

11202  
4



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**  
**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**DETERMINACION DE LA PRESENCIA O DESARROLLO  
DE ANTICUERPOS OPSONICOS TIPO-ESPECIFICOS  
CONTRA *STREPTOCOCCUS PYOGENES* EN SUERO DE  
PERSONAS CONVALESCIENTES. DESARROLLO  
DE UNA PRUEBA ALTAMENTE SENSIBLE  
Y ESPECIFICA MEDIANTE EL USO DE  
LA QUIMIOLUMINISCENCIA**

27731

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS**  
**P R E S E N T A**  
**M. EN C. ALBERTO VILLASEÑOR SIERRA**  
**DIRECTORES DE TESIS**  
**NACIONAL: DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO**  
**EXTRANJERO: DENNIS L. STEVENS, PH.D., M.D.**  
**M E X I C O , D . F . 2 0 0 0**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Determinación de la Presencia o Desarrollo de Anticuerpos Opsónicos  
Tipo-Específicos contra *Streptococcus pyogenes* en Suero de Personas  
Convalecientes. Desarrollo de una Prueba Altamente Sensible y  
Específica Mediante el Uso de la Quimioluminiscencia**

Tesis que para completar los requisitos para obtener  
el grado de Doctor en Ciencias Médicas por la



UNAM

**Universidad Nacional Autónoma de México**

Presenta

***M. en C. Alberto Villaseñor Sierra***

Investigador Asociado B., Candidato a Investigador Nacional Sistema Nacional de Investigadores (SNI). Adscrito a la Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud del Adolescente\*, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Guadalajara, Jalisco. México.

\*(Actualmente en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), IMSS, Guadalajara, Jal.)

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de **Dennis L. Stevens Ph.D., M.D.** del Hospital de Veteranos, Centro Médico, en Boise, Idaho, E.U.A. durante el periodo de junio de 1996 a junio de 1999. El M. en C. Alberto Villaseñor Sierra recibió una beca del IMSS durante dos años. El estudio fue financiado por fondos del Hospital de Veteranos de Boise, Idaho.

**Año 2000**

Tutor Nacional: ***Dr. José Ignacio Santos Preciado***

Tutor Extranjero: ***Dennis L. Stevens, Ph.D., M.D.***

## COMITE TUTORIAL

DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS

DR. FRANCISCO JAVIER TORRES LOPEZ

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE

## JURADO

PRESIDENTE:

DR. JESUS KUMATE RODRIGUEZ

SECRETARIO:

DR. ONOFRE MUÑOZ HERNANDEZ

1ER. VOCAL:

DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO

2DO. VOCAL:

DR. CESAR GONZALEZ BONILLA

3ER. VOCAL:

DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS

SUPLENTE:

DR. FRANCISCO JAVIER TORRES LOPEZ

SUPLENTE:

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE

## **Resumen:**

Fue desarrollada una prueba para detectar la presencia de anticuerpos serotipo-específicos en contra de estreptococo del grupo A (EGA) en suero humano basado en quimioluminiscencia (QL) y utilizando sangre total como fuente de fagocitos. Sueros de pacientes con una alta actividad bactericida en contra de cepas del serotipo M-1, fueron incubados con diferentes serotipos de EGA. La actividad fagocítica fue monitoreada durante 20 minutos y los resultados expresados como cuentas por minuto por fagocito. La respuesta en quimioluminiscencia de los fagocitos incubados con una cepa M-1 previamente opsonizada con un suero homólogo anti-M-1 fue significativamente superior que la respuesta de los fagocitos incubados con una cepa heteróloga M-3. La adsorción del suero inmune anti-M-1 contra la cepa homóloga pero no contra la cepa heteróloga, redujo en forma marcada la respuesta en QL demostrando la tipo-especificidad de la prueba. La prueba de QL mostró una alta correlación con la prueba bactericida indirecta (IBT,  $r=0.90$ ). En conclusión, esta prueba de QL es un método rápido, sensible para su detección aún diluyendo el suero 1:8, serotipo-específico y reproducible para la identificación de anticuerpos opsonizantes en contra de EGA, ofreciendo una herramienta útil para estudios clínicos, básicos y epidemiológicos.

## Resumen:

Fue desarrollada una prueba para detectar la presencia de anticuerpos serotipo-específicos en contra de estreptococo del grupo A (EGA) en suero humano basado en quimioluminiscencia (QL) y utilizando sangre total como fuente de fagocitos. Sueros de pacientes con una alta actividad bactericida en contra de cepas del serotipo M-1, fueron incubados con diferentes serotipos de EGA. La actividad fagocítica fue monitoreada durante 20 minutos y los resultados expresados como cuentas por minuto por fagocito. La respuesta en quimioluminiscencia de los fagocitos incubados con una cepa M-1 previamente opsonizada con un suero homólogo anti-M-1 fue significativamente superior que la respuesta de los fagocitos incubados con una cepa heteróloga M-3. La adsorción del suero inmune anti-M-1 contra la cepa homóloga pero no contra la cepa heteróloga, redujo en forma marcada la respuesta en QL demostrando la tipo-especificidad de la prueba. La prueba de QL mostró una alta correlación con la prueba bactericida indirecta (IBT,  $r=0.90$ ). En conclusión, esta prueba de QL es un método rápido, sensible para su detección aún diluyendo el suero 1:8, serotipo-específico y reproducible para la identificación de anticuerpos opsonicos en contra de EGA, ofreciendo una herramienta útil para estudios clínicos, básicos y epidemiológicos.

## **Agradecimientos**

A ti Rosa, mi esposa, compañera y amiga. Por tu soporte, paciencia, amor y ternura constantes que han hecho posible la cristalización de nuestros sueños y logros.

A mis hijos Alberto, Rosita y Francisco por su ternura, cariño y detalles que llenan de felicidad y esperanza nuestra vida.

A mis padres, por darme los cimientos que sostienen y guían mi vida y por su incansable aliento y cariño.

A mis suegros, por sus oraciones y su apoyo constante y sincero.

Al Dr. Alfredo Hidalgo San Martín, Dr. Onofre Muñoz Hernández y Dr. Hector Guiscafré Gallardo, por la confianza depositada y su apoyo incondicional.

Al Dr. José Ignacio Santos Preciado, porque su vida regida por los más altos principios académicos y humanos ha dejado en mi un ejemplo imborrable.

Al Dr. Dennis L. Stevens y Amy Bryant del Hospital de Veteranos de Boise, Idaho por su amistad, la oportunidad que me brindaron y por sus enseñanzas del más alto nivel científico

A la Srta. Alicia Jimenez Burgos, por su ayuda constante, incansable y sincera.

A todos los niños, en especial aquellos económica, social o mentalmente desprotegidos, motivo y fin de mi carrera como pediatra e investigador.

**A. M. D. G.**

## Indice General

página

Presentación de la tesis.....	1
Comité Tutorial y Jurado.....	2
Agradecimientos.....	3
Indice general.....	4
Listado de Figuras y Tablas .....	5-6

### Partes:

I. Opsonofagocitosis Tipo-especifica de Streptococcus del Grupo A Mediante la Utilización de una Prueba Rápida Basada en Quimioluminiscencia.....	7
II Variable Susceptibilidad a Opsono-fagocitosis de Cepas de Estreptococo del Grupo A del Serotipo M-I Posterior a su Incubación con un Suero Inmune Humano.....	37
III. Opsonización de Estreptococo del Grupo A del Serotipo MIT1: Dinámica de la Producción de Anticuerpos y Especificidad por Cepa.....	66



## Listado de Figuras y Tablas

<b>Figura 1.</b> Prueba de Quimioluminiscencia.....	p. 25
<b>Figura 2</b> Dilución de un suero convaleciente anti-M1 y su efecto en la actividad opsonica en contra de una cepa M-1. ....	p. 26
<b>Figura 3.</b> Efecto de la homogenización manual vs mecánica de una suspensión bacteriana sobre la respuesta fagocítica .....	p. 27
<b>Figura 4.</b> Efecto del complemento en la opsonización de EBHGA.....	p.28
<b>Figura 5.</b> Efecto del complemento en una cepa M-1 previamente digerida con tripsina .....	p. 29
<b>Figura 6.</b> Efecto de la concentración de bacterias en la suspensión bacteriana sobre la respuesta fagocitaria ...	p 30
<b>Tabla 1.</b> Tipo especificidad de anticuerpos opsonicos en la P. bactericida y la quimioluminiscencia .....	p. 31
<b>Figura 7.</b> Tipo-especificidad de la prueba de quimioluminiscencia.....	p. 32
<b>Figura 8.</b> Correlación entre la prueba de quimioluminiscencia y la prueba bactericida indirecta.....	p. 33
<b>Figura 9.</b> Capacidad de un suero inmune anti-M-1 para opsonizar 70 cepas de <i>S pyogenes</i> del serotipo M-1 .....	p. 56
<b>Figura 10.</b> Actividad bactericida de un suero inmune anti-M-1 en contra de 10 cepas homólogas M-1 y dos heterólogas M-3 y M-11.....	p. 57
<b>Figura 11.</b> Actividad opsonica de un suero inmune anti-M-1 en contra de 10 cepas homólogas M-1 y dos heterólogas M-3 y M-11....	p. 58

## Listado de Figuras y Tablas

- Figura 12. Representación esquemática de la proteína  $\alpha$ -helicoidal trenzada de la proteína M en la superficie de *S. pyogenes* M-1.....p. 59
- Figura 13. Secuencia deducida de aminoácidos de la región N-terminal y regiones A repetidas de 10 cepas del serotipo M-1.....p 60
- Figura 14. Actividad opsónica del suero en fase aguda y convaleciente de pacientes de Suecia con diversas infecciones por E $\beta$ HGA .....p. 85
- Figura 15. Relación entre el incremento en la actividad opsónica del suero y el intervalo de tiempo transcurrido desde la toma del suero en fase aguda y convaleciente.....p. 86
- Figura 16. Distribución de la actividad opsónica de un suero inmune anti-M-1 en contra de 62 cepas TIM1 aisladas en Suecia durante el periodo 1980-1998.....p. 87

## Primera Parte

# Opsonofagocitosis Tipo-específica de Streptococcus del Grupo A Mediante la Utilización de una Prueba Rápida Basada en Quimioluminiscencia.

A. Villaseñor-Sierra<sup>1</sup>, A. Bryant<sup>2</sup>, D.L. Stevens<sup>2,3</sup>.

1. UIESSA Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco. México.
2. Hospital de Veteranos, Centro Médico, Boise, Idaho., E.U.A.
3. Hospital de Veteranos, Centro Médico, Boise, Idaho, Universidad de Washington, Seattle Washington, E.U.

Parte de este trabajo fue presentado en la 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. (Trabajo No.G-049) Toronto, Ontario, Canada; Septiembre 28-Octubre 1,1997. Publicado en **Journal of Infectious Diseases** 1999;179:1293-1296.

**Resumen:**

Fue desarrollada una prueba para detectar la presencia de anticuerpos serotipo-específicos en contra de estreptococo del grupo A (EGA) en suero humano basado en quimoluminiscencia (QL) y utilizando sangre total como fuente de fagocitos. Sueros de pacientes con un alta actividad bactericida en contra de cepas del serotipo M-1 fueron incubados con diferentes serotipos de EGA. La actividad fagocítica fue monitoreada durante 20 minutos y los resultados expresados como cuentas por minuto por fagocito. La respuesta en quimoluminiscencia de los fagocitos incubados con una cepa M-1 previamente opsonizada con un suero homólogo anti-M-1 fue significativamente superior que la respuesta de los fagocitos incubados con una cepa heteróloga M-3. La adsorción del suero inmune anti-M-1 contra la cepa homóloga pero no contra la cepa heteróloga, redujo en forma marcada la respuesta en QL demostrando la tipo-especificidad de la prueba. La prueba de QL mostró una alta correlación con la prueba bactericida indirecta (IBT,  $r = 0.90$ ). En conclusión, esta prueba de QL es un método rápido, sensible para su detección aún diluyendo el suero 1:8, serotipo-específico y reproducible para la identificación de anticuerpos opsonicos en contra de EGA, ofreciendo una herramienta útil para estudios clínicos, básicos y epidemiológicos.

## Introducción

La fagocitosis es un mecanismo primario de defensa del huésped en contra de bacterias invasivas y realizado en su mayoría por fagocitos profesionales tales como los leucocitos polimorfonucleares (LPMN), monocitos y macrófagos. Las opsoninas, tales como inmunoglobulinas y complemento, facilitan la fagocitosis y muerte de microorganismos [1]. La proteína M del estreptococo del grupo A (EGA) es un componente de su superficie que le permite a este organismo resistir la fagocitosis [2]. Por otro lado, la protección en contra de una nueva infección ha sido relacionada con la presencia de anticuerpos opsonicos serotipo-específicos dirigidos en contra de la proteína M [2]. Por lo anterior, la determinación de la presencia y cuantificación de anticuerpos opsonicos serotipo-específicos nos proporciona valiosa información en relación con la inmunidad en contra de este microorganismo.

Algunas pruebas para medir opsonofagocitosis del EGA utilizan la cuantificación de muerte bacteriana, tales como la prueba bactericida indirecta (PBI) [3] o conteo directo de EGA dentro de los fagocitos [4]. En general, la fagocitosis puede también ser cuantificada indirectamente a través de la medición de los productos metabólicos y químicos asociados con la ingestión y muerte de las partículas opsonizadas por los leucocitos [5]. Una vez que la partícula opsonizada es adherida a la célula fagocítica, el ciclo de la hexosa monofosfato es activada generando NADPH. La NADPH oxidasa activada utiliza el poder reductor de NADPH para la reducción univalente de  $O_2$  liberando protones ( $H^+$ ) y aniones superóxido ( $O_2^-$ ) mismos que son microbicidas [6]. Esta actividad metabólica oxidativa libera productos de oxidación electrónicamente excitables, y su relajación subsecuente hacia un

estado basal resulta en una emisión de luz [6.7]. La adición de cantidades nanomolares de la hidrazida cíclica luminol, (5-amino-2, 3-dihidro-1, 4-ftalazinediona) a la mezcla opsonizante, incrementa la quimioluminiscencia (CL) en aproximadamente tres ordenes de magnitud permitiendo la cuantificación de la actividad oxidativa usando una cantidad relativamente pequeña de fagocitos [6]. Esta prueba altamente sensible puede estandarizarse para evaluar una sola variable como es la presencia o ausencia de anticuerpos opsónicos serotipo-específicos.

El objetivo del presente estudio fue el desarrollar una prueba rápida, sensible y reproducible para la cuantificación de anticuerpos opsónicos serotipo-específicos en contra de EGA en muestras de suero humano.

## Materiales y Métodos

*Cepas y cultivos.* Para la estandarización de la prueba de CL, se utilizaron cepas de EGA de los serotipos M-1 (96/004) y M-3 (88/003) pertenecientes a la colección del laboratorio del Dr. Dennis L. Stevens. Una colonia de cada cepa fue usada para inocular 5 ml de caldo Todd Hewitt al que se adicionó 1% de neopeptona (THN) (Difco, Detroit, MI) y crecidas durante 18 horas a 37°C y un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5% para obtener un cultivo en fase estacionaria. La suspensión bacteriana fue entonces usada para inocular 45 ml de caldo THN previamente calentado a 37°C y puesto nuevamente en la incubadora por 4 horas a 37°C y un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5% para obtener un cultivo en fase logarítmica. Cada tubo de 50 ml conteniendo la suspensión bacteriana en fase logarítmica fue centrifugado a 1250 x g, a una temperatura de 4°C y el botón bacteriano lavado en dos ocasiones con solución salina amortiguadora de fosfato Dulbecco=s estéril y fría (PBS) y resuspendido en 5 ml de la misma solución. Las bacterias fueron muertas por calentamiento en baño maría a 56°C por un periodo de 1 hora.

*Fagocitos.* Sangre total de un donador normal quien demostró carecer de una cantidad significativa de anticuerpos opsonicos contra las cepas serotipos M-1 y M-3 en la prueba de rotación sanguínea [8], fue anticoagulada con ácido etilen diamino tetra acético, mantenida en agitación suave a temperatura ambiente (23-24°C) y usada en los siguientes 5 a 30 minutos.

*Muestras de suero.* Un suero empleado como control negativo fue obtenido de un donador sano (AV). Este suero mostró no tener anticuerpos específicos contra cepas de los

serotipos M-1 y M-3. Este suero al igual que el suero normal de conejo (control negativo, Centro de Referencia Estreptocócico de la OMS en Minneapolis, MN E.U.A.) mostraron una actividad bactericida baja en contra de cepas de los serotipos M-1 y M-3 en la PBI [8]. Como control positivo fue usado el suero inmune (anti-M-1) obtenido de tres donadores (AB, DR, y KF). Estos donadores tenían una historia de faringitis por estreptococo del serotipo M-1 durante el año previo y no recibieron antibioticos o tratamientos medicamentosos durante las dos semanas previas a la toma de la muestra de suero. Los tres sueros demostraron una actividad bactericida comparable con la del antisuero anti-M-1 de conejo utilizado como control positivo en la PBI (Suero estandar anti-M-1, OMS). Todos los sueros empleados fueron mantenidos a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

*Prueba de opsonofagocitosis mediante el uso de quimioluminiscencia.* La opsonización fue realizada mediante la mezcla de  $100\ \mu\text{l}$  de bacterias muertas y  $50\ \mu\text{l}$  de suero humano diluido 1:2 en PBS en tubos de poliestireno (Lumcuve; Wallac, Inc. Gaithersburg, MD) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Después de lavar una vez la mezcla con 2 ml de PBS, las muestras fueron centrifugadas a  $1,275 \times g$  durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el complejo bacteria-anticuerpo fue resuspendido en  $100\ \mu\text{l}$  de PBS. Posterior a esto, se agregan a cada tubo  $600\ \mu\text{l}$  de una solución salina balanceada conteniendo  $0.15\ \text{mM}$ -luminol (SSBL) previamente calentada a  $37^{\circ}\text{C}$  [9]. Las muestras por duplicado, se colocan en el luminometro (LB953 modified; Berthold, Wildbad, Germany) durante 10 minutos previos al corrimiento para permitir un equilibrio de temperatura a  $37^{\circ}\text{C}$ . Mientras tanto, el donador "normal" de fagocitos es sangrado y una muestra de  $100\ \mu\text{l}$  de sangre fresca total es diluida en  $9.9\ \text{ml}$  de medio diluyente de sangre (MDS)



previamente calentado a 37°C [9]. Una vez diluida la sangre, una muestra de 100  $\mu$ l (conteniendo ~ 5-10,000 células blancas) es inyectada automáticamente en cada uno de los tubos colocados en el luminómetro (**Figura 1**). Se realizaron mediciones de quimioluminiscencia cada 30 segundos hasta completar 20 minutos en total [9]. Los resultados son expresados como cuentas por minuto (cpm) de un valor acumulado o integral. Para una mejor comparación de resultados obtenidos en días diferentes de un mismo donador, se realizó una biometría hemática con cuenta total de leucocitos y diferencial para calcular la cantidad de fagocitos totales (todas las células blancas excepto linfocitos), y los resultados fueron entonces expresados como cuentas por minuto por fagocito (cpm/fagocito). Un foton estandar fue usado para la estandarización de pruebas entre corrimientos. Para evaluar la respuesta fagocítica máxima del huésped en cada prueba de quimioluminiscencia, se usó zimosan opsonizado con complemento como control [9].

