se encontró en ninguna cepa de las 95 estudiadas, posiblemente esto es debido a que el gen es específico del genoma del bacteriófago T12 de *S. pyogenes*.⁷⁶ Aunque existen estudios donde se ha logrado encontrar a *speA* (*speA2* y *speA4*), en cepas de SGG sin encontrar alguna relación clara entre la gravedad de la enfermedad y la presencia de este gen.^{9,37}

Pocos estudios hacen referencia sobre la presencia de *speC* en cepas de SGC y SGG, debido a los muy escasos resultados que se obtienen, tal es el caso de Kalia & Bessen, que de 34 cepas de SGC y SGG solo fue positiva una.³⁷ En otro estudio Behera & et al. también encontraron una cepa de Grupo G positiva para este gen de 20 aislamientos de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.⁹

El gen *speC*, se amplificó en el 7.3% de las cepas estudiadas (4 de SGC y 3 de SGG), distribuidos en 5 tipos M diferentes. **Figura 16**

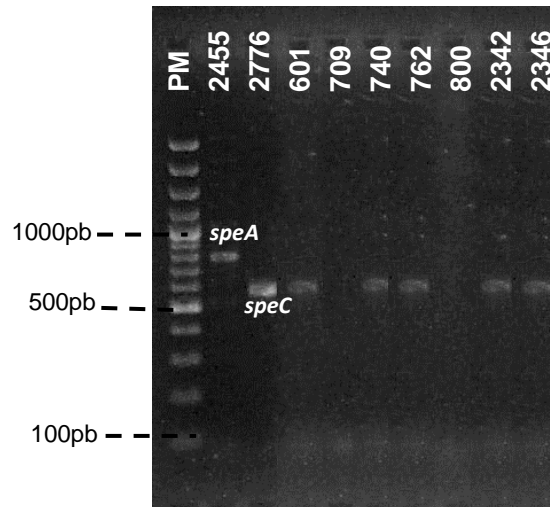


Figura 16. Productos de PCR dual de los genes *speA* y *speC* en gel agarosa al 1.7%. Primer carril PM: Marcador 100 pb (Thermo-Scientific®), segundo y tercer carril son controles positivos de *Streptococcus pyogenes*, carriles 4,6,9 y 10 son muestras positivas para el gen *speC*.

En SGC , el gen *speC* amplificó en 2 cepas de tipo M stC36 y 2 cepas stC839.0, para SGG, las cepas positivas que amplificaron el gen fueron los tipos M stG653.0, stG5345 y stG6792. Los resultados obtenidos son muy parecidos a una investigación hecha en la India, donde se identifica el gen *speC* en 4.5% de las 131 cepas de SGCy SGG analizadas.⁵⁶

Llama la atención algunas cepas de tipo M stC36, stG653 y **stG6792** que poseen el gen *speC* el cual es codificado a nivel cromosomal, también demostraron tener el gen *speG* en un 4.2%. Este es otro dato que concuerda con la investigación antes mencionada donde hablan de una relación entre *speC* y *speG* de 2.2%, en cepas de tipo M stG245.0, stG866.0, stG1750 y **stG6792**. Esto es importante ya que existen informes sobre la presencia de estos genes juntos en cepas aisladas de portadores asintomáticos.⁵⁶

Estos resultados nos hacen pensar que posiblemente exista una relación entre el gen *speC* y *speG*, por el momento no hay datos que confirmen esta teoría, la cual sería un tema interesante de investigar sobre todo en cepas de SGC y SGG.

8.3.4.2. Genes *speH* y *speI*

La identificación de los genes *speH* y *speI* se realizó por medio de una PCR dual, encontrándose al gen *speH* con una frecuencia del 14.7% y de *speI* en un porcentaje de 18.9%. **(Figura 17).**

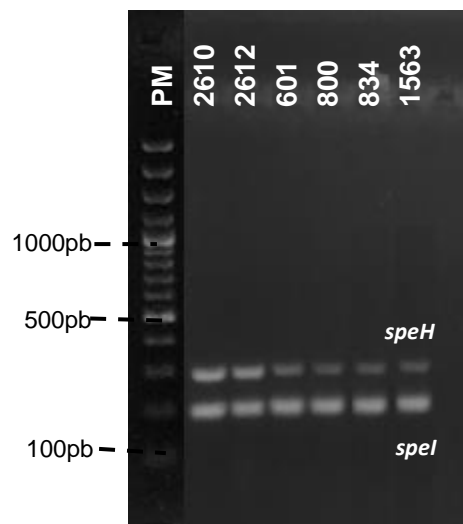
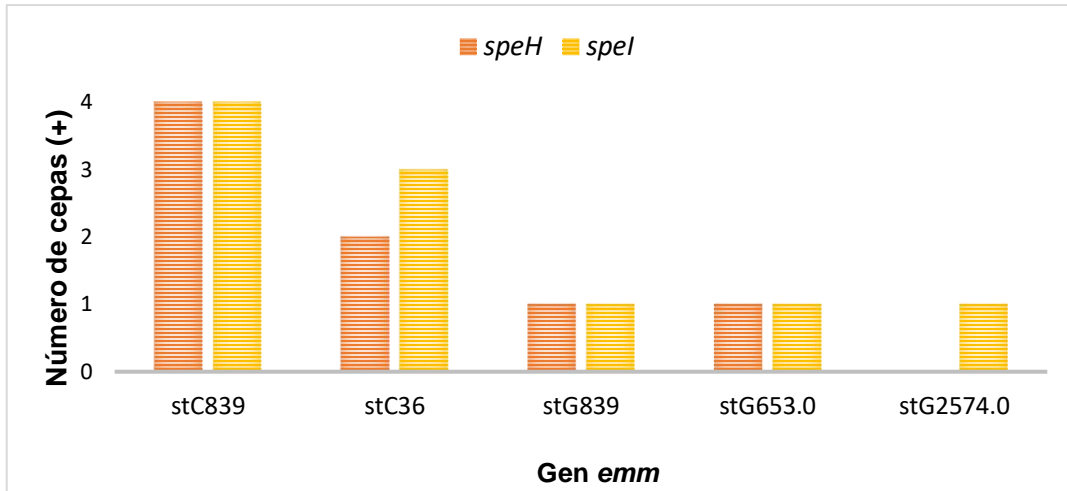