#### *Estandarización de la dilución del suero y su efecto en la respuesta fagocitaria.*

Para evaluar la sensibilidad de la prueba de QL para la detección de anticuerpos opsonicos, un suero inmune anti-M-1 (D.R.) fue diluido 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 con PBS e incubado con una suspensión de una cepa M-1. La dilución del suero 1:2 no mostró diferencias en su actividad opsonica (promedio) en relación al suero no diluido (521 vs 480 cpm/fagocito,  $P = .5$ ). Aunque en diluciones posteriores mostró una disminución gradual, esta permaneció sin cambios significativos en relación al suero no diluido hasta la dilución 1:8 ( $P = .3$ ) (**Figura 2**).

*Efecto de la agitación de la suspensión bacteriana en la respuesta en quimioluminiscencia.* Debido a que *Streptococcus pyogenes* es una bacteria que forma cadenas largas, una pregunta obligada fue determinar si la homogeneización de la muestra mediante el uso de vortex, necesaria para poder equiparar la absorbancia entre diferentes suspensiones bacterianas podría en teoría romper las cadenas de cocos y afectar el grado de opsonofagocitosis por fagocito al alterar el tamaño y número de las partículas opsonizables. Para tal propósito, una suspensión bacteriana del serotipo M-1 (96-004) fue dividida en 2 tubos y sometiendo una de ellas a "homogeneización" mediante agitación manual suave (~10 movimientos de inversión completa) y la otra mediante agitación vigorosa mecánica utilizando un vortex (~1000 rpm, 4 x 15"). Una muestra de cada una fue teñida con gram, identificando un predominio de grandes cadenas en la primera y cadenas fragmentadas y cocos aislados en la muestra sujeta a homogeneización mecánica. No hubo una diferencia significativa ( $P = .4$ ) en la actividad fagocítica al emplear bacterias opsonizadas previamente homogeneizadas en forma manual o mecánica (Figura 3).

*Efecto de la viabilidad bacteriana sobre la actividad opsonica de un suero immune sobre una cepa homóloga y heteróloga.* Con la finalidad de evitar el efecto potencial de la producción variable de exotoxinas y hemolisinas propias de las diferentes cepas de EGA en la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares, decidimos emplear bacterias no viables en nuestras pruebas de quimioluminiscencia. Para determinar el efecto de usar bacterias muertas por calor (56°C por una hora) en la opsonización de las mismas, fueron usadas cepas de los serotipos M-1 y M-3 crecidas en fase logarítmica (4 horas), lavadas en dos ocasiones con PBS helado y mantenidas en hielo hasta su uso. El experimento fue

realizado mezclando un suero inmune anti-M-1 diluido (1:2) con una cantidad estandar de cepas de serotipos homólogos y heterólogos tanto viables como muertas por calor en muestras por duplicado. Después del corrimiento durante 20 minutos a 37°C, la capacidad del suero inmune anti-M-1 para opsonizar cepas homólogas viables o muertas fue comparable y no significativa ( $P = .63$ ). Asimismo, la capacidad de opsonizar las bacterias heterólogas fue significativamente inferior a la capacidad de opsonizar las bacterias homólogas ( $P = .001$ ), pero comparable entre las cepas viables o muertas ( $P = .10$ ).

*Efecto del complemento en la opsonofagocitosis de S pyogenes.* El efecto del complemento en la opsonofagocitosis fue evaluado mediante el uso de una cepa M-1 (96 004) muerta por calor. Otra muestra de la misma cepa fue tratada con tripsina (SIGMA, St. Louis, MO) para eliminar la proteína M y otras proteínas de su superficie utilizando un procedimiento modificado de Swanson y cols. [10] de la siguiente manera: una colonia de una cepa serotipo M-1 es cultivada en 10 ml de THBN hasta fase estacionaria (18 hrs) en una incubadora a 37°C y un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, 2 ml de la suspensión bacteriana son adicionados a 16 ml de medio THBN fresco y se adicionan 2 ml de una suspensión de tripsina bovina disuelta en PBS (0.01g/ml) y esterilizada por filtración, quedando a una concentración final de 0.1% . Esta mezcla es incubada por 5 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente centrifugada a 4,000 rpm y 4°C de temperatura y lavada en una ocasion con PBS frío conteniendo tripsina al 0.05% y en dos más con PBS frío sin la enzima. El botón bacteriano resuspendió en 5 ml de PBS y las bacterias son muertas por calor a 56°C durante una hora. La cepa M-1 tratada con tripsina y la cepa control sin tratamiento fueron incubadas con PBS, con suero inmune anti-M-1, con suero inmune anti-

M-1 inactivado por calor y suero inactivado + complemento de cobayo (SIGMA, St. Louis, MO) La incubación de la cepa control M-1 (no tratada con tripsina) con PBS y con complemento de cobayo resultó en una respuesta fagocitaria mínima y sin diferencia significativa entre ambas. La incubación de la cepa control con el suero inmune anti-M-1 previamente inactivado por calor mostró un incremento no significativo en relación al suero no inactivado. La adición de complemento al suero inactivado mostró no diferencia en la actividad fagocítica al compararlo con la actividad desarrollada con el suero anti-M-1 (Figura 4). Por el contrario, la incubación del suero inmune anti-M-1 con la cepa M-1 tratada con tripsina mostró una respuesta fagocítica superior a la esperada, con una disminución dramática al usar suero anti-M-1 inactivado y recuperando dicha actividad al adicionar complemento al suero inactivado (Figura 5). Lo anterior demuestra que en presencia de proteína M, el complemento no parece tener un rol importante en la opsonofagocitosis de cepas del serotipo M-1 de EGA.

*Determinación de la relación bacteria:fagocito para la prueba de CL.* Una misma dilución (1:2) de suero inmune anti-M-1 fue incubado con diluciones seriadas (1:2) de una suspensión bacteriana (en PBS) de una cepa homóloga, correspondiendo a una absorbancia a 650nm ( $A_{650}$ ) de 1.0, 0.67, 0.21, 0.06 y 0.04. La curva obtenida al graficar la absorbancia ( $A_{650}$ ) en el eje de las X y la respuesta fagocitaria (cpm) en el eje de las Y mostró ser lineal entre 0.06 y 0.2  $A_{650}$  y máxima a  $A_{650} \geq 0.5$  (Figura 6). Todas las pruebas subsiguientes fueron realizadas usando una concentración de bacterias igual a 0.5  $A_{650}$ . A esta absorbancia, la razón bacteria:fagocito es de  $\sim 200:1$ . Esta razón asegura un exceso de

partículas opsonizables de manera que pequeñas variaciones en la concentración de bacterias no afectaría la tasa de opsonización.

*Tipo especificidad de la prueba de quimioluminiscencia.* Cada uno de los tres sueros inmunes anti-M-1 fueron adsorbidos mezclando dos partes de suero no diluido con una parte (w/w) de bacterias muertas homólogas M-1 previamente lavadas con PBS. Otra porción de los mismos sueros fueron también adsorbidas con bacterias muertas heterólogas M-3. La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 minutos. El suero fue recuperado mediante centrifugación y esterilizado por filtración (Millipore, 0.22µm, Bedford, MA).

Para demostrar la serotipo-especificidad de la prueba de quimioluminiscencia, utilizamos una cepa M-1 incubada con PBS, así como cepas M-1 y M-3 incubadas por separado con suero normal, inmune anti-M-1 e inmune anti-M-1 adsorbido con una cepa homóloga (M-1) o heteróloga (M-3).

La tipo-especificidad de la prueba de quimioluminiscencia fue también probada mediante la adsorción secuencial de un solo suero inmune anti-M-1 en contra de cepas de EGA de serotipos heterólogos (M-3, M-41, M-28, M-12) y finalizando en contra de una cepa homóloga M-1. Inmediatamente después de su adsorción con cada una de las cinco cepas antes mencionadas, una muestra de suero fue tomada y usada para evaluar su capacidad para opsonizar una cepa homóloga M-1.

*Prueba bactericida indirecta.* La PBI es una prueba para evaluar la capacidad bactericida de un suero determinado utilizando sangre total como fuente de fagocitos. Brevemente, la prueba es realizada mediante la pre-opsonización de las bacterias con el suero a probar durante 1 hora a 4°C con agitación suave. Se realizan cuantificaciones de unidades formadoras de colonias (UFC) de una muestra de la mezcla antes y después de incubar las muestras durante 3 horas a 37°C y con rotación de 360° a 8 RPM [8]. Cada uno de los sueros (normal  $n = 1$ ) e inmunes anti-M-1 ( $n = 3$ ) fueron incubados con una cepa homóloga y una cepa heteróloga. Sueros estándar de conejo (normal y anti-M-1) fueron incluidos como controles negativos y positivos adicionales (amablemente donados por el Dr. Dwight R. Johnson y Dr. Edward L. Kaplan, Laboratorio de Referencia estreptocócico de la OMS en la Universidad de Minnesota, E.U.A.). Los resultados fueron expresados como índice bactericida ( $IB = \text{índice de crecimiento en suero normal} \div \text{índice de crecimiento en antisuero tipo-específico}$ ). Al igual que en otros laboratorios [8] y para fines de análisis estadístico, el IB fue expresado como el logaritmo base 2 ( $IB_{\log_2}$ ).

*Análisis estadístico* Diferencias entre promedios de corrimientos en duplicado de muestras conteniendo una mezcla de bacterias, sueros inmune o normal y fagocitos fueron comparados mediante la *t* de Student para muestras independientes o apareadas. El grado de correlación entre la prueba bactericida indirecta ( $IB_{\log_2}$ ) y la prueba de quimioluminiscencia (cpm/fagocito) fue evaluada mediante el cálculo del coeficiente de correlación (*r*). Las diferencias de la prueba de quimioluminiscencia entre muestras (muestras duplicadas) y entre individuos (diferentes donadores de fagocitos) fue evaluada mediante la utilización de análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

## Resultados

*Serotipo-especificidad de la prueba de quimioluminiscencia.* Una cepa M-1 no opsonizada (incubada con PBS) resultó en una respuesta apenas apreciable en QL. Una cepa M-1 incubada con suero normal, también resultó en una baja respuesta de quimioluminiscencia. Sin embargo, la cepa M-1 opsonizada con suero inmune anti-M-1 resultó en una respuesta en QL marcada (Tabla 1). La respuesta en QL obtenida al incubar una cepa heteróloga M-3 con el mismo suero anti-M-1 fue significativamente baja ( $P < .001$ ). La adsorción de cada uno de los tres sueros inmunes anti-M-1 con una cepa homóloga M-1, redujo significativamente su habilidad para opsonizar una cepa M-1 tanto en la prueba de QL como en la prueba bactericida indirecta (IBLog<sub>2</sub>)  $P < .005$ . En contraste, la adsorción de los sueros inmunes anti-M-1 en contra de una cepa heteróloga M-3 no interfirió con su capacidad para opsonizar una cepa M-1 tanto en la prueba de QL como en la PBI (Tabla 1).

La adsorción secuencial de un suero humano anti-M-1 en contra de cepas heterólogas de los serotipos M-3, M-41, M-21 y M-12 no disminuyó en forma significativa su capacidad para opsonizar a una cepa homóloga M-1. Sin embargo, una última adsorción del suero anti-M-1 con una cepa homóloga abolió por completo la capacidad del suero para opsonizar una cepa homóloga M-1 (Figura 7).

*Reproducibilidad de la prueba en diferentes donadores de fagocitos.* La respuesta en QL de fagocitos de 10 personas diferentes fue evaluada después de exponerlos a una mezcla de un suero inmune anti-M-1 con una cepa homóloga M-1 y con una heteróloga M-3 de EGA. Los valores en QL (considerados como porcentaje sobre el control no

opsonizado) generados después de incubar cada una de las 10 muestras de sangres diferentes con una cepa M-1 previamente opsonizada un suero anti-M-1 mostró un valor promedio en cpm/fagocito de 271 y una desviación estándar (DS) de 74.8. No hubo diferencias significativas tanto entre las muestras por duplicado como en la respuesta entre los 10 diferentes donadores ( $F = 1.18$ ,  $P = .39$ ) La respuesta en QL de fagocitos retados con una cepa M-3 previamente incubada con el suero heterologo anti-M-1 (expresado como porcentaje sobre su control no opsonizado) fueron significativamente inferiores (promedio = 94, DS = 19.8). ( $P < .001$ )

*Correlación entre la prueba de quimioluminiscencia y la prueba bactericida*

*indirecta.* Para probar la correlación entre las dos pruebas, se utilizaron sueros inmunes anti-M-1, inmune anti-M-1 adsorbidos y suero normal. Los mismos sueros fueron usados simultaneamente en ambas pruebas. Hubo una correlación directa ( $r = 0.90$ , poder = 0.99) entre el grado de opsonización medida en la prueba de QL y la actividad bactericida medida en la prueba bactericida indirecta (**Figura 8**). Además, el coeficiente de correlación entre las dos pruebas fue de 0.77 al emplear suero de 10 personas normales elegidas en forma aleatoria.



## Discusión

En las últimas siete décadas, se han empleado diferentes abordajes para demostrar la presencia de anticuerpos opsonicos serotipo-específicos dirigidos en contra de EGA. La prueba bactericida fue desarrollada por Todd [11] y Lancefield [3] para la demostrar la presencia y especificidad de los antígenos M en EGA así como la presencia de anticuerpos bactericidas serotipo-específicos en suero de personas convalecientes. Aunque la prueba bactericida sigue siendo considerada como el estandar de oro, es complicada y requiere mucho tiempo para su realización. Una prueba típica necesita tres días para ser completada así como el uso de grandes cantidades de suero no diluido (120µl por tubo). Además, el número de muestras por corrimiento es limitado, haciendo esta prueba poco práctica para estudios a gran escala de tipo epidemiológicos. Dichos estudios a nivel poblacional aportarán valiosa información en cuanto a la dinámica del desarrollo de anticuerpos opsonicos serotipo-específicos (protectores) y su duración después de una infección natural o secundarios a la aplicación de vacunas.

Un segundo abordaje emplea el cálculo visual del porcentaje de EGA “ingerido” por fagocitos en un frotis de sangre teñido [4]. Sin embargo, la clara distinción de los *estreptococos* que se encuentran dentro de los fagocitos y los que están en la parte posterior podría ser difícil. Finalmente, el tiempo necesario para leer y contabilizar estos frotis es también un factor limitante para su uso en estudios epidemiológicos que incluyan gran número de muestras.

La prueba de quimioluminiscencia ha sido utilizada para evaluar la ingestión de organismos opsonizados por leucocitos aislados [5,12]. Aunque esta prueba es versátil y sensible, el tiempo requerido para purificar los leucocitos es prolongado. Además, el proceso de purificación de neutrófilos y células mononucleares [13] puede activarlos produciendo resultados erróneos.

En el presente trabajo, se describe la metodología empleada para desarrollar una prueba de quimioluminiscencia altamente sensible, específica y reproducible para la detección de anticuerpos opsonicos contra estreptococo del grupo A que utiliza sangre fresca total como fuente de fagocitos. Mediante la utilización de esta prueba hemos demostrado una actividad fagocitaria baja después de incubar una cepa serotipo M-1 con PBS. Esta baja actividad podría estar relacionada con fagocitosis no opsonica [14], o a un pequeño efecto estimulador directo de las bacterias muertas por si mismas. Una respuesta modesta en QL fue desencadenada al incubar una cepa M-1 con suero normal así como al incubar una cepa M-3 con suero *immune anti-M-1 heterologo*. Esta respuesta representa la presencia de pequeñas cantidades de anticuerpos opsonicos serotipo-especificos, anticuerpos con reactividad cruzada o anticuerpos en contra de otros componentes de *superficie del estreptococo* tales como peptidoglicano, peptidasa C5a o el carbohidrato de grupo [15].

La serotipo-especificidad de esta prueba de QL fue también demostrada. La respuesta de QL de los fagocitos ante una cepa M-1 incubada con suero homólogo anti-M-1 demostró ser significativamente superior a la respuesta de una cepa heteróloga M-3

incubada con el mismo suero. Incubando suero inmune anti-M-1 adsorbido tanto con una cepa homóloga como con una heteróloga también demostró que la respuesta de QL de los fagocitos es dependiente de la presencia de anticuerpos opsonicos serotipo-especificos. Además, la realización de la prueba bactericida indirecta en paralelo utilizando los mismos sueros inmune anti-M-1, adsorbidos y normal, demostró una correlación directa y significativa con la prueba de quimioluminiscencia.

La prueba de quimioluminiscencia posee varias ventajas sobre otras técnicas usadas en la actualidad para medir la presencia de anticuerpos serotipo-especificos. Primero, el uso de sangre total en vez de leucocitos purificados ahorra tiempo y reduce la posibilidad de una activación o inactivación de los fagocitos debido a su mínima manipulación. Segundo, la prueba de quimioluminiscencia es un procedimiento rápido, que provee resultados listos para ser interpretados en menos de dos horas. Tercero, los datos son inmediatamente procesados por un sistema computarizado que en forma automática calcula los valores integrales de quimioluminiscencia. Cuarto, la capacidad de la maquina de quimioluminiscencia la hace capaz de procesar hasta 40 diferentes muestras en duplicado por cada corrimiento durante un periodo de 20 minutos. Quinto, se requiere un volumen mínimo de suero para cada prueba (25  $\mu$ l por muestra).

Una posible desventaja es el costo del luminometro necesario para este tipo de estudios.