Figura 17. Productos de PCR dual de los genes *speH* y *speI* en gel agarosa al 1.7%. Primer carril PM: Marcador 100 pb (Thermo-Scientific®), segundo y tercer carril son controles positivos de *S. pyogenes*, carriles (4-7) son muestras positivas para los genes *speH* y *speI*.

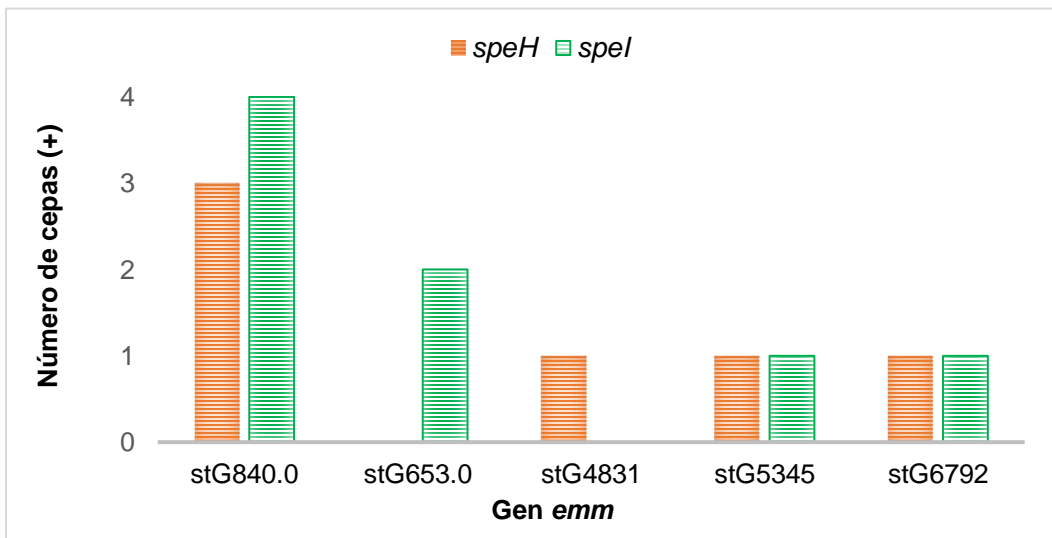
En SGC se observaron positivos para los genes *speH* y *speI* en algunos aislamientos con tipo M stC839, stC36, stG839, stG653.0 y stG2574.0. **(Figura 18).** El 80% de estos tipos M de SGC contienen ambos genes.

Figura 18. Frecuencia de los genes *speH* y *speI* en algunos tipos M de SGC



Mientras que los tipos M stG840.0, stG653.0, stG4831, stG5345 y stG6792 de SGG fueron positivos para al menos un gen. De estos el 55.5% contenían ambos genes. (Figura 19)

Figura 19. Frecuencia de los genes *speH* y *speI* en ciertos tipos M de SGG



Los genes *speH* y *speI* se han reportado juntos en la mayoría de las veces, debido a que ellos se localizan en el mismo fago $\Phi 370.2$.²⁵ Aquí no fue la excepción, puesto que la mayoría de las cepas positivas demostraron tener ambos genes (stC36, stC839, stG653.0, stG839, stG840, stG5345 y stG6792). En particular las cepas de stC839 tienen ambos genes o ninguno, a diferencia de los demás tipos.

La mayoría de las cepas positivas pertenecen al grupo C (8/14 para *speH* y 10/18 para *speI*), siendo semejante a una investigación realizada al sur de la India, donde se reportó la presencia de estos genes en 6 cepas de SGC de tipo M *stC46.0* y en una no tipificada.² Esto nos indicaría que el gen podría tener preferencia hacia cepas de SGC.

8.3.4.3. Genes *speK*, *speL*, *speM* y *ssa*

Finalmente se llevó a cabo una PCR múltiple para la amplificación de los genes *speK*, *speL*, *speM* y *ssa*, de estos el gen *speM* se identificó en 12 aislamientos, *speL* en 7, *speK* en 3 y 0 positivos para *ssa*. (Figura 20)