En conclusión, la prueba de quimioluminiscencia es un método que requiere una cantidad mínima de suero, pudiéndose diluir hasta 1:8 sin afectar el resultado (sensible); es serotipo-específica y reproducible en la detección de anticuerpos opsónicos serotipo-específicos en contra de *Streptococcus pyogenes*. Además tiene un alta correlación con el estándar de oro (prueba bactericida indirecta). Debido a sus ventajas sobre el estándar de oro, esta prueba es una herramienta potencialmente útil en estudios clínicos y epidemiológicos en los que se requiera la evaluación de la presencia o desarrollo de anticuerpos opsónicos serotipo-específicos, tales como la determinación de la prevalencia de población susceptible hacia los serotipos más prevalentes, o la evaluación del efecto de una vacuna potencial contra *S. pyogenes* sobre el desarrollo de anticuerpos opsónicos en contra de los serotipos incluidos en la misma.

Figura 1.

## Prueba de Quimioluminiscencia

---

SβHGA no viable (100 μl) + suero 1:2 (50 μl)



37°C x 30'

Lavar y



Descartar

Resuspender en (100 μl) de PBS



Agregar luminol (600 μl)



Luminómetro

Agregar (100μl) de sangre total (1:100 en



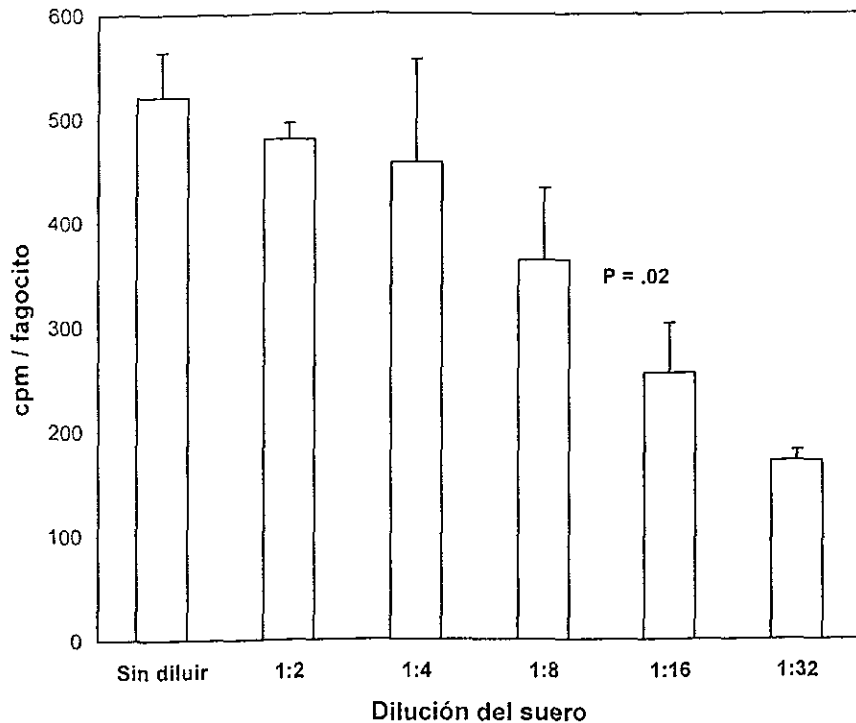
Lectura

---

Representación esquemática de la prueba de quimioluminiscencia desarrollada

Figura 2.

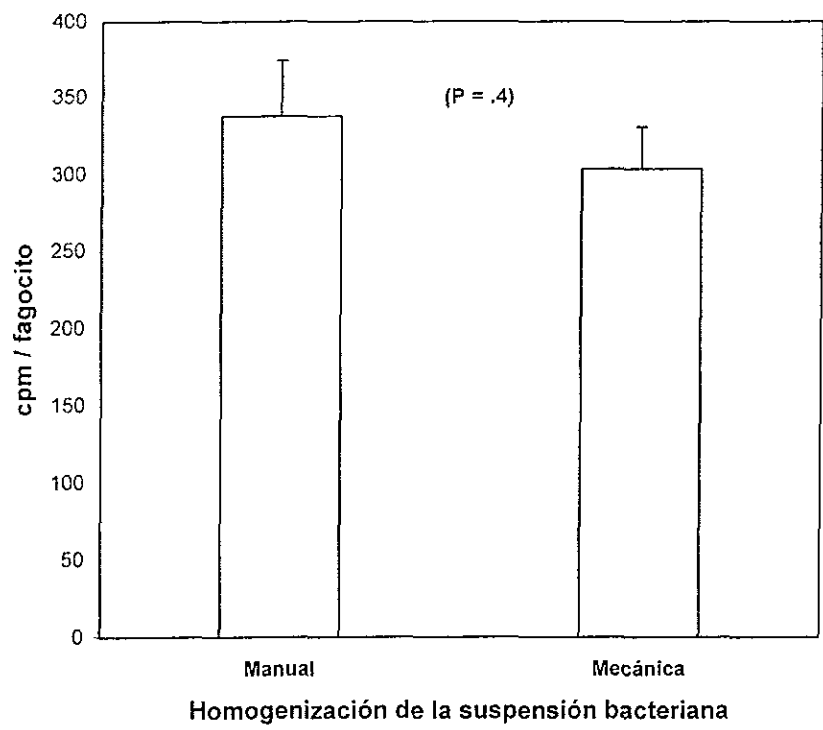
Dilución de un suero convaleciente anti-M1 y su efecto en la actividad opsónica en contra de una cepa M-1



Las diluciones 1:2 hasta 1:8 de un suero convaleciente anti-M1 no mostró diferencias significativas en su capacidad para opsonizar una cantidad estandar de bacterias del serotipo homólogo M-1. Los valores de cada barra representan el promedio y la desviación estandar en cpm/fagocito de corrimientos por duplicado.

Figura 3.

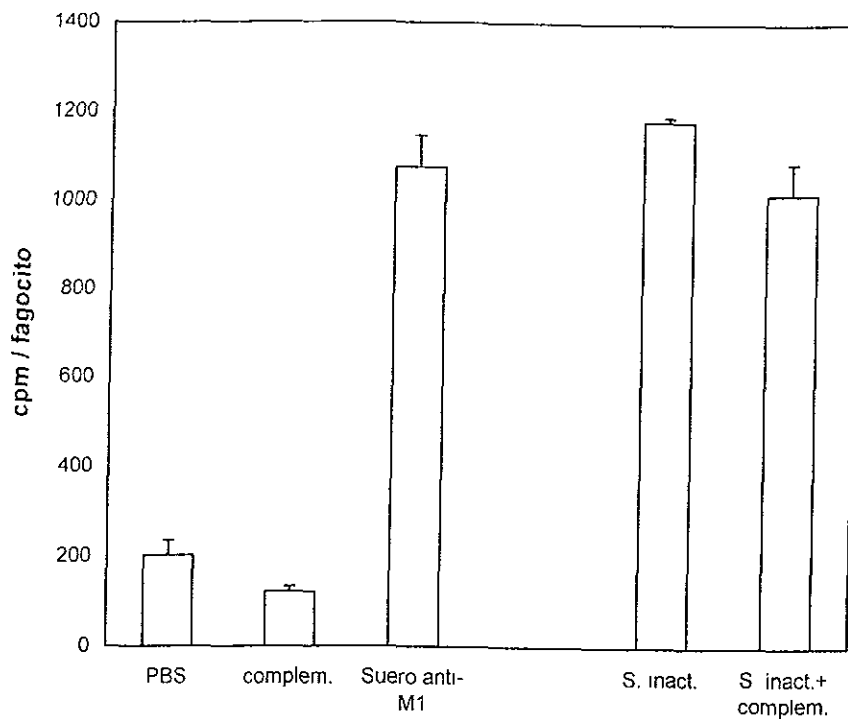
**Efecto de la homogenización manual vs mecánica de una suspensión bacteriana sobre la respuesta fagocítica**



Las barras representan la actividad opsónica de los fagocitos después de ser retados con una suspensión bacteriana M-1 opsonizada con suero inmune homólogo y homogeneizada manualmente vs otra muestra de la misma suspensión homogeneizada mecánicamente.

Figura 4.

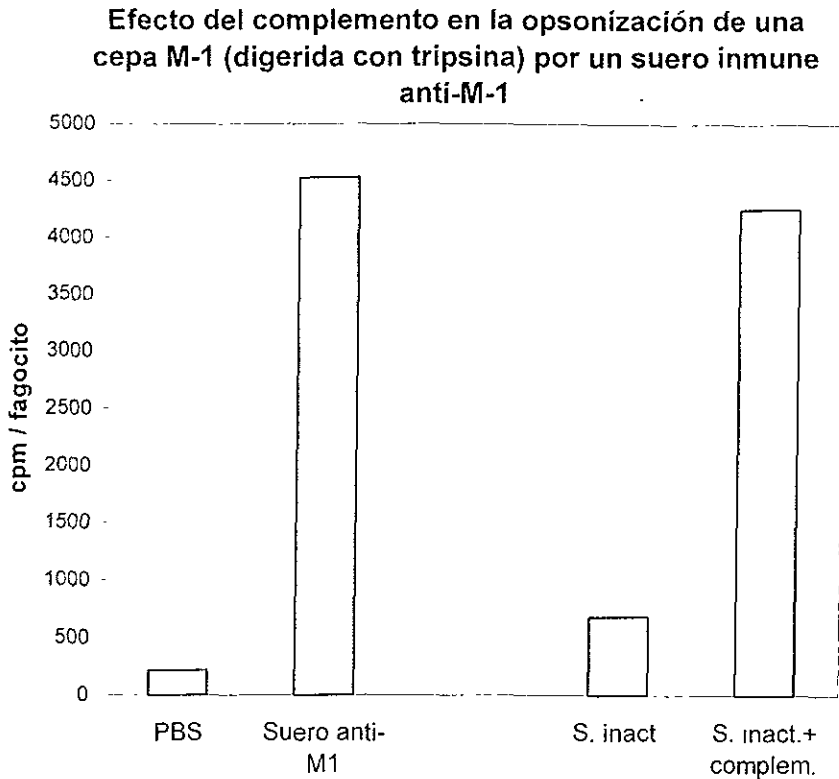
## Efecto del complemento en la opsonización de EBHGA



Cada una de las barras representa el valor promedio y desviación estandar en cpm/fagocito resultante de incubar una cepa M-1 con PBS, complemento de cobayo, un suero inmune anti-M-1, el mismo suero inmune inactivado por calor y suero inmune inactivado por calor con adición de complemento de cobayo.



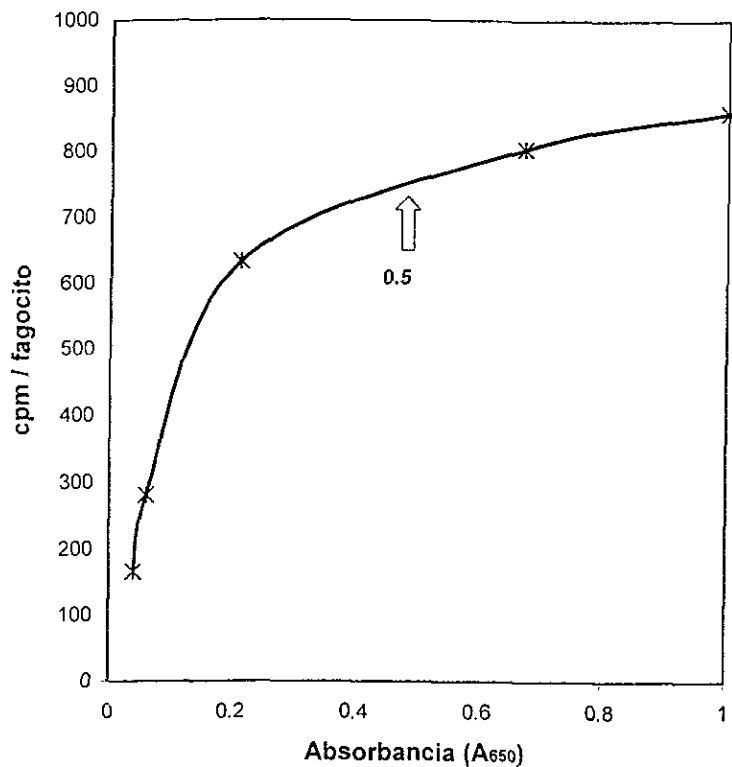
Figura 5.



Las barras representan la actividad opsónica generada después de incubar suero inmune anti-M-1, suero inmune inactivado o suero inmune inactivado + complemento, con una cepa M-1 previamente digerida con tripsina para denudar sus proteínas de superficie.

Figura 6.

**Efecto de la concentración de bacterias en la suspensión bacteriana sobre la respuesta fagocitaria**



Una misma dilución (1:2) de suero inmune anti-M-1 fue incubado con diluciones seriadas (1:2) de una suspensión bacteriana (en PBS) de una cepa homóloga. La curva obtenida al graficar la absorbancia y la respuesta fagocitaria (cpm/fagocito) mostró ser lineal entre 0.06 y 0.2  $A_{650}$  y máxima a  $A_{650}$  mayor de 0.5.

Tabla I.

Tipo especificidad de anticuerpos opsónicos en la *P. bactericida* y la quimioluminiscencia.

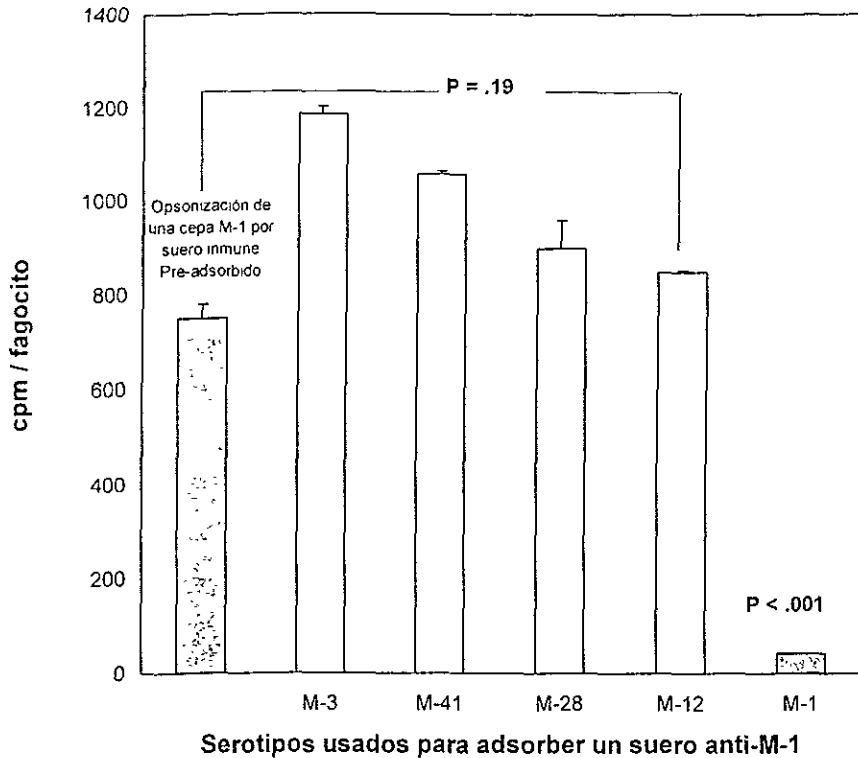
Suero	Tratamiento del suero	Cepas usadas	Muerte Bacteriana			†Prueba de QL
			Resultante *UFC (T-0)	Resultante UFC (3 hr)	BI (Log <sub>2</sub> )	Cpm / fagocito
Conval. 1	Ninguno	M-1	182	608	5	626
	Adsorbido M3	M-1	216	276	6.46	612
	Adsorbido M1	M-1	127	15200	-0.16	46
	Ninguno	M-3	220	14400	0.09	80
Conval. 2	Ninguno	M-1	146	116	7	481
	Adsorbido M3	M-1	238	4	13	748
	Adsorbido M1	M-1	238	22400	0.17	44
	Ninguno	M-3	175	23200	-0.9	114
Conval. 3	Ninguno	M-1	176	400	5.6	480
	Adsorbido M3	M-1	160	288	5.9	772
	Adsorbido M1	M-1	192	14400	0.49	46
	Ninguno	M-3	215	12400	0.3	78
Normal	Ninguno	M-1	140	14,840	0.9	163
	Ninguno	M-3	206	14,320	1.5	139

UFC = Unidades Formadoras de Colonias

†Prueba QL = Prueba de Quimioluminiscencia. Los datos representan la media de corrimientos por duplicado y son reportados como cuentas por minuto por fagocito (cpm-fag) determinados al integrar el area bajo la curva durante un periodo de 0 a 20 minutos.

Figura 7.

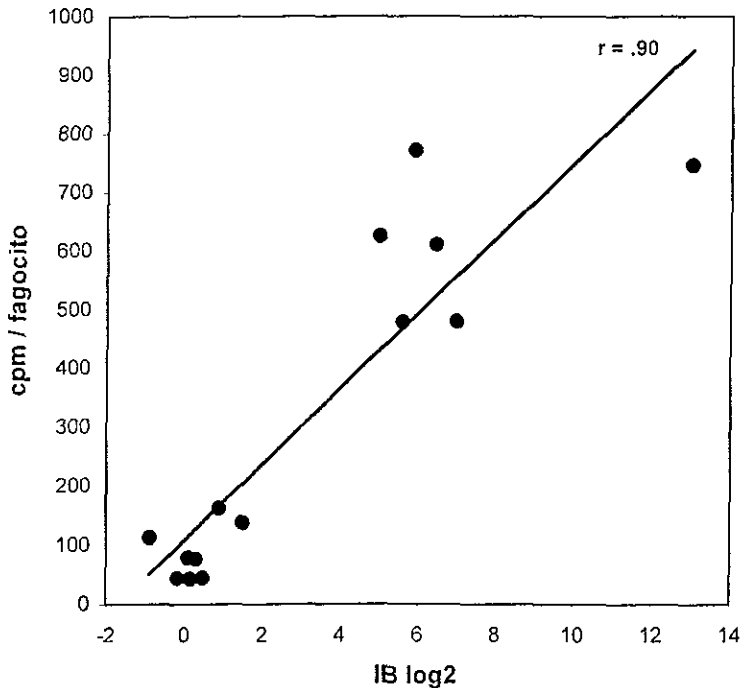
### Tipo-especificidad de la prueba de quimioluminiscencia.



Capacidad opsonica de un suero inmune anti-M-1 en contra de una cepa homóloga M-1, antes y después (barras punteadas) de su adsorción secuencial con 4 cepas heterólogas y una homóloga. Su capacidad opsonica no se vió significativamente afectada después de ser adsorbido con las cepas heterólogas. Sin embargo, su actividad opsonica es prácticamente anulada después de su adsorción con una cepa homóloga M-1.

Figura 8.