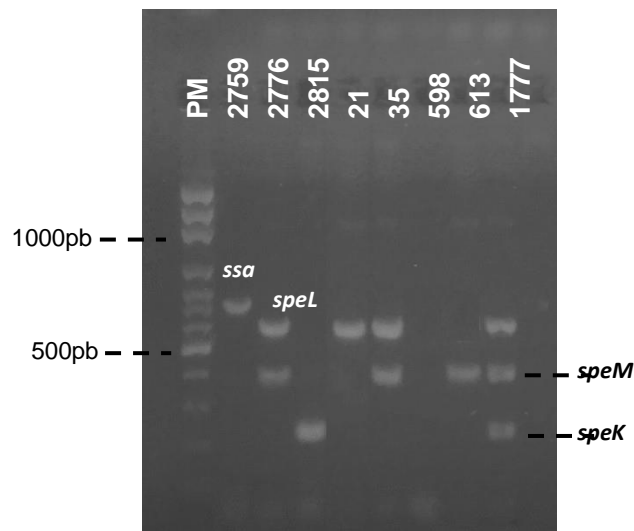


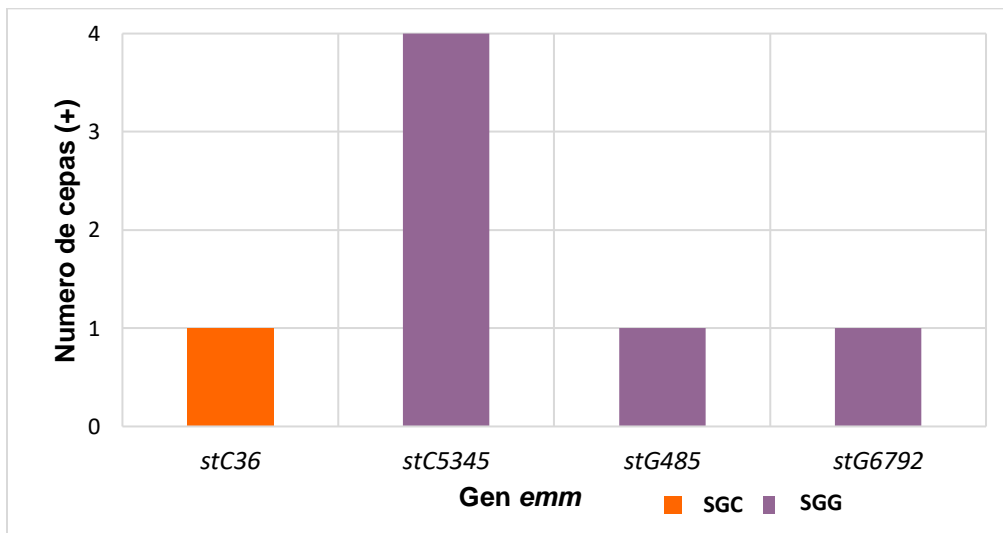
Figura 20. Productos de PCR múltiple de los genes *speK*, *speL*, *speM* y *ssa* en gel agarosa al 1.7%. Primer carril PM: Marcador 100 pb (Thermo-Scientific®), carriles (2-4) son controles positivos de *S. pyogenes*, carriles (5-9) son muestras positivas.

El gen *speK* se encontró con una frecuencia del 3.1%, una cepa de SGC (*stC36*) y dos de SGG (*stG6792*). Hasta el momento no hay reportes sobre la presencia de este gen en cepas de SGC y SGG aislados de humanos, por lo que este podría ser

uno de los primeros hallazgos, el cual daría la pauta para nuevas investigaciones en la búsqueda del gen *speK* en otras cepas de SGC y SGG. Se tiene la teoría de que este gen está involucrado en eventos de transferencia lateral de genes, transfiriéndose de *S. pyogenes* a *S. equi subsp. equi*.⁴²

El gen *speL* indico una frecuencia del 7.3% en cepas de SGC y SGG, destacando los tipos M stC36, stC5345, stG485 y stG6792. **(Figura 21)**. Se puede apreciar que la mayoría de resultados positivos fueron dentro del grupo G. Aun existen pocos reportes que hablan sobre la búsqueda del gen *speL* en SGC y SGG. Babbar & et al. mencionan un 2.2% de frecuencia en 45 aislamientos de SGC y 2.8% en 210 aislamientos de SGG.⁶

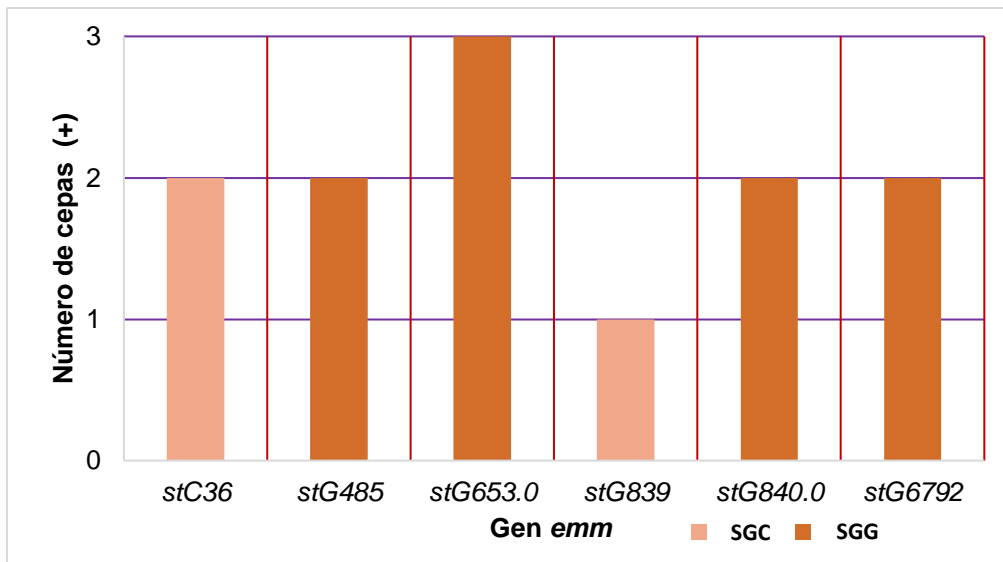
Figura 21. Distribución del gen *speL* en cepas de SGC y SGG



El gen *speM* fue positivo para 12 cepas, siendo una frecuencia de 12.6% detectándose en 6 tipos M: stC36(2), stG485(2), stG653.0(3), stG839(1), stG840.0(2), y stG6792. (2) **(Figura 22)**.

Igwe & et al. reportaron un estudio donde encontraron 5 cepas positivas de 21 (24%) para *speM* en SGC y SGG, predominando el grupo G.³⁴ Este predominio se presentó dentro del estudio obteniendo 9 cepas positivas al gen *speM* en SGG y 3 en SGC.

Figura 22. Distribución del gen *speM* en cepas de SGC y SGG



Solo en 3 aislamientos se identificaron de manera conjunta los genes *speL* y *speM*; *stC36*, *stG485* y *stG6792*. Indicando que su presencia no depende de un tipo M en particular en SGC y SGG.

Hace pocos años estos dos genes se identificaron en cepas de *S. equi* mediante el análisis de su genoma, denominándolos *speL_{se}* y *speM_{se}* debido a su homología con sus contrapartes de *S. pyogenes* *speL* y *speM* con identidades homologas en sus nucleótidos del 99% y 98.1%, respectivamente.⁴³

El gen *ssa* no logró ser identificado en las 95 cepas estudiadas de SGC y SGG, no existen reportes en la literatura sobre su identificación en estos grupos, hasta ahora se ha encontrado en *S. pyogenes* en 10 tipos M (M3, M4, M12, M15, M23, M33, M41, M43, M56 y M82).^{49,62}

8.4. Relación de los genes de virulencia de *S. pyogenes* en aislamientos de SGC y SGG con su tipo M.

Después de realizar un análisis minucioso para cada gen identificado de forma individual, se prosigió a realizar un bosquejo más general de la relación que tienen los tipos M con los genes de virulencia antes mencionados.

Se agruparon solo las cepas que dieron positivas al menos para un gen de virulencia por tipo M (que presenta gen *emm*) y el perfil de genes que amplificaron respectivamente.

Resultaron un total de 43 perfiles, que mostraron la presencia de genes de virulencia en 60 aislamientos tanto de SGC como de SGG de un total de 95 cepas. Esto nos ayuda a visualizar la variación genética entre tipos M. Las 35 cepas restantes no amplificaron para ningún gen de virulencia, por lo que no se encuentran mencionadas en la **Tabla 14**.

Los tipos M que presentaron 2 o más genes de virulencia fueron: stG840.0, stC36, stC839.0, stG653.0, stG6792, stC5345, stG485, stG839 y stG2574.0.

Dentro de cada tipo M se obtuvieron diferentes resultados en cuanto a la presencia de genes de virulencia, demostrando que ningún gen es específico del tipo M en SGC y SGG, sin embargo, no podemos afirmar lo mismo al relacionar un tipo M con la cantidad de genes encontrados.

En la **Tabla 15**, observamos el número de cepas que dieron positivas para cada gen de virulencia y a que grupo de *Streptococcus* pertenece, obteniendo mayor número de cepas positivas por parte del grupo G, así como una mayor cantidad de cepas positivas para el gen *prtF* y una menor respuesta al gen *sof*, *smeZ*, *speB*, y *speK*.

No hubo producto de amplificación de los genes *sic*, *speA*, *speJ* y *ssa* en las cepas estudiadas.

Hasta el momento no hay reportes donde exista comparativos sobre la búsqueda de estos genes en los dos grupos de SGC y SGG, la mayoría de los investigadores se han enfocado más en seleccionar un grupo de *Streptococcus* o en ocasiones especifican una especie de *Streptococcus* a estudiar, no obstante, sería atrayente la idea de estudiar ambos grupos a un nivel más profundo.

Tabla 14. Perfiles de los genes de virulencia relacionados con los tipos M de SGC y SGG.

Tipo M (Total de cepas)	Número de cepas	Perfil	<i>prtF</i>	<i>speI</i>	<i>speH</i>	<i>speM</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speL</i>	<i>speK</i>	<i>smeZ</i>	<i>sof</i>	<i>speB</i>
stG6792(7)	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
stG6792(7)	1	2	+			+							
stG6792(7)	1	3	+							+			
stG6792(7)	3	4	+										
stC839.0(7)	1	5	+	+	+		+	+			+		
stC839.0(7)	1	6		+	+		+						
stC839.0(7)	2	7		+	+								
stC36 (7)	1	8		+		+	+	+					
stC36 (7)	1	9	+	+	+		+						
stC36 (7)	1	10	+			+			+	+			
stC36 (7)	1	11	+	+	+								
stC36 (7)	1	12	+										
stG653.0(10)	1	13	+	+		+	+						
stG653.0(10)	2	14	+					+					
stG653.0(10)	1	15		+	+								
stG653.0(10)	2	16	+										
stG653.0(10)	1	17		+									
stG653.0(10)	1	18				+							
stG840(10)	3	19	+	+	+								
stG840(10)	1	20	+			+		+					
stG840(10)	1	21	+		+								
stG840(10)	1	22	+			+							
stG840(10)	1	23	+					+					
stG840(10)	2	24	+										
stG485(13)	1	25	+			+			+				
stG485(13)	3	26	+										
stG485(13)	1	27				+							
stG839(2)	1	28		+	+	+							
stG2574.0(4)	1	29	+	+									
stG2574.0(4)	1	30	+										
stC5345(7)	3	31	+						+				
stC5345(7)	2	32	+										
stC5345(7)	1	33							+				
stG480(5)	3	34	+										
stC74a (2)	2	35	+										
stC1400(2)	2	36	+										
stG4831(2)	1	37	+										
stG4831(2)	1	38			+								
stC6979.0(1)	1	39	+										
stG6(2)	1	40	+										
stG120(1)	1	41	+										
stG245.0(2)	1	42	+										
stG3060(1)	1	43	+										
TOTAL	60												