**Correlación entre la prueba de quimioluminiscencia y  
la prueba bactericida indirecta**



Esta figura muestra la correlación entre la respuesta fagocitaria en cuentas por minuto / fagocito y el índice bactericida ( $\log_2$ ) calculado en pruebas paralelas simultáneas. Hubo una correlación directa positiva ( $r = 0.90$ ) entre el grado de opsonización (cpm / fag) y la actividad bactericida (IBlog<sub>2</sub>).

## Referencias

1. Kalmar JR. Measurement of opsonic phagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils. In: Clark VL, Bavoil PM, editors. *Methods in Enzymology*. San Diego, California: Academic Press, Inc, 1994. 108-119.
2. Fischetti VA. Streptococcal M Protein: Molecular Design and Biological Behavior. *Clinical Microbiol Rev* 1989;2:285-314.
3. Lancefield RC. Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types with a special reference to the bactericidal test. *J Exp Med* 1957;106:525-44
4. Beachey EH, Cunningham M. Type specific inhibition of preopsonization versus immunoprecipitation by streptococcal M proteins. *Infect Immun* 1973;8:19-24.
5. Allen RC. Evaluation of serum opsonic capacity by quantitating the initial chemiluminescent response from phagocytizing polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1977;15:828-33.
6. Allen RC. Phagocyte leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods in Enzymology* 1986;133:449-93.

- 7 Briheim G, Stendahl O, Dahlgren C. Intra- and Extracellular Events in Luminol-Dependent Chemiluminescence of Polymorphonuclear Leucocytes. *Infect Immun* 1984;45:1-5.
- 8 Johnson DR, Kaplan EL. Indirect bactericidal test for measurement of anti-M antibodies. In: Johnson DR, Kaplan EL, editors. Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections. 1st ed. Geneva: World Health Organization, 1996.81-95.
9. Stevens DL, Bryant AE, Huffman J, Thompson K, Allen RC. Analysis of circulating phagocyte activity measured by whole blood luminescence: Correlations with clinical status. *J Infect Dis* 1994;170:1463-72.
10. Swanson J, Hsu KC, Gotschlich EC. Electron microscopic studies on streptococci. I. M antigen. *J Exp Med* 1969;130:1063-91.
11. Todd EW. Method of measuring increase or decrease of population of haemolytic streptococci in blood. *Brit J Exper Path* 1927;8:1-5.
12. Hemming VG, Hall RT, Rhodes PG, Shigeoka AO, Hill HR. Assessment of group B streptococcal opsonins in human and rabbit serum by neutrophil chemiluminescence. *J Clin Invest* 1976;58:1379-87.
13. Nelson RD, Mills EL, Simmons RL, Quie PG. Chemiluminescence response of phagocytizing human monocytes. *Infect Immun* 1976;14:129-34.

14. Ofek JG, Keisari Y. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Ann Rev Microbiol* 1995;49:239-76.
15. Todome Y, Ohkuni H, Yokomuro K, Kimura Y, Hamada S, Johnston KH, Zabriskie JB. Enzyme-linked immunosorbent assay of antibody to group A *streptococcus*-specific C carbohydrate with trypsin-pronase-treated whole cells as antigen. *J Clin Microbiol* 1988;26:464-70.



## Segunda Parte

# Variable Susceptibilidad a Opsono-fagocitosis de Cepas de Estreptococo del Grupo A del Serotipo M-1 Posterior a su Incubación con un Suero Inmune Humano.

A Villaseñor-S<sup>1</sup>, W.M. McShan<sup>2</sup>, D. Salmi<sup>3</sup>, E.L. Kaplan<sup>4</sup>, D.R. Johnson<sup>4</sup>, y D.L. Stevens<sup>3</sup>. UIESSA, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, Mexico<sup>1</sup>. Universidad de Oklahoma<sup>2</sup>, Ciudad de Oklahoma, OK. VAMC, Boise, ID., Universidad de Washington, Seattle WA<sup>3</sup>. OMS Centro Colaborativo para Referencia e Investigación en Estreptococo, Minneapolis, MN<sup>4</sup>.

Parte de este trabajo fue presentado en el 37th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. (Trabajo No. 11) Philadelphia, PA; Noviembre 18-21, 1999.

Publicado en *Journal of Infectious Diseases* 1999; 180:1921-1928.

**Resumen:**

La inmunidad en contra de cepas de estreptococo del grupo A (EGA) se relaciona con la presencia de anticuerpos serotipo-específicos dirigidos contra la región hipervariable (N-terminal) y A repetida de la proteína M. Sin embargo, publicaciones recientes sugieren que dicha inmunidad podría ser más limitada y ser solo cepa y no serotipo específica. Por lo anterior, decidimos determinar la susceptibilidad a la opsonización y muerte de 70 cepas del serotipo M-1 por un solo suero de una persona inmune empleando para ello una prueba basada en quimioluminiscencia (QL) recientemente descrita y la prueba bactericida indirecta (PBI) como estandar de oro. La respuesta fagocitaria expresada en cuentas por minuto por fagocito (cpm/fagocito) obtenida después de opsonizar cada una de las 70 cepas del serotipo M-1 con un suero inmune fue heterogénea, con un rango de 47-477 cpm/fagocito (media 310, DS=75). Con la finalidad de conocer si la diferencia en susceptibilidad a ser opsonizadas por un mismo suero inmune estaba relacionada con diferencias en la región N-terminal o A repetida de la proteína M, se eligió una muestra de 10 cepas representativas con grados alto, intermedio o bajo de opsonización y muerte en la prueba de QL y PBI respectivamente para realizar secuenciación del gen *emm1*. En nueve de las 10 cepas se encontró un 100% de homología en la región N-terminal. Un cambio en un aminoácido de la región repetida A1 en una de esas nueve cepas no se asoció con disminución en la opsonización. En contraste, la sustitución de varios aminoácidos en la región N-terminal y dos en la región repetida A<sub>3</sub> en otra cepa (CS-190) se asoció a una reducción marcada en la opsonización similar a la obtenida después de incubar el mismo suero inmune anti-M-1 con dos cepas heterólogas de control de los serotipos M-3 y M-11. El presente estudio demuestra que 1) cambios substanciales en la

región hipervariable y posiblemente en la región A<sub>3</sub> repetida afectan en forma marcada la opsonización y muerte por fagocitos en presencia de suero inmune anti-M-1; y 2) que la susceptibilidad a ser opsonizadas y muertas no es solo dependiente de la conformación de la región N-terminal de la proteína M. Los hallazgos descritos sugieren que otros componentes de superficie además de la proteína M, interfieren con la opsonización de cepas del serotipo M-1 por suero inmune. Esto podría sugerir además que la inmunidad adquirida posterior a una infección por EGA podría no ser protectora en contra de todas las cepas homólogas. Esto podría explicar la prevalencia persistentemente alta de cepas del serotipo M-1 en todo el mundo en los últimos 15 años.

## Introducción

Estreptococo del grupo A (EGA) continúa causando infecciones leves, moderadas y severas en humanos en todo el mundo. Este organismo es responsable de muchas infecciones comunes tales como faringitis, amigdalitis, fiebre escarlatina, neumonía, impétigo, celulitis, erisipela y sinfangitis así como secuelas no supurativas como fiebre reumática y glomerulonefritis post-estreptocócica. En los Estados Unidos de Norte América, la incidencia de fiebre reumática ha ido disminuyendo durante los últimos 40 años [1]. sin embargo, debido a los recientes brotes de fiebre reumática, la emergencia de infecciones invasivas [2] y el síndrome de choque tóxico [3,4] han hecho necesarias la implementación de medidas efectivas de control y tratamiento.

Aunque EGA posee varios factores de virulencia tales como la estreptolisina-O, hialuronidasa, estreptoquinasa, peptidasa C5a y exotoxinas pirogénicas (SPEA, SPEB, SPEC), es la proteína M, un componente de superficie el que confiere a este organismo la capacidad de ser resistente a la fagocitosis [5]. De acuerdo a lo anterior, la protección en contra de una infección se ha asociado con la presencia de anticuerpos opsonicos serotipo-especificos dirigidos en contra de la proteína M [5].

La estructura secundaria  $\alpha$ -helicoidal enrollada de las proteínas M es rara en bacterias, pero comparte propiedades fisicoquímicas y su secuencia de amino ácidos tiene homología con algunas proteínas fibrilares de mamíferos tales como la cadena pesada de la miosina y la tropomiosina- $\alpha$  [5]. Esta homología con las proteínas de mamíferos

provee la base para el desarrollo de anticuerpos cruzados en contra de proteínas del sarcolema en las membranas del miocardio humano [6].

La secuenciación del ADN de numerosos genes *emm* de EGA ha demostrado que la región 3' que codifica para la región carboxi terminal está altamente conservada entre diferentes proteínas M. Por el contrario, los segmentos amino terminales tienen una gran variabilidad. Esta variabilidad en la región N-terminal es la base para la tipificación serológica del EGA en serotipos M [7]. Las regiones N-terminal y/o A repetidas de la proteína M son los sitios en los que se fijan los anticuerpos opsonicos serotipo-específicos [5] y algunos autores han demostrado que un epítope se localiza en los primeros 10 aminoácidos de la región N-terminal [8].

La fagocitosis es un mecanismo de defensa primario en contra de bacterias invasoras y es realizado en su mayoría por fagocitos profesionales tales como los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos. Las opsoninas, tales como inmunoglobulinas y complemento facilitan la fagocitosis y muerte de diversos microorganismos [9].

De las pruebas disponibles para evaluar la opsonofagocitosis de EGA, una emplea la cuantificación de la muerte bacteriana, como es el caso de la prueba bactericida indirecta [10], o el conteo directo de EGA dentro de fagocitos [11]. La opsonofagocitosis puede ser también cuantificada mediante la medición de los productos metabólicos y químicos asociados con la "ingestion" y muerte de las partículas opsonizadas por los

leucocitos [12]. Una vez que la partícula opsonizada es adherida a la célula fagocítica, la vía hexosa monofosfato es activada generando NADPH. La oxidasa de NADPH activada emplea el potencial reductor de la NADPH para la reducción univalente de  $O_2$  para generar protones ( $H^+$ ) y aniones superóxido ( $O_2^-$ ), mismos que son microbicidas [13]. Esta actividad metabólica oxidativa produce productos de oxidación electrónicamente activos, y su relajación subsecuente a su nivel basal resulta en emisión de fotones [13,14]. La adición de cantidades nanomolares de la hidrazida cíclica luminol (5-amino-2, 3-dihidro-1, 4-ftalazinedione) a la mezcla opsonizante incrementa la quimioluminiscencia (QL) en aproximadamente tres órdenes de magnitud, permitiendo la cuantificación de la actividad oxidativa utilizando cantidades relativamente pequeñas de fagocitos [13].

Los objetivos de este estudio fueron: primero, evaluar la actividad opsonica de un suero único anti M-1 en contra de 70 cepas M-1 de EGA usando un método rápido sensible y reproducible de quimioluminiscencia que emplea sangre total y segundo; determinar si diferencias en la opsonización están relacionadas a diferencias en el gen *emml*.

## Materiales y Métodos

*Cepas y cultivos.* Para este estudio fueron utilizadas 70 cepas del serotipo M-1 de la colección del Dr. Dennis L. Stevens. La mayoría de las cepas fueron recuperadas de casos con infección invasiva por EGA y aisladas tanto de un sitio normalmente estéril ( $n = 47$ ), o no estéril ( $n = 6$ ). En 17 casos se desconoce el sitio de aislamiento. La mayoría de las cepas fueron aisladas de personas que viven en los E.U. ( $n = 59$ ), aunque hubo otras aisladas de Alemania ( $n = 6$ ), Japón ( $n = 2$ ), Holanda ( $n = 2$ ), y Suiza ( $n = 1$ ) durante el periodo entre 1988 a 1997. Cepas de los serotipos M-3 y M-11 fueron usadas como controles negativos. Todas las cepas fueron serotipificadas por los doctores Edward Kaplan y Dwight R. Johnson de la Universidad de Minnesota y el Laboratorio de Referencia estreptocócico de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Una colonia de cada cepa fué sembrada en 9 ml de caldo Todd Hewitt conteniendo 1% adicional de neopeptona (CTHN) (Difco, Detroit, MI) e incubada durante la noche (18 hr) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El caldo de cultivo fue entonces adicionado a 90 ml de CTHN previamente calentado a 37°C e incubado durante 4 hr a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> y con agitación suave (100 RPM) para obtener un cultivo en fase logarítmica. Los cultivos fueron centrifugados a 1,700 x g durante 15 minutos, lavados en dos ocasiones con 10 ml de PBS (Sigma, St. Louis MO) frío y el botón bacteriano fue resuspendido en 5 ml de PBS. Las bacterias contenidas en cada suspensión bacteriana fueron muertas mediante la exposición a rayos ultravioleta (254nm) durante una a cuatro horas (hasta obtener cultivo negativo) en una caja de petri de poliestireno de 100 x 15-mm sin cubierta, o mediante exposición al calor (56°C) por 1 hora en tubos de polipropileno

cerrados de 50 ml sumergidos en baño maría. Todas las pruebas de quimioluminiscencia fueron realizadas empleando una concentración estandarizada de bacterias correspondiente a una absorbancia de  $0.5A_{650nm}$ .

*Fagocitos.* Para cada experimento, fue utilizada sangre total anticoagulada con EDTA empleando tubos al vacío conteniendo EDTA (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) de un solo donador normal (AV) y quien de acuerdo a la prueba de rotación en tubo (Índice de crecimiento  $\geq 32$ ) [15], carecía de anticuerpos opsónicos en contra de cepas de los serotipos M-1 y M-3. El tubo conteniendo la muestra de sangre fue puesto en un rotor con movimiento suave y a temperatura ambiente ( $23-24^{\circ}C$ ) y mantenida en ese lugar hasta su uso (5-30 minutos). Para poder comparar los resultados entre pruebas realizadas en diferentes días, en cada prueba se realizó una biometría hemática con diferencial y los resultados fueron expresados en cuentas por minuto por fagocito.

*Muestras de suero.* Suero normal fue obtenido de un donador que de acuerdo a la prueba bactericida carece de anticuerpos opsónicos en contra de cepas de los serotipos M-1 y M-3 ( $IBlog_2 = 0.9$  y  $0.95$ ). La actividad bactericida del suero normal es comparable con la actividad del suero normal de conejo usado como control negativo para las cepas serotipo M-1 y M-3 ( $IBlog_2 = 1$ ) en el Centro de Referencia de la OMS en Minnesota [10]. Suero de un donador convalesciente con una historia de faringitis estreptocócica fue empleado como suero positivo. Al momento de obtener el suero, esta persona no había recibido ningún antimicrobiano ni tratamiento medicamentoso alguno en las dos semanas previas. La actividad bactericida del suero de este suero inmune en contra de



una cepa M-1 ( $IBlog_2 = 8.3$ ) fue comparable con la actividad del suero de conejo anti M-1 ( $IBlog_2 = 8.9$ ) usado como control positivo (suero estandar anti-M-1,OMS) en la prueba bactericida [15]. Las muestras de suero fueron mantenidas en tubos criogénicos a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

*Prueba de opsonofagocitosis usando quimioluminiscencia.* La opsonización fue llevada a cabo en tubos de poliestireno (Lumcuve; Wallac, Inc. Gaithersburg, MD) mezclando  $100\mu\text{l}$  de bacterias muertas y  $50\mu\text{l}$  de suero convalesciente o normal diluido 1:2 con PBS e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Después de lavar una vez con PBS, las muestras fueron centrifugadas a  $1,275 \times g$  durante 10 minutos. El sobrenadante es descartado y las bacterias resuspendidas en  $100\mu\text{l}$  de PBS. Después de esto, se agregan a cada tubo  $600\mu\text{l}$  de una solución salina balanceada previamente calentada conteniendo  $0.15\text{mM}$  de luminol (SSBL) [16]. Las muestras por duplicado son puestas en el luminómetro (LB953 modificado; Berthold, Wildbad, Alemania) durante 10 minutos para permitir un equilibrio de temperatura a  $37^{\circ}\text{C}$ . En este momento, se obtiene sangre del donador normal y se colocan  $100\mu\text{l}$  de sangre fresca total en  $9.9\text{ ml}$  de solución diluyente de sangre (SDS) previamente calentada a  $37^{\circ}\text{C}$  [16]. El luminómetro entonces inyecta  $100\mu\text{l}$  de la sangre diluida en cada tubo.

Las mediciones de quimioluminiscencia se realizaron automáticamente cada medio minuto durante un periodo de incubación de 20 minutos. Los resultados fueron expresados como cuentas por minuto por fagocito como valor acumulado o integral. Un fotón estandar es corrido al mismo tiempo en cada prueba para tener una estandarización

de la luz emitida entre cada prueba. Otros controles son: 1). Suspensión de bacterias M-1, M-3 y M-11 incubadas con PBS. 2). Suspensión de bacterias M-1, M-3 y M-11 incubadas con suero normal. 3). Suspensión de bacterias M-3 y M-11 incubadas con suero inmune heterólogo, y 4) 50µl de zymosan opsonizado con complemento [16].

*Prueba Bactericida Indirecta (PBI).* Esta prueba fue realizada de acuerdo al método originalmente descrito por Lancefield [10] y modificado por Johnson y cols. [15] al adicionar una pre-opsonización de las bacterias y el suero a evaluar. Brevemente, 110µl de suero es mezclado con un volumen igual de una suspensión diluida de bacterias en fase estacionaria conteniendo ~200-400 unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa a ser probada, e incubada a 4°C durante 1 hora. Después de este periodo de incubación, 100µl de la mezcla es adicionado a un tubo de polipropileno estéril de 12 x 75 con tapa, conteniendo 300µl de sangre fresca heparinizada obtenida de un donador normal (AV). Una muestra adicional de 100µl es sembrada en una placa de agar sangre de cordero para determinar el número inicial de UFC (T-0). La mezcla fagocítica es entonces colocada en un rotor (LABQUAKE Rotator, Barnstead Thermolyne Corp.) a 8 revoluciones por minuto e incubado a 37°C durante 3 horas. Al término del periodo de incubación, 100µl de la mezcla no diluida y de 2 diluciones 1:10 de cada tubo son cultivados en placas de agar sangre de cordero e incubados durante toda la noche (18 horas) a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, el número resultante de UFC es contabilizado y la actividad bactericida del suero es determinada calculando el Índice Bactericida (IB) como sigue:  $IB = (\text{Índice de crecimiento en suero normal}) \div (\text{Índice de$

crecimiento en el suero tipo-específico). De la misma manera que en otros laboratorios, nosotros calculamos el índice bactericida y su correspondiente logaritmo base 2 del mismo ( $IBlog_2$ ) para facilitar comparaciones. Un  $IB \geq 32$  o su correspondiente  $IBlog_2 (\geq 5)$  fue el mínimo valor para ser considerado como significativo. Los valores de IB resultantes luego de incubar diferentes cepas homólogas M-1 y heterólogas M-3 y M-11 con un mismo suero inmune anti M-1 fueron asimismo interpretadas tomando en consideración los rangos de IB descritos por Stollerman y cols. [17]. Los controles para evaluar la habilidad de cada cepa para crecer en suero normal, la tipo-especificidad de la prueba y la habilidad de los fagocitos para matar bacterias en presencia de anticuerpos serotipo-específicos fueron corridos en paralelo. Los sueros de conejo normal y anti M-1 estandarizados fueron amablemente donados por los Doctores Dwight R. Johnson y Edward L. Kaplan, de la OMS.