Finalmente, la cepa #601 de SGG con tipo M stG6792 presentó 11 genes positivos de los 15 estudiados, esta información es importante ya que nos da una idea de cómo ha evolucionado la cepa al adquirir dichos genes.

Investigaciones recientes mencionan que stG6792 tiene una estrecha relación con infecciones invasivas y no invasivas de piel y tejidos blandos,⁷⁵ también es asociado al Síndrome de Shock Tóxico.⁷²

Tabla 15. Relación de la cantidad de cepas positivas de SGC y SGG con los genes de virulencia.

Gen de virulencia	SGC	SGG
<i>prtF</i>	11/35	36/60
<i>smeZ</i>	1/35	1/60
<i>sof</i>	0/35	1/60
<i>speB</i>	0/35	1/60
<i>speC</i>	4/35	3/60
<i>speG</i>	2/35	5/60
<i>speH</i>	8/35	6/60
<i>speI</i>	10/35	8/60
<i>speK</i>	1/35	2/60
<i>speL</i>	1/35	6/60
<i>speM</i>	3/35	9/60
<i>ssa</i>	0/35	0/60
<i>sic</i>	0/35	0/60
<i>speA</i>	0/35	0/60
<i>speJ</i>	0/35	0/60

9. CONCLUSIONES

La presencia de genes de virulencia en *Streptococcus* de grupo C y G no está relacionada con el tipo M (gen *emm*) que presentan.

Veinticinco diferentes tipos M fueron identificados en las 95 cepas de *Streptococcus* de Grupos C y G, siendo stG485, stG653 y stG480 los más frecuentes.

Los genes de virulencia *prtF*, *smeZ*, *sof*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speK*, *speL* y *speM* se lograron detectar en los aislamientos clínicos de SGC y SGG.

Se identificó por vez primera la presencia de los genes *prtF*, *speB* y *speK* en cepas de SGC y SGG.

El gen *prtF* con 49% de frecuencia, representó el factor de virulencia mayor encontrado en las cepas estudiadas.

Los tipos M que mostraron una mayor cantidad de genes de virulencia son stG2574.0, stG6792, stC839.0, stC36, stG653.0, stG840.0, stG485, stG839 y stC5345.

Cuarenta y tres 3 diferentes perfiles genéticos fueron determinados relacionando el tipo M con los genes identificados.

10. REFERENCIAS

1. Akesson, P., Sjöholm, A. G., & Björck, L. (1996). Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 1081-1088.
2. Anand, T. D., Rajesh, T., Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2012). Superantigen profiles of *emm* and *emm*-like typeable and nontypeable pharyngeal streptococcal isolates of South India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(3), 1-3.
3. Artiushin, S., Timoney, J., Sheoran, A., & Muthupalani, S. (2002). Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SPE-H and SPE-I of *Streptococcus equi*. *Microbial Pathogenesis*, 32(2), 71-85.
4. Austin, B., & Austin, D. A. (2016). Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish .Capítulo Aerobic Grampositive Rods and Cocci,Reino Unido: Springer, 17-18.
5. Babbar, A. (2015). Streptococcal Superantigens.Capitulo 2 Superantigens New York: Springer, 11-22.
6. Babbar, A., Itzek, A., Pieper, D., & Nitschesmitz D, P. (2018). Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence genes in *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* from Vellore, India. *Folia Microbiologica*, 63(5), 581-586.
7. Baker, C. J. (2007). Atlas de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Capítulo Estreptococos (especies no pertenecientes a los grupos A o B) y enterococos, infecciones, Madrid, España: Medica Panamericana.
8. Baldassarri, L., Creti, R., Imperi, M., Recchia, S., Pataracchia, M., & Orefici, G. (2007). Detection of genes encoding internalization-associated proteins in *Streptococcus pyogenes* isolates from patients with invasive diseases and asymptomatic carriers. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1284-1287.
9. Behera, B., Mathur, P., Bhardwaj, N., Jain, N., Misra, M. C., Kapil, A., & Singh, S. (2014). Antibiotic susceptibilities, streptococcal pyrogenic exotoxin gene profiles among clinical isolates of group C or G *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* & of group G *S.anginosus* group at a tertiary care centre. *Indian Journal of Medical Research*, 139(3), 438-445.