*Secuenciación del gen emm* . El ADN cromosómico de cada una de las 10 cepas M-1 representativas con diferente susceptibilidad a ser opsonizadas por un solo suero inmune anti-M-1 fue usado como templete para secuenciar el gen *emm1* . La secuenciación fue realizada en el Centro Avanzado de Tecnología Genómica de la Universidad de Oklahoma. Brevemente, el ADN cromosómico fue aislado de cultivos crecidos durante 18 horas en 10 ml de caldo Todd-Hewitt levadura (THL) de acuerdo a una modificación del método de Pitcher y cols. [18]. Se adicionaron 10U de lisina del Bacteriofago C1 para suplementar la lisozima especificada en el protocolo original para incrementar la degradación de la pared celular. La porción variable del *emm* fue entonces amplificada usando los siguientes pares de iniciadores: (iniciador 1,5'

TATT(GC)GCTTAGAAAATTAA; primer 2,5' GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT) [19].

Siguiendo las condiciones recomendadas por Beally cols. [20] los productos de PCR fueron clonados (de acuerdo con el protocolo de Promega) con el vector de clonación pGEM-T. Posteriormente, los insertos fueron secuenciados después de ser purificados mediante el uso del kit Qiagen® disponible comercialmente.

La secuenciación fue realizada usando un secuenciador de ADN automatizado (ABI Modelo 391). La alineación múltiple del ADN fue hecha utilizando el programa CLUSTAL-X [21] en una computadora personal Macintosh Power modelo 7600.

## Resultados

*Prueba de quimioluminiscencia.* Al opsonizar cada una de las 70 cepas M-1 con un solo suero inmune, la respuesta fagocitaria fue heterogénea generando QL en un rango de 47 a 477 cpm/fagocito (promedio = 310, DS = 75) y una distribución normal (Kolmogorov Smirnov = 0.067,  $P > .200$ ). Cincuenta y una cepas (73%) se distribuyeron entre la media y  $\pm 1^{\text{a}}$  DS; diez y seis cepas (23%) se distribuyeron en el área entre la  $1^{\text{a}}$  y  $2^{\text{a}}$  DS en ambos lados de la media y dos (3%) se distribuyeron entre la  $2^{\text{a}}$  y  $3^{\text{a}}$  DS en ambos sitios de la media. Las cepas de serotipos heterólogos M-3 y M-11 usadas como control, se ubicaron después de la  $3^{\text{er}}$  DS debajo del promedio en el lado izquierdo de la curva (**Figura 9**).

Este experimento fue repetido usando dos sueros inmunes anti-M-1 adicionales (A.B., K.F.). Estos sueros fueron incubados con cepas representativas del serotipo M-1 con alta (96/004) y baja (CS-190) susceptibilidad a ser opsonizadas por un primer suero inmune anti-M-1 (D.R.). La opsonización de la cepa 96/004 fue superior en forma significativa ( $P < .05$ ) que la cepa CS-190 por ambos sueros y consistente con los experimentos con el primer suero inmune empleado.

*Prueba bactericida indirecta.* Una muestra de 10 de las 70 cepas probadas anteriormente fueron seleccionadas al azar de cada porción de la curva normal. Para cada cepa, un índice de crecimiento  $> 32$  fue requerido después de incubarla con suero normal para demostrar que la producción de proteína M era suficiente para resistir la fagocitosis. La actividad bactericida de un suero inmune anti-M-1 en contra de cada una de las 10

cepas homólogas M-1 y las dos heterólogas (M-3, M-11), fue heterogénea con un  $IB_{log_2}$  con un rango entre 1.5 y 8.9 (promedio = 4.4, DS = 2.6). Los valores del IB fueron además analizados de acuerdo a la escala descrita por Stollerman y cols. [17]. Por ejemplo, un valor de IB menor a 10 en un suero fue considerado como no significativo; 10-25 como trazas de anticuerpos; 25-50 débil positivo; 50-200 positivo; 200-500 fuertemente positivo; y mayor que 500 fue considerado como muy fuertemente positivo. El valor de IB y su correspondiente ( $IB_{Log_2}$ ) para cada cepa probada fue como sigue:

90/079 IB = 41 ( $Log_2 = 5.3$ ). 89/022 IB = 13 ( $Log_2 = 3.6$ ). CS-190 IB = 3 ( $Log_2 = 1.5$ ).  
 95/007 IB = 125 ( $Log_2 = 6.9$ ). 95/008 IB = 26 ( $Log_2 = 4.7$ ). 89/034 IB = 42 ( $Log_2 = 5.4$ ).  
 96/004 IB = 16 ( $Log_2 = 4$ ). 93/049 IB = 23 ( $Log_2 = 4.6$ ). 93/046 IB = 13 ( $Log_2 = 3.6$ ). SF-  
 370 IB = 473 ( $Log_2 = 8.9$ ). M-3 IB = 1 ( $Log_2 = 0.4$ ). M-11 IB = 3 ( $Log_2 = 1.4$ ) (**Figura 10**). Hubo una correlación directa positiva ( $r = 0.77$ ) entre la prueba de quimioluminiscencia y la prueba bactericida.

La prueba de quimioluminiscencia fue desarrollada nuevamente usando dos controles (M-3 y M-11) y las 10 cepas empleadas para la prueba bactericida y la secuenciación del gen *emm*, e incubadas con el mismo suero inmune anti-M-1. La actividad fagocítica mostró un rango de 85 a 625 cpm/fagocito (promedio = 361, DS = 160) y una distribución normal en el área bajo la curva (**figura 11**).

*Secuenciación del ADN.* Para tratar de explicar la razón por la cual existe dicha heterogeneidad en opsonofagocitosis demostradas en la prueba de quimioluminiscencia y la prueba bactericida, las mismas 10 cepas representativas (CS-190, 95/007, 96/004,

93/049, SF-370, 89/022, 90/079, 95/008, 89/034, 93/046) fueron usadas para secuenciar el gen *emm*. Analisis de la secuencia predecida de aminoácidos de la proteína madura M, demostró un patrón común compuesto de la región N-terminal hipervariable, las regiones repetidas A, B y C, repetidas y la región de anclaje (**Figura 12**). Seis cepas (96/004, 93-049, SF-370, 89/022, 90/079, 95/008) demostraron tener un 100% de homología a nivel de la secuencia deducida de aminoácidos en la región N-terminal y las tres regiones repetidas (**Figura 13**). En la cepa 95/007 se encontró una sustitución en un aminoácido localizado al final de la región repetida A<sub>1</sub> (**Figura 13**). Esta cepa sin embargo fue bien opsonizada y muerta en la prueba de QL y la PBI y se localizó en el lado derecho de la curva (**Figuras 10 y 11**).

Finalmente, en la cepa CS-190 se encontraron dos sustituciones en aminoácidos localizados en la región repetida A<sub>3</sub> y otras diversas en la N-terminal (**Figura 13**). Esta cepa tuvo muy baja susceptibilidad a la opsonización tanto en la prueba de QL como en la PBI, y con valores cercanos a los encontrados con las cepas heterólogas M-3 y M-11 usadas como controles negativos (**Figuras 10 y 11**).

## Discusión

Durante las pasadas siete décadas, se han empleado diferentes abordajes para demostrar la presencia de anticuerpos opsónicos tipo-específicos en contra de EGA. La prueba bactericida fue desarrollada por Todd [22] y Lancefield [10] para demostrar la presencia y especificidad de los antígenos M en EGA así como la presencia de anticuerpos específicos anti proteína-M en suero de personas convalecientes. A pesar de que la prueba bactericida continúa siendo el estándar de oro, es una técnica complicada y lleva mucho tiempo requiriendo hasta 3 días para completarla y empleando una mayor cantidad de suero no diluido (120µl por tubo). También, el número de muestras por prueba es limitado, haciendo esta prueba aun más impráctica para estudios epidemiológicos a gran escala.

La prueba bactericida indirecta realizada en paralelo en las 10 cepas seleccionadas, resultó en una actividad bactericida heterocogena y con distribución normal. Empleando el método de Stollerman para categorizar los resultados, la actividad bactericida de un solo suero inmune en contra de varias cepas de un mismo serotipo M-1 varió en un rango desde “no significativa” hasta “fuertemente positiva” [17]. Sin embargo en una cepa M-1 (CS-190) la actividad bactericida del mismo suero convalescente no solo no fue significativa sino que fue comparable con la actividad en contra de cepas heterólogas M-3 y M-11.

En el presente estudio, usamos una prueba de quimioluminiscencia recientemente desarrollada que utiliza sangre fresca total [23] y con una correlación significativa con la



prueba bactericida indirecta, para medir la dinámica de opsonización de 70 cepas M-1 por un solo suero suero inmune anti-M-1. Nuestros resultados demuestran que la respuesta fagocítica es heterogénea y con una distribución normal similar a otros fenómenos biológicos. Para mostrar lo anterior, podemos ver que la mayoría de las cepas causaron una respuesta fagocitaria promedio de 310 cpm/fagocito. En contraste, 7 cepas fueron pobremente opsonizadas ubicándose después de la 1ª DS en el lado izquierdo del promedio, y una (CS-190) fue pobremente opsonizada al igual que las cepas heterólogas de control de los serotipos M-3 y M-11.

Para investigar el mecanismo a nivel molecular responsable de la heterogénea susceptibilidad mostrada por cepas del serotipo M-1 para ser opsonizadas por un solo suero inmune anti-M-1, fue comparada la secuencia deducida de aminoácidos de las regiones N-terminal y A repetidas de 10 cepas M-1 representativas de aquellas con una susceptibilidad alta, intermedia y baja a ser opsonizadas y muertas por un solo suero inmune humano en las pruebas de QL y PBI. La cepa CS-190 tuvo dos sustituciones en aminoácidos de la región A<sub>3</sub> y varias en la región N-terminal y estuvo asociada con la más baja susceptibilidad a ser opsonizada por el suero inmune. Esto apoya la noción de que cambios menores en la secuencia de nucleótidos de la regiones N-terminal [24] y A-repetida [25] alteran el reconocimiento por anticuerpos serotipo-específicos. Sin embargo, nosotros encontramos que el gran espectro de susceptibilidad a ser opsonizados y muertos por un suero inmune anti-M-1 ocurrió a pesar de un 100% de homología en la región hipervariable N-terminal en nueve de 10 cepas M-1. Estos resultados demuestran que aunque los cambios en la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la

proteína M correlacionó con una pobre opsonización por anticuerpos serotipo-específicos, no explican la heterogeneidad de la susceptibilidad a ser opsonizadas en 9 cepas con secuencias idénticas de los amonoácidos de la región hipervariable. Nuestros resultados sugieren que otros factores además de la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal son importantes en el reconocimiento funcional por anticuerpos serotipo-específicos.

Estos datos demuestran que pequeñas diferencias en la región N-terminal de la proteína M podrían resultar en cambios significativos en la opsonización. Estos resultados han sido corroborados en un estudio previo en que también demostraron que anticuerpos opsonicos tipo específicos son capaces de opsonizar selectivamente algunas cepas del mismo serotipo y que por ello la protección que confieren podría ser solo cepa específica [26]. Otros factores que podrían contribuir a las diferencias encontradas en susceptibilidad a la opsonización entre cepas del serotipo M-1 son la expresión variable de otros componentes de superficie tales como la cápsula de ácido hialurónico y peptidasa C5a [27].

En resumen, este estudio demuestra que: 1) Un solo suero inmune anti-M-1 tiene una capacidad opsonica y bactericida variable en contra de cepas del mismo serotipo que va desde no significativa hasta fuertemente positiva; 2) la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la proteína M no varió en nueve de diez cepas M-1 evaluadas y no puede explicar la heterogenea susceptibilidad a la opsonización; 3) las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal se asoció con una marcada resistencia a

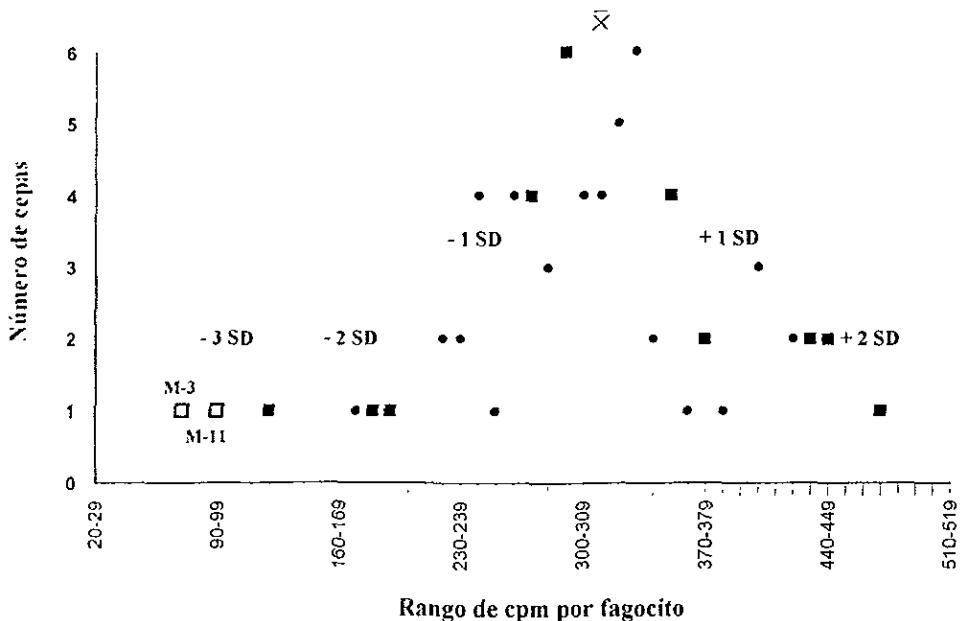
la opsonización por un suero inmune homólogo; y 4) que la prueba de QL ofrece una alternativa para estudiar la presencia de anticuerpos serotipo-específicos en estudios epidemiológicos poblacionales.

Nuestros resultados muestran que cepas de EGA del mismo serotipo no son igualmente susceptibles a ser opsonizadas por un mismo suero inmune humano. Esta *variabilidad en susceptibilidad a opsonización podría explicar el alta prevalencia y persistencia de cepas del serotipo M-1 alrededor del mundo en los últimos 15 años [28-30].*

Figura 9.

### Capacidad de un suero inmune anti-M-1 para opsonizar 70 cepas de *S. pyogenes* del serotipo M - 1

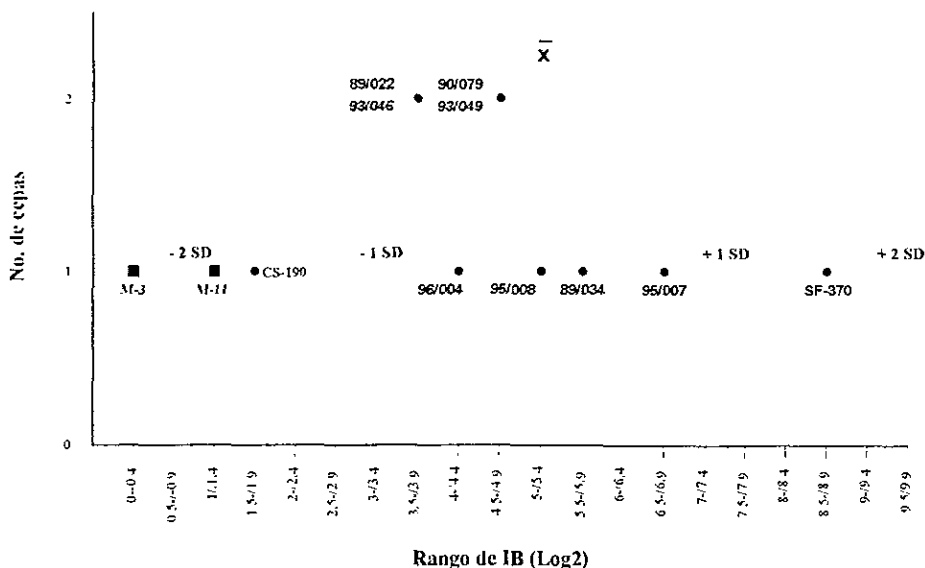
- Distribución en el área bajo la curva -



La respuesta fagocítica medida por quimioluminiscencia entre 70 cepas de EGA después de haber sido opsonizadas por un suero inmune anti-M-1 fue heterogénea. Como otros fenómenos biológicos, la actividad fagocítica mostró una distribución normal en el área bajo la curva. Note como las cepas heterólogas M-3 y M-11 (□) se ubicaron después de la 3a desviación estándar del lado izquierdo de la misma. Los cuadros (■) muestran el sitio donde se ubicaron las 10 cepas elegidas al azar, representativas de un grado alto, intermedio o bajo de opsonización y utilizadas para el estudio comparativo de la fracción N-terminal mediante la secuenciación del gen *emm1*.

Figura 10.

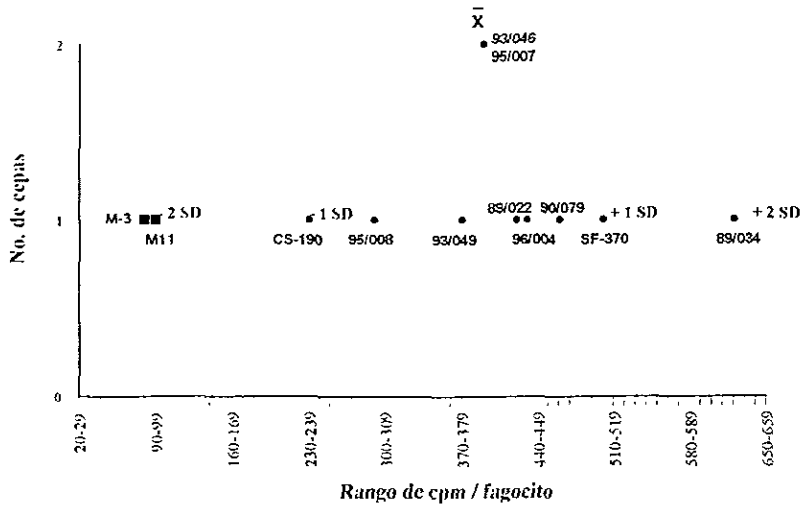
### Actividad bactericida de un suero inmune anti-M1 en contra de 10 cepas homólogas M-1 y dos heterólogas M-3 y M-11



La actividad bactericida de un suero inmune anti-M-1 en contra de una muestra de 10 cepas M-1 obtenidas en forma aleatoria de las 70 cepas con diferente susceptibilidad a ser opsonizadas, mostró ser heterogénea. La cepa CS-190 con varias sustituciones en la región N-terminal y dos en la repetida A<sub>3</sub>, mostró una muy baja susceptibilidad a la opsonización, comparable a la encontrada en cepas heterólogas M-3 y M-11.