10. Beres, S., Sylva, G., Barbian, K., Lei, B., Hoff, J., Mammarella, N.,... Musser, J. (2002). Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(15), 10078-10083.
11. Betancur, C. A., Giraldo, J. D., Saldarriaga, E. L., & Medellín, C. M. (2009). Aortitis con bacteriemia by *Streptococcus equi zooepidemicus*. *Acta Médica de Colombia*,(32) 85-86.
12. Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2010). JAWETZ, MELNICK Y ALDELBERG. Microbiología Médica. Capítulo Estreptococos, México, D.F.: Mc Graw Hill, 195-212.
13. Brouillard, P., Günther, S., K. Varma, A., Gryski, I., A. Herfst, C., Nur-ur Rahman, A.,...McCormick, K. J. (2007). Crystal structure of the streptococcal superantigen SpeI and functional role of a novel loop domain in T Cell activation by group V superantigens. *Journal of Molecular Biology*, 367(4), 925-934.
14. Buller, N. B. (2014). Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals. Capítulo Aquatic Animal Species and Organism Relationship Boston: CABI, 1-37.
15. Cardenas S., P., Dib M., M., Cardenas D., C., & Justiniano P., J. C. (2008). Sepsis por *Streptococcus anginosus* originada en cáncer de colon abscedado. Reporte de un caso. *Revista Chilena de Cirugía*, 60(4), 348-351.
16. Casallas, J. G., Millán, F. C., Kling, L. F., & Boada, M. P. (2013). Celulitis por *Streptococcus equi*: reporte de caso y revisión de literatura. *Infección Asociación Colombiana de Infectología*, 17(3), 160-162.
17. Casey, A. (2012). *Streptococci and Enterococci*. En T. Elliott, A. Casey, P. Lambert, & J. Sandoe, *Medical Microbiology and Infection*, Reino Unido: WILEY- BLACKWELL, 102.
18. Chhatwal, G. S., & Graham, R. (2010). Streptococcal Disease. D. Hamer, J. K. Griffiths, J. H. Maguire, H. K. Heggenhougen, & S. R. Quah, *Public Health and Infectious Diseases*, U.S.A: ELSEVIER, 180.
19. Cohen Poradosu, R., Jaffe, J., Lavi, D., Grisariu Greenzaid, S., Nir Paz, R., Valinsky, L.,...E. Moses, A. (2004). Group G Streptococcal Bacteremia in Jerusalem. *Emerging Infectious Diseases*, 10(8), 1455-1460.

20. Cole, J.N, Barnett, C, Nizet, T. V., & J. Walker, M. (2011). Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 724-736.
21. Commons, R., Rogers, S., Gooding, T., Danchin , M., Carapetis, J., Robins-Browne , R., & Curtis, N. (2008). Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with *emm* types. *Journal of Medical Microbiology*(57), 1238-1246.
22. Courtney, H. S., & Pownall, H. J. (2010). The structure and function of serum opacity factor: A unique streptococcal virulence determinant that targets high-density lipoproteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.32(1),1-16.
23. Engelkirk, P. G., & Engerlkirk, D. J. (2008). Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Capítulo GramPositive Cocci, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 226-229
24. Engleberg, N. C., DiRita, V. J., & Dermody, T. S. (2013). Estreptococos y enterococos : amigdalitis estreptocócica y otros síntomas. En N. C. Engleberg , V. J. DiRita, & T. S. Dermody , Capítulo Mecanismos de las Enfermedades Microbianas, Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins.161-167
25. Euler, C. W., Juncosa, B., Ryan, P. A., Deutsch, D. R., McShan, W. M., & Fischetti, V. A.(2016). Targeted curing of all lysogenic bacteriophage from *Streptococcus pyogenes* using a novel counter-selection technique. *PLoS One*, 11(1),275-295.
26. Fernie-King, B. A., Seilly, D. J., & Lachmann, P. J. (2004). The interaction of streptococcal inhibitor of complement (SIC) and its proteolytic fragments with the human beta defensins. *Immunology*, 111(4), 444-452.
27. Friaes, A., Pinto, F. R., Silva Costa, C., Ramirez, M., & Melo Cristino, J. (2012). Superantigen gene complement of *Streptococcus pyogenes* relationship with other typing methods and short-term stability. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32, 115-125.
28. Fujita, T., Horiuchi, A., Ogawa, M., Yoshida, H., Hirose, Y., Nagano, N., & Takahashi, T. (2017). Genetic Diversity in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Isolates from Patients with Invasive and Noninvasive Infections in a Japanese University Hospital (2014–2015). *Journal Infections Diseases* , 70, 100-104.

29. Gaviria, J. M., & Bisno, A. L. (2000). Group C and G Streptococci. En D. L. Stevens, & E. L. Kaplan, *Streptococcal Infections; Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*, New York: Oxford University Press, 238-255.
30. Goodfellow, A. M., Hibble, M., Talay, S. R., Kreikemeyer, B., Currie, B. J., Sriprakash, K. S., & Chhatwal, G. S. (2000). Distribution and antigenicity of fibronectin binding proteins (Sfbl and SfbII) of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates from the northern territory, Australia . *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 389-392.
31. Hagiya, H., Okita, S., Kuroe, Y., Nojima, H., Otani, S., Sugiyama, J., ...Morimoto, N. (2013). A fatal case of streptococcal toxic shock syndrome due to *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*. possibly caused by an intramuscular injection . *Internal Medicine*, 52(3), 397-402.
32. Hanski, E., A Horwitz, P., & G Caparon, M. (1992). Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infection and Immunity* 60(12), 5119-5125.
33. Hytönen, J., Haataja, S., Gerlach, D., Podbielski, A., & Finne, J. (2001). The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with streptadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Molecular Microbiology*, 39(2), 512-519.
34. Igwe I., E., Shewmaker L., P., Flackman, R., R., Farley M., M., Van Beneden, C., & Beall, B. (2003). 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*, 229(2), 259-264.
35. Ikebe , T., Wada, A., Inagaki, Y., Sugama, K., Suzuki, R., Tanaka, D., ...Watanabe, H. (2002). Dissemination of the phage-associated novel superantigen gene *speL* in recent invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* M3/T3 Isolates in Japan .*Infection and Immunity*, 70(6), 3227-3233.
36. Jansen, J., & Rink, L. (2011). *Streptococcus*:Molecular detection of Human Bacterial Pathogens, United States of America: CRC Press Taylor & Francis Group, 323-324.

37. Kalia, A., & Bessen, D. E. (2003). Presence of streptococcal pyrogenic exotoxin A and C genes in human isolates of group G streptococci . *FEMS Microbiology Letters*, 219(2), 291-295.
38. Kamezawa , Y., Nakahara , T., Nakano, S., Abe, Y., Renard, J. N., & Isono, T. (1997). Streptococcal mitogenic exotoxin Z, a novel acidic superantigenic. *Infection and Immunity* , 65(9), 3828–3833.
39. Kim, S., Hyun Byun, J., Park, H., Lee, J., Soo Lee, H., Yoshida, H.,...Takahashi, T. (2018). Molecular Epidemiological Features and Antibiotic Susceptibility Patterns of *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* isolates from Korea and Japan. *Annals of Laboratory Medicine* , 38(3), 212-219.
40. Klos, M., & Wójkowska-Mach, J. (2017). Pathogenicity of virulent species of Group C Streptococci in Human. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*,(2) 111-121.
41. Koneman, E. W. (2008). Cocos grampositivos Parte II: Estreptococos, enterococos y bacterias "similares a *Streptococcus*". En *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana.643-653
42. Lefébure, T., Richards, V., Lang, P., Pavinski-Bitar, P., & Stanhope, M. J. (2012). Gene repertoire evolution of *Streptococcus pyogenes* inferred from phylogenomic analysis with *Streptococcus canis* and *Streptococcus dysgalactiae*. *PLOS One*, 7(5), 63-68
43. Marone, G. (2007). Superantigens and Superallergens (Vol. 93), Naples: KARGER, 24-41.
44. McCormick, J. K., A. Pragman, A., C. Stolpa , J., M. Leung, D. Y., & M. Schlievert,P. (2001). Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen. *Infection and Inmunity*,69(3), 1381-1388.
45. McCormick, J.K., Schlievert, P. M.,(2000). Toxins and superantigens of group A streptococci, En Fischetti, V., A., Novick, R., P., Ferretti, J., J., Portnoy., D.,A., & Rood J. *Gram- Positive Pathogens*, ASM PRESS Washington,45-46.
46. McLaughlin, R.L., Sezate, S., Ferretti, J.,(1999). Molecular characterization of genes encoding streptococcal erythrogenic toxin-like proteins SPE-H and

- SPE-I, Nueva Zeland: International Symposium on streptococci and streptococcal diseases, 357-362.
47. McPhee, S. J., Papadakis, M. A., & Rabow, M. W. (2011). *Lange: diagnóstico clínico y tratamiento*. Capítulo 33 Infecciones por bacterias y Clamidia, México, D.F: Mc Graw Hill.
 48. Meera, U., Altmann, D. M., Proft, T., Wahid, F., Cohen, J., Fraser, J. D., & Shiranee, S. (2002). The bacterial superantigen streptococcal mitogenic exotoxin Z is the major immunoactive agent of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Immunology*, 169, 2561-2569.
 49. Meisal, R., G. Andreasson, I. K., Høiby, E. A., Aaberge, I. S., E. Michaelsen, T., & Caugant, D. A. (2010). *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: *emm* types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 842-851.
 50. Murray, P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). *Streptococcus y Enterococcus*. En P. Murray, K. S. Rosenthal, & M. A. Pfaller, *Microbiología Médica*, Barcelona, España: ELSEVIER, 188-189.
 51. Mylvaganam, H., Skrede, S., Oppegaard, O., Lindemann, P. C., & Kittang, B. R. (2017). Emergence of a *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* stG62647- lineage associated with severe clinical manifestations. *Scientific Reports*, (7) 75-89.
 52. Nelson, D. C., Garbe, J., & Collin, M. (Diciembre de 2011). Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biological Chemistry*, 392(12), 1077-1088.
 53. Olivas, E. E. (2004). *Manual de Prácticas de Microbiología I, II y Parasitología*. México, Ciudad Juárez: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
 54. Ozeri, V., Tovi, A., Burstein, I., Natanson-Yaron, S., G. Caparon, M., M. Yamada, K.,...Hanski, E. (1996). A two-domain mechanism for group A streptococcal adherence through protein F to the extracellular matrix. *The EMBO Journal*, 15(5), 989-998.
 55. Perea Mejía, L. M. (2019). Streptococcus. En J. T. Zavala, M. G. Quiroz, R. L. Martínez, M. M. Zavala, & M. J. López, *Microbiología y Parasitología Médicas*, México, D.F: Méndez Editores, pág 83.