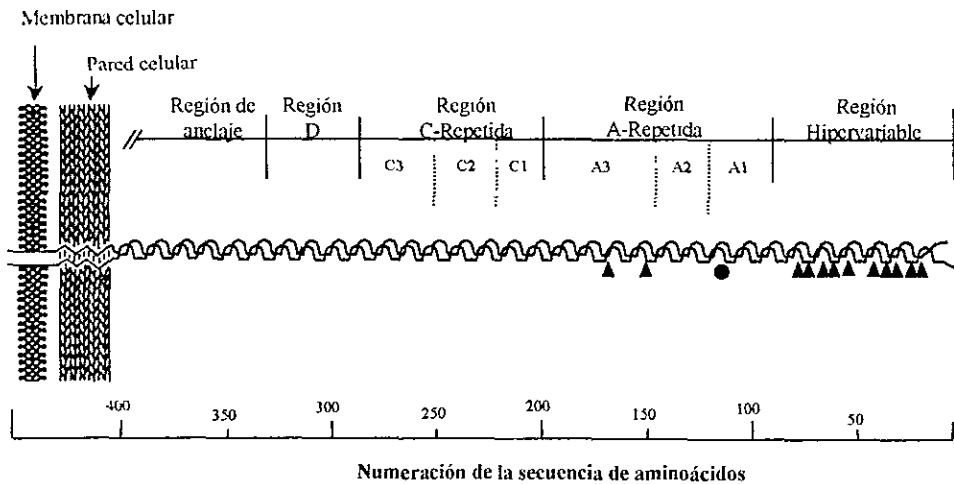
Figura 11.

Actividad opsonica de un suero inmune anti-M-1 en contra de  
10 cepas homólogas M-1 y dos heterólogas M-3 y M-11



La actividad opsonica de un suero inmune anti-M-1 en contra de una muestra representativa de 10 cepas homólogas M-1 y dos cepas heterólogas M-3 y M-11 fue también heterogenea. La incubación de la cepa M-1 CS-190 resultó en una respuesta fagocitaria cercana a la ocurrida con las cepas heterólogas M-3 y M-11.

Representación esquemática de la proteína  $\alpha$ -helicoidal trenzada de la proteína M en la superficie de *S. pyogenes* M-1.



Esta gráfica muestra las regiones más importantes de la proteína M-1. La secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de 9 de 10 cepas M-1 con gran heterogeneidad en la susceptibilidad a ser opsonizadas por un mismo suero inmune homólogo, tuvo un 100% de homología. Una cepa (95/007) presentó una sustitución en un aminoácido de la región A<sub>1</sub> (●) y no se asoció a un deterioro en su opsonización. Otra cepa (CS-190) presentó varias sustituciones en la región N-terminal y en dos aminoácidos de la región repetida A<sub>3</sub>, (▲) y se asoció a una muy pobre opsonización por el suero inmune homólogo comparable con la obtenida con cepas heterólogas

Figura 13.

Secuencia deducida de aminoácidos de la región N-terminal y regiones A repetidas de 10 cepas del serotipo M-1.

Proteína Madura

⇒

CS190 **N**NDG**R**S**R**D**V**T**E**L**I**A**A**N**N**T**V**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L**  
 95/007 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L  
 96/004 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L  
 93/049 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L  
 SF-370 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L  
 99/022 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L  
 90/079 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L  
 95/008 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L  
 93/046 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L  
 99/034 **N**GD**G****N**P**R**E**V**I**E**D**L**A**A**N**N**P**A**I**Q**N**I**R**L**R**H**E**N**K**D**L**K**A**R**L**E**N**A**M**E**V**A**G**R**D**F**K**R**A**E**E**L**E**K**A**K**Q**A**L

A1-Repetida

⇒

CS-190 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**  
 95/007 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**S**A**T**A**  
 96/004 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**  
 93/049 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**  
 SF-370 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**  
 99/022 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**  
 90/079 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**  
 95/008 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**  
 93/046 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**  
 99/034 **E**D**Q**R**K**D**L**E**T**K**L**K**E**L**Q**D**D**Y**D**L**A**K**E**S**T**S**W**D**R**Q**R**L**E**K**E**L**E**E**K**K**E**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**R**D**Y**H**R**A**T**A**

A2-Repetida

A3-Repetida

⇒

CS-190 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**A**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K  
 95/007 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**  
 96/004 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**  
 93/049 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**  
 SF-370 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**  
 99/022 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**  
 90/079 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**  
 95/008 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**  
 93/046 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**  
 99/034 **L**E**K**E**L**E**E**K**K**K**A**L**E**L**A**I**D**Q**A**S**Q**D**Y**N**R**A**N**V**L**E**K**E**L**E**T**I**T**R**E**Q**E**I**N**R**N**L**L**G**N**A**K**L**E**L**D**Q**L**S**S**E**K**

CS-190 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 95/007 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 96/004 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 93/049 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 SF-370 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 99/022 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 90/079 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 95/008 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 93/046 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**  
 99/034 **E**Q**L**T**I**E**K**A**K**L**E**E**E**K**Q**I**S**D**A**S**R**Q**S**

Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de 10 cepas del serotipo M-1. Los sitios correspondientes a la adhesión de anticuerpos opsonicos serotipo-especificos (regiones N-terminal y repetidas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>) fueron comparados y correlacionados con el grado de susceptibilidad a la opsonización. Las sustituciones encontradas están señaladas con negritas subrayadas.



## Referencias

1. Gordis L. The virtual disappearance of rheumatic fever in the United States: lessons in the rise and fall of disease. *Circulation* 1985;72:1155-62.
2. Hosier DM, Craenen JN, Teske DW, Wheller JJ. Resurgence of acute rheumatic fever. *Am J Dis Child* 1987;141:730-3.
3. Stevens DL, Tanner MH, Winship J, Swartz R, Reis KM, Schlievert PM, Kaplan E. Reappearance of scarlet fever toxin A among streptococci in the Rocky Mountain West: Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome. *N Eng J Med* 1989;321(1):1-7.
4. Johnson DR, Stevens DL, Kaplan EL. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis* 1992;166:374-82.
5. Fischetti VA. Streptococcal M Protein: Molecular Design and Biological Behavior. *Clinical Microbiol Rev* 1989;2:285-314.
6. Dale JB, Beachey EH. Multiple, heart-cross-reactive epitopes of streptococcal M proteins. *J Exp Med* 1985;161:113-22.

7. Lancefield RC. The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. J Exp Med 1928;47:91-103.
8. Robinson JH, Kehoe MA. Group A streptococcal M proteins: virulence factors and protective antigens. Immunology Today 1992;13:362-7.
9. Kalmar JR. Measurement of opsonic phagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils. In: Clark VL, Bavoil PM, editors. Methods in Enzymology. San Diego, California: Academic Press, Inc, 1994:108-119.
10. Lancefield RC. Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types with a special reference to the bactericidal test. J Exp Med 1957;106:525-44
11. Beachey EH, Cunningham M. Type specific inhibition of preopsonization versus immunoprecipitation by streptococcal M proteins. Infect Immun 1973;8:19-24.
12. Allen RC. Evaluation of serum opsonic capacity by quantitating the initial chemiluminescent response from phagocytizing polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 1977;15:828-33.
13. Allen RC. Phagocyte leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. Methods in Enzymology 1986;133:449-93.

14. Briheim G, Stendahl O, Dahlgren C. Intra- and Extracellular Events in Luminol-Dependent Chemiluminescence of Polymorphonuclear Leucocytes. *Infect Immun* 1984;45:1-5.
15. Johnson DR, Kaplan EL. Indirect bactericidal test for measurement of anti-M antibodies In: Johnson DR, Kaplan EL, editors. *Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections* 1st ed. Geneva: World Health Organization, 1996:81-95.
16. Stevens DL, Bryant AE, Huffman J, Thompson K, Allen RC. Analysis of circulating phagocyte activity measured by whole blood luminescence: Correlations with clinical status. *J Infect Dis* 1994;170:1463-72.
17. Stollerman GH, Kantor FS, Gordon BD. Accessory plasma factors involved in the bactericidal test for type-specific antibody to group A streptococci. *J Exp Med* 1958;108:475-91.
18. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989;8:151-6.
19. Whatmore AM, Kehoe MA. Horizontal gene transfer in the evolution of group A streptococcal emm-like genes: gene mosaics and variation in *Vir* regulons. *Mol Microbiol* 1994;11:363-74.

20. Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:953-8
21. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface. flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-2.
22. Todd EW. Method of measuring increase or decrease of population of haemolytic streptococci in blood. *Brit J Exper Path* 1927;8:1-5.
23. Villasenor-S.A , Bryant AE, Stevens DL. Type-specific opsonophagocytosis of group A streptococcus using a rapid chemiluminescence assay. *J Infect Dis* 1999;179:1293-6.
24. Harbaugh MP, Podbielski A, Hugl S, Cleary PP. Nucleotide substitutions and small-scale insertion produce size and antigenic variation in group A streptococcal M1 protein. *Mol Microbiol* 1993;8:981-91.
25. Jones KF, Hollingshead SK, Scott JR, Fischetti VA. Spontaneous M6 protein size mutants of group A streptococci display variation in antigenic and opsonogenic epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8271-5.

26. de Malmanche SA, Martin DR. Protective immunity to the group A streptococcus may be only strain specific. *Medical Microbiol Immunol* 1994;183:299-306.
27. Wessels MR, Moses AE, Goldberg JB, DiCesare TJ. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8317-21.
28. Holm SE, Norrby A, Bergholm AM, Norgren M. Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infections in Sweden, 1988-1989. *J Infect Dis* 1992;166:31-7.
29. Stromberg A, Romanus V, Burman LG. Outbreak of group A streptococcal bacteremia in Sweden: An epidemiologic and clinical study. *J Infect Dis* 1991;164:595-8.
30. Martin DR, Single LA. Molecular epidemiology of group A streptococcus M type 1 infections. *J Infect Dis* 1993;167:1112-7.

## Tercera Parte

### **Opsonización de Estreptococo del Grupo A del Serotipo MIT1: Dinámica de la Producción de Anticuerpos y Especificidad por Cepa.**

B. K. G. Eriksson\*†, A. Villaseñor-Sierra‡§, M. Norgren†, y D. L. Stevens§

\* *Division de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Inmunología, Microbiología, Patología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Huddinge, Huddinge, Suecia.*

† *Departamento de Bacteriología Clínica, Universidad de Umeå, Umeå, Suecia.*

‡ *Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Mexico*

§ *Hospital de Veteranos, Centro Médico, Boise, Idaho, Universidad de Washington, Seattle Washington, E.U.*

Este trabajo fue sometido a *Clinical Infectious Diseases* en diciembre de 1999.

## Resumen

La actividad opsonica del suero de pacientes de Suecia con erisipela, bacteremia o amigdalitis por E $\beta$ HGA del serotipo T1M1 en contra de su aislamiento homólogo fue evaluada mediante el uso de un método que emplea la quimioluminiscencia (QL). La actividad opsonica del suero de fase aguda fue en general baja y sin diferencias por entidad clínica. Aunque se identificó una mayor actividad opsonica en el suero de fase convaleciente durante las siguientes 2 a 6 semanas del inicio de la infección, se requirió de varias semanas para que se desarrollara un nivel alto de actividad opsonica. Se demostró una mayor actividad opsonica en el suero de fase convaleciente de personas con erisipela que en aquellos con amigdalitis. No está claro si la mayor actividad opsonica fue debido a que el intervalo de tiempo entre la toma del suero en fase aguda y convaleciente fue mayor o a que la dinámica en el desarrollo de anticuerpos opsonicos es diferente en esas dos infecciones. La actividad opsonica promedio del suero de 20 donadores sanguíneos "normales" de Suecia en contra de una cepa estandar del serotipo M-1 (96/004) fue mayor que la encontrada en el suero de enfermos en fase aguda, pero solo un 15% mostró una actividad opsonica elevada. Esto podría reflejar un bajo status de inmunidad en contra del serotipo M-1 en adultos jóvenes. La susceptibilidad a la opsonización por un suero humano inmune anti-M-1 en 62 cepas del serotipo T1M1 aisladas en Suecia en el periodo entre 1980 y 1998 fue muy heterogenea indicando que una inmunidad opsonica elevada podría estar limitada a la cepa infectante o a clonas idénticas. Las cepas de EGA del serotipo T1M1 aisladas en Suecia durante el primer brote de la segunda mitad de los 1980s fueron más susceptibles a la opsonización por este suero. Esto podría indicar un cambio temporal de los antígenos de su superficie capaz de afectar la susceptibilidad a la opsonización. Son necesarios estudios a nivel molecular que definan dichas variaciones y su importancia clínica y epidemiológica.

## Introducción

Las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones invasivas por estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo A (E $\beta$ HGA) han cambiado desde mediados de 1980s [1]. Se ha hecho evidente un incremento en los episodios severos originados de una infección de piel o tejidos blandos y con frecuencia terminan en choque y falla orgánica múltiple [2], clasificándose como Síndrome de Choque Tóxico Estreptocócico (SCHTE) [3].

Se ha aislado cepas de los serotipos M-1 y M-3 que portan un gen transmitido por un fago, que codifica para la expresión de la exotoxina pirogénica A (*SpeA*) de un gran número de pacientes con manifestaciones severas [4]. Esta toxina es un potente superantígeno [5] implicado como un factor muy importante en la patogénesis del SCHTE [2]. Algunos otros superantígenos son producidos por algunos aislamientos de E $\beta$ HGA de pacientes con infecciones invasivas, pero su asociación con el SCHTE permanece incierta [6]. Durante 1988/89 y 1993/94 han sido descritos en Suecia dos picos de infecciones invasivas por E $\beta$ HGA del serotipo M-1, portadores del gen *SpeA* [7-9]. Además, otras infecciones no invasivas fueron también causadas durante los mismos periodos de tiempo, principalmente por cepas del serotipo M-1 o clonas muy relacionadas [9, 10]. En el periodo entre esos picos, la incidencia de infecciones por cepas del serotipo M-1 declinaron.

Las razones de esos ciclos epidémicos de infecciones por cepas M-1 en la población no son claras. La inmunidad protectora en contra de una infección por E $\beta$ HGA se cree que es debida al desarrollo de anticuerpos opsónicos dirigidos en contra de la porción hipervariable N-terminal de la proteína M, misma que es reconocida como el principal factor de virulencia [11]. Los cambios



en la inmunidad adquirida en contra de los epítopes de las cepas M-1 es de la mayor importancia para la epidemiología de esas infecciones. Los cambios en los aminoácidos de los epítopes de la proteína M-1 de clonas recientemente diseminadas pueden hacer que la inmunidad previamente adquirida sea ineficiente. Por otra parte, la pérdida de la inmunidad adquirida o un incremento en la población no inmune, en especial los niños [12], podrían influenciar el patrón epidémico. Después de los primeros estudios realizados por Lancefield [13], la capacidad opsonica del suero en contra de aislamientos de E $\beta$ HGA ha sido analizada en su mayoría en estudios experimentales [14]. Hasta donde sabemos, solo unos cuantos estudios basados en pacientes han sido realizados [15-17]. La forma clásica de estudiar opsonización incluye las pruebas bactericida directa o indirecta, mismas que son largas y laboriosas. Sin embargo, se han desarrollado nuevas técnicas para la medición de opsonización de E $\beta$ HGA tales como la citometría de flujo [18] y la quimioluminiscencia [19], permitiendo la posibilidad de realizar estudios de gran cantidad de sueros.

El propósito del presente trabajo fue el de estudiar la capacidad opsonica del suero de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de infecciones por E $\beta$ HGA del serotipo T1M1 en contra de su aislamiento homólogo, así como del suero de donadores sanguíneos sanos en contra de una cepa estándar M-1. También estudiamos la posibilidad de un posible cambio antigénico de superficie mediante el estudio de la susceptibilidad a la opsonización de 62 cepas M-1 aisladas en Suecia durante el periodo de 1980-1998, después de su incubación con un mismo suero humano inmune anti-M-1.

## Materiales y Métodos

*Aislamientos de EβHGA* Sesenta y dos cepas del serotipo T1M1 fueron empleadas. Todas fueron aisladas en Suecia de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de infección por SβHGA en el periodo comprendido entre 1980 y 1998. Diez aislamientos fueron obtenidos de la superficie cutánea de pacientes con erisipela durante un estudio realizado en el periodo de 1988-90 [20] y 27 aislamientos fueron obtenidos de hemocultivos de pacientes con enfermedad invasiva en el periodo de 1983 a 1995, atendidos en el hospital de Huddinge [21]. Ocho aislamientos de cepas T1M1 y una T12 fueron obtenidos en 1989 de pacientes con amigdalitis no complicada [21] y 3 fueron aislados de hemocultivos de pacientes con infección invasiva severa durante 1988 a 1989, todos procedentes del hospital de la Universidad de Umeå [22]. Otros siete aislamientos de hemocultivos de pacientes de diversas áreas de Suecia en el periodo entre 1980 y 1986 fueron amablemente proporcionados por la Dra. Birgitta Henriques del Instituto para el Control de Enfermedades Infecciosas de Suecia. Finalmente, fueron usados siete aislamientos de pacientes con infecciones de la garganta en el periodo 1996-98 procedentes de Umeå .

*Sueros* Sueros obtenidos durante la fase aguda y convaleciente de pacientes con infecciones estreptocócicas referidas anteriormente, fueron usados simultáneamente para opsonizar su aislamiento homólogo. Todos los sueros de fase aguda fueron obtenidos durante los primeros 4 días de admisión o en el caso de amigdalitis, en el día en que acudieron a la consulta externa. El suero de fase convaleciente fue obtenido en un rango de 6 a 74 días (mediana = 19) después de haber obtenido el suero de fase aguda.