56. Prabu, D., & Menon, T. (2011). Genotypic characterization of toxigenic group C and G streptococci isolated in Chennai, South India. *Folia Microbiologica*, 56(4), 345-348
57. Prats, G. (2005). Microbiología clínica. Capítulo 3 Bacteriología II Buenos Aires: Médica Panamericana, 45-48.
58. Proft, T., & Fraser, J. D. (2006). Streptococcal superantigenic toxins. E. J. Alouf, & M. R. Popoff, The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, San Diego, C.: ELSEVIER, 844-857.
59. Proft, T., D. Webb, P., Handley, V., & D. Fraser, J. (Marzo de 2003). Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*. *Infection and Immunity*, 71(3), 1361-1369.
60. Proft, T., L. Arcus, V., Handley, V., N. Baker, E., & D. Fraser, J. (2001). Immunological and biochemical characterization of Streptococcal pyrogenic exotoxins I and J (SPE-I and SPE-J) from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Immunology*, 166(1), 6711-6719.
61. Rantala, S. (2014). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* bacteremia: an emerging infection. *European Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1303-1310.
62. Reda, K. B., Kapur, V., A. Mollick, J., G. Lamphear, J., M. Musser, J., & R. Rich, R. (1994). Molecular characterization and phylogenetic distribution of streptococcal superantigens gene (*ssa*) from *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, 62(5), 1867-1874.
63. Reglinski, M., & Sriskandan, S. (2015). *Streptococcus pyogenes*. En Y.W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, & J. Schwartzman, *Molecular Medical Microbiology*, San Diego, B.C. : ELSEVIER, 675-705.
64. Reibmann, S., Friedichs, C., Rajkumari, R., Itzek, A., Fulde, M., C. Rodloff, A., ... Nitsche-Schmitz, D. P. (2010). Contribution of *Streptococcus anginosus* to infections caused by Groups C and G Streptococci, Southern India. *Emerging Infectious Diseases*, 16(4), 656-663.
65. Roggiani, M., P. Assimacopoulos, A., & M. Schlievert, P. (2000). Exotoxins of *Streptococcus pyogenes*. En D. L. Stevens, & E. L. Kaplan, *Streptococcal Infections*. New York : Oxford University Press, 57-62.

66. Rohde, M., & Chhatwal, G. S. (2013). Adherence and invasion of Streptococci to eukaryotic cells and their role in disease pathogenesis. En G. S. Chhatwal, *Host-Pathogen Interactions in Streptococcal Diseases*, Berlín: Springer pág. 90.
67. Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2010). Sherris Microbiología Médica, Capítulo 25 Estreptococos y enterococos, México,D.F.: Mc Graw Hill, 725-731.
68. Sachse, S., Seidel, P., Gerlach, D., Günther, E., Rödel, J., Straube, E., & Schmidt, K.-H. (2002). Superantigen-like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*: genomic location of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (speGdys). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 34(2), 159-167.
69. Shimomura, Y., Okumura, K., Yamagata, M. S., Yagi, J., Ubukata, K., Kirikae, T., & Miyoshi-Akiyama, T. (2011). Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics*, 12(17), 1-17.
70. Stevens, D. (1992). Invasive group A streptococcus infections. *Clinical Infectious Diseases*, 14, 2-11.
71. Stevens, D. L. (2004). Virulence factors of *Streptococcus pyogenes*. En E. J. Kaplan, & J. C. Pechère, *Streptococcal Pharyngitis Optimal Management*, Basel: KARGER, 5-6.
72. Sunaoshi, K., Murayama, S. Y., Adachi, K., Yagoshi, M., Okuzumi, K., Chiba, N.,...Ubukata, K. (2010). Molecular *emm* genotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* isolated from invasive and non-invasive infections. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 82-88.
73. Tanaka, D., Isobe, J., Watahik, M., Nagai, Y., Katsukawa, C., Kawahara, R.,...Watanabe, H. (2008). Genetic features of clinical isolates of *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* possessing Lancefield's Group A antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1526-1529.
74. Tizard, T., R. (2013) Veterinary Immunology, Capítulo Helper T Cells and Their Response to Antigen, Texas, ELSEVIER, Pág.144.

75. Wajima, T., Morozumi, M., Hanada, S., Sunaoshi, K., Chiba, N., Iwata, S., & Ubukata, K. (2016). Molecular characterization of invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 22(2), 247-254.
76. Weeks, C. R., & Ferretti, J. J. (1986). Nucleotide sequence of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage T12. *Infection and immunity*, 52(1), 144-150.
77. Wei Ping Ng, K., & Mukhopadhyay, A. (2009). *Streptococcus constellatus* bacteremia causing septic shock following tooth extraction: a case report. *Cases Journal*, 2(6493), 1-4.
78. Wessels, M. R. (2012). Infecciones estreptocócicas. En L. Longo, L. D. Kasper, J. L. Jameson, A. S. Fauci, S. L. Hauser, & J. Loscalzo, *Harrison Principios de Medicina Interna Vol. 1* México, D.F.: Mc Graw Hill, 1171-1777.
79. Whiley, R. A., & Hardie, J. M. (2009). Genus I. *Streptococcus*. En P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, ...W. Whitman, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*, New York: Springer, pág.690.
80. Wood, B. J., & Holzapfel, W. N. (1995). The genera of lactic acid bacteria (Vol. 2). London: Springer.
81. Yamaguchi, M., Terao, Y., & Kawabata, S. (2012). Pleiotropic virulence factor *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding proteins. *Cellular Microbiology*, 15(4), 503-511.