Se dispusieron de 8 sueros de fase aguda y 8 de fase convaleciente de 10 pacientes con erisipela; seis pares de suero de fase aguda y convaleciente así como 2 sueros de fase aguda sin su correspondiente convaleciente y dos sueros de fase convaleciente sin su correspondiente suero de fase aguda. También se dispuso de suero de fase aguda de quince pacientes con enfermedad invasiva y aislamiento de SβHGA de hemocultivos. Asimismo se estudió el suero de un paciente cuyo aislamiento homólogo no fue encontrado, midiendo su capacidad opsonica en contra de una cepa T1M1 aislada durante el mismo año y sitio (Umeå). En dos de los quince pacientes se obtuvo suero de fase convaleciente. Nueve sueros pareados de fase aguda y convaleciente estuvieron disponibles de los pacientes con amigdalitis. En uno de ellos, el aislamiento fue tipo T12 y los ocho restantes fue T1M1.

Las muestras de suero procedentes de pacientes con erisipela correspondieron a 4 hombres y 6 mujeres con una edad promedio de 48 años (rango 26-89); los procedentes de pacientes con bacteremia correspondieron a 12 hombres y 3 mujeres con una edad promedio de 47 años (rango 11-86); y los procedentes de pacientes con amigdalitis correspondieron a 3 hombres y 6 mujeres con una edad promedio de 21 años (rango 8-31).

El suero de 20 donadores "sanos" obtenidos durante 1994, fue usado para evaluar su capacidad para opsonizar una cepa T1M1 estandar (96/004) del laboratorio del Dr. Dennis L. Stevens. Estos sueros correspondieron a 10 hombres con una edad promedio de 34 años (rango 23-41) y 10 mujeres con una edad promedio de 31 años (rango 21-39). Finalmente, un único suero inmune anti-M-1 con una actividad bactericida conocida y significativa en contra de su cepa homóloga, fue usada para opsonizar a 62 cepas de EβHGA del serotipo T1M1.

Todas las muestras de suero fueron mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Todas fueron sujetas a inactivación por calor colocandolas en baño maría a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Se agregó complemento de cobayo (Sigma, St. Louis, MO) en exceso ( $20\ \mu\text{l}$  por muestra), para asegurar una cantidad estandar de complemento en cada muestra de suero.

*Prueba de quimoluminiscencia.* Las cepas fueron crecidas en caldo Todd-Hewitt con 1% de neopeptona (THBN, Difco, Detroit, MI) durante 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en 5% de  $\text{CO}_2$ . Diez por ciento del cultivo en fase estacionaria fue usado para inocular medio THBN precalentado e incubandolo nuevamente por 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en 5% de  $\text{CO}_2$  con agitación para obtener un cultivo en fase logarítmica. Cada suspensión bacteriana fue centrifugada a 2,500 RPM x 10 minutos. El botón bacteriano fue lavado en dos ocasiones con solución de PBS helada y resuspendida en 5 ml de PBS. Cada suspensión fue entonces calentada a  $56^{\circ}\text{C}$  por 1 hora para matar las bacterias.

Para la preparación de los fagocitos, se extrajo sangre total de un donador "normal" utilizando tubos al vacío conteniendo EDTA como anticoagulante y se mantuvieron en agitación suave a temperatura ambiente y usados dentro de los siguientes 5 a 20 minutos de su extracción. Para la estandarización de los resultados entre corrimientos, se relizó una biometría hemática con diferencial. El mismo donador fue usado en todos los experimentos y los resultados expresados en cuentas por minuto por fagocito (cpm/fagocito).

La opsonización fue realizada de acuerdo a la metodología descrita previamente [19]. Brevemente,  $100\ \mu\text{l}$  de una suspensión bacteriana estandarizada y muertas por calor ( $A_{650\text{nm}} = 0.5$ ) se mezcló con  $50\ \mu\text{l}$  de suero (diluído 1:2 en solución salina al 0.9%) e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$

por 30 minutos. Después de la incubación, las muestras fueron lavadas con PBS, centrifugadas y el sobrenadante fue descartado. El botón bacteriano fue resuspendido en 100  $\mu$ l de PBS y se adicionaron 600  $\mu$ l de luminol (Sigma, St.Louis, MO). Las muestras por duplicado fueron colocadas en el luminómetro y dejadas durante 10 minutos para equilibrar la temperatura. Luego, se adicionaron 100  $\mu$ l de sangre total previamente diluída 1:100 en medio diluyente de sangre mediante inyección automática en cada tubo [19]. El sistema se mantuvo a 37°C y se realizaron mediciones cada 30 segundos durante un periodo de 20 minutos.

Fueron usados los siguientes controles; 1) suero normal incubado con una cepa T1M1 como control negativo; 2) suero inmune anti-T1M1 con una actividad bactericida alta en la prueba bactericida indirecta [20] incubado con la cepa estandar (96/004) M-1 como control positivo; y 3) zymozan opsonizado con complemento (50  $\mu$ l) como control de la competencia fagocítica de los leucocitos. Un fotón estandar fue usado para estandarizar las pruebas entre corrimientos. La opsonización resultante de cada suero específico fue expresada como el valor acumulado integral en cpm/fagocito en corrimientos por duplicado.

*Análisis estadístico.* Las diferencias en la actividad opsónica entre los pares de sueros obtenidos en la fase aguda y convaleciente en cada categoría de pacientes fue analizada con la prueba t-pareada y la prueba de rangos de Wilcoxon. Las variables categóricas fueron analizadas mediante la prueba exacta de Fischer.

*Aspectos éticos.* El estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Karolinska en el Hospital de Huddinge, la Universidad de Umeå en Suecia y la Oficina de sujetos humanos de la Universidad de Washington, en Seattle Washington.

## Resultados

*Actividad opsónica del suero de fase aguda y convaleciente de pacientes con infecciones por EβHGA del serotipo TIM1.* Con fines de análisis de la actividad opsónica de todos los sueros evaluados, se tomó como referencia el intervalo de confianza 95% (IC 95%) de los valores en cpm/fagocito obtenidos de todas las muestras de suero de fase aguda. Los límites inferior y superior de este IC 95% fue de 137 y 277 cpm/fagocito respectivamente (**Figura 14**). El control negativo usado en cada uno de los corrimientos mostró valores en un rango por debajo de este IC 95% (76-104), y el control positivo con un rango por arriba del mismo (321-632). La actividad opsónica promedio del suero de fase aguda de pacientes con bacteremia, erisipela y amigdalitis fue de 207 cpm/fagocito. Como era de esperarse, la actividad opsónica fue en general baja en el suero de fase aguda de pacientes con bacteremia, pero también lo fue en el caso de pacientes con erisipelas y amigdalitis. Generalmente solo uno o dos sueros de fase aguda de cada grupo de pacientes tuvo valores por arriba del IC 95% o a un nivel casi igual del control positivo (**Figura 14**).

La actividad opsónica promedio (en cpm/fagocito) del suero de fase aguda de pacientes con erisipela fue de 297 (rango 102-827) mientras que el de fase convaleciente fue de 417 (rango 190-640) (**Figura 14**). La actividad opsónica de las muestras de suero de fase aguda estuvo por debajo o muy cercana al límite inferior del IC 95% en 4/8, y dentro del IC 95% en 1/8. Tres sueros mostraron una actividad opsónica por encima del límite superior del IC 95% y uno de ellos con un alta actividad opsónica (827). El suero de fase convaleciente de este último paciente con alta actividad opsónica y obtenido a los 47 días mostró una actividad inferior (640 cpm/fagocito). Cinco de los seis sueros pareados (83%) mostró un incremento de su actividad opsónica en contra

de su cepa homóloga durante la fase convaleciente y siete de los ocho sueros de fase convaleciente mostró actividad opsónica por arriba del límite superior del IC 95% (Figura 14). El incremento vario entre 61 y 306 cpm/fagocito (prueba de t-pareada  $P= .12.$ , P. de Wilcoxon  $P= .16$ ) Solo un suero convaleciente mostró una actividad opsónica por debajo del límite superior del IC 95% (Figura 14).

La actividad opsónica de los 15 sueros de fase aguda de pacientes con bacteremia fue en general baja. El valor promedio fue de 190 cpm/fagocito (rango 61-732). Nueve sueros (50%) tuvieron cifras por debajo o cercanas al límite inferior del IC 95% y cuatro las tuvieron dentro de los límites del IC 95% (Figura 14). Llama la atención que dos sueros mostraron una actividad opsónica alta (732 y 495 cpm/fagocito) y por encima del límite superior del IC 95%. El primer paciente fue un varón de 67 años de edad con una enfermedad cardiovascular quien desarrolló celulitis de una mano y posterior osteitis de un dedo. El fue admitido después de dos días de estar enfermo y tanto el hemocultivo como la muestra de suero fueron tomados ese mismo día. El otro paciente fue un varón de 39 años de edad previamente sano quien fue admitido con una historia de una semana de evolución con fiebre poco elevada e inflamación de los ganglios de la nuca. Un día antes de ser admitido desarrolló fiebre alta y celulitis de la nuca y dificultad respiratoria. Fue observado durante la noche en la terapia intensiva por sospecha de epiglotitis la cual no fue confirmada. En estos pacientes, la enfermedad empezó al menos una semana previa a su ingreso y estudio, pudiendo contribuir al alto nivel de actividad opsónica demostrada a su ingreso y desarrollada posiblemente durante esa semana. Entre los pacientes con bacteremia, solo hubo dos sueros de fase convaleciente disponibles para estudio y tomados 6 y 26 días después del suero de



fase aguda: la actividad opsónica de estos sueros mostró un incremento moderado de 64 y 91 cpm/fagocito respectivamente (**Figura 14**).

Nueve sueros pareados fueron estudiados de pacientes con amigdalitis. La actividad opsónica promedio en los sueros de fase aguda fue de 155 cpm/fagocito (rango 54-529). Cinco sueros tuvieron una actividad opsónica por debajo y tres apenas por arriba del límite inferior del IC 95%. Solo un suero mostró una actividad opsónica alta (529). La actividad opsónica promedio de los sueros de fase convaleciente fue de 177 cpm/fagocito (rango 60-615, **Figura 14**). Siete de los nueve sueros de fase convaleciente mostraron ninguno o mínimo incremento en la actividad opsónica, mientras en dos fue evidente un incremento substancial (prueba de t-pareada  $P = .08$ , P. de Wilcoxon  $P = .04$ ).

El suero de fase convaleciente de pacientes con amigdalitis en general fue obtenido alrededor de dos semanas después del de fase aguda (promedio = 16 días), mientras que el tiempo promedio de obtención del suero en pacientes con erisipela fue de más de 4 semanas (promedio = 40 días). El suero de fase convaleciente de pacientes con erisipela en general mostró un nivel superior de actividad opsónica que en aquellos con amigdalitis. Debido a esto, decidimos analizar el incremento en la actividad opsónica en relación al intervalo de tiempo transcurrido entre la toma del suero en fase aguda y convaleciente de todos los sueros pareados (**Figura 15**). La actividad opsónica se incrementó significativamente en relación al tiempo (**Figura 15**). Un suero pareado con un comportamiento aberrante con una actividad opsónica alta en el suero de fase aguda (827) y considerablemente más baja actividad opsónica en el suero de fase convaleciente fue excluido de la gráfica, así como un suero obtenido 74 días después del suero agudo. Sin embargo,

el análisis de esos sueros podrían indicar que la actividad opsónica disminuye rápidamente en el transcurso de meses en algunos pacientes.

*Actividad opsónica de muestras de suero de pacientes donadores sanguíneos "normales" en contra de una cepa estandar (96/004) M-1.* La actividad opsónica de los 20 donadores en contra de una cepa estandar M-1 varió en un rango de 72 a 781 cpm/fagocito (promedio = 258, **Figura 14**). Ocho donadores (40%) tuvieron una actividad opsónica por debajo y seis dentro del IC 95% (**Figura 14**). Seis sueros mostraron valores por arriba del límite superior del IC 95% y tres se encontraron dentro del rango del más alto valor del control positivo. No hubo una diferencia significativa en el valor promedio de donadores normales y el del suero de fase aguda de pacientes con erisipela, bacteremia o amigdalitis.

*Capacidad de un suero inmune anti-M-1 para opsonizar 62 cepas del serotipo TIM1 aisladas en Suecia durante el periodo de 1980-1998.* Un suero humano inmune anti-M-1 obtenido en 1998 de un donador de los E.U. con antecedentes de una infección por una cepa M-1 en 1996 y con actividad bactericida significativa en contra de su aislamiento homólogo fue usado para opsonizar 62 cepas TIM1. La actividad opsónica de este suero fue heterogenea y en un rango que varió entre 178 y 930 (promedio 466 cpm/fagocito, **Figura 16**). La habilidad de este suero para opsonizar las 62 cepas fue en general mucho mejor que la observada en el suero de fase aguda y en muchos de los sueros de fase convaleciente de pacientes con erisipela, bacteremia y amigdalitis. No hubo diferencia en la opsonización de aislamientos de diferentes areas geográficas, sitio de aislamiento (sangre, tracto respiratorio etc.), o tipo clínico de infección. Sin embargo, las cepas parecieran pertenecer a dos grupos (**Figura 16**). Un grupo de aislamientos

pobrememente opsonizados y otro grupo de cepas mejor opsonizadas con una diferencia de hasta 500 cpm/fagocito (Figura 16). En base a esta observación, los aislamientos fueron arbitrariamente divididos en dos grupos designados como de "alta" y "baja" susceptibilidad a la opsonización (Figura 17). Es interesante notar que un numero significativamente mayor de cepas recuperadas durante 1987 a 1990 mostraron una mayor susceptibilidad a la opsonización comparadas con las del periodo posterior ( $P = .05$ , al comparar aislamientos del periodo de 1980-86 con los del periodo 1987-90, y  $P = .02$ , al comparar los del periodo de 1991-98 con los del periodo 1987-90, Prueba exacta de Fischer).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## Discusión

Las proteínas M de *Streptococcus pyogenes* son consideradas como el principal factor de virulencia dada la habilidad que le confieren para resistir la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, y medida como su habilidad para sobrevivir y crecer en sangre total en ausencia de anticuerpos opsonicos homólogos [11]. Esta resistencia puede ser anulada por la presencia en el suero de anticuerpos opsonicos dirigidos contra la región N-terminal hipervariable serotipo-específica de la proteína [14]. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que también las proteínas "M-like" codificadas por otros genes del cluster *mga*-gene diferentes a los que codifican para la proteína M poseen propiedades antifagocíticas [24,25]. Además, la cápsula de ácido hialurónico ha mostrado tener propiedades antifagocíticas [26] y los anticuerpos dirigidos en contra del carbohidrato de la pared podrían ser también antifagocíticos [27]. Una nueva proteína antifagocítica ha sido recientemente descubierta y que en ausencia de proteína M confiere a la bacteria resistencia a la fagocitosis [28]. Por tanto, los factores involucrados en la resistencia de E $\beta$ HGA a la opsonización parecen ser compleja y dependiente de otros factores además de la proteína M.

Los métodos clásicos para la medición de fagocitosis opsonica usando las pruebas bactericida directa e indirecta involucran todos los factores antifagocíticos debido al uso de bacterias intactas en presencia de fagocitos. Sin embargo son procedimientos largos, laboriosos y poco útiles para estudios clínicos y epidemiológicos. El metodo empleado en el presente estudio mediante el uso de quimioluminiscencia además de ser poco laborioso y rápido, ha mostrado una buena correlación con la prueba bactericida indirecta [19].

Durante mucho tiempo se ha considerado que los anticuerpos opsónicos actúan protegiendo al huésped en contra de una nueva infección [2]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan esta noción dado que en la mayoría de los sueros de fase aguda de pacientes con una infección clínica se encontró una actividad opsónica baja en contra de su cepa homóloga. Sin embargo, no se encontraron diferencias importantes en la actividad opsónica de pacientes con bacteremia al compararla con la de pacientes con erisipela o amigdalitis sin bacteremia. Esto podrían indicar que existen factores adicionales que contribuyen para el desarrollo de enfermedad invasiva severa [2,7]. En todos los grupos de pacientes, unos pocos sueros mostraron una actividad opsónica alta. Esto es de alguna manera desconcertante y en especial en aquellos con bacteremia. Uno de los dos pacientes con bacteremia y actividad opsónica alta estuvo enfermo durante una semana previa a su admisión, lo cual pudo haber sido suficiente para la inducción de anticuerpos opsónicos. Sin embargo, este paciente estaba bacterémico al momento de la admisión. Para el otro paciente, no podemos identificar una posible explicación.

Aunque se analizaron unos cuantos sueros de fase convaleciente, se observó un incremento gradual en la actividad opsónica durante las siguientes semanas después de una infección por E $\beta$ HGA. Esto es consistente con los primeros estudios hechos por la Dra. Lancefield [13]. Dichos estudios indicaron que la inmunidad opsónica en contra del serotipo M infectante era en general duradera y posiblemente confiriendo protección en contra de una re-infección por una cepa del mismo serotipo M [13]. Solo dos de las muestras de suero estudiadas fueron obtenidas después de varias semanas del inicio de la infección y ambos mostraron títulos inferiores a los obtenidos en el suero de fase aguda. Ha sido descrito que el tratamiento con antibióticos podría reducir el desarrollo de anticuerpos opsónicos después de una infección por E $\beta$ HGA [11, 15, 16].

En este estudio, no nos es posible saber si el tratamiento con antimicrobianos fue un factor determinante para el desarrollo o persistencia de los anticuerpos opsonicos. El incremento en la actividad opsonica fue menor en los pacientes con amigdalitis que en aquellos con erisipela. Esto podria estar relacionado con diferencias en la fisiopatologia y en la clinica de estas entidades, o quizá solo se relaciona con la diferencia en el tiempo en el que fueron tomados los sueros de fase convaleciente, mismo que fue casi el doble en los pacientes con erisipela.

La capacidad de un único suero inmune anti-M-1 para opsonizar 62 cepas de E $\beta$ HGA del serotipo TIM1 de Suecia mostró ser heterogenea. Un estudio reciente (descrito en la segunda sección) en el que se emplearon una gran cantidad de aislamientos de Estados Unidos de Norte América mostró una heterogeneidad en la opsonización similar a la encontrada en el presente estudio. Por lo anterior, la inmunidad opsonica desarrollada despues de una infección por una cepa M-1 podria estar limitada a la cepa infectante o a clonas muy relacionadas. Un estudio previo mostró resultados similares [29] Muchos de esos aislamientos fueron analizados con electroforesis de pulso y para la presencia del gen *speA* y mostraron ser idénticos [8]. Por lo anterior, el mecanismo subyacente que determina dicha variación en la susceptibilidad a la opsonización requiere de un mayor estudio.

En el presente estudio, las cepas de E $\beta$ HGA aisladas durante el periodo de 1987 a 1990 fueron en general mejor opsonizadas por ese único suero inmune anti-M-1 que las cepas aisladas antes a 1987 o después de 1990. Ha sido demostrado que las mutaciones puntuales e inserciones de pequeña escala en el gen *emml* resulta en variantes de la proteína M-1 con cambios en los epitopes en donde se adhieren los anticuerpos opsonico [31]. Esto podria generar cepas del

serotipo T1M1 con una susceptibilidad diferente a la fagocitosis opsonica por un suero inmune especifico. Aunque la susceptibilidad a la opsonización fue significativamente superior en muchos de los aislamientos recuperados en el periodo 1987-90, otros aislamientos durante ese mismo periodo mostraron una baja susceptibilidad a la opsonización. Por ello, es posible que haya ocurrido un cambio en las características de la superficie que haya afectado la susceptibilidad de algunas cepas T1M1 a mediados de los 1980s. Ese viraje o cambio en la composición de antígenos de superficie podrían explicar el alta prevalencia de las infecciones por EβHGA del serotipo T1M1 en Suecia durante la última década. Es necesario seguir su estudio con un abordaje molecular.

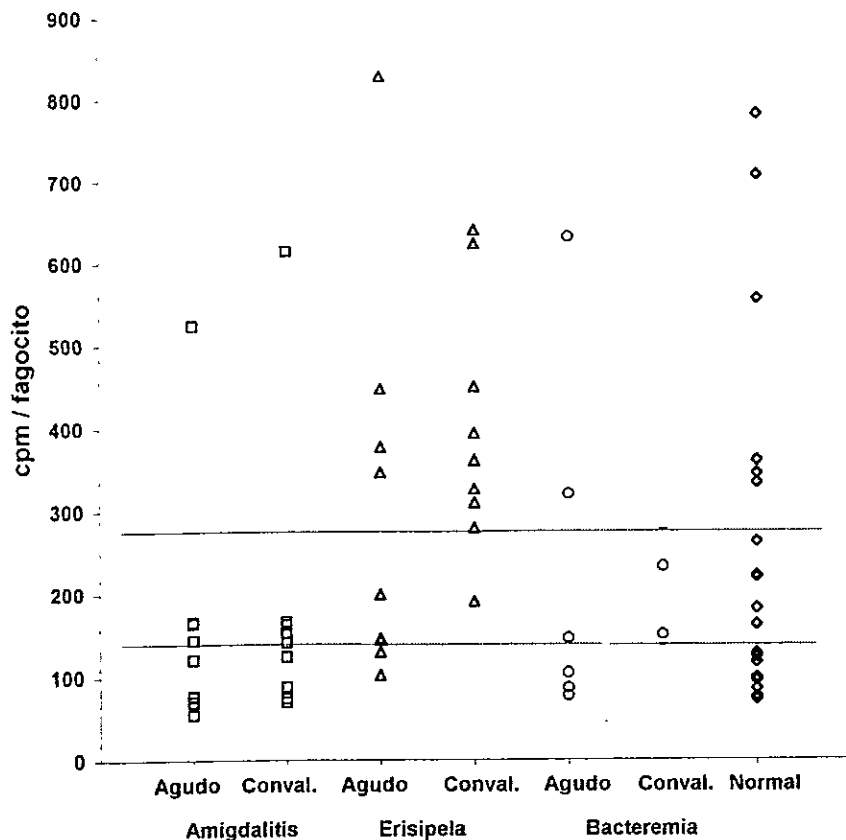
Para concluir, la actividad opsonica del suero de fase aguda de pacientes con erisipela, bacteremia y amigdalitis fue baja en contra de su aislamiento homólogo. El suero de fase convaleciente mostró una actividad opsonica superior a la del suero de fase aguda, pero al parecer se requieren varias semanas para el desarrollo de la inmunidad opsonica. La actividad opsonica del suero de fase convaleciente de pacientes con erisipela fue mayor que la de aquellos con amigdalitis. No está claro si esto se debe a una diferencia real en la dinámica de la producción de anticuerpos opsonicos o si solo es secundaria al mayor intervalo de tiempo entre la toma del suero de fase aguda y convaleciente de pacientes con erisipela. Una pérdida parcial de la inmunidad opsonica podría ocurrir durante las semanas subsiguientes a la infección en algunos casos. El suero de donadores sanguineos “normales” mostraron una actividad opsonica relativamente alta, pero aproximadamente solo un 15% presentó niveles altos de actividad opsonica, reflejando que la población joven podría tener un nivel bajo de inmunidad opsonica. La capacidad de un suero único inmune anti-M-1 para opsonizar 62 aislamientos de EβHGA durante el periodo de 1980 a

1998 mostró una variabilidad considerable y una actividad inmune opsonica alta podría estar limitada a la cepa infectante o clones idénticas. Las cepas de E $\beta$ HGA aisladas durante la segunda mitad de los 1980s fueron más susceptibles a opsonización por este suero inmune por lo que se requieren estudios que permitan definir las bases moleculares de esa variación en la susceptibilidad a la opsonización así como su importancia clínica y epidemiológica.



Figura 14.

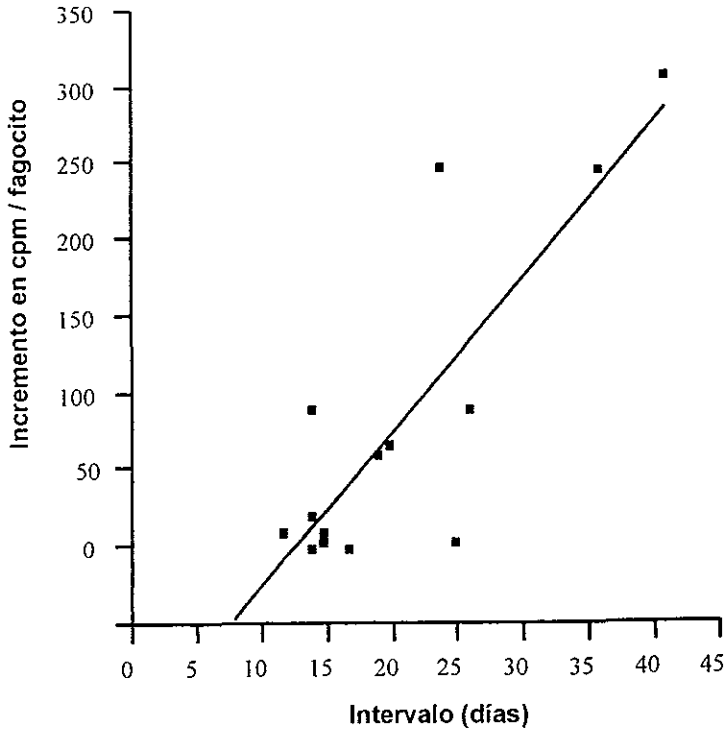
**Actividad opsónica del suero de fase aguda y convaleciente de pacientes de Suecia con diversas infecciones por EBHGA**



En esta gráfica se muestra la actividad opsónica en cpm/fagocito de sueros en fase aguda y convaleciente en contra de su aislamiento homólogo de pacientes con diversas infecciones por EBHGA. Las líneas punteadas muestran los límites superior e inferior de la actividad opsónica de todos los sueros de fase aguda.

Figura 15.

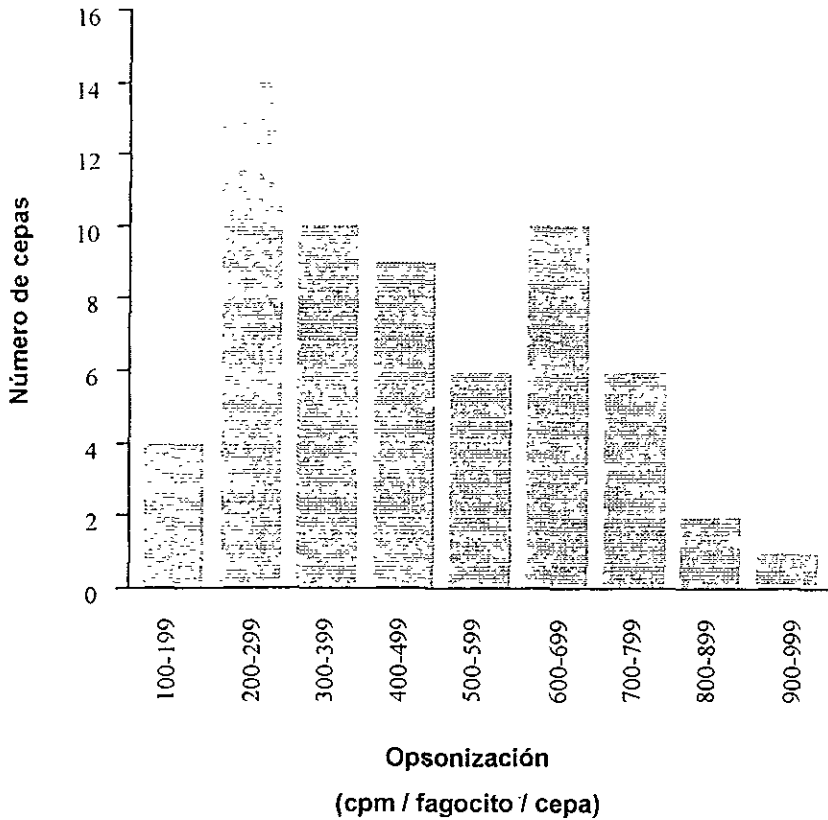
**Relación entre el incremento en la actividad opsónica del suero y el intervalo de tiempo transcurrido desde la toma del suero en fase aguda y convaleciente**



Esta gráfica muestra la relación directa entre el incremento en la actividad opsónica del suero y el incremento en el intervalo de tiempo entre la toma del suero en fase aguda y convaleciente.

Figura 16.

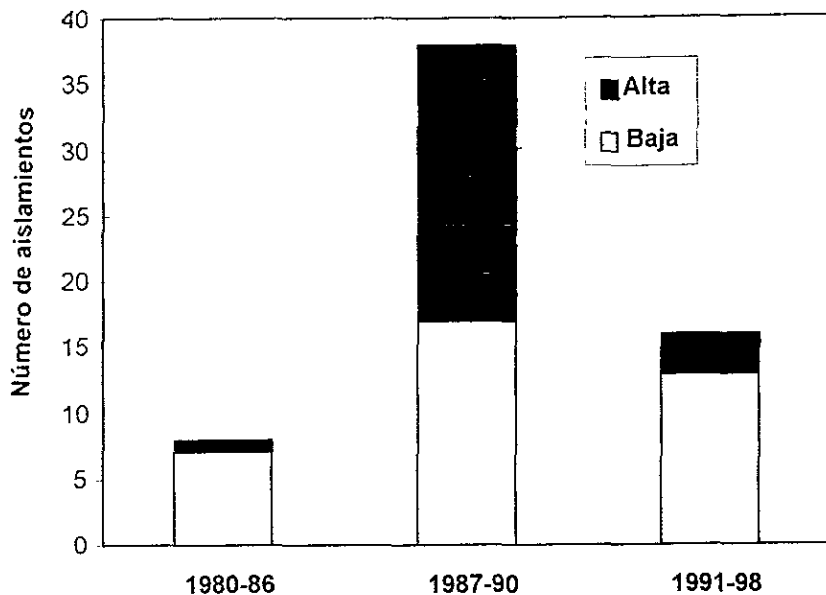
**Distribución de la actividad opsonica de un suero inmune anti-M-1 en contra de 62 cepas T1M1 aisladas en Suecia durante el periodo de 1980-1998**



La actividad de un suero inmune anti-M-1 para opsonizar 62 cepas homólogas fue heterogénea. Las barras muestran el número de cepas correspondientes a cada rango en cpm/fagocito.

Figura 17.

**Susceptibilidad a la opsonización por un suero inmune anti-M-1 de 62 cepas de E $\beta$ HGA aisladas en Suecia durante diferentes periodos de tiempo**



**Periodos de aislamiento de las cepas M-1**

Las barras representan 3 diferentes periodos de tiempo y dos grados de opsonización, alta (■) y baja (□). Durante el periodo de 1987-1990, el número de aislamientos con un alta susceptibilidad a la opsonización fue significativamente superior que los periodos previo y posterior. Esto podría estar relacionado con cambios en los determinantes antigénicos de la superficie de E $\beta$ HGA.

## Referencias

- 1 Kaplan EL. Recent epidemiology of group A streptococcal infections in North America and abroad: an overview. *Pediatrics* 1996; 97: 945-8.
2. Stevens DL. *Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis and new concepts of treatment.* *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 69-78.
- 3 The Working Group on Severe Streptococcal Infections. Defining the group A Streptococcal Toxic Shock Syndrome. Rationale and consensus definition. *JAMA* 1993; 269: 390-1.
4. Talkington D, Schwartz B, Black CM, Todd JK, Elliott J, Breiman RF, Facklam RR. Association of phenotypic and genotypic characteristics of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates with clinical components of Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *Infect Immun* 1993; 61: 3369-74
5. Norrby-Teglund. A., Norgren M, Holm SE, Andersson U, Andersson J. Similar cytokine induction profiles of a novel streptococcal exotoxin, MF, and pyrogenic exotoxins A and B. *Infect Immun* 1994; 62: 3731-8.
6. Cockerill FR, Thompson RL, Musser JJ, et al. Molecular, serological, and clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1448-58

7. Stromberg A, Romanus V, Burman LG: Outbreak of group A streptococcal bacteremia in Sweden: an epidemiologic and clinical study. *J Infect Dis* 1991; 164(3): 595-8.
8. Eriksson, BKG, Andersson J. E. Holm SE, Norgren M. 1999. Invasive group A streptococcal infections: TIM1 isolates expressing pyrogenic exotoxins A and B in combination with selective lack of toxin-neutralizing antibodies are associated with increased risk for the streptococcal toxic shock syndrome. *J Infect Dis* 1999;180:410-8
9. Österlund A. Epidemiological observations on *Streptococcus pyogenes* serotype T1 in Uppsala county, Sweden 1989-95. *APMIS* 1996; 104: 168-70.
10. Muotiala A, Seppälä H, Huovinen P, Vuopio-Varkila J. Molecular comparison of group A streptococci of TIM1 serotype from invasive and noninvasive infections in Finland. *J Infect Dis* 1997; 175: 392-9.
11. Lancefield RC. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* 1962; 89: 307-13
12. Cockerill III FR, MacDonald KL, Thompson RL, Roberson F, Kohner PC, Besser-Wiek J, Manahan JM, Musser JM, Schlievert PM, Talbot J, Frankfort B, Steckelberg JM, Wilson WR, Osterholm MT, and the Investigation Team. An outbreak of invasive group A streptococcal disease associated with high carriage rates of the invasive clone among school-aged children. *JAMA* 1997; 277: 38-43.

13. Lancefield RC. Persistence of type-specific antibodies in man following infection with group A streptococci. *J Exp Med* 1959; 110: 271-92.
14. Fischetti VA. Streptococcal M protein; molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 285-314.
15. Denny FW, Perry WD, Wannamaker LW. Type-specific streptococcal antibody. *J Clin Invest* 1957; 36: 1092-1100.
16. Guirguis N, Fraser DW, Facklam RR, El Kholly A, Wannamaker LW. Type-specific immunity and pharyngeal colonization of group A Streptococcus. *Am J Epidemiol* 1982; 116: 933-9.
17. Quinn RW, Vander Zwaag R, Lowry PN. Acquisition of group A streptococcal M protein antibodies. *Pediatr Infect Dis* 1985; 4: 374-8.
18. Schnitzler N, Haase G, Büssling A, Kaufhold A, Beyhs P, Podbielski A. Measuring resistance to phagocytosis of group A and G streptococci: comparison of direct bactericidal assay and flow cytometry. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1995; 184: 17-22.
19. Villaseñor-S A, Bryant AE, Stevens DL. Type-specific opsonophagocytosis of group A streptococcus using a rapid chemiluminescence assay. *J Infect Dis* 1999; 179:1293-6.

20. Eriksson B, Jorup-Rönström C, Karkkonen K, Sjöblom AC, Holm SE. Erysipelas: clinical and bacteriological spectrum and serological aspects. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 1091-8.
21. Eriksson BKG, Andersson J, Holm SE, Norgren M. Epidemiological and clinical aspects of invasive group A streptococcal infections and the streptococcal toxic shock syndrome. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1428-1436.
22. Holm SE, Norrby A, Bergholm A-M, Norgren M. Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infections in Sweden, 1988-1989. *J Infect Dis* 1992; 166: 31-7.
23. Lancefield RC. Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types, with special reference to the bactericidal test. *J Exp Med* 1957; 106: 525-44.
24. Podbielski A, Schnitzler N, Beyhs P, Boyle MD. M-related protein (Mrp) contributes to group A streptococcal resistance to phagocytosis by human granulocytes. *Mol Microbiol* 1996; 19: 429-41.
25. Thern A, Wastfeldt M, Lindahl G. Expression of two different antiphagocytic M proteins by *Streptococcus pyogenes* of the OF+ lineage. *J Immunol* 1998; 160(2): 860-9.
26. Dale JB, Washburn RG, Marques MB, Wessels. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun* 1996; 64:1495-501.



27. Salvadori LG, Blake MS, McCarty M, Tai JY, Zabriskie JB. Group A streptococcus-liposome ELISA antibody titers to group A polysaccharide and opsonophagocytic capabilities of the antibodies. *J Infect Dis* 1995; 171: 593-600.
28. Dale JB, Chiang EY, Liu S, Courtney HS, Hasty DL. New protective antigen of group A streptococci. *J Clin Invest* 1999; 103: 1261-8.
29. de Malmanche SA, Martin DR. Protective immunity to the group A *Streptococcus* may be only strain specific. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1994; 183: 299-306.
30. Musser JM, Kapur V, Kanjilal S, Shah U, Musher DM, Barg NL, Johnston KH, Schlievert PM, Henrichsen J, Gerlach D, Rakita RM, Tanna A, Cookson BD, Huang JC. Geographic and temporal distribution and molecular characterization of two highly pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes* expressing allelic variants of pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin). *J Infect Dis* 1993; 167: 337-46.
31. Harbaugh MP, Podbielski A, Hügl S, Cleary PP. Nucleotide substitutions and small-scale insertion produce size and antigenic variation in group A streptococcal M1 protein. *Mol Microbiol* 1993; 8: 981-91.